

## Projektets titel och projektnummer

Optimering av penicillinbehandlingar till häst för att minska resistensutveckling/ Optimization of penicillin treatments in horses to minimize the risk of resistance development, projektnummer H-13-47-153.

**Rapportens författare:** Lena Olsén

## Bakgrund

Antimikrobiella läkemedel är bland de mest betydelsefulla inom veterinärmedicinen. Hästar är generellt känsliga för gastrointestinala störningar vid behandling med antimikrobiella medel vilket kraftigt begränsar utbudet till ett fåtal substansgrupper. Det är därför av största vikt att de idag tillgängliga antimikrobiella läkemedlen används optimalt för ett bra behandlingsresultat, minskade biverkningar och motverkad resistensutveckling.

I Sverige är bensylpenicillin (pc) förstahandsval för behandling av infektioner hos häst då det har god effekt mot de viktigaste patogena bakterierna på häst, såsom grampositiva kocker, (*Streptococcus Equi*, *S. Zooepidemicus* och *S. Equisimilis*) stavar och anaerobes utan förvärvad resistens (SVS 2013; SWEDRES-SVARM, 2015). Ingen resistens har beskrivits mot betahemolyserande streptokocker.

Pc ger endast begränsad påverkan på den gramnegativa delen i tarmfloran, vars yttre membran skyddar bakterien från substansen. Detta är mycket fördelaktigt ur resistenssynpunkt, då det i synnerhet är påverkan på normalfloran som selekterar för resistens.

Risken för "penicillinchock" (rättare prokaintoxicitet) vid pc-behandling kan troligtvis bidra till onödigt hög användning av kombinationen sulfonamid och trimetoprim. Orsaken till "chocken" anses inte vara pc, utan istället framförallt prokainet i den ena tillgängliga beredningsformen, pc-prok (Olsén et al 2007). Prokain är ett lokalanestetikum, som kan ge toxiska reaktioner vid systemisk effekt. Lindriga symtom är att hästen stelnar till, vinglar, backar, ökad andningsfrekvens och muskeltremor. Allvarliga reaktioner är stegring och flyktförsök, kramper och nystagmus. Ett antal hästar går omkull och blir liggande. Dödsfall förekommer (Olsén et al 2007).

Användning av bensylpenicillin utan prokain utesluter risken för prokaintoxicitet. Till häst finns idag en beredning av pc utan prokain: bensylpenicillinnatrium (pc-Na) som är godkänt för intravenös (IV) giva. Då endast utbildad personal får administrera läkemedel IV begränsas användningen. Vi har tidigare undersökt möjligheten att ge pc-Na intramuskulärt (IM) till häst (Olsén et al. 2013). Pc-Na givet 2 ggr/dag IM gav både tillfredställande terapeutisk koncentration och längre halveringstid än IV administrering. Tyvärr uppvisade hästarna mer beteenden som tydde på obehag och smärta jämfört med pc-prok, och vi bedömde smärtnivån som oacceptabel med hänsyn till djurvälståndet.

En framkomlig väg kan vara att lösa penicillinet i lidokain (2-(dietylamino)-N-(2,6-dimetylfenyl)acetamid) istället för i sterilt vatten. Lidokain ges ofta till häst som lokalbedövning och smärtlindring och har väldokumenterad säkerhet (Doherty & Seddighi, 2010). I den aktuella studien är lidokaindoserna betydligt lägre än de som används vid infusion för analgesi till häst. Lidokain förefaller ha en antiinflammatorisk verkan, en ytterligare fördel vid detta användningsområde (Caracas et al., 2009).

Infektion i synoviala strukturer och leder hos häst kan bli förödande för hästens funktion och i vissa fall dess liv när brosket och intraartikulära strukturer bryts ned. För att få ett effektivt och lyckat behandlingsresultat är det väsentligt att koncentrationen av pc-Na i leden kommer att vara tillräckligt högt under tillräckligt lång tid. Kunskap om farmakokinetiken (PK) av pc-Na i synovia efter IV tillförsel saknas vilket gör att det finns möjligheter att optimera terapin både för att få ett bättre behandlingsresultat men även för att kunna motverka resistensutveckling genom att effektiv dosering minskar behandlingstidens längd.

MIC (*minimum inhibitory concentration*) är den lägsta koncentration av antimikrobiell substans *in vitro* som hindrar tillväxt av bakterien. Pc och andra betalaktamer är tidsberoende antibiotika – antimikrobiell aktivitet och behandlingseffekt är korrelerad till den tid under vilken den fria plasmakoncentrationen är över MIC under ett dosintervall (mått för farmakodynamik, PD).

Vid utvärdering av nytt läkemedel, eller nytt administrations sätt för ett läkemedel, är det viktigt att bedöma eventuell smärta i samband med administrering. Dessutom måste tillförlitliga utvärderingsverktyg användas. Att studera förändringar i beteende och även i fysiologiska parametrar anses vara de mest användbara verktygen när man ska utvärdera smärta hos djur.

Målen med projektet

- att genom ett pilotförsök bestämma vilka läkemedel och i vilken dos vi skulle använda i det större försöket.
- att undersöka stabiliteten av pc-lido
- att ta fram en säker och smärfri behandling av pc-lido som kan användas IM till häst.
- att undersöka farmakokinetiken av pc-prok för att optimera doseringsrekommendationerna.
- att korrelera pc-halter i synovia och plasma efter IV behandling med befintligt preparat av pc-Na för att möjliggöra optimering av dosering vid ledinfektion hos häst.

## Material och metoder

Studien är godkänd av djurförsöksetiska nämnden i Uppsala (C173/14).

### **Pilot studie**

#### *Försöksdesign*

Studien utfördes på två hästar ett sto 575 kg en valack 500 kg designen var cross-over med en veckas wash-out. I pilotundersökningen undersöktes reaktionen (smärtreaktioner samt tecken på vävnadsretning) efter tillförsel två olika behandlingar (pc-Na & pc-lido) och noggranna observationer utförs enligt ett utarbetat protokoll efter injektionen för att utvärdera eventuell smärtreaktion, lokala vävnadsreaktioner vid injektionsplatsen eller andra biverkningar. Under undersökningen fick hästarna stå inne i sin vanliga box för observation. En klinisk undersökning utfördes före och 24 h efter injektionen. Beteendeobservationer enligt tidigare använt beteendeprotokoll (Olsén et al 2013). Hästen observeras under 4 min enligt försöksschema före och direkt efter injektion. Var 20 s antecknas vad hästen gör (ett streck sätts i rätt ruta under beteendekategorier) och beteenden som inte är pågående noteras varje gång de förekom (frekvens) under observationsperioden. Tydliga definitioner av beteenden har tagits fram för de olika beteendena och kategorierna.

#### *Läkemedel*

Behandling var IM injektion lateralt i halsen med 7,5 mg/kg bensylpenicillin utan (pc-Na) eller med (pc-lido) lidokain med adrenalin. Pc-Na bereddades enligt följande: 3 gram pc-Na (Bensylpenicillin® Phanpharma) löstes i 10 ml sterilt vatten (Sterilt vatten Fresenius Kabi). Pc-lido bereddades enligt följande: 3 gram pc-Na (Bensylpenicillin® Phanpharma) löstes i 5 ml sterilt vatten (Sterilt vatten Fresenius Kabi,) och 5 ml lidokain med adrenalin (Xylokain® adrenalin (10 mg/ml + 5 µg/ml), AstraZeneca). Injektionsvolym 2,5 ml/100kg häst

### **Cross-over studie med pc-Na och pc-prok**

#### *Studiedesign och hästar*

I studien ingick åtta varmblodiga travhästar, sju ston samt en valack, ägda av institutionen för kliniska vetenskaper, SLU. Hästarna var mellan 13 och 23 år gamla och vägde mellan 474 och 599 kg. Under försöket hölls hästarna uppstallade i boxar strödda med spån och gick dagtid i hagar utomhus, alternativt motionerades för hand de dagar då täta provtagningar gjordes. Hästarna utfodrades enligt sina ordinarie foderstater med hösilage och kraftfoder. Kontroll av hästarnas kroppstemperatur utfördes dagligen.



Försöket gjordes i två omgångar med *cross-overdesign*. I den första omgången slumpades varje häst att behandlas antingen med pc-prok eller pc-lido. Det preparat som användes av pc-prok var Penovet® vet. (Boehringer Ingelheim Vetmedica, 300 mg/ml. och vatten för injektionsvätskor). Pc-lido bereddes enligt följande: 3 gram bensylpenicillin löstes i 5 ml sterilt vatten och 5 ml lidokain med adrenalin (Bensylpenicillin® Meda, innehåll: 3 g (5 milj IE) bensylpenicillinnatrium; Sterilt vatten Fresenius Kabi, Fresenius Kabi.; Xylorin® adrenalin, AstraZeneca, innehåll per ml: lidokainhydroklorid 10 mg, adrenalin 5 µg. *Wash out*-perioden mellan omgångarna var 8 veckor. Hästarna medicinerades IM i fyra dagar vid varje försökstillfälle. Dosen pc-prok var 21 mg/kg kroppsvikt (7 ml/100 kg) en gång dagligen (q 24 h), totalt fyra injektioner. Detta motsvarar 11,9 mg *rent* bensylpenicillin/kg. Dosen pc-lido var motsvarande 6,25 mg pc-Na/kg (2,5 ml/100 kg) två gånger dagligen (q 12 h), totalt sju injektioner.

Figur 1: Häst under utevistelse under försöket. Lateralt på halsen ses rakade ytor för markering av injektionsplatser och provtagningskateter.

Volymen av läkemedelslösningen avrundades till närmsta hela ml. Injektionerna gjordes i halsmuskulaturen, omväxlande på höger och vänster sida och på tre olika genom rakning markerade platser på var sida (figur 1). Kanylerna som användes för administrering av pc-prok var 18 G (rosa, 1,2 mm x 40 mm) och för pc-lido 21G (grön, 0,8 x 40mm, Microlance™). Om injektionsvolymen översteg 20 ml riktades kanylen om efter injektion av de första 20 ml. Aspiration gjordes innan injektionen påbörjades samt efter att kanylen riktats om. Om blod sågs vid aspiration byttes kanyl och injektionsplats. Under försökets gång togs upprepade blodprover för analys av bensylpenicillin och kortisol. Tidpunkter då blodprover togs från första injektionen var 0 (före första injektionen), 12, 24, 36, 48, 60, 72, 72,25, 72,5, 73, 74, 75, 77, 80, 84, 96, 108 och 120 h. Detta innebär att blodprover togs innan varje injektion och 12 h efter första till tredje injektionen. Efter försökets sista (tid 72 h) injektion togs prov 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24, 36 och 48 h efter injektionen.

Allt arbete med blodproverna gjordes med steril teknik. Blodprover togs med vacutainer ur jugularvenen på motstående sida från den senaste injektionen. Dagen innan den sista injektionen anlades en permanent venkateter med aseptisk teknik i ena sidans jugularven, därur togs resterande blodprover. Området hade rakats i förväg och lokalbedövningskräm hade applicerats (Emla®, Astra Zeneca, 25 mg/g lidokain och 25 mg/g prilokain). Innan varje provtagning togs 10 ml blod ur katetern för att tömma ut det som låg i katetern, och efter varje provtagning spolades katetern med 10 ml natriumkloridlösning (Natriumklorid, Fresenius Kabi, 9 mg/ml). Alla blodprover togs aseptiskt till kylda heparinrör och förvarades i isvatten tills de centrifugerades (1500 g, 10 minuter, 4°C). Plasma avskildes till kylda sterila plaströr och förvarades i -80°C tills de analyserades.

#### Analys

Analys av bensylpenicillin i plasma utfördes på SVA, Uppsala med validerad metod, *Liquid chromatography tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS). Lägsta mätbara koncentration av bensylpenicillin var 6,4 ng/ml. För närmare detaljer kring analysmetoden, se Olsén *et al.* (2013). Plasmakortisolnivåerna analyserades med ELISA (Enzyme Linked Immuno sorbent assay). ELISA-kitet som användes (Demeditec) är utvecklat för humant bruk men tidigare validerat för häst (Boman, 2013).

Med hjälp av Microsoft Office Excel avsattes plasmakoncentrationerna av penicillin mot tiden i diagram ur vilka lägsta koncentrationen under ett dosintervall ( $C_{\min}$ ), högsta koncentrationen ( $C_{\max}$ ) och tiden när högsta koncentration i blodet nås ( $T_{\max}$ ) avlästes. Den fria plasmakoncentrationen beräknades med proteinbindningsgraden 63% (Olsén *et al.*, 2013). Halveringstiden ( $T_{1/2}$ ) beräknades efter den sista injektionen och tiden som den fria koncentrationen i plasma översteg MIC för bakterierna ( $fT > MIC$ ) beräknades utifrån detta. Den fria penicillinkoncentrationen i plasma jämfördes med MIC av penicillin för tre vanliga patogena bakterier hos häst: *Actinobacillus equuli* (*A. equuli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) och betahemolyserande streptokocker. MIC för vildtypen (isolat utan förvärvad resistens) av *A. equuli* är 1,0 µg/ml, för *S. aureus* 0,125 µg/ml och för

betahemolyserande streptokocker 0,03 µg/ml (Pringle et al 2015). Statistisk analys har utförts med tvåsidigt parat t-test för att beräkna p-värde med hjälp av Microsoft Office Excel.  $P < 0,05$  har betraktats som statistiskt signifikant.

#### *Biverkningar*

Beteendestudier gjordes i samband med injektionstillfällen, liksom klinisk undersökning, enligt schema och protokoll för att upptäcka tecken på smärta eller andra biverkningar. Hästarnas beteende observerades under 6 minuter före och efter varje morgoninjektion för att fånga upp eventuella beteendeförändringar som kunde tyda på smärta på grund av injektionerna. Var 20:e sekund markerades vad hästen gjorde just då (pågående beteenden; stå, gå, med sträckt eller vilande hals, äter eller utför munrörelser). Även frekvens av alla diskreta beteenden noterades (till exempel halsskakningar och skrap med framben). De beteenden som utfördes tillräckligt ofta för att ge ett meningsfullt resultat analyserades statistiskt. Klinisk undersökning av injektionsplatserna gjordes före och 12 h efter första injektionen, samt därefter varje morgon (efter injektionerna) och till och med 48 h efter sista injektionen. Då noterades eventuella svullnader och palpationsömheter på halsen, samt eventuell ovilja att böja halsen ventralt eller lateralt för att nå en bit morot/äpple. Resultaten graderades i skala 0-3 för varje sida av hästens hals så maximal gradering är 6 för varje avläsning. De som utförde beteendeobservationerna och de kliniska undersökningarna hade inte kännedom om vilken behandling hästen fått.

#### **Stabilitet av pc-lido och pc-Na**

Stabiliteten hos den färdiga lösningen av pc-lido respektive pc-Na studerades. Två flaskor pc-lido bereddades enligt ovan, samt en flaska med 3 g pc-Na i 10 ml sterilt vatten. En flaska pc-lido förvarades i rumstemperatur (19-20 °C), den andra pc-lido samt pc-Na i kylskåp (4-5°C). Prover för analys av bensylpenicillin-koncentration togs från flaskorna direkt efter beredning, samt 0,5; 1, 2, 3, 12, 24, 48 och 72 h därefter. Proverna förvarades i -80°C tills de analyserades. Analysen gjordes på samma sätt som analysen av bensylpenicillin i plasma (Olsén et al 2013).

#### **Korrelation mellan pc-halter i blod och synovia**

Studien utfördes på fyra friska undervisningshästar av olika vikt, kön och ras alla behandlades IV med pc-Na i doser 17,5 – 25 mg/kg. Två hästar fick Geopenil® vet (Orion Pharma Animal Health) IV och två hästar fick pc-Na (Bensylpenicillin® Meda, 3 g i 10 ml sterilt vatten). Upprepade blodprover (10-13 st/häst) och något färre antal ledprover tagna vid samma tidpunkter analyserades med avseende på halten pc. Synoviocentes utfördes under strikt aseptiska förhållanden. Proverna förvarades i -80°C tills de analyserades. Analysen av pc halter utfördes på samma sätt som analysen av pc i plasma tidigare beskrivet (Olsén et al 2013). Med hjälp av Microsoft Office Excel avsattes plasma- och synoviakoncentrationerna av penicillin mot tiden i diagram. Halveringstiden för synovia beräknades i en nonkompartiment-modell genom att poola alla hästars synovivärden (20 värden tagna vid 120 min eller senare togs med i beräkningen). För plasma beräknades PK-värden med hjälp av en 2-kompartimentmodell (med viktning  $1/C^2_{obs}$ ) där analyserna genomfördes med PK-Solver som finns tillgängligt som add-in för Microsoft Office Excel och simuleringar med MLXplore (Lixoft).

## **Resultat**

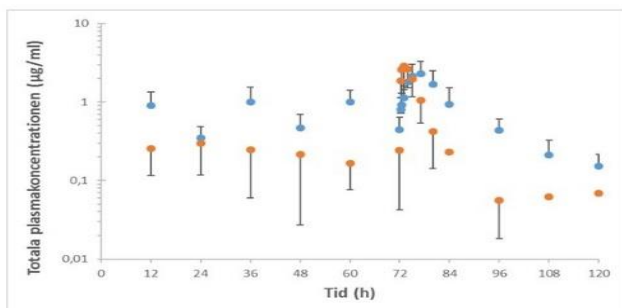
### **Pilot studie**

Protokollet justerades inför omgång två då hästarna kan titta ut i de nya stallarna vilket inte var fallet tidigare. Observationstiden var något kort och kommer att förlängas till 6 min. Den tydligaste skillnaden var att hästarna skakade på halsen efter pc-Na injektion (10 resp 7 ggr) men inte alls efter pc-lido eller före behandlingarna. Ingen tydlig skillnad sågs i den kliniska undersökningen och pc-lido valdes ut för fortsatta studier.

### **Cross-over studie med pc-Na och pc-prok**

Plasmakoncentrationen av bensylpenicillin över tid efter IM injektion av pc-lido respektive pc-prok presenteras i figur 2. Tabell 1 visar farmakokinetiska parametrar och tabell 2 visar tiden över MIC ( $fT > MIC$ ). Den fria plasmakoncentrationen (korrigerat för plasmaproteinbindningsgraden) efter injektion med pc-prok låg för *S aureus* över MIC (0,125 µg/ml) i minst 104% av tiden under ett dosintervall för varje enskild häst. Vid behandling med pc-lido var motsvarande värde 56%. För

betahemolyserande streptokocker (MIC 0,03 µg/ml) var tiden över MIC ( $fT > MIC$ ) som minst 176% vid pc-prokbehandling och 81% vid behandling med pc-lido. I figur 3 visas penicillinkoncentrationen i plasma hos 200 slumpmässigt utvalda hästar med hjälp av Monte-Carlo simulering, utifrån variationen i studiepopulationen (pc-lido respektive pc-prok). Simuleringen för pc-lido visar att  $fT > MIC$  (MIC = 0,125 µg/ml) överstiger 6 h (50%) för de flesta hästar. Simuleringen för pc-prok visar att den fria koncentrationen i plasma överstiger MIC = 0,125 µg/ml i över 12 h (50% av dosintervallet) för alla hästar



Figur 2. Total medelkoncentration (med standardavvikelse) av penicillin i plasma 12 timmar efter varje injektion och tätare provtagning efter sista intramuskulära injektionen av pc-prok (21 mg/kg, q 24 h, orange cirkel) respektive pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h, blå cirkel) från 8 hästar.

Tabell 1. Farmakokinetiska parametrar (medel ± SD) för pc-prok (21 mg/kg, q 24 h) och pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h) efter IM injektion under 4 dygn till häst (n=8).

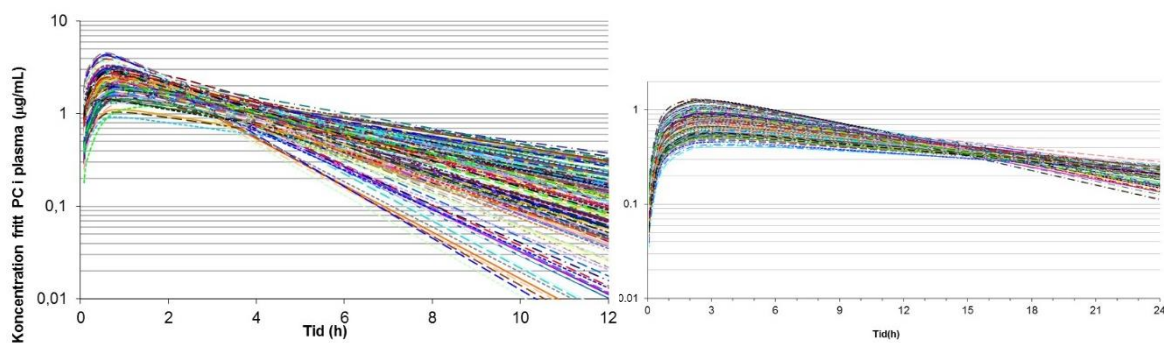
	<b>Pc-prok</b>	<b>Pc-lido</b>
$T_{max}$ (h)	4 ± 1,1 h	1,4 ± 0,9
$T_{1/2}$ (h)	11,4 ± 3,6 h	2,6 ± 1,0 h
$C_{max}$ (µg/ml)	2,7 ± 0,50	3,4 ± 0,88
$C_{min}$ adm 1 (µg/ml)	0,38 ± 0,06	0,26 ± 0,12
$C_{min}$ adm 2 (µg/ml)	0,49 ± 0,16	0,32 ± 0,16
$C_{min}$ adm 3 (µg/ml)	0,48 ± 0,12	0,27 ± 0,18
$C_{min}$ adm 4 (µg/ml)	0,47 ± 0,13	0,23 ± 0,19
$C_{min}$ adm 5 (µg/ml)		0,17 ± 0,09
$C_{min}$ adm 6 (µg/ml)		0,25 ± 0,21
$C_{min}$ adm 7 (µg/ml)		0,12 ± 0,12

$T_{max}$  - Tiden för maximal plasmakoncentration;  $T_{1/2}$  - halveringstid;  $C_{max}$  - maximal plasmakoncentration;  $C_{min}$  - lägsta plasmakoncentrationen under ett dosintervall (24 respektive 12 h)

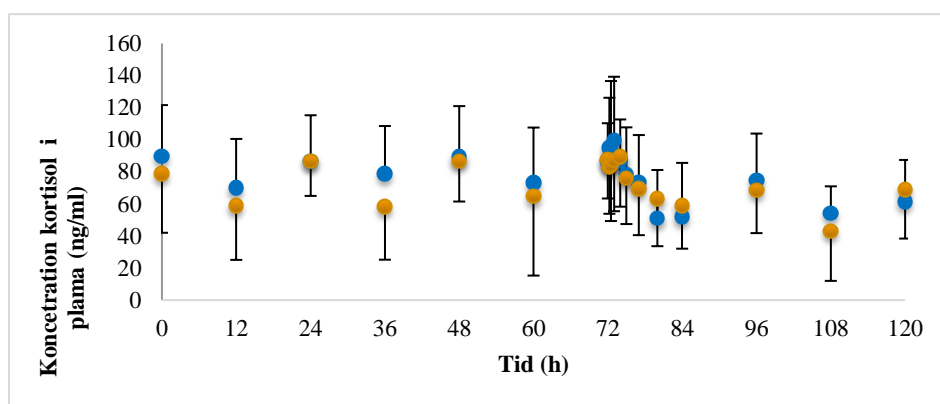
Tabell 2. Tiden över MIC ( $fT > MIC$ ) efter sista IM injektionen pc-prok (21 mg/kg, q 24 h) respektive pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h) efter 4 dygns behandling till häst (n=8), som procentandel av doseringsintervallet (medel ± SD).

<b>MIC</b>	<b>Pc-prok</b>	<b>Pc-lido</b>
<b>0,03 µg/ml</b> Betahemolyserande streptokocker	231 % ± 49	124 % ± 42
<b>0,125 µg/ml</b> <i>S. aureus</i>	133 % ± 21	79 % ± 24
<b>1 µg/ml</b> <i>A. equuli</i>	6 % ± 9	8 % ± 6

Kortisolkoncentrationen i plasma visar stora individuella skillnader och en dygnsvariation med högre koncentrationer på morgonen och lägre på kvällen (figur 4). En liten skillnad i kortisolnivåer ses mellan behandling med pc-lido (78 ± 32 ng/ml) respektive pc-prok (73 ± 32 ng/ml) under försöket som helhet (p=0,02). Vid den tätare provtagningen under den första timmen efter sista injektionen ses en signifikant skillnad (pc-lido 96 ng/ml ± 37 och pc-prok 85 ng/ml ± 31; p=0,009).



Figur 3. Monte Carlo-simulering av fri koncentration bensylpenicillin i plasma efter administrering av pc-lido (6,25 mg/kg, till vänster) till 200 slumpvis utvalda hästar, beräknat utifrån studiepopulationens variation och för intramuskulära injektionen av pc-prok (21 mg/kg, till höger)

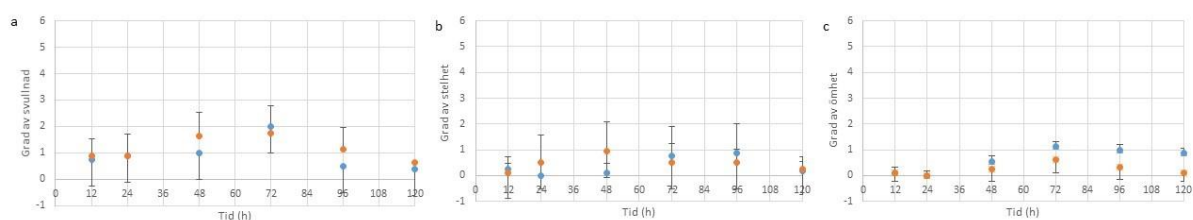


Figur 4. Kortisolkoncentration (medel  $\pm$  SD) i plasma under försökets gång, där de 8 hästarna injicerades med pc-prok (21 mg/kg, q 24 h, totalt 4 injektioner, orange cirkel) respektive pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h, totalt 7 injektioner, blå cirkel)

### Biverkningar

Beteendestudierna visade inte någon signifikant skillnad mellan de båda behandlingarna. Däremot sågs en skillnad i vissa diskreta beteenden (såsom sucka/frusta, munrörelser och skaka på halsen) under de observerade 6 min efter injektion jämfört med före (pc-lido  $p=0,012$  pc-prok  $p=0,0001$ ).

Svullnader, stelhet och ömhet vid palpation av injektionsplatserna var i allmänhet lindriga (figur 4). Vid behandling med pc-prok sågs lindriga svullnader upp till 5 cm<sup>3</sup> och en häst fick stora men diffusa svullnader, 3 hästar som behandlades med pc-lido hade svullnader över 5 cm<sup>3</sup> vid 1-4 undersökningstillfällena (av 6).



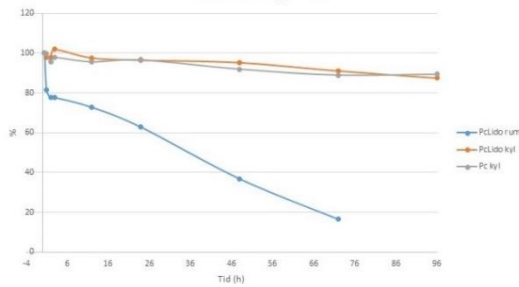
Figur 5 Klinisk undersökning av injektionsplatserna för gradering av a) svullnad, b) stelhet och c) ömhet utförd före och 12 h efter första injektionen, samt därefter varje morgon (efter injektionerna) och till och med 48 h efter sista injektionen (tid 120 h) där 8 hästar injicerades med pc-prok (21 mg/kg, q 24 h, totalt 4 injektioner, orange cirkel) respektive pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h, totalt 7 injektioner, blå cirkel). Resultaten graderades i skala 0-3 för varje sida av hästens hals så maximal gradering är 6 för varje avläsning.

### Stabilitet av pc-lido och pc-Na

Figur 6 visar stabiliteten av bensylpenicillin i färdigblandad läkemedelslösning av pc-lido respektive pc-Na löst i sterilt vatten. Det maximala värdet som uppmättes (252 mg/ml). Ingen betydande skillnad



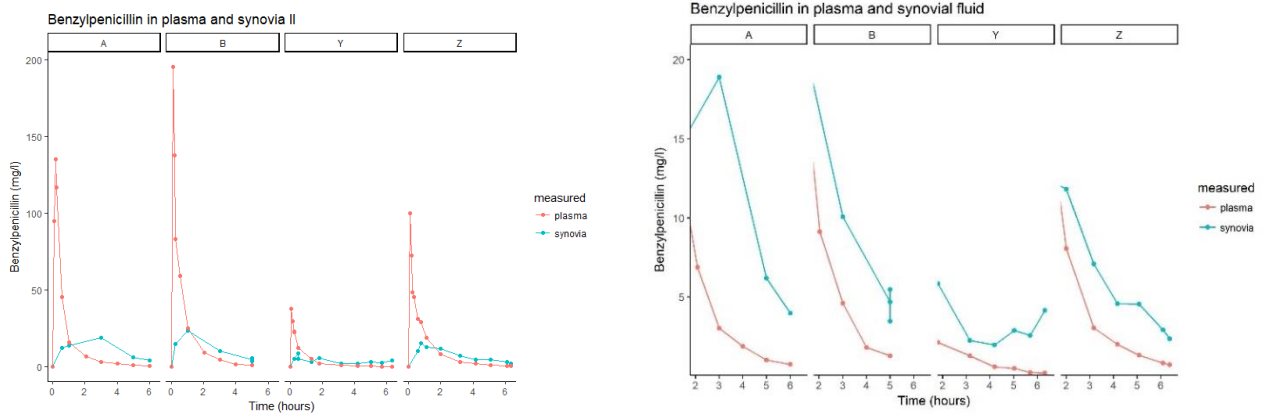
i hållbarhet ses mellan de båda beredningsvarianterna. Vid förvaring i kylskåp är stabiliteten tillräckligt god i minst 4 dygn, medan stabiliteten i rumstemperatur är kortvarig.



Figur 6. Procentuell ändring av bensylpenicillinkoncentration i färdigblandad läkemedelslösning (3 g pc-Na + 5 ml sterilt vatten + 5 ml lidokain med adrenalin respektive 3 g pc-Na + 10 ml sterilt vatten) vid förvaring i kylskåp respektive rumstemperatur. Blå linje pc-lido i rumstemp, orange linje Pc-lido i kyl och grå linje PcNa i kyl.

### Korrelation mellan pc-halter i blod och synovia

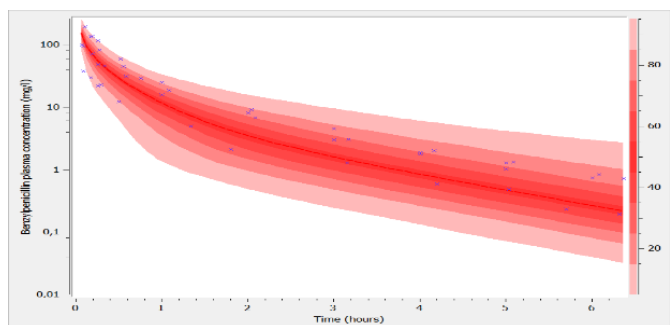
Plasma och synovia koncentrationen av bensylpenicillin över tid efter IV injektion av pc-Na presenteras i figur 7. Tabell 3 visar farmakokinetiska parametrar för plasma. Halveringstiden för de poolade synovia proverna var 4 h och  $T_{max}$  var 1 h,  $C_{max}$  var 23,5 mg/l.



Figur 7. Plasma (röd linje) och synovia (blå linje) koncentrationer av bensylpenicillin över tid efter IV injektion av pc-Na för individuella hästar. Figuren i olika skalor på Y-axeln; med alla prover till vänster (med höga konc i plasma) och prover från två timmar till höger (med lägre koncentrationer).

Tabell 3. Farmakokinetiska parametrar (medel  $\pm$  SD) för fyra hästar efter IV injektion av pc-Na

2-kompartment		Medel	SD
t1/2Alpha	min	11,6	2,8
t1/2Beta	min	118,4	17,5
t1/2Alpha	h	0,19	0,05
t1/2Beta	h	1,97	0,29
V	L/kg	0,18	0,18
CL	L/kg/h	0,47	0,45
V2	L/kg	0,25	0,24
CL2	L/kg/h	0,12	0,10



Figur 8. Koncentration-tidsprofil av bensylpenicillin i plasma efter intravenös injektion med 90% konfidensintervall där varje band av röd nyans representerar 10% och blå x är uppmätta värden från fyra hästar.

## Diskussion

### Pilot studie

Beteendeprotokollet justerades inför den större studien då hästarna kunde titta ut i de nya stallarna vilket inte var fallet tidigare och observationstiden förlängdes till 6 min då hästarna fortsatte med några av beteendena efter observationstidens slut.

Utifrån resultaten av pilotstudien valdes det minst smärtsamma läkemedlet ut med hjälp av det samlade resultatet från både klinisk undersökning samt beteendeobservationer (indikationer på smärta, lokala vävnadsreaktioner vid injektionsplatsen eller andra biverkningar). Den tydligaste skillnaden var att hästarna skakade på halsen efter pc-Na injektion och därför valdes pc-lido som behandling i den större studien.

### Cross-over studie med pc-Na och pc-prok

För god behandlingseffekt av bensylpenicillin bör  $fT > MIC$  vara minst 30-50% av dosintervallet (Martinez et al 2013; MacGowan 2011; Muller et al 2013). Monte-Carlo-simuleringarna visar att den fria plasmakoncentrationen av bensylpenicillin kommer att överstiga  $MIC = 0,125 \mu\text{g/ml}$  i minst halva dosintervallet hos i princip alla hästar som behandlas med pc-prok IM (21 mg/kg, q 24 h), och hos de allra flesta som behandlas med pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h; figur 3). Goda behandlingsresultat mot *S aureus* och beta-hemolyserande streptokocker (*S equi* och *S zooepidemicus*) är att förvänta av båda behandlingarna. För behandling av *A. equuli* ( $MIC 1 \mu\text{g/ml}$ ) är dock  $fT > MIC$  alltför låg, vilket gäller båda behandlingarna. Pc-lido är ett bra alternativ till pc-prok då risken för prokainrelaterade biverkningar är eliminerad. Ett annat sätt att minska risken för prokaintoxicitet skulle kunna vara att minska doseringen av pc-prok, då 21 mg/kg av pc-prok är onödigt hög. Som väntat är halveringstiden i plasma för bensylpenicillin betydligt kortare efter IM-administration av pc-lido ( $2,6 \pm 1,0$  h) än pc-prok ( $11,4 \pm 3,6$  h). Prokain bildar tillsammans med bensylpenicillin ett svårslösligt salt som långsamt dissocierar i muskeln vilket ger en långsam absorption av bensylpenicillin som förlänger halveringstiden. Adrenalin ger vasokonstriktion vilket kan göra upptaget något långsammare än utan, men det är rimligt att den depåeffekten är mindre än prokainets. Effekten av lidokain och adrenalin på upptag och halveringstid kan utvärderas genom att jämföra med resultatet tidigare studier (Olsén et al 2013) där hästarna behandlades med pc-Na IM. Halveringstiden hos pc-lido ( $2,6 \pm 1,0$  h) var möjligen något längre än hos pc-Na ( $1,9 \pm 0,2$  h), och  $T_{\max}$  var längre för pc-lido ( $1,4 \pm 0,9$  h) än för pc-Na ( $0,34 \pm 0,13$  h). Vasokonstriktion till följd av adrenalintillsatsen kan möjligen bidra till långsammare upptag och därmed förlänga halveringstiden något. Vid försöket med pc-Na visade hästarna uttalade smärtreaktioner med bland annat frekventa halsskakningar det är möjligt att rörelsen i halsmuskulaturen kan öka blodgenomströmningen och därmed göra upptaget snabbare och att smärtlindringen som lidokainet ger bidrar till långsammare upptag.

Koncentrationen av fritt bensylpenicillin i plasma efter behandling med pc-prok är hög i förhållande till MIC för relevanta patogener under lång tid vilket innebär att man troligen skulle kunna sänka dosen och ändå bibehålla god effekt. När injektion av pc-prok leder till prokaintoxicitet beror det troligen på oavsiktlig IV injektion, eller att en ovanligt stor del av prokainet i läkemedlet är löst och därmed tillgängligt för snabb absorption (Chapman et al., 1992; Olsén et al, 2007). Av tillverkaren rekommenderad dos av Penovet® vet. (21 mg/kg) motsvarar 8,4 mg prokain/kg och hästar visar symptom på dosberoende prokaintoxicitet redan vid IV injektion av 1,7 mg prokain/kg (Chapman et al., 1992; Tobin et al., 1977a). Det är rimligt att anta att risken för, och/eller allvarlighetsgraden av, prokaintoxicitet skulle minska vid en minskad dos av pc-prok, men inte elimineras. Vid sänkning av doseringsrekommendationen kan risken för terapivikt öka. Behandling sätts ibland in i väntan på provsvar eller utan provtagning, det vill säga utan kännedom om vilken bakterie man behandlar. Om det rör sig om en bakterie med  $MIC 0,5 \mu\text{g/ml}$ , kanske dosen 21 mg/kg hade haft tillräcklig effekt, medan en lägre dos inte har det. Vid förekomst av bölder kan distributionen av penicillin till infektionsområdet försämrats. Kliniska data som visar vilka preparat och doseringar som är lämpliga vid bölder med stafylokocker och streptokocker saknas, men eventuellt krävs IV behandling för effektiv terapi (Läkemedelsverket, 2015, Ingvast-Larsson et al 2015). Om pc-prok trots det väljs som behandling vid bölder är det troligt att en lägre dos ger större risk för terapivikt.

Pc-lido ger något högre kortisolkoncentrationer i plasma än pc-prok under första timmen efter administration. Tänkbara orsaker är att injektionen av pc-lido är mer smärtsam eller att tillsatsen av adrenalin påverkar kortisolnivåerna.



## *Biverkningar*

Beteendestudierna visade ingen signifikant skillnad mellan behandlingarna, men däremot att vissa beteenden ökar efter injektion (frustande/suckar, munrörelser, halsskakningar). Det är rimligt att anta att detta beror på att en IM injektion gör ont. Skillnaden var så liten att den subjektivt inte uppfattades av observatörerna, utan först kunde ses vid statistisk analys av resultaten. Majoriteten av svullnader, stelhet och ömhet vid injektionsplatserna som uppstod var lindriga. Vid tidigare studie av IM injektion av pc-Na sågs kraftiga smärtreaktioner och en häst fick tas ur försöket på grund av detta (Olsén et al 2013). Båda försöken utfördes delvis med samma försökshästar och den av pc-Na mest smärtpåverkade hästen kunde fullfölja pc-lidobehandlingen utan problem. Lidokain verkar effektivt som smärtlindrande vid injektionen.

Sammantaget visar beteende, klinisk undersökning och kortisolnivåer att båda behandlingarna är förenade med lindrig smärta hos hästen. Ingen häst var så smärtpåverkad att den blev svår att behandla. Lindriga reaktioner i samband med injektioner kan anses vara acceptabel när antibiotikabehandling är indicerad.

## **Stabilitet av pc-lido och pc-Na**

Stabilitetsstudien visar att färdigblandad pc-lido och pc-Na har båda acceptabel hållbarhet i kyl i åtminstone 4 dygn, men hållbarheten i rumstemperatur är kortvarig och läkemedlet bör därför placeras i kyl omedelbart efter användning. En färdig läkemedelsprodukt med fast kombination penicillin-lidokain skulle underlätta hanteringen för djurägaren.

## **Korrelation mellan pc-halter i blod och synovia**

Vid IV behandling av pc-Na kommer höga halter av pc-Na snabbt ut i leden och når sitt max efter en timme och terapeutiska halter kvarstår under minst 6 timmar (för MIC 0,125 µg/ml) hos de fyra behandlade hästarna. T<sub>1/2</sub> för de poolade synovian var betydligt längre (4h) än tidigare visat och även den T<sub>1/2</sub> för plasma var jämförelsevis lång (1,1h). Även om det behövs fler studier på både friska och sjuka hästar är det en indikation för att rekommenderade doser är adekvata.

## **Publikationer**

Publikationer & abstract:

Lena Olsén and Carina Ingvast-Larsson, Intramuscular administration of benzylpenicillin in horses as an alternative to procaine benzylpenicillin, Animal Welfare Science Workshop, 23-24th May 2016, SLU, *Abstract & oral presentation*

Amelie Lind och Judith Grossman, Bensylpenicillin för intramuskulär injection hos häst – en studie av plasmakoncentrationen efter giva av bensylpenicillinprokain respektive bensylpenicillin i kombination med lidokain och adrenalin, Veterinärkongressen 10-11 november 2016, *Abstract och muntlig presentation*

Examensarbeten:

Judith Grossman (Intramuskulär administration av bensylpenicillin med lidokain och adrenalin till häst/ Intramuscular administration of benzylpenicillin with lidocain and adrenaline in horse)

<http://stud.epsilon.slu.se/8801/>

Amelie Lind (Intramuskulär administration av bensylpenicillinprokain till häst - en farmakokinetisk studie/ Intramuscular administration of procaine benzylpenicillin in horse – a pharmacokinetic study)

<http://stud.epsilon.slu.se/8800/>

Backström Matilda (Plasmakortisol som en indikator för stress under djurförsök på häst och hund).

<http://stud.epsilon.slu.se/9618/>

Pågående: Matilda Axelsson, (Benzylpenicillin med tillsats och benzylpenicillinprokain- Smärtbedömning hos häst efter intramuskulär administrering / Benzylpenicillin with addition and benzylpenicillinprokain- Pain assessment in horses after intramuscular administration).

## **Slutsatser (gällande nytta med råd till näringen)**

Studien visar att IM behandling med pc-lido (6,25 mg/kg, q 12 h) eller pc-prok (21 mg/kg, q 24 h) ger adekvat antimikrobiell behandling mot flera vanliga patogener hos häst (MIC upp till 0,125 µg/ml). Båda behandlingarna är förenade med viss risk för smärta och svullnad vid injektionsplatsen, men reaktionerna är generellt lindriga och kan anses acceptabla i sammanhanget. Smärtan och svullnaden

efter injektion tycks vara jämförbar för de olika behandlingarna. Fler injektioner krävs för behandling med pc-lido, men fördelen med pc-lido framför pc-prok är att risken för prokaintoxicitet elimineras vilket är önskvärt ur djurvälståndssynpunkt. Pc-lido kan förvaras i kyl under fyra dygn. Vid IV behandling av pc-Na för behandling av infektion i hästens leder kommer höga halter av pc-Na ut i leden snabbt och kvarstår i terapeutiska halter under flera timmar (beroende på agens) vid nuvarande rekommenderad dosering.

## Resultatförmedling till näringen

Resultaten kommer att publiceras i internationell vetenskaplig referee-granskade tidskrifter för att forskare och veterinärer utomlands ska kunna ta del av resultaten. För att nå ut till och få kontakt med forskarkollegor kommer resultaten att presenteras vid internationell konferens där ämnen såsom antibiotikaresistens, farmakologi, behandling och djurvälstånd tas upp. För att nå ut till kliniskt verksamma veterinärer och annan djurhälsopersonal i Sverige har resultaten presenterats muntligt och skriftligt som abstrakt vid nationell konferens (Veterinärkongressen 2016) och manuskript är sammanställt för publicering i Svensk Veterinärtidning. En muntlig presentation på Hippocampus lunchseminarier anordnad av SVA & SLU är inbokad i september.

Resultaten kommer att publiceras så att veterinärer verksamma i Sverige kan få tillgång till de nya rönen. Via Hästsverige.se, SLU & Hippocampus hemsidor och via hemsidor för populärvetenskapliga inriktningar kommer resultaten att presenteras via postrar och föredrag vid seminarier och andra möten. Resultaten kommer även att presenteras inom olika hästforum. Våra ambitioner är också att spridning av resultaten via de övriga kanaler som anges i den information som givits ut angående forskningsbidrag från Stiftelsen för Svensk Hästforskning.

## Referenser

- Boman S. Plasma cortisol concentrations after treatment with methadone alone or together with acepromazine or detomidine in horses. Sveriges lantbruksuniversitet. Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap/Veterinärprogrammet (Examensarbete 2013:19)
- Caracas HC, Maciel JV, Martins PM, de Souza MM, Maia LC. The use of lidocaine as an anti-inflammatory substance: a systematic review. *J Dent.* 2009, 37, 93-97.
- Doherty TJ, Seddighi MR Local anesthetics as pain therapy in horses. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2010, 26, 533-549
- Ingvast-Larsson, C., Kendall, A., Olsén, L., Penicilliner. Information från Läkemedelsverket 2015;26(supplement): 22-26.
- Läkemedelsverket. Dosering av antibiotika till häst - behandlingsrekommendation. Information från Läkemedelsverket, supplement oktober/november 2015, årgång 26, Uppsala.
- Martinez M, Toutain P-L, Turnridge J. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine: The pharmacodynamics of antimicrobial agents. Ames, Iowa; John Wiley & Sons, Inc, 2013;79–103.
- MacGowan A. Revisiting Beta-lactams - PK/PD improves dosing of old antibiotics. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:470–476.
- Muller AE, Punt N, Mouton JW. Optimal exposures of ceftazidime predict the probability of microbiological and clinical outcome in the treatment of nosocomial pneumonia. *J Antimicrob Chemother* 2013;68:900–906.
- Olsén L, Ingvast-Larsson C, Broström H, Larsson P, Tjälve H. Clinical signs and etiology of adverse reactions to procaine benzylpenicillin and sodium/potassium benzylpenicillin in horses. *J Vet PharmacolTher.*, 2007, 30, 201-207.
- Olsén L, Bremer H, Olofsson K, Bröjer J, Bondesson U, Bergh A, Nostell K, Broström H, Bengtsson B, Ingvast-Larsson C. Intramuscular administration of sodium benzylpenicillin in horses as an alternative to procaine benzylpenicillin *Res Vet Sci.* 2013, 95, 212-218.
- Pringle M, Bergström K, Greko C. Mikrobiologiska aspekter på dosering av antibiotika. Information från Läkemedelsverket, 2015, 26 (supplement), 18 – 21.
- Schreiber W, Krieg JC. Hoignesyndrome. Case report and current literature review *Nervenarzt.* 2001, 72, 546-548.
- SVEDRES -SVARM 2015. Folkhälsomyndigheten & Statens veterinärmedicinska anstalt. (2016). Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala ISSN 1650–6332.
- Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, SVS, (2013). Riktlinjer för användning av antibiotika inom hästsjukvård.