



*Sveriges lantbruksuniversitet*  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

# Bensylpenicillinnatrium intramuskulärt till häst som alternativ till bensylpenicillinprokain

Karin Olofsson

*Uppsala*

*2009*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2010:51*



Bensylpenicillinnatrium  
intramuskulärt till häst som alternativ  
till bensylpenicillinprokain

Karin Olofsson

*Handledare: Lena Olsén*

*Biträdande handledare: Carina Ingvast Larsson*

*Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avdelningen för  
farmakologi och toxikologi*

*Examinator: Pia Larsson,  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avdelningen för  
farmakologi och toxikologi*

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009  
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap  
Kurskod: EX0232, Nivå X, 30hp*

*Nyckelord: bensylpenicillin, häst, intramuskulär, proteininbindning, farmakokinetik*

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>*

*ISSN 1652-8697*

*Examensarbete 2010:51*



<b>INNEHÅLLSFÖRTECKNING</b>	
<b>SAMMANFATTNING</b>	<b>2</b>
<b>SUMMARY</b>	<b>3</b>
<b>INLEDNING</b>	<b>4</b>
Syfte	5
<b>LITTERATURÖVERSIKT</b>	<b>5</b>
Bensylpenicillinnatrium	5
Bensylpenicillinprokain	5
Administrering av bensylpenicillin	6
<i>Intramuskulär injektion</i>	6
<i>Intravenös injektion</i>	6
<i>Per os</i>	7
Biverkningar	8
Farmakokinetik och -dynamik	9
<i>Minimal inhibitory concentration</i>	9
<i>PK/PD-index</i>	10
<b>MATERIAL OCH METODER</b>	<b>11</b>
Djur	11
Försöksplan	11
<i>Doser</i>	11
Blodprovstagning	11
<i>Permanentkanyl</i>	11
<i>Blodprovsprotokoll</i>	11
Analys av penicillin	12
Plasmaproteinbindning	12
Farmakokinetisk analys	13
<i>Tid över MIC</i>	13
<b>RESULTAT</b>	<b>14</b>
Farmakokinetik	15
<i>Maxkoncentration, <math>C_{max}</math></i>	15
<i>Tid vid maxkoncentration, <math>T_{max}</math></i>	15
<i>Halveringstid, <math>T_{1/2}</math></i>	16
<i>Lägsta koncentration, <math>C_{min}</math></i>	17
<i>Proteinbindning</i>	17
<i>Tid över MIC</i>	18
<b>DISKUSSION</b>	<b>18</b>
<b>SLUTSATSER</b>	<b>21</b>
<b>TACK</b>	<b>22</b>
<b>LITTERATURFÖRTECKNING</b>	<b>23</b>



## SAMMANFATTNING

Bensylpenicillin är den mest använda antibiotikan till häst i Sverige idag. Den beredning som skrivs ut till djurägare är framförallt bensylpenicillinprokain, men många hästar får kraftiga biverkningar av preparatet. Biverkningarna kan vara milda så som skakningar eller nervositet, men kan också bli livshotande. Forskning visar att prokain kan vara orsaken till majoriteten av biverkningar, vilket gör att bensylpenicillin utan prokain kan bli aktuellt att använda för att minska risken för biverkningar och öka djurvälståndet. Att byta antibiotika till trimetoprim i kombination med sulfonamid är ej önskvärdt då det antibakteriella spektrat då vidgas. Bensylpenicillinnatrium är det alternativ som finns i Sverige idag, som till nötkreatur får ges både intravenöst och intramuskulärt, men bara intravenöst till häst. Detta arbete syftade till att undersöka farmakokinetiska parametrar hos häst efter intramuskulär injektion av bensylpenicillinnatrium. Resultatet visade att halveringstiden för bensylpenicillin förlängs från ca 50 min efter intravenös giva till 2 h efter intramuskulär injektion, att maxkoncentrationen var 14 600 ng bensylpenicillin/ml serum och att maxkoncentrationen uppnåddes efter i medel  $23,0 \pm 12,1$  min. Hästarna i studien injicerades var tolfte timme med bensylpenicillinnatrium och de hade innan ny injektion i medel 281,1 ng bensylpenicillin/ml serum.

Det är den icke-proteinbundna delen av bensylpenicillin i serum som anses bäst representerar koncentrationen av bensylpenicillin i extracellulär vävnad. Proteinbindningsgraden av bensylpenicillin fastställdes i studien till  $62,8 \pm 1,8$  %. För bensylpenicillin är det tiden som den fria koncentrationen i serum håller sig över en avdödande koncentration som är mest avgörande för den antibakteriella effektiviteten. *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus zooepidemicus* och *Staphylococcus aureus* är känsliga för penicillin och vanliga hästpatogener i Sverige och valdes därav ut som representativa bakterier. Den minsta hämmande koncentration (minimal inhibitory concentration; MIC) av penicillin som krävs för avdödande av vardera bakterieart togs fram. Det är önskvärdt att den fria penicillinkoncentrationen ligger över MIC till 50-80 % av dosintervallet. Samtliga hästar låg över MIC 50 % av dosintervallet för alla tre patogenerna, men endast för *Streptococcus equi* subsp. *equi* låg alla hästar över MIC i 80 % av dosintervallet.

De farmakokinetiska resultaten i detta arbete indikerar att bensylpenicillinnatrium kan ges intramuskulärt till häst var tolfte timme och har då teoretisk god effekt på penicillinkänsliga bakterier. Dock bör resultaten för biverkningar presenteras innan vidare slutsatser kan dras om bensylpenicillin intramuskulärt till häst kan användas kliniskt.

## SUMMARY

Benzylpenicillin is the most widely used antibiotics in horses in Sweden today. The preparation prescribed to most horse owners is particularly benzylpenicillin procaine, but many horses show severe side effects after injection of this preparation. Side effects can be mild, such as tremors, or nervousness, but can also be life threatening. Research shows that procaine could be the cause of the majority of adverse reactions, which indicate that maybe benzylpenicillin without procaine can be used to reduce the risk of side effects and improve animal welfare. Changing antibiotics to trimethoprim in combination with sulphonamide is not desirable because the antibacterial spectrum is then widened. Sodium benzylpenicillin is the alternative that exists in Sweden today, given both intravenously and intramuscularly to cattle, but only intravenously to horses. This study aimed to investigate the pharmacokinetic parameters in horses after intramuscular injection of sodium benzylpenicillin. The results showed that the half-life of benzylpenicillin is increased from approximately 50 min after intravenous injection to 2 h after intramuscular injection, the peak concentrations were 14 600 ng benzylpenicillin/ml serum and the peak concentrations was reached after an average of  $23.0 \pm 12.1$  min. The horses in this study were injected every twelve hours with sodium benzylpenicillin and they had prior to new injection an average of 281.1 ng benzylpenicillin/ml serum.

It is the non-protein-bound portion of benzylpenicillin in serum, which is considered the best representative to the concentration of benzylpenicillin in extracellular tissue. The protein binding percentage of benzylpenicillin in this paper was determined to  $62.8 \pm 1.8$  %. For benzylpenicillin it is the time that the free serum concentration remains above an inhibitory concentration that is most crucial for the antibacterial efficiency. *Streptococcus equi* subsp. *equi*, *Streptococcus zooepidemicus* and *Staphylococcus aureus*, all susceptible to penicillin and ordinary horse pathogens in Sweden and hence were chosen as representative bacteria. The minimal inhibitory concentration (MIC) of penicillin required for antibacterial effect was stated for each bacterial species. The free penicillin concentrations should be above MIC for 50-80 % of the dosing interval. All horses were above the MIC 50% of the dosing interval for all three pathogens, but only for *Streptococcus equi* subsp. *equi* all horses were over MIC in 80 % of the dosing interval.

The pharmacokinetic results of this work indicate that benzylpenicillin sodium can be administered intramuscularly to horses every twelve hours and then have good theoretical effect on penicillin-sensitive bacteria. However, the results of adverse events are presented before further conclusions can be drawn on benzylpenicillin intramuscularly to horses can be used clinically.



## INLEDNING

Alexander Fleming anses idag vara den som upptäckte penicillinets antibakteriella egenskaper. Det skedde redan under 1920-talet och än idag är penicillin en av de viktigaste antimikrobiella substanserna inom såväl humanmedicinen som veterinärmedicinen. Till häst har penicillin använts sedan 1940-talet (Doll, 1946). Cirka 90 år efter upptäckten är penicillin det mest sålda antimikrobiella läkemedlet inom svensk veterinärmedicin (SVARM 2008, 2009) vilket tydligt visar dess betydelse för behandling av sjukdom än idag. Det penicillin vi använder idag är bensylpenicillin, ibland kallat penicillin G, som har god verkan på ett flertal sjukdomsframkallande bakterier. Det är ett läkemedel med brett terapeutiskt fönster och det är billigt (Love *et al.*, 1983; Ricketts & Hopes, 1984; Sullins *et al.*, 1984). Av dessa anledningar är dess användningsområden många och kan användas på flertalet djurslag.

Till häst finns i Sverige idag två beredningar av bensylpenicillin; **bensylpenicillinnatrium (Na-pc)** och **bensylpenicillinprokain (prokain-pc)**. Na-pc är idag endast godkänt att ges intravenöst till häst och av den anledningen ska behandlingen utfärdas under veterinärt överinseende. Prokain-pc ska däremot ges intramuskulärt, vilket ger möjlighet för djurägare att själva ge uppföljande behandlingar av sina hästar, efter instruktion från veterinär. Nackdelen med prokain-pc är att man sett biverkningar av preparatet som i dagligt tal kallas "penicillinchock" (Tjälve, 1997). Prokain i för hög koncentration i blodet är troligen orsaken till de flesta reaktionerna även om allergisk anafylaktisk chock av penicillin också förekommer (Nielsen *et al.*, 1988; Olsén *et al.*, 2007). Då Na-pc helt saknar prokain skulle eventuellt intramuskulär tillförsel av Na-pc kunna ersätta prokain-pc och frekvensen av penicillinchock skulle kunna minskas.

Bensylpenicillin är ett så kallat smalspektrum antibiotikum (Adamson *et al.*, 1985). För att minska resistensutvecklingen behövs mer riktad behandling med antibiotikum. Antibiotikum med smalt bakteriellt spektrum bör användas för att undvika allt för stor påverkan på normalfloran, vilket är viktigast ur resistenssynpunkt. Hästar bör behandlas med penicillin om infektionen orsakas av penicillin känsliga bakterier. För att optimera behandling samt i viss mån undvika att resistensutveckling sker ska ett läkemedels **farmakokinetiska (PK)** och **farmakodynamiska (PD)** egenskaper integreras. PK och PD beskriver hur läkemedlet omsätts i kroppen respektive hur känslig en bakterie är mot antibiotikumet. Om PK och PD inte är utvärderade riskerar dosen vara för låg och risken att resistens utvecklas ökar (Burgess, 1999). Behandlingsresultatet riskerar även bli suboptimalt. Proteinbindningsgrad är väsentligt för att få reda på hur stor del av den dos som getts som faktiskt har verkan. Den fria, icke-proteinbundna, delen av penicillin i blodet anses vara den bästa markören för den extracellulära vävnadskoncentrationen (Craig & Ebert, 1989; Cars, 1997).

Studien är en fortsättning av Julia Lindbergs examensarbete (2008), vilket var en pilotstudie med två hästar. Mitt arbete presenterar endast en del av projektet *Natriumbensylpenicillin intramuskulärt till häst – ett alternativ till bensylpenicillinprokain*. Hästarna gavs prokain-pc respektive Na-pc intramuskulärt, men endast det senare kommer att behandlas i detta arbete.

## Syfte

Syftet med den här delen av projektet är att undersöka om Na-pc kan användas intramuskulärt till häst i stället för pc-prokain med hjälp av att integrera PK med PD (PK/PD-analys).

## LITTERATURÖVERSIKT

Penicilliner är främst effektiva mot aeroba **grampositiva (gram<sup>+</sup>)** bakterier samt vissa anaerobes (Giguère *et al.*, 2006). Tre bakterier som är penicillinkänsliga och kan infektera häst är *Streptococcus equi subsp. zooepidemicus* (*Strept zooepidemicus*), *Streptococcus equi subsp. equi* (*Strept equi*) och *Staphylococcus aureus* (*Staph aureus*). En av de vanligaste gram<sup>+</sup> bakterieinfektioner på häst idag är *Strept zooepidemicus* (Clark *et al.*, 2008). *Strept equi* är den bakterie som orsakar sjukdomen kallad kvarka. Även vid de tillfällen då hästar med kvarka bedöms vara i behov av antibiotika kan bencylpenicillin användas (Sweeney *et al.*, 1995). *Staph aureus* är en viktig hästpatogen, men kan även isoleras hos kliniskt friska djur (Burton *et al.*, 2008). Resistensläget hos *Staph aureus* har försämrats och flertalet isolat är numera resistenta mot penicillin (Clark *et al.*, 2008; EUCAST, 2009).

Bencylpenicillin ges idag via **intravenös tillförsel (i.v.)** eller **intramuskulär injektion (i.m.)**, då i form av ett prokainsalt. Penicillin givet **per os (p. o.)** har också förekommit, men används inte på häst i Sverige idag, främst på grund av biverkningar i mag-tarmkanalen. Beredningar med bencylpenicillin ihop med prokain finns för att få ett långsammare upptag, men biverkningar från beredningarna har iakttagits.

## Bencylpenicillinnatrium

Na-pc är ett lättlösligt salt som när det ges i.v. eller i.m. snabbt löser sig till natrium respektive penicillin, vilket snabbt ger en hög koncentration av bencylpenicillin i blodet. Då **halveringstiden (T<sub>1/2</sub>)** för bencylpenicillin efter i.v. giva är runt 50 min (Dürr, 1976; Love *et al.*, 1983) kommer den höga koncentration snabbt sjunka och nivån hamnar under den som är effektiv för avdödning av bakterier.

Na-pc finns registrerat i Sverige och är idag endast godkänt att ges i.v. till häst men får ges både i.v. och i.m. till nötkreatur (Fass<sup>®</sup> vet., 2008). Dosering av Na-pc i.m. till nötkreatur sker 2 ggr/dag och Lindbergs arbete (2008) antydde att samma dosintervall eventuellt kan vara applicerbart på häst. Hästar har försöksvis behandlats enligt kaskadprincipen med Na-pc i.m. i Sverige (pers. medd. Bröjer, 2010). Vetenskapligt stöd som visar att Na-pc i.m. kan användas för en hel behandlingsperiod saknas.

## Bencylpenicillinprokain

Som tidigare nämnts får man höga initiala koncentrationer av penicillin när man ger Na-pc i.v. och T<sub>1/2</sub> är mindre än 1 h. För att förlänga halveringstiden har prokain tillsatts. Penicillin bildar tillsammans med prokain ett svårlösligt salt som inte absorberas och ger en depåeffekt i muskeln. Efter i.m. injektion av prokain-pc sker en långsam dissociation av prokain-pc till penicillin respektive prokain som därmed kan absorberas till blodet. Den långsamma dissociationen ger en

fördröjning innan **maximal koncentration av penicillin i serum ( $C_{\max}$ )** nås (Stover *et al.*, 1981; Sullins *et al.*, 1984). Depåeffekten gör att  $C_{\max}$  blir lägre än vid i.v. injektion av Na-pc och att  $T_{1/2}$  och duration förlängs vilket medger ett längre dosintervall. De idag i Sverige registrerade preparaten med prokain-pc injiceras i.m. en gång per dygn till häst

Prokain är ett lokalanestesimedel vilket ger en smärtlindrande effekt (Kuchembuck *et al.*, 2007) och har tidigare använts för nervblockad under operationer. Prokain har dessutom förekommit vid doping av hästar för att maskera smärta från rörelseapparaten (Tobin *et al.*, 1977), men dessutom har det använts i syfte att öka prestationen (Meyer-Jones, 1951). Tobin & Blake (1976) visade att prokainets centralnervösa påverkan är dosrelaterad och att hästar är känsligare för prokain än vad människor är. Vid höga doser av prokain sågs kraftiga centralnervösa symtom.

## **Administrering av bensylpenicillin**

### ***Intramuskulär injektion***

Generellt anses i.m. injektion vara säkert och delegering till djurägare för uppföljande behandling med i.m. giva är tillåtet på häst (SJVFS 2002:57, 4§). Dagens praxis inom svensk hästmedicin är att man injicerar i.m. preparat i halsmuskulaturen på vuxna hästar. Till unga föl rekommenderas dock glutealmuskulaturen för att inte påverka diandet. Vid volymer över 20 ml riktas kanylen om för att minska obehaget hos hästen. Efter injektion av prokain-pc i halsmuskeln får man ett högre  $C_{\max}$  samt högre biotillgänglighet än efter injektion i andra muskelgrupper (Firth *et al.*, 1986). Skillnaden i blodtillförsel till musklerna är troligen en bidragande faktor till skillnaden i penicillinets biotillgänglighet. Franklin (1989) visade att om man injicerade penicillin på flera ställen i samma muskel jämfört med en injektionsplats sågs ingen skillnad i absorptionshastighet eller  $C_{\max}$ .

### ***Intravenös injektion***

Vid i.v. giva av bensylpenicillin fås  $C_{\max}$  direkt och penicillinet distribueras och elimineras sedan snabbt (Love *et al.*, 1983; Franklin, 1989). Love *et al.* (1983) visade att Na-pc efter i.v. injektion hade en  $T_{1/2}$  på mellan 0,72 - 0,88 **timmar (h)** och att inom loppet av 1,68 h hade koncentrationen av penicillin sjunkit till 0,5 µg/ml. Dürr (1976) angav halveringstiden för bensylpenicillin efter i.v. giva till 53,3 min ± 4,5 min. För att upprätthålla effekt krävs därför oftast upprepade doseringar av läkemedlet per dygn (se tabell 2). Plumb (2008) anger en lägre dos när infektionen orsakas av en aerob gram<sup>+</sup> och en högre dos när en allvarligare gram<sup>+</sup>-infektion ska behandlas. Användandet av bensylpenicillin i.v. är begränsat till patienter på djursjukhus, då i.v. behandling av häst endast får utföras av behörig personal.

Tabell 2. Rekommenderade doser och dosintervall för Na-pc i.v. till häst. Fetad stil anger vilken enhet författaren använt. – = uppgift saknas

Rekommenderade doser för Na-pc i.v till häst			
Källa	Dos (IE/kg)	Dos (mg/kg)	Dosintervall (h)
Dürr (1976)	35 000	21	-
Wilson (2001)	10 000 - 40 000	6 - 24	4 - 6
Van Erck & Lekeux (2005)	22 000	13,2	6
Fass® vet (2008)	15 000 - 31 730	9,5 - 19	12
Plumb (2008)	10 000 - 20 000	6 - 12	6
	22 000 - 44 000	13,2 - 26,4	6

Dürr (1976) och Love *et al.* (1983) ansåg att i.v. tillförsel av bensylpenicillin sällan är kliniskt applicerbart, då koncentrationen snabbt blev för låg. Eventuellt användningsområde skulle vara en mycket akut situation där en hög koncentration omgående krävs.

Vid i.v. giva av kaliumsaltet av bensylpenicillin har man noterat biverkningar som huvudskakningar, smackningar, tandgnissling, salivering och lindrig kolik (Wilson, 2001). Biverkningarna har kunnat undvikas med infusion av preparatet under en längre tid. Liknande reaktioner har inte setts vid i.v. giva av Na-pc.

### Per os

De flesta former av penicillin kan inte ges p. o. eftersom bensylpenicillin är känsligt för magsäckens sura pH (Horspool & McKellar, 1995; McKellar & Horspool, 1995). Fenoximetylpenicillin, även kallat penicillin V (Plumb, 2008) är stabilt även vid surt pH, men finns idag inte godkänt till häst på den svenska marknaden Penicillin per os medför ökade risker för gastrointestinala störningar hos häst till följd av antibiotikainducerad bakterieöverväxt (Davis, 1987; Horspool & McKellar, 1995; Wilson *et al.*, 1996). Det har visats att det framför allt är *Clostridium spp.* som orsakar problem med överväxt och toxinproduktion (Wilson *et al.*, 1996; Bäverud *et al.*, 1997).

Schwark *et al.* (1983) och Ducharme *et al.* (1983) visade att fenoxymetylpenicillin p. o. med ett dosintervall på 8 h skulle ge en tillräckligt hög serumnivå av penicillin för att avdöda betalaktamkänsliga, gram<sup>+</sup> bakterier. För att få tillräckligt god absorption krävdes att hästarna var svälta innan giva och större doser p. o. jämfört med i.v. behövs för att få terapeutiska serumnivåer (Schwark *et al.*, 1983) även mängden foder i mag-tarmkanalen påverkar biotillgängligheten av penicillin (Wilson, 2001). Penicillin p. o. rekommenderas endast vid icke-livshotande infektion med höggradigt känsliga bakterier eftersom biotillgängligheten är låg och det finns risker med behandlingen (Wilson *et al.*, 1988; Horspool & McKellar, 1995). Baggot *et al.* (1990) ansåg att penicillin per os inte skulle användas till vuxna hästar överhuvudtaget på grund av tarmstörningar.

## Biverkningar

Biverkningar hos hästar som injicerats med Na-pc eller prokain-pc rapporteras in till Läkemedelsverket i Sverige. Akuta symtom varierar allt ifrån skakningar, svettningar, oro och kollaps till att hästen dött (Allpress & Heathcote, 1986; Nielsen *et al.*, 1988; Tjälve, 1989; Olsén *et al.*, 2007). Icke-akuta reaktioner har iakttagits i form av ledsmärta och feber (Westerman *et al.*, 1966). Mellan 1987 och 2008 har cirka 100 biverkningar rapporterats in på hästar efter behandling med prokain-pc eller Na-pc alternativt bensylpenicillinkalium i Sverige (Tjälve, 1988; Tjälve, 1989; Tjälve, 1991; Tjälve, 1996; Tjälve, 1997; Tjälve, 1999; Tjälve, 2000; Tjälve, 2002; Tjälve, 2003; Tjälve, 2004; Tjälve, 2005; Tjälve, 2007; Tjälve, 2009) Ungefär 30 % av fallen resulterade i att hästen dog. För ko har 16 biverkningar på prokain-pc rapporterats mellan åren 2000 och 2008, 11 av dessa kor dog (pers. medd. Tjälve, 2009). Det är troligare att fall med allvarligare biverkningar rapporteras än fall med mildare symtom (Olsén *et al.*, 2007).

Det finns flera orsaker till att hästar kan reagera mycket kraftigt på en injektion av bensylpenicillin. Hästar kan utveckla allergi mot penicillinet, vilket ger en typ av anafylaktisk chock (Davis, 1984; Davis 1987; Wilson 2001). De symtom som då ses är hypotension, bronkospasm, arytmier och/eller kolik. Man har även iakttagit urtikaria och angioödem efter injektion av Na-pc som tros bero på en allergisk reaktion på penicillin (Tjälve, 2002; Olsén *et al.*, 2007). Andelen hästar som är penicillinallergiska är troligen ganska låg (Nielsen *et al.*, 1988; Wilson, 2001; Olsén *et al.*, 2007). De flesta biverkningar på bensylpenicillin som rapporterats är efter injektion med prokain-pc (Tjälve, 1988; Tjälve, 1989; Tjälve, 1991; Tjälve, 1996; Tjälve, 1997; Tjälve, 1999; Tjälve, 2000; Tjälve, 2002; Tjälve, 2003; Tjälve, 2004; Tjälve, 2005; Tjälve, 2007; Tjälve, 2009). Prokain är toxiskt och kan ge hästen kraftiga biverkningar (Chapman *et al.*, 1992). Att en häst får en toxisk nivå av prokain i blodet beror på för snabb upplösning av saltet. Detta kan inträffa om injektion skett i ett mindre kärl i muskeln. Vid upprepade injektioner på samma plats anses risken öka för chock på grund av ökad kärlinväxt (Nielsen *et al.*, 1988). Tobin *et al.* (1977) och Chapman *et al.* (1992) visade att prokain i.v. gav liknande symtom som beskrivits hos penicillinchockande hästar. Nielsen *et al.* (1988) ansåg att flertalet fall av de hästar som reagerat på prokain-pc troligen fått prokainförgiftning. En faktor som styrker teorin om att det är just prokain som ger den kraftiga reaktionen mot prokain-pc är att vissa hästar som fått en penicillinchock och sedan fortsatt får bensylpenicillin inte visar någon negativ reaktion mot preparatet (Nielsen *et al.*, 1988; Olsén *et al.*, 2007).

Det finns idag inga enkla, tydliga test för vilken slags reaktion hästen haft mot prokain-pc (Davis, 1984; Davis 1987). Att injicera en mindre mängd **subcutant (sc.)** för att se en allergisk reaktion har gett både falskt positiva och falskt negativa resultat. Detta fenomen har även iakttagits hos människa (Saxon, 1983). Det går att diagnostisera penicillinallergi via immunologiska testar genom att påvisa antikroppar (Blue *et al.*, 1987; Step *et al.*, 1991), men ingen kliniskt applicerbar metod för häst finns utarbetad. Svårigheten att förutsäga om det är en penicillinallergi eller biverkan av prokain gör att man oftast undviker behandling med penicillin överhuvudtaget vid kraftiga reaktioner efter prokain-pc injektion.

## Farmakokinetik och -dynamik

Penicillinet distribueras efter administrering ut i vävnaderna och kan återfinnas i leder, bukvätska och urin (Stover *et al.*, 1981). Na-pc återfinns även i endometriet hos häst efter injektion i.m. (Allen & Ayliffe, 1981). Blod-hjärnbarriären försvårar penicillin att nå CSN, men vid inflammation i meningerna blir barriären mer genomsläpplig (Han *et al.*, 2002).

Att administrera en för låg dos av ett penicillin gör att en bakteriell infektion inte bekämpas optimalt och infektionen kan återkomma (Powers *et al.*, 1984). Risken finns även att antibiotikaresistens uppstår vid suboptimala doser av antibiotika (Washington, 1979). En ökad koncentration av penicillin ger inte alltid ökad effekt (Powers *et al.*, 1984) dock har penicillin låg toxicitet så biverkningar av höga koncentrationer ses sällan (Nielsen *et al.*, 1988; Fass<sup>®</sup> vet., 2008). Att finna den optimala doseringen bör baseras på flertalet faktorer som avser den specifika infektionen och djurslaget som drabbats. Man bör då ta både farmakokinetiska (PK) och farmakodynamiska (PD) i beaktande (Toutain *et al.*, 2002). PK används för att förutse läkemedlets koncentration i kroppen medan PD beskriver läkemedlets effekt, bland annat bakteriens känslighet mot antibiotika.

### **Minimal inhibitory concentration**

**Minimal inhibitory concentration (MIC)** är ett värde på en bakteries känslighet mot ett visst antibiotikum. Detta mäts *in vitro* och anger i vilken antibiotikakoncentration bakterien inte kan växa. Powers *et al.* (1984) visade att MIC är väsentligt då en dosering av penicillin som understeg MIC gav sämre resultat kliniskt än om doseringen var runt MIC eller över.

När antibiotika finns i blodet kommer en viss del att bindas till proteiner. Endast den fria, icke-proteinbundna, delen är aktiv mot infektion. **Den fria koncentrationen (*f konc*)** över MIC är den koncentration som *in vivo* behövs för att ha effekt. Formeln för uträkning av *f konc* är följande:

$$f\text{ konc} = \text{totalt konc.} - \frac{\text{totalt konc.} \times \text{proteininbindningsgrad (\%)}}{100}$$

För att få fram *f konc* krävs att proteininbindningsgraden i plasma är känd. Litteraturen visar på en plasmaproteininbindningsgrad för bensylpenicillin mellan 52 till 62,8 % hos häst (Keen, 1965; Dürr, 1976; Firth *et al.*, 1986).

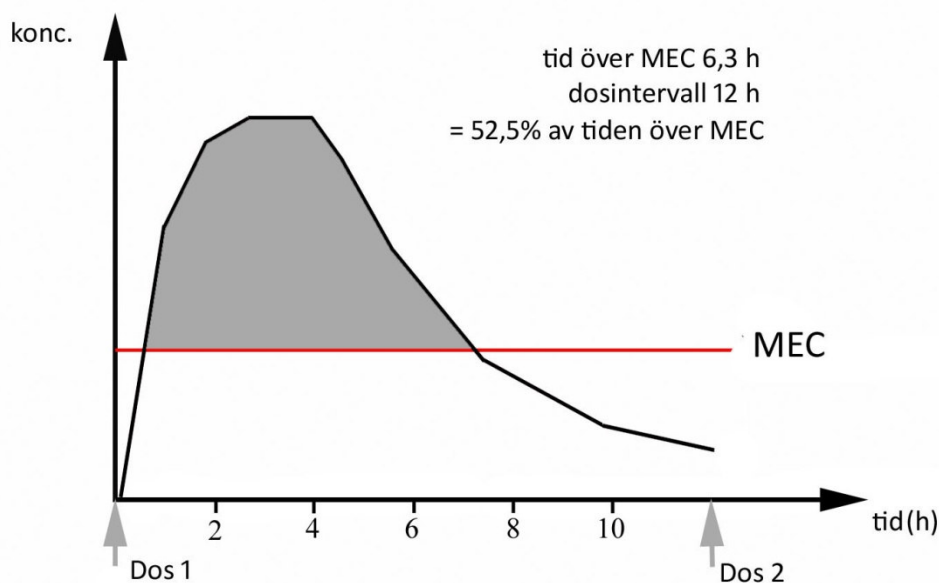
*Staph aureus*, *Strept zooepidemicus* och *Strept equi* valdes ut som patogener. MIC-värden för nämnda patogener för bensylpenicillin visas i tabell 3. Där MIC angavs som ett intervall valdes det högsta värdet för uträkning av PK/PD-index. 0,12 mg/L är den lägsta spädningen som rutinmässigt görs på *Strept zooepidemicus* på SVA, Uppsala (pers. medd. Björn Bengtsson, 2009). För *Staph aureus* avser MIC-värden ”wild-type”.

Tabell 3. Minimal inhibitory concentration för vanliga hästpatogener, med avseende på bensylpenicillin

MIC, bensylpenicillin			
Bakterie	MIC (mg/L)	MIC (ng/ml)	Källa
<i>Staph aureus</i>	0,032 - 0,125	32 - 125	EUCAST (2009)
<i>Strept zooepidemicus</i>	≤ 0,12	≤ 120	SVARM 2008 (2009)
	≤ 0,015	≤ 15	Ensik <i>et al.</i> (1993)
<i>Strept equi</i>	≤ 0,015	≤ 15	Ensik <i>et al.</i> (1993)

### PK/PD-index

Det finns idag matematiska modeller som används för att förutsäga ett läkemedels effekt i kroppen och som integrerar ett läkemedels PK och PD så kallade PK/PD-analyser. För antimikrobiella substanser finns PK/PD-analyser som beskriver de olika substansgruppernas effektivitet. Penicillin är effektivt endast om det finns i tillräcklig koncentration under en längre tid (så kallat tidsberoende) och för alla betalaktamer är **tiden som koncentrationen av läkemedlet överstiger patogenens MIC ( $T_{>MIC}$ )** det främsta PK/PD-indexet (Toutain *et al.*, 2002). För att ta hänsyn till att endast den fria delen av läkemedlet kan ha effekt så uttrycks sambandet som **tiden som den fria koncentrationen av läkemedlet överstiger patogenens MIC ( $fT_{>MIC}$ )** (Mouton, *et al.*, 2005).  $fT_{>MIC}$  anges som en procent av dosintervallet. Figur 1 visar generellt hur  $fT_{>MIC}$  beräknas. För fullgod effekt bör den fria koncentrationen av penicillin vara över MIC 50 % av dosintervallet (Cars, 1997; Toutain *et al.*, 2002). Önskvärt är att nivån är över MIC till 50-80% av tiden mellan två doseringar för optimal antibakteriell effekt. Att hålla koncentrationen av penicillin över MIC under större delen av dosintervallet (>80 %) minskar av allt att döma risken att utveckla resistens (Burgess, 1999).



Figur 1. Den fria koncentrationen ( $f_{konc}$ ) bör för betalaktamer ligga över MIC 50 % av dosintervallet för optimal klinisk effekt.

## **MATERIAL OCH METODER**

Försöket var i förväg granskat och godkänt av Djurförsöksetiska nämnden i Uppsala, C8/88.

### **Djur**

Åtta friska svenska varmblodiga travare användes i studien, tillhörande Institutionen för kliniska vetenskaper vid SLU, Uppsala. Sju av hästarna var ston, en var valack och de vägde mellan 471 och 581kg. Åldern varierade mellan 7 och 17 år.

Hästarna stod under studien i individuella boxar med utfodring av hö. Automatiska vattenkoppar stod för hästarnas vattentillgång och de hade tillgång till daglig utevistelse.

Ingen av hästarna hade medicinerats under minst 10 veckor före försökens genomförande.

### **Försöksplan**

Försöksupplägget följde en så kallad cross-over studie där hästarna först fick ett preparat och efter 19 veckor bytte till det andra preparatet. Hästarna lottades till vilket preparat de skulle få under studiens första del. 4 hästar fick Na-pc (Geepenil vet., Orion Pharma, Sollentuna, Sverige, 24 g blandas till 300 mg/ml) och 4 hästar fick prokain-pc (Penovet<sup>®</sup> vet. Boehringer Ingelheim, Köpenhamn, Danmark, 300 mg/ml). Pc-prokain gavs som positiv kontroll för att kunna utvärdera eventuella biverkningar, men ingår inte i detta arbete.

All penicillin administrerades intramuskulärt i halsmuskulaturen, omväxlande på höger och vänster sida av halsen. Vid injektionsvolym över 20 ml riktades kanylen om för fortsatt injektion.

### **Doser**

När hästarna fick Na-pc injicerades de med 15 mg Geepenil vet. per kg kroppsvikt, vilket motsvarar 14 mg/kg bensylpenicillin. Dosintervallet var 12 h, och injektion skedde sju gånger totalt.

### **Blodprovstagning**

#### ***Permanentkanyl***

Samtliga hästar fick en permanentkanyl i endera *vena jugularis* (14Ga, 13cm Milacath<sup>®</sup>, Mila International Inc., Erlanger, USA). För lokal smärtlindring applicerades topikal bedövningskräm cirka 60 min innan anläggning av permanentkanyl (Emla<sup>®</sup>, Astra Zeneca, Södertälje, Sverige, 25 mg/g lidokain och 25 mg/g prilokain). Insättande av kanylen skedde 12 h innan första injektion. Till permanentkanylen kopplades en förlängningsslang (Discofix<sup>®</sup> C-3, B. Braun, Melsungen, Tyskland).

#### ***Blodprovsprotokoll***

Blodprov togs innan första injektion (0-prov). Därefter togs prov efter 15 och 30 min samt efter 1, 2, 3, 5, 8, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 72.25, 72.5, 73, 74, 75, 77, 80,



84, 96, 108 och 120 h, det vill säga tätare provtagningar efter 1: a och sista (7: e) injektionen.

Allt arbete med proverna skedde med steril teknik. Proven togs ur permanentkanyl med hjälp av 10 ml sprutor (BD Discardit™ II, Becton Dickinson, Fraga, Spanien). Efter att blodprov tagits spolades permanentkanylen med 5-8 ml natriumklorid (Natriumklorid, Fresenius Kabi, Uppsala, Sverige, 9 mg/ml). Steril kanyl (BD Microlance™ 3, Becton Dickinson, Dogheda, Irland, 1,2 x 40 mm) sattes till spruta och blodet fördes över till heparinrör (BD Vacutainer™, LH 102 I. U., Plymouth, Storbritannien, 6 ml) som förvarats på is. Rören centrifugerades snarast i 10 min, 1500 G i 4°C i centrifug (Universal 16R, Hettich, Tuttlingen, Tyskland). Serumet fördes över i förkylda 5 ml plaströr (Sarstedt Tubes 5 ml 75 x 12 mmØ) och förvarades i frys med temperaturen -80°C tills analys av läkemedel.

### **Analys av penicillin**

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMSMS) utfördes på **Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA)**, Uppsala för analys av bensylpenicillin i plasma. Samma instrumentering och metod användes som i pilotstudien utförd av Lindberg (2008). För vidare information angående metoden se Lindberg (2008).

### **Plasmaproteinbindning**

Innan användning av Centrifree® YM-30 gjordes kontroll att bensylpenicillin ej hade affinitet till filter eller andra delar av Centrifree® YM-30. Buffert (Hank's Balanced Salt Solution, HBSS, 10 mM HEPES pH 7,4, sterilfiltrerad) med bensylpenicillin använde. Ett prov analyserades innan filtrering och två prover analyserades efter filtrering. Ingen signifikant skillnad i koncentration sågs i de olika proverna och ingen bindning till YM-30 förelåg.

Kontroll av lagringsstabilitet hos penicillin i 37 °C utfördes. Plasma med en tillsatt känd koncentration av bensylpenicillin analyserades efter 0, 15, 30, 45 respektive 60 min i ett 37-gradigt vattenbad. Ingen signifikant skillnad sågs i bensylpenicillinkoncentrationen i de olika proverna, därmed ansågs hållbarheten vara god fram till minst 60 min i 37 °C.

För proteinbindningsanalysen togs blodprov 1 och 8 h efter första injektion på de hästar som injicerats med Na-pc. 20 ml sprutor (Omnifix®, B. Braun, Melsungen, Tyskland) och heparinrör av större storlek (BD Vacutainer™, NH 170 I. U., Plymouth, Storbritannien, 10 ml alternativt Venoject® NH, Terumo, Leuven, Belgien, 10 ml) användes. Tidpunkterna valdes för att mäta proteinbindning vid en hög bensylpenicillinkoncentration i plasma och för mätning vid en låg koncentration. Proverna centrifugerades omgående, för att behålla pH stabilt, i 37 °C i centrifug (EBA 20, Hettich, Tuttlingen, Tyskland) under 1500 G i 20 min. 1 ml serum överfördes med hjälp av kanyl (Sterican®, B. Braun, Melsungen, Tyskland, 0,9 x 40 mm) till vardera rör för ultrafiltrering, totalt fyra rör per häst (Centrifree® YM-30, Millipore, Carrigtwohill, Irland). Rören centrifugerades 25 min i 1500 G i 37°C. Ultrafiltratet frystes ner direkt i frys med temperaturen -80°C tills analys utfärdades på dem.

Varje provtagningstillfälle gav 4 ultrafiltrat för analys av penicillin per häst. Penicillinkoncentrationen bestämdes på samma sätt som angivits under rubriken 'Analys av penicillin'. Proteinbindningen räknades ut med hjälp av nedanstående formel:

$$\text{Proteininbindning \%} = \frac{\text{Total koncentration} - \text{fri koncentration}}{\text{Total koncentration}} \times 100$$

Ett medelvärde på proteininbindning per häst och provtagningstillfälle räknades ut. Medelvärde och standardavvikelse bestämdes för vardera mätning.

### Farmakokinetisk analys

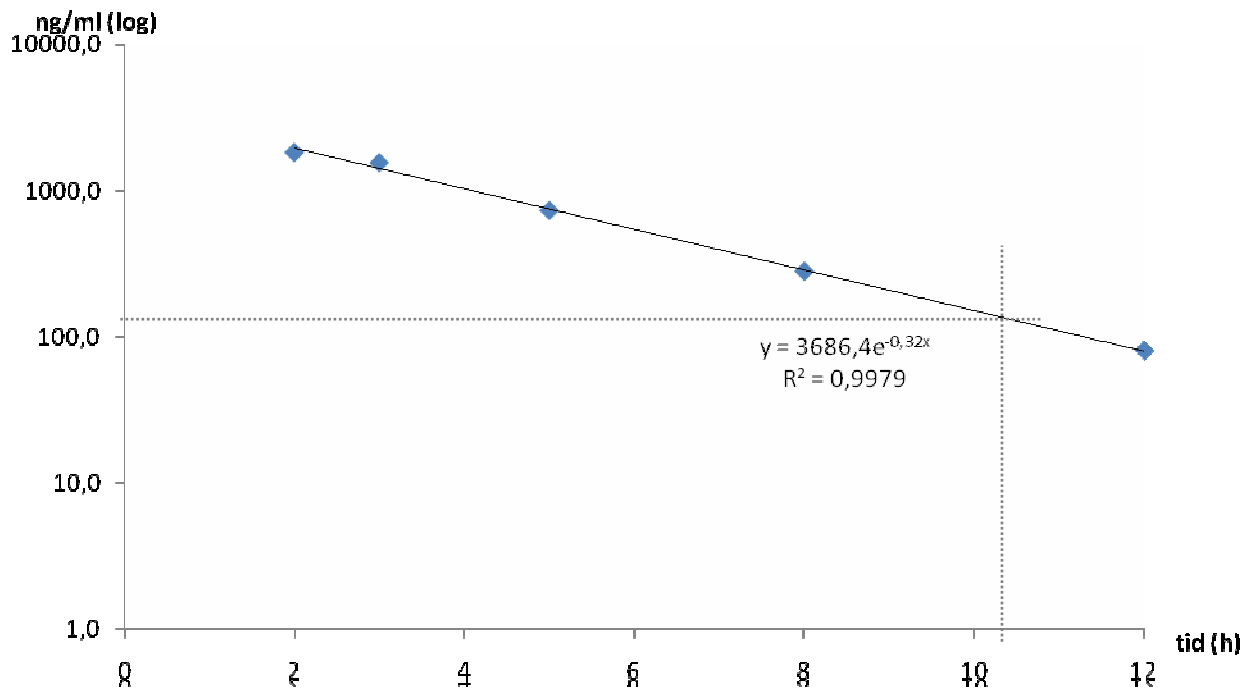
Datorprogrammet WinNonlin<sup>®</sup> (version 5.0.1, Pharsight<sup>®</sup>, St. Louis, Missouri, USA) användes för framtagandet av farmakokinetiska parametrar. Analyserna utfördes för varje häst och skedde med hjälp av en "non-compartment"-modell. De parametrar som fastställdes var  $C_{\max}$ , **tiden när högsta koncentration i blodet nås ( $T_{\max}$ )** och  $T_{1/2}$ . Halveringstiden beräknades via lambda ( $\lambda$ ) för terminala fasen av koncentrationskurvan för var häst av programmet WinNonlin, ( $T_{1/2} = \ln 2 / \lambda$ ). **Lägst koncentrationen av bensylpenicillin i blodet ( $C_{\min}$ )**, proteininbindningsgrad och **standardavvikelser (SD)** bestämdes med hjälp av datorprogrammet Microsoft Office Excel (version 2007, Microsoft<sup>®</sup>, Redmond, Washington, USA).

QuickCalc (GraphPad<sup>®</sup>, 2010) användes för parade t-test av de farmakokinetiska värdena. Signifikansnivå satt till  $P < 0,05$ .

### Tid över MIC

$f T >_{\text{MIC}}$  bestämdes med hjälp av Microsoft Office Excel. Den fria koncentrationen av bensylpenicillin efter första och sjunde injektion av Na-pc ritades i en graf. Tiden 2 till 12 h efter injektion användas för beräkning av en exponentiell trendlinje för var hästs koncentrationskurva, för respektive injektion. Formel för trendlinjen angavs av programmet och denna användes för fortsatt beräkning (se figur 2 och beräkning 1).  $f T >_{\text{MIC}}$  togs fram för de tre utvalda patogenerna, för samtliga hästar efter första injektion och för sju hästar efter sjunde injektion.

Hästarnas fria plasmakoncentration av bensylpenicillin beräknades med en proteininbindning 62,8 %. Tiden till att koncentrationen översteg MIC sattes till 0,25 h från injektion för samtliga MIC, samtliga hästar.



Figur 2. *Fria* bensylpenicillinkoncentration 2 till 12 h efter första injektion hos häst 7 (logaritmerad). Formeln avser trendlinjen (heldragen linje). Streckad linje avser tiden när koncentrationen 125 ng/ml understigs.

Beräkning 1. Exempel på framtagning  $fT > MIC$ . Exemplet avser häst 7 efter första injektion.

$$y = 3686,4e^{-0,32x} \Rightarrow x = (\ln(y / 3686,4)) / -0,32$$

$x$  anger tiden när koncentrationen  $y$  nås

MIC = 125 ng/ml för bensylpenicillin *Staph aureus*, 125 sätts som  $y$

$$x = (\ln(125 / 3686,4)) / -0,32 \approx 10,57 \text{ h}$$

efter drygt 10 h är serumkoncentrationen under MIC för *Staph aureus* hos häst 7 efter första injektion

$$10,57 - 0,25 = 10,32 \text{ h}$$

tid när koncentrationen 125 ng/ml nås minus tid tills MIC överstigs

$$\text{tid över MIC} \frac{10,32 \text{ h}}{12 \text{ h}} = 86,1 \%$$

$fT > MIC$  är i detta exempel 86,1 %

## RESULTAT

En häst (häst 6) injicerades endast 5 gånger med Na-pc. Hästen utgick på grund av kraftiga biverkningar i form av svullnad på injektionsplatsen samt smärta och obehag efter injektion. Resultaten för häst 6 är inkluderade mellan timme 0 och 48, då denne efter givan vid 48 h utgick ur studien. Endast bensylpenicillin efter giva av Na-pc analyserades.

## Farmakokinetik

### Maxkoncentration, $C_{max}$

$C_{max}$  beräknades för samtliga hästar efter första injektion och för sju av hästarna efter sjunde injektionen av Na-pc.  $C_{max}$  varierade mellan 9 553 ng/ml och 23 341 ng/ml, (se tabell 4) med ett medel på 14 600 ng/ml över hela studien. Det parade t-testet gav  $t = 0,4958$ , **degrees of freedom (d. f.) = 6**, **confidence interval (c. i.)** med 95 % = -7 833,8 till 5 194,2 och  $P = 0,638$ . Ingen signifikant skillnad i  $C_{max}$  sågs därmed mellan de två injektionerna.

Tabell 4.  $C_{max}$  angivna i ng/ml efter första och sjunde injektion av Na-pc. Medelvärdet för vardera tillfälle med standardavvikelsen angiven

Maxkoncentration, $C_{max}$		
	Efter 1: a inj. (ng/ml)	Efter 7: e inj. (ng/ml)
Häst 1	13 713	20 140
Häst 2	10 067	10 547
Häst 3	9 553	18 010
Häst 4	19 174	15 441
Häst 5	10 449	15 885
Häst 6	10 404	
Häst 7	13 382	17 300
Häst 8	23 341	11 595
Medel ± SD	<b>13 760</b> <b>± 4 675</b>	<b>15 560</b> <b>± 3 990</b>

### Tid vid maxkoncentration, $T_{max}$

$C_{max}$  sågs i blodprov tagna från 15 till 60 min efter första och sjunde injektion (se tabell 5). Tiden då maxkoncentration av penicillin i plasma uppnåddes,  $T_{max}$ , var i medel 24,4 min efter första injektion och efter sjunde injektion 21,4 min, med ett sammanlagt medel på  $23,0 \pm 12,1$  min. Medianvärdet för  $T_{max}$  var 15 min efter injektion efter både första och sjunde injektion.  $P = 0,6036$ ,  $t = 0,54$  d. f. = 6 och c. i. 95 % = -0,19 till 0,12 i parade t-test av  $T_{max}$ . Ingen signifikant skillnad funnen mellan  $T_{max}$  vid första respektive sjunde injektion.

Tabell 5.  $T_{max}$  angivet i timmar efter första respektive sjunde injektion av Na-pc. Medelvärdet med standardavvikelse och median för vardera tillfälle angivna

Tid vid maxkoncentration, $T_{max}$		
	Efter 1: a inj. (h)	Efter 7: e inj. (h)
Häst 1	0,25	0,25
Häst 2	0,5	0,5
Häst 3	0,25	0,25
Häst 4	0,25	0,25
Häst 5	0,25	0,5
Häst 6	1	
Häst 7	0,5	0,25
Häst 8	0,25	0,5
Medel ± SD	<b>0,41</b> ± <b>0,24</b>	<b>0,38</b> ± <b>0,12</b>
Median	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>

### Halveringstid, $T_{1/2}$

Halveringstiden fastställdes för Na-pc efter i.m. injektion efter första och sjunde injektion till 2,00 h ± 0,25 (se tabell 6). Ytterligheter i värdena för  $T_{1/2}$  var 1,45 h respektive 2,31 h. Medelvärdet efter första injektion var 2,03 h och efter sjunde 1,97 h. Parat t-test visade ingen signifikant skillnad på  $T_{1/2}$  mellan första och sjunde injektion ( $P = 0,8256$ ,  $t = 0,2301$ , d. f. = 6, c. i. 95 % = -0,40 till 0,48).

Tabell 6.  $T_{1/2}$  angivet i timmar efter första respektive sjunde injektion av Na-pc. Medelvärdet med standardavvikelse för vardera tillfälle angivna

Halveringstid, $T_{1/2}$		
	Efter 1: a inj. (h)	Efter 7: e inj. (h)
Häst 1	2,25	2,18
Häst 2	1,69	2,31
Häst 3	2,27	1,56
Häst 4	2,11	1,91
Häst 5	2,13	1,94
Häst 6	2,18	
Häst 7	2,17	1,87
Häst 8	1,45	2,01
Medel ± SD	<b>2,03</b> ± <b>0,28</b>	<b>1,97</b> ± <b>0,22</b>

### Lägsta koncentration, $C_{min}$

Bensylpenicillinkoncentration 12 h efter första till femte injektion,  $C_{min}$ , uppmättes hos samtliga hästar. 12 h efter sjätte och sjunde injektion uppmättes  $C_{min}$ -värdet för sju av de åtta hästarna. Medelvärdet för  $C_{min}$  samtliga hästar, samtliga angivna tillfällen var 281,1 ng/ml (se tabell 7). Vid tiden 108 h (36 h efter sista injektion) var penicillinkoncentrationen under detekterbar nivå hos de 7 hästarna. Den häst som utgick ur studien vid 48 h fick icke-detekterbara nivåer av penicillin 24 h efter sin sista injektion.

Tabell 7.  $C_{min}$  efter första till sjunde injektion av Na-pc. Högsta uppmätta värde svarar för den häst som vid tillfället hade högst koncentration av bensylpenicillin i serum. Samma princip gäller för de lägsta värdena. Inom parantes anges vilken häst som siffran avser

Lägsta koncentration, $C_{min}$							
	1: a inj (ng/ml)	2: a inj (ng/ml)	3: e inj (ng/ml)	4: e inj (ng/ml)	5: e inj (ng/ml)	6: e inj (ng/ml)	7: e inj (ng/ml)
Högsta uppmätta värdet	271,8 (häst 5)	929,8 (häst 1)	434,9 (häst 2)	677,7 (häst 3)	535,9 (häst 2)	548,0 (häst 8)	232,4 (häst 8)
Lägsta uppmätta värdet	36,9 (häst 8)	52,8 (häst 4)	37,9 (häst 4)	84,4 (häst 6)	37,9 (häst 4)	24,7 (häst 4)	72,4 (häst 3)
Medel ± SD	173,3 ± 83,5	423,2 ± 231,6	213,5 ± 119,1	451,6 ± 194,6	293,8 ± 176,4	236,2 ± 161,6	156,2 ± 55,7

### Proteininbindning

Proteininbindningsgraden varierade mellan 59,4 och 65,2 % med ett medelvärde på 62,8 %, SD ± 1,8 för samtliga hästar, båda mättillfällena (se tabell 8). Parat t-test visade signifikant skillnad mellan tillfällena, med  $P = 0,0189$  ( $t = 3,03$ , d. f. = 7, c. i. 95 % = -1,96 till -0,24). Vid första mätning var plasmakoncentrationen av bensylpenicillin hög och vid andra tillfället var den låg. Medelvärdet för koncentration av bensylpenicillin var för samtliga hästar 1 h efter deras första Na-pc giva 9 068,0 ng/ml, och efter 8 h 703,5 ng/ml.

Tabell 8. Proteininbindning av bensylpenicillin i plasma, angivet i procent, uppmätt 1 respektive 8 h efter första injektion

Proteininbindning		
	1 h efter 1: a inj. (%)	8 h efter 1: a inj. (%)
Häst 1	64,2	64,7
Häst 2	60,2	59,4
Häst 3	63,1	64,6
Häst 4	61,7	64,0
Häst 5	60,0	61,2
Häst 6	63	65,0
Häst 7	63,5	65,2
Häst 8	62,2	62,4
Medel ± SD	62,2 ± 1,4	63,3 ± 2,0

### Tid över MIC

$f T > MIC$  för samtliga hästar bestämdes för första dosintervallet (se tabell 9). Efter sjunde injektionen av Na-pc fastställdes  $f T > MIC$  för sju av hästarna. Av de 15  $f T > MIC$  som genomfördes för *Staph aureus* var sju stycken 80 % eller högre, för *Strept zooepidemicus* låg nio av värdena över 80 % för  $f T > MIC$ . För *Strept equi* låg den fria koncentrationen av bensylpenicillin över MIC under hela dosintervallet.

Tabell 9. PK/PD-indexet  $f T > MIC$  för olika vanliga hästpatogener känsliga för bensylpenicillin. Siffrorna är angivna i %

$f T > MIC$				
	<i>Staph aureus</i> (%)	<i>Strept zooepidemicus</i> (%)	<i>Strept equi</i> (%)	
Häst 1 efter 1: a inj efter 7: e inj	87,9	89	145,3	
	79,6	80,7	135,2	
Häst 2 efter 1: a inj efter 7: e inj	72,6	73,5	115,8	
	85,7	86,8	140,1	
Häst 3 efter 1: a inj efter 7: e inj	92,5	93,6	147,6	
	64,8	65,5	104,6	
Häst 4 efter 1: a inj efter 7: e inj	65,4	66,4	119,2	
	68	68,9	116,7	
Häst 5 efter 1: a inj efter 7: e inj	94,8	95,9	149,1	
	77,9	78,9	127,5	
Häst 6 efter 1: a inj efter 7: e inj	83,6	84,7	139,2	
Häst 7 efter 1: a inj efter 7: e inj	86,1	87,1	141,3	
	69,1	70	116,8	
Häst 8 efter 1: a inj efter 7: e inj	55,4	56,1	92,5	
	83,6	84,6	137,2	
Medel ± SD	77,8 ± 11,0	78,8 ± 11,2	128,5 ± 37,0	

### DISKUSSION

Det finns ett större behov av ett behandlingsalternativ till prokain-pc än tidigare. För ökad djurvälstånd och förbättrat djurskydd krävs minskade biverkningar efter behandling med bensylpenicillin. Resistensutvecklingen är ett faktum och antibiotika med smalt spektrum ska användas när det är möjligt. Hästar som visat på reaktion på prokain-pc och som ska vårdas av djurägare får på grund av brist på parenteralt alternativ idag ofta en oral beredningsform utskrivnen. Det enda alternativ som finns till vuxna hästar i Sverige idag är då **trimetoprim i kombination med sulfonamid (trim-sulfa)** (Fass<sup>®</sup> vet., 2008). Trim-sulfa har ett betydligare bredare antimikrobiellt spektrum än penicillin och är ur resistenssynpunkt ett sämre val. *Streptococcus spp.* är vanliga patogener hos häst och ca 20-50 % av stammarna i kliniska tracheaprover har de senaste 10 åren varit resistenta mot trim-sulfa, men varit känsliga för penicillin (SVARM 2008, 2009). Det är visat att mot *Strept zooepidemicus* kan penicillin vara mer effektivt än trim-sulfa vad gäller att bekämpa infektion (Ensik *et al.*, 2003). Det är rekommenderat

att vid betahemolyserande streptokocker alltid använda bensylpenicillin som förstahandsval och att trim-sulfaalternativ endast ska användas där penicillin inte kan användas av någon anledning (Wilson, 2001). Antibiotika som ges oralt till häst ökar risken för påverkan på den gastrointestinalfloran, vilket kan leda till allvarliga konsekvenser så som överväxt av *Clostridium spp.* i tarmen (Wilson *et al.*, 1996; Båverud *et al.*, 1997). Det är ur både djurets välfärd och det generella resistensläget att föredra parenteral bensylpenicillin framför trim-sulfa.

Ett behandlingsalternativ med ett penicillinpreparat utan prokain som djurägare kan administrera parenteral bör tas fram. Att injicera Na-pc i.m. har traditionellt skett till nötkreatur, medan hos häst har i.m. injektion skett nästan uteslutande med prokain-pc. Det är inte klarlagt om man för att undvika en del av fallen med "penicillinchock" kan ge Na-pc i.m. och därmed undvika prokaindelen. Hästar som chokat på prokain-pc kan i många fall fortsättningsvis behandlas med Na-pc vilket kan tyda på att behandling med Na-pc kan reducera antalet penicillinchocker. Fallen med sann penicillinallergi kan dock inte undvikas. Fåtal studier är gjorda på Na-pc i.m. på häst. English (1965) och Love *et al.* (1983) ansåg att en i.m. injektion av Na-pc i.m. skulle ges ihop med prokain-pc initialt i en behandling. Detta för att snabbt få upp koncentrationen av penicillin i blodet som sedan hålls uppe tack vare prokain-pc. Att använda enbart Na-pc i.m. diskuterade de inte. Allen & Ayliffe (1981) gav i sin studie Na-pc i.m. till hästar, men kontrollerade då nivåerna av penicillin i endometrium och inte dosering för behandling eller biverkningar. Fler studier som tydligt visar på terapeutiskt resultat hos infekterade hästar behövs för att utvärdera Na-pc i.m. som ett kliniskt applicerbart alternativ. Då Na-pc inte innehåller en smärtlindrande komponent, så som prokain-pc gör, bör utredning av eventuell smärta i samband med injektionen ske.

Blodprov togs omedelbart innan injektion av Na-pc, för att kontrollera  $C_{min}$  under studien. Efter första och sjunde injektion togs blodprov 15 och 30 min samt 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, och 8 h efter injektion som angetts ovan. Detta för att kunna jämföra Na-pc farmakologiska parametrar efter första och sjunde injektion. I denna studie sågs inga signifikanta förändringar i  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  eller  $T_{1/2}$  mellan första och sjunde injektion. Viss reaktion kan fås vid intramuskulär injektion på häst, men ingen påverkan iaktogs på de farmakokinetiska värdena i vår studie från en eventuell reaktion. Halveringstiden var längre både efter första och sjunde i.m. injektion hos studiens hästar jämfört med halveringstiden som angetts efter i.v. injektion av Na-pc. Uboh *et al.* (2000) anger halveringstiden på bensylpenicillinkalium till 12,9 h efter injektion i.m. vilket är klart längre än denna studies halveringstid på cirka 2 h. Uboh *et al.* gav prokain i.m. samtidigt med bensylpenicillinkalium. Det framgår ej var prokainet gavs och om prokainet hade möjlighet att bilda ett salt med bensylpenicillin. Om prokain och penicillin bildade ett salt kan en depåeffekt skett, vilket kan ha påverkat halveringstiden.

Proteininbindning för bensylpenicillin varierar mellan 52 och 62,8 % i litteraturen. Variationen i proteininbindningsgrad är stor och kan bero på brist på kontroll av pH och temperatur under försöken. Firth *et al.* (1986) beskriver inte sin metod och därför är deras värde på  $57,3 \pm 7,3$  % svårt att värdera. Proteininbindningsgraden i vår studie var  $62,8 \pm 1,8$  % och har applicerats i våra PK/PD-index. Proteininbindningsgraden är framtaget under en kontrollerad temperatur och utfördes omgående efter blodprovstagning för att behålla ett stabilt pH och



proverna frystes ner inom 60 min. En statistisk signifikant skillnad sågs mellan proverna tagna 1 h efter injektion av pc (höga serumkoncentrationer) och efter 8 h (låga serumkoncentrationer). Skillnaden var dock mycket liten, och har troligen liten klinisk relevans vad gäller behandling av infektioner med bensylpenicillin. Ingen av de tidigare studierna av bensylpenicillin med avseende på proteininbindning har testat skillnad vid olika koncentrationer. Keen (1965) tittade endast på 2 hästar och Firth *et al.* (1986) anger inte hur många prover som analyserats för proteininbindning. Den metod som användes i det här arbetet är tidigare ej beskriven, de kontrollprover som gjordes innan studien visade på stabilitet i koncentration vid analys. Vid bakteriell kontaminering finns risken att penicillin bryts ner i provmaterial, troligen på grund av betalaktamaser (Wiese & Martin, 1989). Sterilteknik användes under arbetet med blodproverna för att undvika kontaminering av proverna.

Syftet med denna studie var att se om den fria koncentrationen av Na-pc kunde kvarstå över MIC under större delen av dosintervallet efter i.m. administrering till häst. Önskvärt är att koncentrationen upprätthållas i mer än 50 % av dosintervallet på 12 h. I vår studie fann vi att samtliga hästar hade  $fT_{>MIC}$  som var 50 % eller mer för *Staph aureus*, *Strept zooepidemicus* och *Strept equi*. Medelvärde för  $fT_{>MIC}$  för *Strept zooepidemicus* var 78,8 % anses vara klart tillfredsställande. För *Strept equi* var  $fT_{>MIC}$  över 100 % och för *Staph aureus* 77,8 %. Att  $fT_{>MIC}$  är över de rekommenderade nivåerna på  $\leq 50$  % gör att Na-pc i.m. troligen ur en farmakokinetisk synvinkel kan vara kliniskt användbart vid infektion med penicillinkänsliga bakterier hos häst. Vissa forskare anser att över 80 % är optimalt för att inte få resistensutveckling, en siffra som ligger nära de resultat denna studie visar. *Staph aureus* har ett resistensläge som visar en ökad resistens mot betalaktamaser. Det MIC som redovisas i denna studie avser den penicillinkänsliga *Staph aureus* ("wild-type"), och gäller inte generellt för patogenen. Multiresistenta *Staph aureus* har hittats hos häst i Sverige och där kan ej bensylpenicillin användas vid infektion (SVARM 2008, 2009).

I studien användes 0,25 h som den tid det tog innan MIC överstegs i samtliga hästar, alla tre bakterier, vilket är baserat på studiens  $T_{max}$  median. Medelvärde för  $T_{max}$  var  $0,38 \pm 0,2$  h. Differenser beror på att blodprov togs vid 0,25; 0,5 och 1 h och den häst som fick sitt  $T_{max}$  vid 1 h kraftigt drog upp medel. På grund av få blodprov kunde ingen exaktare tid för när  $T_{max}$  inföll tas fram. För att få fram exaktare värde skulle fler blodprover behöva tas direkt efter injektion, då koncentrationen av penicillin snabbt ändras. Att koncentrationen i serum översteg MIC vid 0,25 h är ett antagande. En häst nådde inte  $T_{max}$  förrän 1 h efter första injektion, men hade i sitt blodprov vid 0,25 h efter första injektion 6 541,3 ng bensylpenicillin/ml, vilket är 4 106,6 ng icke-proteinbundet bensylpenicillin per ml serum. Detta ger en indikation om att tiden till att koncentrationen överstiger MIC är kortare än antaget i detta arbete.

$C_{min}$ -värdena var mellan 24,7 och 929 ng/ml 12 h efter injektion. Att ha längre dosintervall än 12 h bör därför inte rekommenderas för patogener med MIC runt 125 ng/ml. Vissa forskare har använt sig av ett dosintervall på mellan 4 och 6 h vid experimentell användning av Na-pc i.m. utan att beskriva hur de tagit fram den siffran. Det är svårt att jämföra studiens doseringsintervall med andra studier av den anledningen. Att beakta är även att MIC-värden förändras och bakterier

utvecklar resistens, detta gör att denna studie är aktuell endast när bakterier med samma känslighet som nämnts ska behandlas.

Den fria delen av penicillin i serum har antagits är av samma koncentration som i det extracellulära rummet. Penicillin kan normalt inte passera barriärer såsom blodhjärnbarriären och blod-testisbarriären vilket gör att resultaten endast kan appliceras på infektioner i områden dit penicillin kan diffundera. Farmakokinetiskt är troligen Na-pc i.m. lämpligt till häst, men om det är kliniskt applicerbart är ej besvarat i detta arbete. De hästar som användes i studien var uteslutande friska hästar. Farmakologiska parametrarna kan eventuellt ändras hos en sjuk häst som ska behandlas.

Andra delar av projektet, som den här studien är en del av, bör redovisa sina resultat innan tydligare slutsatser om Na-pc i.m. kan dras. Vidare bör kliniska studier även utföras för att se behandlingsresultat.  $fT_{>MIC}$  för dosintervallet 12 h anses tillräckligt för vanligt förekommande penicillinkänsliga hästpatogener.

## **SLUTSATSER**

Resultaten i denna studie indikerar att behandling med Na-pc i.m. var 12:e timma kan upprätthålla serumkoncentrationer som överstiger MIC för penicillinkänsliga bakterier i tillfredsställande stor andel av dosintervallet hos häst. Na-pc i.m. kan utföras av djurägaren själva vilket gör alternativet mer attraktivt för fältarbetande veterinärer och minskar behovet av remittering till djursjukhus för i.v. behandling med bensylpenicillin. Om Na-pc i.m. kan vara ett alternativ till behandling med prokain-pc där penicillin fortfarande är första val av antibiotika beror på fler faktorer än farmakokinetik och farmakodynamik. Innan rekommendation av Na-pc i.m. måste eventuella lokala biverkningar som smärta i samband med injektionen utvärderas.

## **TACK**

Jag vill rikta ett enormt tack till mina handledare – Lena och Carina. Er glädje för ämnet, Er humor och envishet har gett mig enormt med inspiration och energi. Lena fortsätt med dina ”silly walks” och se till att bota din hästskräck. Carina, jag imponeras av hur lugn du är i alla lägen. När jag blir stor vill jag bli som du.

Tack även till alla Ni andra som var engagerade i projektet; Anna Berg, Hanna Bremer, Hasse Broström, Johan Bröjer och Kia Nostell. Ni gjorde arbetet under projektveckorna roliga och lärorika. Lycka till med Era bitar av projektet!

Ett stort tack till djurvårdarna på OG och IME för att Ni gjorde allt för att vårt projekt skulle gå smidigt som möjligt.

Tack också till berörda parter på institutionen för obstetrik och gynekologi. Hade det inte varit för er hade jag aldrig hamnat i det här roliga projektet.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Adamson, P. J. W., Wilson, W. D., Hirsch, D. C., Baggot, J. D. & Martin, L. D. (1985)** Susceptibility of equine bacterial isolates to antimicrobial agents. *Am J Vet Res* Vol. 46, February: 447-450
- Allen, W. E. & Ayliffe, T. R. (1981)** Effect of repeated biopsy sampling on endometrial concentrations of sodium benzylpenicillin following intramuscular injection in ponies. *Res Vet Sci* 31: 281-283
- Allpress, R. G. & Heathcote, R. (1986)** Adverse reactions in horses to intramuscular penicillin. *Vet Rec* Oct 18; 119 (16): 411-412
- Baggot, J. D. Love, D. N., Raus, J. & Rose, R. J. (1990)** Oral dosage of penicillin V in adult horses and foals. *Equine Vet J* 22 (4): 290-292
- Bengtsson, Björn.** Enheten för djurhälsa och antibiotikafrågor, SVA, Uppsala.  
**Personligt meddelande**, december 2009
- Blue, J. T., Dinsmore, R. P. & Anderson, K. L. (1987)** Immune-mediated haemolytic anemia induced by penicillin in horses. *Cornell Vet* 77: 263-276
- Bröjer, Johan.** Institutionen för kliniska vetenskaper, avd för diagnostik och stordjur; hästmedicin, SLU, Uppsala. **Personligt meddelande**, februari 2010
- Burgess, D. S. (1999)** Pharmacodynamic Principles of Antimicrobial Therapy in the Prevention of Resistance. *Chest* 115 supplement, 3, March: 19S-23S
- Burton, S., Reid-Smith, R., McClure, J. T. & Weese, J. S. (2008)** *Staphylococcus aureus* colonization in healthy horses in Atlantic Canada. *Can Vet* 49: 797 - 799
- Båverud, V., Gustafsson, A., Franklin, A., Lindholm, A. & Gunnarsson, A. (1997)** *Clostridium difficile* associated with acute colitis in mature horses treated with antibiotics. *Equine Vet J* 29 (4): 279-284
- Cars, O. (1997)** Efficacy of Beta-lactam Antibiotics: Integration of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2: 29-33
- Chapman, C. B., Courage, P., Nielsen, I. L., Sitaram, B. R. & Huntington, P. J. (1992)** The role of procaine in adverse reaction to procaine penicillin in horses. *Aust Vet J* Vol. 69, No. 6, June: 129-133
- Clark, C., Greenwood, S., Boison, J. O, Chirino-Trejo, M. & Dowling, P. M. (2008)** Bacterial isolates from equine infections in western Canada (1998-2003) *Can Vet J* Vol. 49, No. 2, February: 153-160
- Craig W. A. & Ebert S. C. (1989)** Protein binding and its significance in antibacterial therapy. *Infect Dis Clin North Am* 3: 407-414
- Davis, L. E. (1984)** Hypersensitivity reactions induced by antimicrobial drugs. *JAVMA* Vol. 185, No. 10, November 15: 1131-1136
- Davis, L. E (1987)** Adverse Drug Reaction in the Horse. *Vet Clin N Am [Equine Pract]* Vol. 3, No. 1, April: 153-179
- Doll, E. R. (1946)** Penicillin Dosage and Blood Levels for Horses. *JAVMA* Vol. 108, No. 829, April: 209 - 214
- Ducharme, N. G., Dill, S. G., Shin, S. J., Schwark, W. S., Ducharme, G. R. & Beilman, W. W. (1983)** Phenoxymethyl Penicillin in the Horse: An Alternative to Parenteral Administration of Penicillin. *Can J Comp Med* 47: 436 - 439
- Dürr, A. (1976)** Comparison of the pharmacokinetics of penicillin G & ampicillin in the horse. *Res Vet Sci* 20: 24-29

- English, P. B.** (1965) The therapeutic use of penicillin: the relationship between dose rate and plasma concentration after parenteral administration of benzylpenicillin. *Vet Rec* Vol. 77, No. 28, July: 810 - 814
- Ensik, J. M., Van Klingeren, B. Houwers, D. J., Klein, W. R. & Vulto, A. G.** (1993) In-vitro susceptibility to antimicrobial drugs of bacterial isolates from horses in the Netherlands. *Equine Vet J* 25 (4): 309-313
- Ensik, J. M., Smit, J. A. H. & van Duijkeren, E.** (2003) Clinical efficacy of trimethoprim/sulfadiazine and procaine penicillin G in a *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection model in ponies. *J vet Pharmacol Therap* Aug 26 (4): 247-252
- Firth, E. C., Nouws, F. M., Driessens, F., Schmaetz, P., Peperkamp, K. & Klein, W. R.** (1986) Effect of the injection site on the pharmacokinetics of procaine penicillin G in horses. *Am J Vet res* Vol. 47, No. 11, November: 2380-2384
- Franklin, A.** (1989) Prokain-penicillin G & kalium-penicillin G i plasma och synovia hos häst. *Svensk Veterinärtidning* 41, 1: 27-32
- Giguère, S., Prescott, J. F., Baggot, J. D., Walker, R. D. & Dowling, P. M.** (Eds.) (2006) *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, 4<sup>th</sup> ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. ISBN: 978-0-8138-0656-3
- Han, H., Kim, S-G., Lee, M-G., Shim, C-K. & Chung, S-J.** (2002) Mechanism of the reduced elimination clearance of benzylpenicillin from cerebrospinal fluid in rats with intracisternal administration of lipopolysaccharide
- Horspool, L. J. I. & McKellar, Q. A.** (1995) Disposition of penicillin G Sodium following intravenous and oral administration to *Equidae*. *Br vet J* 151: 401-412
- Keen, P. M.** (1965) The binding of three penicillins in the plasma of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature. *Brit J Pharmacol*, 25, 507-514
- Kuchembuck, N. L., Colahan, P. T., Zientek, K. D., Pirman, D. A., Wegner, K. & Cole, C. A.** (2007) Plasma concentration and local anaesthetic activity of procaine hydrochloride following subcutaneous administration to horses. *AJVR* Vol. 68, No. 5, May: 495-500
- LIF, Läkemedelsindustriföreningen (2008) **Fass<sup>®</sup> vet.** 2009: Stockholm  
Läkemedelsindustriföreningen ISSN 0347-1136/ISBN 978-91-85929-01-6
- Lindberg, J.** (2008) *En farmakologisk pilotstudie av olika bensylpenicillin intramuskulärt till häst*. Examensarbete 2009:22, Uppsala: Sverige  
Lantbruksuniversitet. ISSN: 1652-8697
- Love, D. N., Rose, R. J., Martin, C. A. & Bailey, M.** (1983) Serum concentration of penicillin in the horse after administration of a variety of penicillin preparations. *Equine vet J* 15(1): 43-48
- McKellar, Q. A & Horspool, L. J. I.** (1995) Stability of penicillin G, ampicillin, amikacin & oxytetracycline and their interactions with food in *in vitro* simulated equine gastrointestinal contents. *Res Vet Sci* 58: 227- 231
- Meyer-Jones, L.** (1951) Miscellaneous observations on the clinical effects of injecting solutions and suspensions of procaine hydrochloride into domestic animals. *Vet Med* Vol. 46, November: 435-437
- Mouton, J. W., Dudley, M. N., Cars, O., Derendorf, H., & Drusano, G. L.** (2005) Standardization of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) terminology for anti-infective drugs: an update. *J Antimicrob Chemother* 55:601–751

- Nielsen, I. L., Jacobs, K. A., Huntington, P. J., Chapman, C. B. & Lloyds, K. C. (1988)** Adverse reaction to procaine penicillin G in horse. *Aust vet J* Vol. 65 No 6. Jun: 181-185
- Olsén, L., Ingvast-Larsson, C., Broström, H., Larsson, P. & Tjälve, H. (2007)** Clinical signs and etiology of adverse reactions to procaine benzylpenicillin and sodium/potassium benzylpenicillin in horses. *J vet Pharmacol Therap* Jun 30 (3): 201-207
- Plumb, D.C. (2008)** *Plumb's Veterinary Drug Handbook 6<sup>th</sup> ed.* Ames, Iowa: Blackwell Publishing. ISBN: 978-0-8138-2056-9
- Powers, T. E., Varma, K. J. & Powers, J. D. (1984)** Selecting therapeutic concentrations: Minimum inhibitory concentrations vs. subminimum or supraminimum inhibitory concentrations. *JAVMA* Vol. 185 No. 10, Nov 15: 1062-1067
- Ricketts, S. W. & Hopes, R. (1984)** Selection of antibiotics for use in equine practice. *Vet Rec* 114 (22) June: 544-546
- Saxon, A. (1983)** Immediate Hypersensitivity Reactions to  $\beta$ -lactam Antibiotics. *Rev Infect Dis* Vol., suppl. 2, maj-juni: S368-S379
- Schwark, W. S., Ducharme, N. G., Shin, S. J., Beilman, W. T. & Elwell, J. T. (1983)** Absorption and distribution patterns of oral phenoxymethyl penicillin (penicillin V) in the horse. *Cornell Vet* 73: 314-322
- Statens jordbruksverks föreskrifter om veterinärs rätt att förskriva och tillhandahålla läkemedel i anslutning till djursjukvård och djurhälsovård; **SJVFS 2002:57**, Saknummer C15, ISSN 1102-0970
- Step, D. L., Blue, J. T. & Dill, S. G. (1991)** Penicillin-induced haemolytic anemia and acute hepatic failure following treatment of tetanus in a horse. *Cornell Vet* 81: 13-18
- Stover, S. M., Brown, M. P., Kelly, R. H., Farver, T. B. & Knight, H.D. (1981)** Aqueous Procaine Penicillin G in the Horse: Serum, Synovial Peritoneal, and Urine Concentrations After Single-Dose Intramuscular Administration. *Am J Vet Res* Vol. 42, No. 4, April: 629-631
- Sullins, K. E., Messer, N. T. & Nelson, L. (1984)** Serum concentration of penicillin in the horse after repeated intramuscular injections of procaine penicillin G alone or in combination with benzathine penicillin and/or phenylbutazone. *Am J Vet Res*, Vol. 45, No. 5, May: 1003-1007
- SVARM 2008** Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt (SVA), Uppsala, 2009. ISSN 1650-6332
- Sweeney, C. R., Timoney, J. F., Newton, J. R. & Hines, M. T. (1995)** *Streptococcus equi* Infection in Horses: Guidelines for treatment, Control and Prevention of Strangles. *J Vet Intern Med* 19: 123-134 ACVIM Consensus Statement
- Tjälve, H. (1988)** Allvarliga biverkningar rapporterade. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 40, Nr 16: 801-807
- Tjälve, H. (1989)** Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 1989. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 42, Nr 8-9: 367-372
- Tjälve, H. (1991)** Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 1990. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 43, Nr 14: 626-629
- Tjälve, H. (1996)** Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade 1991-1995, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 48, Nr 4: 173-178
- Tjälve, H. (1997)** Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 1996. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 49, Nr 10: 423- 428

- Tjälve, H.** (1999) Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 1997 och 1998. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 51, Nr 11: 533-541
- Tjälve, H.** (2000) Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 1999, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 52, Nr 11: 579-581
- Tjälve, H.** (2002) Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 2000, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 54, Nr 1: 15-18
- Tjälve, H.** (2003) Läkemedelsbiverkningar hos djur rapporterade under 2001 och 2002, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 55, Nr 8-9: 17-23
- Tjälve, H.** (2004) Läkemedelsbiverkningar hos djur under 2003, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 56, Nr 13: 17-21
- Tjälve, H.** (2005) Läkemedelsbiverkningar hos djur under 2004, del 1. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 57, Nr 13: 23-29
- Tjälve, H.** (2007) Läkemedelsbiverkningar hos djur 2005 och 2006, del 1. *Svensk Veterinärtidning*. Vol. 59, Nr 12: 23-30
- Tjälve, H.** (2009) Läkemedelsbiverkningar hos djur 2007 och 2008, del 1. Biverkningar rapporterade hos häst, nöt, svin, får och get. *Svensk Veterinärtidning* Vol. 61, Nr 13: 11-19
- Tjälve, Hans.** Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsa, avd för farmakologi och toxikologi, SLU, Uppsala. **Personligt meddelande**, november 2009.
- Tobin, T. & Blake, J. W.** (1976) A review of the pharmacology, pharmacokinetics and behavioural effects of procaine in thoroughbred horses. *Br J Sports Med* Oct 10, (3): 109-116
- Tobin, T., Blake, J. W., Sturma, L., Arnett, S. & Truelove, J.** (1977) Pharmacology of procaine in the horse: pharmacokinetics and behavioral effects. *Am J Vet Res* Vol. 38, No. 5, May: 637 – 647
- Toutain, P. L., Del Castillo, J. R. E. & Bousquet-Mélou, A.** (2002) The pharmacokinetic-pharmacodynamic approach to a rational dosage regimen for antibiotics. *Res Vet Sci* 73: 105-114
- Uboh, C. E., Soma, L. R., Luo, Y., McNamara, E., Fennell, M. A., May, L., Teleis, D. C., Rudy, J. A. & Watson, A.O.** (2000) Pharmacokinetics of penicillin G procaine versus penicillin G potassium and procaine hydrochloride in horses. *Am J Vet Res* Vol. 61, No. 7 July: 811 - 815
- Van Erck, E. & Lekeux, P.** (2005) Doses of Common Drugs. In: Lekeux, P. (Ed.). *Equine Respiratory Diseases*. [online] Ithaca NY: International Veterinary Information Service. Available from: [www.ivis.org](http://www.ivis.org) [11 Nov. 09] Document No. B0340.0305
- Washington, (1979)** The effect and significance of subminimal inhibitory concentration of antibiotics. *Rev Infect Dis* Vol. 1, No. 5, Sept-Oct: 781-786
- Westerman, G., Corman, A., Stelos, P. & Nodine, J. H.** (1966) Adverse reactions to penicillin. *JAMA* Oct 10, Vol. 198, No. 2: 193-194
- Wiese, B. & Martin, K.** (1989) Determination of benzylpenicillin in plasma and lymph at the ng ml<sup>-1</sup> level by reversed-phase liquid chromatography in combination with digital subtraction chromatography technique. *J Pharmaceut Biomed Anal* Vol. 7, No. 1: 107-118
- Wilson, D. A., MacFadden, K. E., Green, E. M., Crabill, M., Frankeny, R. L. & Thorne, J.** (1996) Case control and historical cohort study of diarrhea associated with

administration to trimethoprim-potentiated sulphonamides to horses and ponies. *J Vet Intern Med* Vol. 10, No. 4 (Jul-Aug): 258-268

**Wilson, W. D., Spensley, M. S., Baggot, J.D. & Hietala, S.K.**(1988) Pharmacokinetics and estimated bioavailability of amoxicillin in mares after intravenous, intramuscular, and oral administration. *Am J Vet Res* Vol. 49, No. 10, October: 1688-1694

**Wilson, W. D.** (2001) Rational Selection of Antimicrobials for Use in Horses. *AAEP proceedings* Vol. 47: 75-93

Data från hemsidan the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (**EUCAST**). *Antimicrobial wild type MIC distributions of microorganisms* [online] Ordförande Gunnar Kahlmeter Available from: [www.eucast.org](http://www.eucast.org) [04 Dec. 09]

Matematisk beräkning via **GraphPad**<sup>®</sup> Software, *Quick Calcs, t test* [online] CEO, Dr. Harvey Motulsky Available from: <http://graphpad.com/quickcalcs/index.cfm> [08 Feb. 10]