

# **Enkel intravenös administrering av trimetoprim-sulfadiazin hos neonatala föl**

*- farmakokinetik samt känslighet hos gramnegativa bakterier från föl med septikemi*

**Romana Hjalmarsen Vertovec**

**Handledare: Johan Bröjer**  
**Institutionen för kliniska vetenskaper**  
**Biträdande handledare: Carina Ingvast Larsson**  
**Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap**



## INNEHÅLL

Summary .....	2
Sammanfattning .....	3
Inledning .....	4
Allmänt om septikemi hos föl.....	4
Bakteriell septikemi .....	4
Observanda vid antibiotikabehandling av neonatal septikemi .....	5
Kombinationen trimetoprim och sulfadiazine .....	6
Farmakologi TMP/SDZ .....	6
Tidigare studier med trimetoprim/sulfonamid .....	7
Viktig farmakologi avseende TMP/SDZ och neonatala föl.....	7
Bakgrund till studien.....	7
Syfte .....	8
Material och metoder .....	9
Retrospektiva data.....	9
Föl .....	9
Provtagning och kemiska analyser .....	9
Datorprogramsanalyser .....	10
Resultat .....	11
Resistens .....	11
Farmakokinetik .....	11
Diskussion.....	15
Resistens .....	15
Farmakokinetik .....	15
Svagheter och felkällor i det genomförda arbetet.....	16
Konklusion.....	18
Tack .....	18
Appendix.....	19
Referenser .....	20
Artiklar.....	20
Böcker .....	21
Examensarbeten .....	21

## SUMMARY

The retrospective part of this study evaluates the susceptibility patterns of bacteria isolated from blood in critically ill foals in Sweden. The most commonly obtained bacteria were *Actinobacillus spp.* (38 %) and *Escherichia coli* (27 %). Trimethoprim-sulphonamide (TMS) had good efficacy against most gram negative bacteria with the exception of *Klebsiella spp.* Among 17 *Escherichia coli* isolates 94 % were susceptible to trimethoprim-sulphonamide whereas all 24 isolates of *Actinobacillus spp.* were susceptible to the same substance. The efficacy against gram positive bacteria was more variable.

Two healthy foals (two and three days old) were given a single intravenous (iv) injection of trimethoprim (TMP) – sulphadiazine (SDZ) at a dosage of 2,5 mg TMP/kg bodyweight (bwt) and 12,5 mg SDZ /kg bwt. Blood samples were collected serially during a 24 hour period and plasma concentrations of TMP and SDZ were determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMSMS). The pharmacokinetic parameters of TMP and SDZ from the foals were compared to published data for adult horses. The pharmacokinetic properties of sulphadiazine were equal to those of adult horses with the exception of the area under the curve ( $AUC_{0-\infty}$ ) and the mean residence time (MRT) for the three day old foal. These both values were slightly higher than those of adult horses. The pharmacokinetic parameters of TMP from the foals were also similar compared to earlier published values for adult horses. However, the two day old foal had a higher clearance (Cl) for TMP and therefore a lower half life ( $t_{1/2}$ ),  $AUC_{0-\infty}$  and MRT. The results of the present study indicates that healthy neonatal foals have similar pharmacokinetics of TMP/SDZ as adult horses and it might therefore be possible to use the same dose regimens for foals as for adult horses. However, further studies of more foals are necessary to confirm the result of this pilot study.

## SAMMANFATTNING

I den retrospektiva delen av studien analyserades data avseende resistensmönster för gramnegativa bakterier involverade i neonatal septikemi. Retrospektiva data från föl med neonatal septikemi behandlade vid Universitetsdjursjukhuset, Sveriges Lantbruksuniversitet, Uppsala visade att vanligast förekommande agens var *Actinobacillus spp.* (38 %) och *Escherichia coli* (27 %). För dessa var resistensen mot trimetoprim-sulfa (TMS) 0 % respektive 6 %. Av de grampositiva bakterierna var streptokocker vanligast och även om dessa uppvisade 40 % resistens mot TMS var samtliga isolat sensitiva för penicillin.

Två kliniskt friska föl injicerades intravenöst med en enkel dos Hippotrim® vet. (2,5 mg trimetoprim (TMP) + 12,5 mg sulfadiazine (SDZ) / kg kroppsvikt). Upprepad provtagning från respektive föl skedde under 24 timmar, vartefter koncentrationen av TMP och SDZ i plasma analyserades medelst liquid chromatography tandem mass spectrometry (LCMSMS). De farmakokinetiska parametrarna för fölen jämfördes med värden för vuxna hästar. För substansen sulfadiazine förelåg mycket god överensstämmelse avseende fölens farmakokinetiska parametrar jämfört med gränsvärden för vuxna hästar och endast arean under kurvan ( $AUC_{0-\infty}$ ) och mean residence time (MRT) för det tre dygn gamla fölet låg strax ovan gränsvärdena för aduler. Även avseende TMP överensstämde flertalet parametrar från fölen med gränsvärden från vuxna hästar, men då det två dygn gamla fölet hade ett högre clearance (Cl) erhöles lägre halveringstid ( $t_{1/2}$ ),  $AUC_{0-\infty}$  och MRT. Analyserade farmakologiska parametrar tyder på att föl fungerar som små vuxna hästar, vilket indikerar att samma dosering för TMP/SDZ skulle kunna användas vid behandling av såväl föl som adulta hästar. För att säkerställa resultatet av pilotstudien krävs dock ytterligare fördjupade studier.

## **INLEDNING**

### **Allmänt om septikemi hos föl**

Septikemi är en av de främsta orsakerna till hög mortalitet hos neonatala föl (Paradis 1994). Vanligast förekommande är den bakteriellt orsakade septikemin, men även virus- eller svamporsakad septikemi kan uppträda med liknande symtom och förlopp (Reed et al. 2004, Vaala and House 2002).

De första symtomen vid sepsis är ofta ospecifika och vaga och består i tidigt skede av trötthet, svaghet, inappetens/anorexi, nedsatt sugreflex och att fölet ligger ned mer än normalt. Sjukdomsförloppet är progredierande och senare ses symtom såsom feber, tachykardi eller bradykardi och ökad andningsfrekvens. Dessa symtom uppkommer på grund av att endotoxiner, det vill säga lipopolysackarider i gramnegativa bakteriers cellmembran, utlöser ett omfattande inflammatoriskt svar från kroppens sida, vilket resulterar i aktivering av lymfocyter, makrofager och neutrofiler. Vidare frisätts en mängd endogena mediatorer såsom bland andra tumörnekrosfaktor $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), interleukiner (IL) och tillväxtfaktorer (GF). Obalans i eller för stark stimulering av immunsvaret gör att frisättningen av cytokiner går över styr och systemic inflammatory response syndrome (SIRS) utlöses. Vid SIRS ses stor påverkan på cirkulationen och bland annat fås ökad kärlpermeabilitet, vasodilatation och hjärtmuskeldysfunktion. Om förloppet fortgår och ytterligare spridning av infektionen sker blir följden att flera organsystem drabbas, vilket benämns multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Detta kan leda till septisk chock och död. Även endotoxinerna i sig har direkta effekter som framför allt ses i form av kärlskador och mikrotromboser och det är bland annat på grund av detta som det är risk för att disseminerad intravasal koagulation (DIC) utvecklas vid neonatal septikemi (Reed et al. 2004, Vaala and House 2002).

Problemet vid septikemi hos neonatala föl är ej att ställa en klinisk diagnos utan att upptäcka symtom i ett initialt skede (Paradis 1994). Noggrann anamnes och klinisk undersökning är givetvis viktiga, men för definitiv diagnos och fastställande av etiologi krävs blododling. Eftersom förloppet är mycket akut krävs att bredspektrumantibiotika sätts in redan innan resultat av blododling erhållits och för val av antibiotikum krävs god klinisk erfarenhet samt vetskap om vanligt förekommande patogener i det aktuella geografiska området (Reed et al. 2004, Sanchez 2005, Vaala and House 2002, Wichtel et al. 1999).

### **Bakteriell septikemi**

Bakteriell septikemi innebär förekomst av bakterier och bakterieendotoxiner i blodet medan sepsis orsakas av kroppens ospecifika inflammatoriska svar (Sanchez 2005). Att failure of passive transfer (FPT) är en bidragande orsak till att föl drabbas av septikemi finns på flera ställen beskrivet i litteraturen, men något direkt samband har dock ej påvisats (Sanchez 2005). Andra faktorer som ökar risken för neonatal septikemi är dålig hygien, infektion hos stoet och onormal dräktighetstid. Den

vanligaste inkörsporren för bakterier hos det unga fölet är oftast via naveln, gastrointestinkanalen eller sårskador (Paradis 1994, Reed et al. 2004).

För en så god prognos som möjligt krävs tidigt insatt behandling i form av intravenös tillförsel av antibiotika samt intensiv understödjande behandling i form av råmjölk/plasma, intravenös vätska och inte minst god omvårdnad (värme, god hygien, vändning av fölet etcetera).

### **Observanda vid antibiotikabehandling av neonatal septikemi**

Vanligast förekommande septikemi-/sepsisorsakande agens är gramnegativa bakterier och då oftast *Escherichia coli*. Andra vanliga bakterier är *Actinobacillus spp* och av de grampositiva bakterierna är streptokocker och stafylokocker de vanligare (Johansson 2006, Sanchez 2005, Vaala and House 2002). Med stöd av detta bör lämpligt antibiotikum sättas in redan innan resultat av blododling erhållits. I amerikansk litteratur föreslås penicillin tillsammans med en aminoglykosid som förstahandsval vid initial antibiotikabehandling (Reed et al. 2004, Sanchez 2005, Vaala and House 2002). Vidare förespråkar samma författare amikacin som förstahandsval av aminoglykosid då denna substans anses vara mindre nefrotoxisk och har visat sig ha lägre resistens än substansen gentamicin. I Sverige används dock oftast penicillin tillsammans med gentamicin eller penicillin tillsammans med trimetoprim/sulfonamid (TMS).

Problemet med behandling av neonatala föl är att man ej fullständigt känner till hur läkemedel distribueras, metaboliseras och utsöndras av fölen. Detta påverkar bland annat vilka läkemedelskoncentrationer som uppnås vid receptorer och hur substansens profil avseende koncentration och tid i plasma ser ut. Därför anses de neonatala fölen vara mer "känsliga" för läkemedel (Baggot 1994, Caprile and Short 1987). En kanske bättre förklaring är att man, på grund av den hos fölen okända farmakologin, oftare kan få terapivikt och/eller fler biverkningar än hos adulta hästar. Neonataler har "bättre" absorption i magtarmkanalen, lägre bindning av plasmaproteiner, ökad volym extracellulär vätska eller större andel vatten i förhållande till den totala kroppsytan (jämfört med adulta hästar), ej fullt utvecklad njur- och leverfunktion, ökad permeabilitet över blodhjärnbarriären samt längre eliminationstid för de flesta läkemedel (Baggot 1994, Vaala 1985). Samtliga dessa ovan nämnda karakteristika är fysiologiska och normala för fölets utveckling.

Farmakokinetiska data från neonatala föl är än så länge otillräckliga och dosering av läkemedel försvåras ytterligare av variation inom art och ras. Även hur länge fölen skall anses vara (och fungerar som) neonatala varierar. Neonatalperioden hos häst anses generellt omfatta den första levnadsveckan (Baggot 1994).

## **Kombinationen trimetoprim och sulfadiazine**

### ***Farmakologi TMP/SDZ***

Kombinationen av trimetoprim (TMP) och sulfadiazine (SDZ) finns i Sverige till häst tillgänglig i form av injektionsvätska, lösning, oral pasta, oralt pulver samt som suspension. Indikationerna för TMP/SDZ hos häst är infektioner i luftvägar, magtarmkanal, urogenitalia och sår (FASS VET 2007). Enligt vissa författare är substansen sulfadiazine, vilken är en sulfonamid, bakteriostatisk, men tillsammans med trimetoprim som är baktericid potentiernas effekten av sulfadiazine till att även denna fungera som baktericid (Plumb 2005). I andra texter beskrivs däremot respektive substans som bakteriostatisk och att endast kombinationen av dessa kan anses vara baktericid (Giguère et al. 2006, Gustafsson et al. 1999). Det är viktigt att serumkoncentrationen hålls över aktuellt MIC-värde (minimum inhibition concentration) så länge som möjligt (Gustafsson et al. 1999). För att effekten av TMP/SDZ skall anses vara baktericid krävs att förhållandet trimetoprim:sulfonamid är optimalt.

Tillsammans hämmar TMP och SDZ två på varandra följande steg i bakteriens folsyrsyntes. Genom att hämma bakteriens folsyrsyntes hämmas nukleotidsyntesen och därmed bakteriens tillväxt.

Serumkoncentrationen av trimetoprim anses vara viktigare än densamma för sulfonamid. För de flesta sensitiva bakterierna är MIC-värdet för TMP över 0,5 µg/ml (Plumb 2005). TMP/SDZ distribueras väl i hela kroppen (Plumb 2005). Metabolisering sker i levern och sulfan bearbetas via acetylering och konjugering med glukoronsyra medan trimetoprim oxideras och hydroxyleras till sina metaboliter. TMP/SDZ utsöndras både i oförändrad form via njurarna medelst glomerulär filtration och tubulär sekretion samt som sina metaboliter (Giguère et al. 2006, Plumb 2005). Trots att litteraturen tidigare förespråkade administration av kombinationen i fråga en gång dagligen förespråkas nu, efter klinisk erfarenhet, administration två gånger dagligen. Den rekommenderade intravenösa dosen för föl är 15 mg/kg 2 gånger dagligen eller 22 mg/kg 1 gång dagligen (Brumbaugh 1999, Caprile and Short 1987, Furr 1999 samt Plumb 2005). Dessa doseringar är dock extrapoleringar av dosering för vuxna hästar och endast i en artikel finns dosen 15 mg/kg 2 gånger dagligen rekommenderad med referens till studien över trimetoprim/sulphametoxazole (TMP/SMZ) hos föl (Brown et al. 1990, Furr 1999). Vanligtvis skiljer sig dock farmakokinetiken för olika sulfonamider, varför jämförelse av densamma för TMP/SDZ och TMP/SMZ ej är självklar.

TMP/SDZ kan ge biverkningar i form av påverkan på gastrointestinalkanalerna såsom akut colit, på njurarna och urinvägarna såsom kristalluri, hematuri eller i sällsynta fall obstruktion av renala tubuli, eller i form av allergi, keratoconjunctivitis sicca (KCS) eller trombocytopeni (Giguère et al. 2006, FASS VET 2007, Plumb 2005 samt van Duijkeren et al. 1994b). Då biverkningarna är många krävs noggrann dosering.



### ***Tidigare studier med trimetoprim/sulfonamid***

Farmakokinetiken för trimetoprim i kombination med sulfonamid för häst finns studerad och beskriven i flera olika artiklar (Brown et al. 1983 och 1990, van Duijkeren et al. 1994b och 1995, Gustafsson et al. 1999). De flesta av studierna är dock gjorda på adulta hästar och endast en tidigare studie gjord på föl avseende trimetoprim/sulphamethoxazole finns. TMP/SDZ har visats tas upp relativt bra i gastrointestinaltrakten, varför läkemedel innehållande TMP/SDZ även kan administreras peroralt (van Duijkeren et al. 1994b). Detta är dock inte aktuellt hos septikemiska föl då de har en mycket nedsatt cirkulation och är i chock, vilket ger en sämre biotillgänglighet för läkemedel administrerade peroralt (Furr 1999, van Duijkeren et al. 1994b). Dessutom är de allmänt nedsatta och har nedsatt sugreflex.

Efter intravenös giva av TMP/SDZ finns substanserna i fri form i likvärdig mängd i synovia, peritonealvätska och serum, medan man i urin finner högre koncentrationer av ämnena. Även i cerebrospinalvätska uppgår koncentrationen av kombinationen över MIC-värden för vanliga ekvina patogener efter intravenös tillförsel av substanserna (Brown et al. 1983, van Duijkeren et al. 1994b). Att utfodringen torde påverka de gastrointestinala sidoeffekterna (diarré) finns beskrivet i flera artiklar (van Duijkeren et al. 1994a och 1994b). I komparativa studier har man visat att varken formen eller tillsats av annan excipien påverkar biotillgängligheten av TMP/SDZ (van Duijkeren et al. 1994a). Vid upprepad administration av TMP/SDZ till adulta hästar har inga större förändringar i gastrointestinalkanalens bakterieflora setts, varken vid intravenös eller peroral tillförsel, även om en initial nedgång av coliformer syns i försök (Gustafsson et al. 1999).

### ***Viktig farmakologi avseende TMP/SDZ och neonatala föl***

Vad gäller neonatala föl och administrering av trimetoprim-sulfonamidkombinationer bör utöver ”vanliga” farmakologiska effekter följande uppmärksammas:

- Sulfonamider är substanser som vid metabolisering genomgår oxidation och föls erythrocyter anses vara (extra) känsliga för just oxidativa effekter. Detta kan resultera i hemolys och methemoglobinemi (Caprile and Short 1987).
- Sulfonamid kan genom att uppta bindningsställen vid albumin ge högre uppmätta värden av andra tillförda substanser och/eller bilirubin (Caprile and Short 1987).
- Då leverns enzymatiska funktioner inte är fullt utvecklade fås längre halveringstider för läkemedel i plasma (Baggot 1994, Vaala 1985).
- Omogen njurfunktion påverkar utsöndringen av TMP/SDZ och eftersom neonatala djurs urin-pH är surt kan exkretion av svaga organiska syror såsom sulfonamider ytterligare fördröjas (Vaala 1985).

### **Bakgrund till studien**

Septikemi hos neonatala föl kräver snabbt insatt behandling med bland annat bredspektrumantibiotika för en så god prognos som möjligt. I amerikanska studier varnas det för ökad resistens hos gramnegativa bakterier, vilka är de som oftast ger upphov till bakteriell septikemi (Brewer and Koterba 1990 samt Marsh and Palmer

2001). I USA används som förstahandspreparat penicillin tillsammans med amikacin medan vi i Sverige använder oss av penicillin tillsammans med gentamicin eller penicillin tillsammans med trimetoprim/sulfonamid.

I ett examensarbete vid Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap, SLU, 2006 gjordes en retrospektiv studie över resistensmönster vid neonatal septikemi. Studien inkluderade fall från 1988 till 2005 och visade att resistensläget i Sverige är mycket gott jämfört med det i Nordamerika (Johansson 2006). Framför allt förekom mycket lite resistens hos de framodlade bakterierna för kombinationen trimetoprim/sulfonamid (TMS). I studien påvisades endast 5 % resistens mot TMS för *Escherichia coli* jämfört med 29 % respektive 43 % resistens i två nordamerikanska studier (Brewer and Koterba 1990, Johansson 2006 samt Marsh and Palmer 2001). Detta talar för att TMS kan ersätta substansen gentamicin vid behandling av neonatala septikemiska föl i Sverige. Det finns emellertid inga dosrekommendationer för trimetoprim/sulfadiazine (TMP/SDZ) tillgängliga för föl då studier avseende aktuella substanser endast utförts på adulta hästar.

Att just penicillin tillsammans med TMP/SDZ anses vara lämpliga antibiotika för behandling av neonatal septikemi kan ytterligare motiveras av att TMP/SDZ passerar blodhjärnbarriären, vilket är lämpligt då en av komplikationerna till septikemi är meningit. Aminoglykosider, som till exempel amikacin och gentamicin, passerar däremot ej över blodhjärnbarriären. Vidare bör aminoglykosider om möjligt undvikas med tanke på att resistensen mot dessa ökar. TMP/SDZ får även anses vara lämpligare än amikacin då studier visat på att serumkoncentrationen av amikacin varierar kraftigt mellan individer och med deras kliniska status så att doseringsintervallet ofta bör förlängas. För att kunna moderera dosen och doseringsintervallet krävs dock att frekventa mätningar av amikacin i serum görs (Adland-Davenport et al. 1990, Bucki et al. 2004 samt Green et al. 1992). Detta görs dock ej som rutin i Sverige. Även vad gäller substansen gentamicin har det visats föreligga stora individvariationer avseende serumkoncentrationen och därför rekommenderas även här frekvent analys av denna, men också analys av kreatinin för att kunna upptäcka eventuell njurpåverkan (toxicitet till följd av insatt antibiotikabehandling (Raisis et al. 1998).

## **Syfte**

Denna pilotstudie syftar till att analysera plasmakoncentrationen och de farmakokinetiska parametrarna för TMP/SDZ hos föl efter enkel intravenös administrering. Resultaten från pilotstudien kommer sedan att ligga till grund för en större farmakokinetisk studie avseende TMP/SDZ under fölsäsongen 2008. Utöver detta skall även retrospektiva data avseende resistensmönster för gramnegativa bakterier analyseras. Förhoppningen är att den aktuella studien skall ge ytterligare vägledning vid behandling med TMP/SDZ av neonatala föl med septikemi.

## **MATERIAL OCH METODER**

### **Retrospektiva data**

De retrospektiva studierna baseras på data från föl behandlade för neonatal septikemi vid Universitetsdjursjukhuset, Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) under perioden 1988-2005. Resultaten från dessa grundar sig på positiva bakterieodlingar rekvirerade från Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) och Institutionen för bakteriologi, SLU, Uppsala under 1988-2005 (dock ej 1993 då analyser genomfördes vid annat laboratorium). Blod samlades aseptiskt från jugularvenen eller vena cephalica och både aerob och anaerob blododlingsflaska användes. Undersökningarna avseende antibiotikaresistens för isolerade bakterier är utförda med hjälp av mikrodilutionsmetodik vid SVA, Uppsala.

### **Föl**

Försöket var godkänt av Centrala försöksdjurnämnden. Den farmakologiska pilotstudien utfördes på två stycken varmblodstravarföl under sommaren 2007. De båda fölen var kliniskt friska och hölls i sin normala miljö (båda vid Västerbo Stuteri). Föl A, en hingst, var då försöket påbörjades 3 dygn gammal och vägde 72 kg och föl B, ett sto, var då försöket påbörjades 2 dygn gammal och vägde 68 kg.

TMP/SDZ (Hippotrim® vet. Injektionsvätska, lösning 200mg/ml + 40 mg/ml, Bayer) injicerades direkt i jugularvenen via permanentkateter (MILACATH® 16ga x 7,5 cm, MILA International inc.) med en enkel dos om 12 mg TMP/kg kroppsvikt och 3 mg SDZ/kg kroppsvikt. Permanentkatetrarna spolades noga igenom med 0,9%-ig NaCl-lösning efter administration av TMP/SDZ.

### **Provtagning och kemiska analyser**

Blodprover togs ur permanentkanyl vid 0, 5, 10, 15, 30 och 45 minuter samt vid 1, 2, 4, 6, 8, 12, 16 och 24 timmar från vardera fölet (se tabell 2 och 3). För föl A prov "10 minuter" blev den faktiska provtagningstidpunkten 11 minuter och för föl B prov "4h" blev densamma 4h 15 minuter. Grafer och beräkningar är korrigerade för detta. Samma permanentkateter användes för både administration av läkemedel och för provtagning. Vid varje provtagningstillfälle aspirerades 5 - 10 ml blod i annan spruta innan aktuellt provmaterial för analys togs från katetern. Efter varje provtagning spolades permanentkatetern med 10 ml 0,9%-ig NaCl-lösning. Blodprov samlades i heparinrör, vilka centrifugerades i 10 minuter vid en hastighet av 5700 rpm (rotations per minute). Plasma avskildes och frystes vid -80 °C inför vidare analys. Plasmakoncentrationerna av TMP och SDZ analyserades vid Avdelningen för kemi, Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), Uppsala medelst vätskekromatografi kopplat till tandem/masspektrometri (LCMSMS – liquid chromatography tandem mass spectrometry). Denna specifika analysmetod är utvecklad vid SVA och kommer att redovisas mer detaljerat i samband med att den uppföljande större studien publiceras.

## Datorprogramsanalyser

Med hjälp av ett "noncompartmental analysis program" (WinNonlin) analyserades farmakokinetiska data. Areal under kurvan (AUC) beräknades med hjälp av linjär trapetsmetod extrapolerat till oändligheten och lutningen ( $\lambda$ ). Därefter räknades halveringstiden ( $t_{1/2}$ ), clearance (Cl), mean residence time (MRT) samt distributionsvolymen vid jämvikt ( $V_{ss}$ ) ut, för formler se appendix (Rowland and Tozer 1995). Samtliga av parametrarna beräknades för respektive substans och föl och värden från och med en timme efter administration till och med sista provtagning inkluderades vid beräkning av lutningen.

## RESULTAT

### Resistens

Resultaten i tabell 1 visar resistensläget avseende substansen TMS för bakterier isolerade från föl med neonatal septikemi behandlade vid Hästkliniken, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala. De vanligaste framodlade bakterierna var *Actinobacillus spp* 38 % (24/64) och *Escherichia coli* 27 % (17/64). För dessa var resistensläget avseende trimetoprimsulfa mycket gott och endast 6 % (1/17) av framodlad *Escherichia coli* respektive 0 % (0/16) av *Actinobacillus equuli* var resistent mot trimetoprimsulfa.

Tabell 1. Antal resistent isolat med det totala antalet undersökta isolat inom parentes. KM-stordjur, 1988-2005 (ej 1993), SVA

Bakterieart	Trimetoprimsulfa
<i>Actinobacillus equuli</i> (16)	0(16)
<i>Actinobacillus spp</i> (8)	0(8)
Alfahemolyserande streptokocker (2)	0(2)
<i>Clostridium perfringens</i> (1)	-
<i>Enterobacteriaceae</i> övriga (2)	0(2)
<i>Enterococcus spp</i> (2)	0(2)
<i>Escherichia coli</i> (17)	1(17)
Gramnegativa ej typade stavar(2)	0(2)
<i>Klebsiella spp</i> (2)	2(2)
KNS (1)	1(1)
<i>Pasturella spp</i> (4)	0(4)
<i>Staphylococcus spp</i> (2)	0(2)
<i>Streptococcus spp</i> (5)	2(5)
Totalt: 64	6(63)

### Farmakokinetik

De uppmätta värdena av TMP och SDZ i plasma hos de båda fölen framgår av tabell 2 och 3. Plasmakoncentrationen i förhållande till tid för respektive substans och föl framgår av graferna i figur 1 och 2. Koncentrationen av SDZ och TMP hos de båda fölen var mycket lika. Föl B hade dock mycket högre clearance (Cl) för TMP än föl A, vilket gav en kortare halveringstid ( $t_{1/2}$ ) och mindre yta under kurvan ( $AUC_{0-\infty}$ ). I övrigt följer koncentrationskurvorna för respektive föl varandra. De farmakokinetiska parametrarna är listade i tabell 4 och 5.

Tabell 2. Koncentration av sulfadiazine ( $\mu\text{g/ml}$ ) i plasma

Plasmakoncentration sulfadiazine ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Tid	Föl A	Föl B
Minuter		
0	0	0
5	32	26
10	24*	28
15	13	31
30	36	26
45	20	21
Timmor		
1	27	18
2	17	15
4	17	11**
6	16	8,8
8	10	5,7
12	4,5	4,8
16	2,8	2,0
24	1,5	0,3

Tabell 3. Koncentration av trimetoprim ( $\mu\text{g/ml}$ ) i plasma

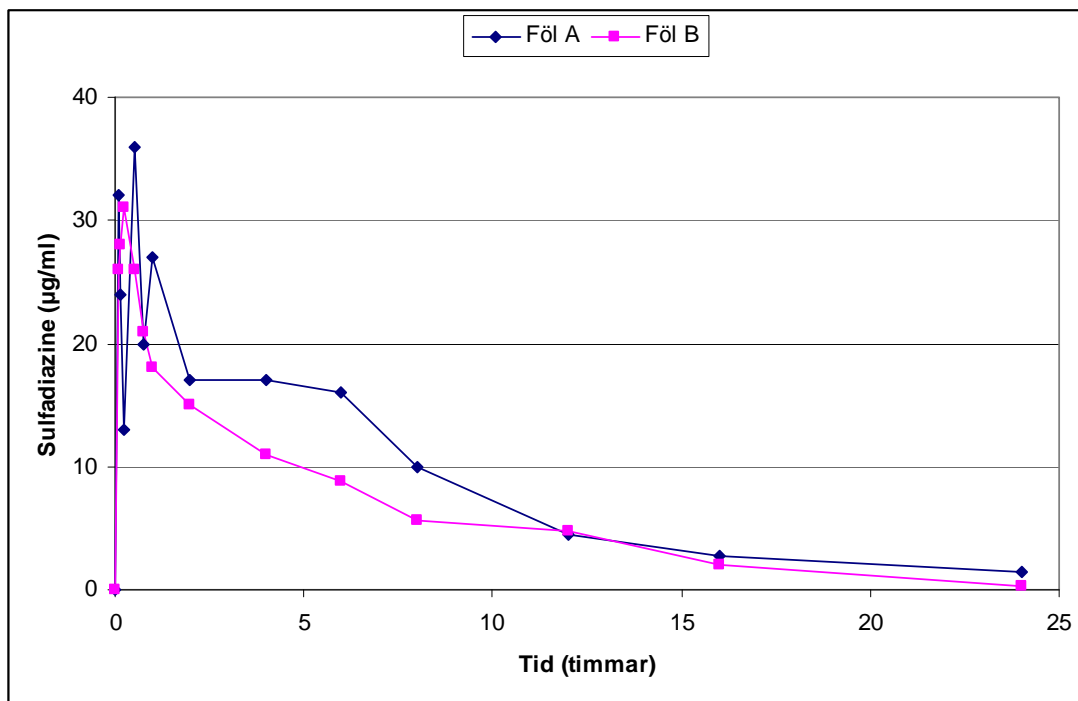
Plasmakoncentration trimetoprim ( $\mu\text{g/ml}$ )		
Tid	Föl A	Föl B
Minuter		
0	0	0
5	1,9	2,1
10	1,4*	1,2
15	1,1	1,6
30	1,0	0,9
45	1,0	0,8
Timmor		
1	1,3	0,6
2	0,7	0,5
4	0,6	0,1**
6	0,3	0,04
8	0,2	NF
12	0,07	NF
16	NF	NF
24	NF	NF

NF = not found, substansen ej detekterbar av instrumentet

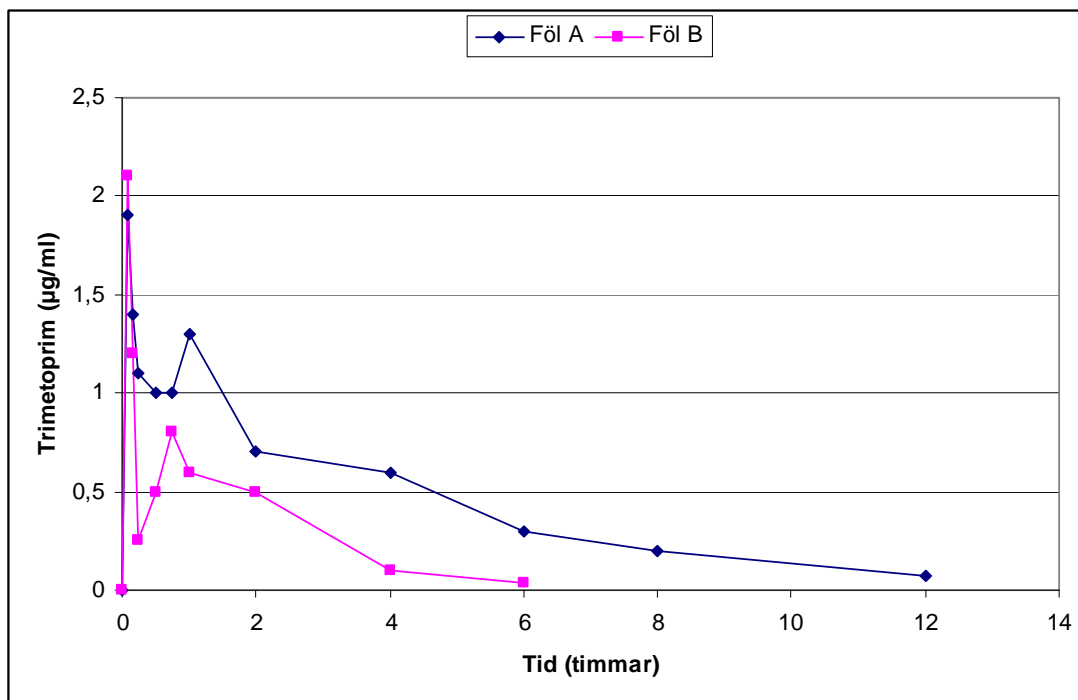
\* Faktisk provtagningstidpunkt 11 minuter

\*\* Faktisk provtagningstidpunkt 4 timmar 15 minuter

Figur 1. Koncentration av sulfadiazine ( $\mu\text{g/ml}$ ) i plasma efter enkel intravenös administrering hos föl A respektive B



Figur 2. Koncentration av trimetoprim ( $\mu\text{g/ml}$ ) i plasma efter enkel intravenös administrering hos föl A respektive B



Tabell 4. Farmakokinetiska parametrar för sulfadiazine

Farmakokinetisk parameter	Föl A	Föl B	Vuxna hästar*
$t_{1/2}$ (h)	5,40	4,11	4,6 (2,5-6,2)
$V_{ss}$ (l/kg)	0,44	0,50	0,50 (0,34-0,61)
$AUC_{0-\infty}$ (mg·h/l)	211,9	145,1	159,5 (127,3-209,8)
Cl (l/kg·h)	0,057	0,081	0,09 (0,07-0,10)
MRT (h)	7,76	6,15	5,6 (3,4-6,7)

\* Gustafsson et al. 1999. (median och gränsvärden)

$AUC_{0-\infty}$  = arean under kurvan extrapolerad till oändligheten, Cl = clearance, MRT = mean residence time,  $t_{1/2}$  = halveringstid,  $V_{ss}$  = distributionsvolymen vid jämvikt

Tabell 5. Farmakokinetiska parametrar för trimetoprim

Farmakokinetisk parameter	Föl A	Föl B	Vuxna hästar*
$t_{1/2}$ (h)	2,75	1,21	2,8 (2,3-3,8)
$V_{ss}$ (l/kg)	2,13	1,96	1,96 (1,50-2,24)
$AUC_{0-\infty}$ (mg·h/l)	5,64	2,45	4,9 (4,3-7,0)
Cl (l/kg·h)	0,531	1,220	0,53 (0,41-0,60)
MRT (h)	4,00	1,61	3,6 (3,2-5,0)

\* Gustafsson et al. 1999. (median och gränsvärden)

$AUC_{0-\infty}$  = arean under kurvan extrapolerad till oändligheten, Cl = clearance, MRT = mean residence time,  $t_{1/2}$  = halveringstid,  $V_{ss}$  = distributionsvolymen vid jämvikt



## DISKUSSION

### Resistens

Man har redan i tidigare opublicerade studier visat att resistensläget för bakterier involverade i neonatal septikemi i Sverige är mycket gott sett ur ett internationellt perspektiv (Johansson 2006). Vid blododling från föl behandlade för neonatal septikemi vid KM-stordjur, SLU i Uppsala under tiden 1988-2005 visade sig de vanligaste septikemiorsakande agensen vara *Actinobacillus spp* (38 %) och *Escherichia coli* (27 %). Resistensen för dessa agens var så låg som 0 % för *Actinobacillus spp* respektive 6 % för *Escherichia coli*. Framodlad *Klebsiella spp* var dock resistent mot TMS i samtliga fall, men bakteriearten hörde till de ovanligare och förekom endast i två fall av 64 (3 %). Med stöd av ovanstående får substansen TMS anses täcka det gramnegativa spektrat väl och därför vara lämplig vid behandling av neonatal septikemi i Sverige. Som jämförelse kan nämnas att resistensen mot trimetoprimsulfa för *Escherichia coli* i två nordamerikanska studier har visats vara 29 % respektive 43 % och att man där inte rekommenderar denna form av antibiotikum vid septikemibehandling (Brewer and Koterba 1990, Marsh and Palmer 2001).

Resistensen mot TMS för de övriga av de framodlade bakterierna får även den anses vara låg. Vad gäller de vanligaste förekommande grampositiva bakterierna var resistensen mot TMS hos streptokockerna 40 % (2/5), hos stafylokockerna 0 % (0/2) och hos enterokockerna 0 % (0/2).

Tolkning av resultatet skall dock även ses mot bakgrund att TMP/SDZ används tillsammans med bensylpenicillin vid behandling av neonatal septikemi. Av de bakterier, förutom *Escherichia coli* och *Actinobacillus spp*, som uppvisade resistens mot TMS var *Streptococcus spp* (40 % resistens mot TMS) i samtliga fall sensitiv för penicillin, vilket även stämmer överens med studier gjorda av Marsh and Palmer i Nordamerika (2001) (Johansson 2006). I de amerikanska studierna uppvisades dock 80 % penicillinresistens hos stafylokockerna jämfört med 0 % resistens avseende samma bakterieart och antibiotikum i studien över data från Hästkliniken, Universitetsdjursjukhuset, SLU, Uppsala. Den totala resistensen vid behandling av neonatal septikemi med penicillin och TMS blir i Sverige (Uppsala) 9,4 % (6/64) medan motsvarande resistens i Nordamerika baserat på Marsh and Palmers (2001) data blir 42,9 % (48/112). I de amerikanska siffrorna är dock ej känsligheten för penicillin testad. Resistensläget för bakterier involverade i neonatal septikemi får således anses vara gott i Sverige jämfört med Nordamerika.

### Farmakokinetik

Plasmakoncentrationen över tid för TMP respektive SDZ var mycket lika för de båda fölen (figur 1 och 2). Föl B har dock mer än dubbelt så stort clearance (1,220 jämfört med 0,531 l/kg·h) för TMP, vilket följaktligen även ger en lägre halveringstid och en mindre area under kurvan för föl B än för föl A.

Jämfört med tidigare studier över farmakokinetiken för TMP/SDZ hos häst, dock adulta sådana, är värdena för fölen i aktuell studie i stort sett överensstämmande (tabell 4 och 5). De farmakokinetiska parametrarna halveringstid ( $t_{1/2}$ ), distributionsvolym vid jämvikt ( $V_{ss}$ ), arean under kurvan ( $AUC_{0-\infty}$ ), clearance (Cl) och mean residence time (MRT) för sulfadiazine för fölen ligger, med undantag för Cl,  $AUC_{0-\infty}$  och MRT för föl A, alla inom gränsvärdena (= range) för respektive farmakologisk parameter och substans hos adulta hästar (Gustafsson et al. 1999). Avvikelserna från gränsvärdena avseende clearance (föl A: 0,057, gränsvärden för aduler: 0,07-0,10), arean under kurvan (föl A: 211,9, gränsvärden för aduler: 127,3-209,8) och mean residence time (föl A: 7,76, gränsvärden för aduler: 3,4-6,7) för föl A är dock små. Halveringstiden och distributionsvolymen för SDZ överensstämmer även med värden i andra studier på vuxna hästar (van Duijkeren et al. 1994a). Även jämfört med parametrar från en studie gjord på föl avseende substansen sulphamethoxazole är analyserad farmakokinetik avseende föl A och B liknande trots att värden för parametrar kan skilja sig avsevärt avseende olika sulfonamider (Brown et al. 1990).

Analyserade parametrar för trimetoprim överensstämmer också väl med tidigare analyserade värden avseende adulta hästar (Gustafsson et al. 1999, van Duijkeren et al. 1994a). För föl A ligger samtliga farmakokinetiska analyserade parametrar inom gränsvärdena angivna för vuxna hästar, men avseende föl B skiljer sig detta något. För föl B ligger distributionsvolymen inom motsvarande gränsvärden, men då individen i fråga är mycket bra på att eliminera substansen trimetoprim ur blodet blir följaktligen Cl högre samt  $t_{1/2}$ ,  $AUC_{0-\infty}$ , och MRT lägre än gränsvärdena analyserade för adulta hästar. Motsvarande förhållande föreligger även vad gäller jämförelse med parametrar för TMP analyserade i studien med föl (Brown et al. 1990). Att föl B har så pass mycket högre Cl avseende trimetoprim än föl A är sannolikt bara en spegling av den individuella variationen eftersom det endast skiljer fölen ett dygn i ålder och 4 kg i vikt åt. Att distributionsvolymen ( $V_{ss}$ ) är högre för TMP än för SDZ härrör sannolikt från att TMP passerar ut i blodet bättre än SDZ.

Sammanfattningsvis kan sägas att det föreligger god överensstämmelse avseende föl A och B:s halveringstid, distributionsvolym, arean under kurvan, clearance och mean residence time. Av detta kan slutsatsen dras att åtminstone dessa föl fungerar som små vuxna hästar avseende farmakologin av substanserna trimetoprim och sulfadiazine. Vid intravenös behandling med substanserna i fråga borde därför samma dosering kunna användas till föl som till adulta hästar.

### **Svagheter och felkällor i det genomförda arbetet**

Studien inkluderar enbart två föl, vilket i och för sig kan anses vara litet till antalet, men försöket är också bara en pilotstudie inför en kommande större studie.

En viss fluktuation av plasmakoncentrationen ses den första timmen. En tänkbar möjlighet till att detta uppstått kan vara att man för att minimera antalet permanentkatetrar använt samma permanentkanyl för både läkemedelsadministration

och provtagning. För att undvika sådana fel har kanylerna dock noga spolats igenom med fysiologisk NaCl-lösning och en mängd blod om ca 5-10 ml har aspirerats i annan spruta innan själva provet dragits upp. Troligtvis kan detta undvikas, så att en jämnare kurva fås även i början av tidsförloppet, om man injicerar fölen i motstående sidas jugularven mot den man sedan tar proven ur.

## **KONKLUSION**

Då studien visar på ett i Sverige mycket gott resistensläge avseende kombinationen trimetoprim/sulfadiazine får denna tillsammans med penicillin anses kunna rekommenderas som förstahandsval av antibiotika vid behandling av neonatal septikemi. Vidare tyder analyserade farmakologiska parametrar från pilotstudien att föl fungerar som små vuxna hästar, vilket indikerar att samma dosering skulle kunna användas vid behandling av såväl föl som vuxna hästar.

Eftersom detta försök enbart avsett två föl krävs ytterligare studier inkluderande flera föl för att fastställa resultatet. Som en fördjupning av denna pilotstudie bör även farmakokinetiken vid upprepad administrering av TMS/SDZ analyseras. Förhoppningsvis kan erfarenheterna och resultaten från denna pilotstudie vara till gagn för och underlätta kommande studier inom ämnet.

## **Tack**

Tack till Bayer Healthcare AB som sponsrat den kliniska studien. Tack även till veterinär Susanne Demmers och Västerbo stuteri som lät det kliniska försöket genomföras på två av deras föl. Tack till veterinär Ingela Johansson för tillskott av data.

Ett stort tack vill jag även rikta till veterinär, och för mig biträdande handledare, Carina Ingvast Larsson som hjälpt till med hela den farmakokinetiska biten. Utan henne hade jag förlorat mig bland alla farmakologiska parametrar och värden.

Sist, men absolut inte minst, vill jag tacka veterinär Johan Bröjer som varit min handledare. Utan honom hade försöket aldrig blivit av!

## APPENDIX

$AUC_{0-\infty}$  (arean under kurvan, extrapolerat till oändligheten)

AUMC (arean under kurvan för plasmakoncentration·tid i förhållande till tid)

Cl (clearance) = dos / AUC

$\lambda$  (lutning för den terminala fasen)

MRT (mean residence time) = AUMC / AUC

$t_{1/2}$  (halveringstid) =  $\ln 2 / \lambda$

$V_{ss}$  (distributionsvolym vid jämvikt) = Cl · MRT

## REFERENSER

### Artiklar

- Adland-Davenport, P., Brown, M.P., Robinson, J.D. and Derendorf, H.C. 1990. Pharmacokinetics of amikacin in critically ill neonatal foals treated for presumed or confirmed sepsis. *Equine Veterinary Journal*. 22: 18-22.
- Baggot, J.D. 1994. Drug therapy in the neonatal foal. *Veterinary clinics of North America: Equine practice*. 10: 87-107.
- Brewer, B.D. and Koterba, A.M. 1990. Bacterial isolates and susceptibility patterns in foals in a neonatal intensive care unit. *The compendium, Equine*. 12: 1773-1781.
- Brown, M.P., Kelly, R.H., Stover, S.M. and Gronwall, R. 1983. Trimethoprim-sulfadiazine in the horse: Serum, synovial, peritoneal, and urine concentrations after single-dose intravenous administration. *American Journal of Veterinary Research*. 44: 540-543.
- Brown, M.P., McCartney, J.H., Gronwall, R. and Houston, A.E. 1990. Pharmacokinetics of trimethoprim-sulphamethoxazole in two-day-old foals after a single intravenous injection. *Equine Veterinary Journal*. 22: 51-53.
- Brumbaugh, G.W. 1999. Clinical pharmacology of the pediatric patient. *45<sup>th</sup> Annual AAEP convention, Albuquerque*. Vol. 45: 226-234.
- Bucki, E.P., Giguère, S., Macpherson, M. and Davis, R. 2004. Pharmacokinetics of Once-Daily Amikacin in Healthy Foals and Therapeutic Drug Monitoring in Hospitalized Equine Neonates. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18: 728-733.
- Caprile, K.A. and Short, C.R. 1987. Pharmacologic Considerations in Drug Therapy in Foals. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 3: 123-144.
- Furr, M. Antimicrobial treatment for the septic foal. *North American Veterinary Conference*. Vol. 2: 86-87.
- Green, S.L., Conlon, P.D., Mama, K. and Baird, J.D. 1992. Effects of hypoxia and azotemia on the pharmacokinetics of amikacin in neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*. 24: 475-479.
- Gustafsson, A., Båverud, V., Franklin, A., Gunnarsson, A., Ögren, G. and Ingvast-Larsson, C. 1999. Repeated administration of trimethoprim/sulfadiazine in the horse – pharmacokinetics, plasma protein binding and influence on the intestinal microflora. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 22: 20-26.
- Marsh, P. and Palmer, J. 2001. Bacterial isolates from blood and their susceptibility patterns in critically ill foals: 513 cases (1991-1998). *Journal of the American veterinary medical association*. 218: 1608-1610.
- Paradis, M.R. 1994. Update on neonatal septicemia. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 10: 109-135.
- Raisis, A.L., Hodgson, J.L. and Hodgson D.R. 1998. Serum gentamicin concentrations in compromised neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*. 30: 324-328.
- Sanchez, L.C. 2005. Equine Neonatal Sepsis. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 21: 273-293.
- Vaala, W.E. 1985. Aspects of Pharmacology in the Neonatal Foal. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 1: 51-75.

- van Duijkeren, E., Vulto, A.G., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Mevius, D.J., Kessels, B.G.F., Breukink, H.J. and van Miert, A.S.J.A.M. 1994a. A comparative study of the pharmacokinetics of intravenous and oral trimethoprim/sulfadiazine formulations in the horse. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 17: 440-446.
- van Duijkeren, E., Vulto, A.G. and van Miert, A.S.J.P.A.M. 1994b. Trimethoprim/sulfonamide combinations in the horse: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 17: 64-73.
- van Duijkeren, E., Vulto, A.G., Sloet van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M.M., Kessels, B.G.F., van Miert, A.S.J.P.A.M., Breukink, H.J. 1995. Pharmacokinetics of trimethoprim/sulphachlorpyridazine in horses after nasogastric and intravenous administration. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 18: 47-53.
- Wichtel, M.E.G., Buys, E., DeLuca, J. and Stringel, G. 1999. Pharmacologic considerations in the treatment of neonatal septicemia and its complications. *Veterinary Clinics of North America: Equine practice*. 15: 725-746.

## **Böcker**

- FASS VET. 2007. Läkemedelsindustriföreningen, LIF.
- Giguère, S., Prescott, J.F., Baggot, J.D., Walker, R.D. and Dowling, P.M. 2006. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*. Blackwell publishing.
- Plumb, D.C. 2005. *Plumb's Veterinary Drug Handbook*. Blackwell publishing.
- Reed, S.M., Bayly, W. and Sellon, D. 2004. *Equine Internal Medicine*. W.B. Saunders company.
- Rowland, M. and Tozer, T.N. 1995. *Clinical pharmacokinetics: concepts and applications*. Williams & Wilkins.
- Vaala, W.E. and House, J.K. 2002. *Large Animal Internal Medicine*. Bradford P. Smith and Mosby. C.V. Mosby.

## **Examensarbeten**

- Johansson, I. 2006. Bakteriella isolat, antibiotikaresistens och överlevnad hos föl med septikemi. *Examensarbete vid Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Sveriges Lantbruksuniversitet*.