

## Penisilliinin utareensisäinen annoksen määrittäminen Gram-positiivisten bakteerien kasvun estämiseksi

## Bestämning av intramammära dosen av bentsylpenicillin som inhiberar tillväxt av gram-positiva bakterier

### 5 Determination of the intramammary dose of benzylpenicillin required to inhibit growth of Gram-positive bacteria

Elke Abbeloos, Satu Pyörälä, Päivi Rajala-Schultz, Vesa Mylly

## YHTEENVETO

Tutkimuksen tavoitteena oli määrittää tarvittava bentsyylipenisilliiniannos, jolla pystytään  
10 ylläpitämään maidossa utaretulehdusta aiheuttavien, Gram-positiivisten bakteerien MIC  
(minimum inhibitory concentration) arvon ylittävä pitoisuus. Tutkimuksessa käytettiin  
kaupallisesti saatavana olevaa valmistetta, jossa prokaiinibentsyylipenisilliini on  
öljymäisessä, pienipartikkelisessa suspensiossa. Tutkittiin kolmea annostasoa: 200 000,  
300 000 ja 600 000 IU, kukin annosteltuna yhteen utareneljännekseen viidelle lehmälle.  
15 Bentsyylipenisilliinipitoisuudet maidossa ja plasmassa määritettiin tutkimuksen yhteydessä  
validoidulla HPLC-MS/MS-menetelmällä. Penisilliinin pitoisuudet maidossa olivat kaikilla  
testatuilla annoksilla selvästi kohdepatogeenien MIC-arvon yläpuolella. Maidon ja  
plasman penisilliinipitoisuuksien keskimääräiset AUC (area under the curve) -arvot  
nousivat lineaarisesti annoksen kasvaessa. Ensimmäisessä lypsyssä 12 tunnin kuluttua  
20 penisilliinin annostelusta maidon keskimääräinen lääkeainepitoisuus oli merkitsevästi  
korkeampi 600 000 IU:n annoksella kuin 200 000 tai 300 000 IU:n annoksella. Tutkimus  
osoittaa, että bentsyylipenisilliiniannoksen ja maidon penisilliinipitoisuuden välillä on  
terveessä utareessa lineaarinen suhde. Olisi kuitenkin hyödyllistä myös tutkia  
utaretulehdusta sairastavia lemmiä utareensisäisen bentsyylipenisilliinihoidon optimaalisen  
25 annostelun ja keston määrittämiseksi.

## SUMMARY

The aim of this study was to determine the intramammary dose of benzylpenicillin required to maintain a concentration in the milk above the MIC for the Gram-positive bacteria that cause mastitis. The product used in this study was a commercially available procaine  
30 benzylpenicillin in an oily suspension with micronized particles. Three dose levels were used: 200,000, 300,000, and 600,000 IU. Concentrations of benzylpenicillin in milk and plasma were determined after a single intramammary dose was administered into one quarter of each of the five cows in each treatment group. Samples were analyzed using an HPLC-MS/MS method, which was validated during the study. Concentrations in the milk  
35 were well above the MIC for the target pathogens for all doses tested. There was a linear dose-dependent increase in the mean AUCs of benzylpenicillin concentrations in plasma and milk. At the first milking, 12 hr after dosing, there was a significant difference between the mean milk benzylpenicillin concentrations in cows treated with a dose of 600,000 IU, and those treated with 200,000 or 300,000 IU. Although this study shows a linear  
40 relationship between the dose of procaine benzylpenicillin administered and the concentration in the milk in the healthy udder, it would be useful to conduct studies on cows with mastitis to define the optimum dose and duration of intramammary treatment with benzylpenicillin.

## YDINKOHDAT

Bentsyylipenisilliini on ensisijainen mikrobilääke Gram-positiivisten, penisilliiniherkkien bakteerien aiheuttaman utaretulehduksen hoidossa.

Penisilliini on aikariippuvainen mikrobilääke, jonka teho perustuu pitoisuuden ylläpitämiseen kohdepatogeenien MIC-arvojen yläpuolella. Pitoisuuden huomattava nostaminen ei lisää penisilliinin tehoa.

Tässä tutkimuksessa määritettiin intramammaarisessa hoidossa tarvittava bentsyylipenisilliiniannos, jolla pystytään ylläpitämään maidossa utaretulehdusta aiheuttavien, Gram-positiivisten bakteerien MIC-arvon ylittävä pitoisuus.

Penisilliinin pitoisuudet maidossa nousivat annoksen kasvaessa lineaarisesti ja olivat kaikilla annoksilla (200 000, 300 000 ja 600 000 IU) selvästi kohdepatogeenien MIC-arvon yläpuolella.

Plasmassa havaittiin annoksen mukaan lineaarisesti kasvavia, mutta hyvin alhaisia penisilliinipitoisuuksia.

Vaikka MIC-taso saavutettiin kaikilla tutkituilla annoksilla, valmisteen ohjeannoksena käytetään suurinta annosta, koska penisilliini ei välttämättä jakaudu tasaisesti tulehtuneessa utareessa ja jotkut patogeenit voivat levitä syvemmälle utarekudokseen.

## JOHDANTO

Mikrobilääkeresistenssi on kasvava ongelma, joten antibioottien käyttöä tuotantoeläimille  
50 seurataan tarkoin.<sup>1</sup> Utaretulehdus on maailmanlaajuisesti tärkein syy antibioottien käyttöön  
lypsykarjatiljoilla.<sup>2,3</sup> Euroopan unionin mikrobilääkkeiden vastuullista käyttöä koskevien  
ohjeiden mukaan bentsyylipenisilliini on kapeakirjoisuutensa vuoksi ensisijainen hoito  
Gram-positiivisten bakteerien aiheuttamassa utaretulehduksessa<sup>4</sup>. Bentsyylipenisilliini on  
65 bakteereihin, kuten stafylokokkeihin ja streptokokkeihin, bakterisidinen (bakteereita  
tappava) vaikutus<sup>5</sup>. Kaikilla betalaktaamiantibiootteilla on aikariippuvainen toimintatapa,  
eli hoidon tehon ratkaisee pääasiassa se, kuinka kauan lääkeaineen pitoisuus pysyy  
bakteerin MIC-arvon yläpuolella.<sup>5-7</sup>

Utareensisäinen infuusio on utaretulehduksen antibiootihoidossa yleisin annostelutapa.<sup>8</sup>  
60 Antamalla lääke suoraan utareneljännekseen hoito pyritään kohdistamaan  
tulehdusalueelle ja saavuttamaan siellä infektiota aiheuttavien bakteerien MIC-arvon  
yläpuolella olevat pitoisuudet. Vaikuttavan aineen on sekä levittävä hyvin utareen  
maitotilassa että imeytyttävä utarekudokseen, jos taudinaiheuttaja on invasiivinen (ja  
mahdollisesti solunsisäinen) patogeeni, kuten *Staphylococcus aureus*.<sup>9</sup> Utareensisäisesti  
65 annetun penisilliinin jakautumista tutkittiin irrallisessa utareessa tehdyssä  
perfuusiotutkimuksessa.<sup>10</sup> Öljymäisessä suspensiossa, jossa penisilliini oli pieninä  
hiukkasina, lääkeaine levisi utareessa paremmin kuin vesiliuoksena tai  
suuripartikkelisessä suspensiossa.

Aikaisemmin julkaistujen tutkimusten perusteella päätettiin, että uuden,  
70 bentsyylipenisilliiniä sisältävän intramammaarivalmisteen vaikuttava aine on öljypitoisessa  
suspensiossa pieninä partikkeleina. Euroopan lääkeviraston (EMA) eläinlääkkeiden

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

farmakokinetiikan tutkimisesta kohde-eläimillä annetun ohjeen mukaan intramammaarin ohjeannos on määritettävä tutkimalla vaikuttavan aineen pitoisuutta maidossa ajan funktiona. Samaa menetelmää sovelletaan plasman tutkimiseen, kun arvioidaan  
75 utareensisäisesti annetun lääkeaineen mahdollista imeytymistä vereen. Lääkkeen annosta määrittävissä tutkimuksissa edellytetään yleensä testattavaksi kolmea eri annostasoa ja tutkimuksissa käytetään terveitä eläimiä.<sup>11</sup>

Tämän tutkimuksen tarkoituksena oli määrittää bentsyylipenisilliiniä sisältävälle intramammaarivalmisteelle ohjeannos, jolla ylläpidetään Gram-positiivisten  
80 utaretulehduksen aiheuttajien MIC-arvon ylittävä pitoisuus maidossa 24 tunnin ajan. Bentsyylipenisilliiniprokaiinia annettiin kolmella eri annostasolla (200 000, 300 000 ja 600 000 IU) yhteen utareneljännekseen ja määritettiin bentsyylipenisilliinin pitoisuus maidossa ja plasmassa. Tutkimus tehtiin vuonna 2005 noudattaen tuolloin voimassa olevaa EMA:n ohjetta.<sup>11</sup> Valmiste oli aluksi rekisteröity vain muutamassa maassa, mutta vuonna 2017  
85 identtinen kopiovalmiste sai myyntiluvan 14 Euroopan unionin jäsenvaltiossa.

## AINEISTO JA MENETELMÄT

### *Koe-eläimet ja valmisteen annostelu*

Tutkimukseen valittiin 15 kliinisesti tervettä 2-5 vuotiasta Holstein-lehmää ranskalaisella tutkimustilalla. Lehmät olivat olleet lypsyssä 3-6 kuukautta, eikä niitä ollut hoidettu  
90 antibiooteilla kahdeksan koetta edeltävän päivän aikana. Koetta edelsi seitsemän päivän sopeutusjakso, jonka aikana, samoin kuin itse kokeen edetessä, lehmät tutkittiin kliinisesti ja utareet ja maidon ulkonäkö tarkastettiin päivittäin. Lehmien maitomäärä mitattiin jokaisella lypsykerralla. Lehmät ryhmiteltiin lypsykauden vaiheen perusteella ja jaettiin viiteen ryhmään, jokaisessa kolme lehmää. Näistä ryhmistä kukin lehmä

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

95 satunnaistettiin yhteen kolmesta tutkimusryhmästä. Lisätietoa koe-eläimistä on taulukossa  
1.

Tutkittava valmiste oli intramammaariseen käyttöön rekisteröity suspensio (Carepen<sup>®</sup>,  
Vetcare Oy, Mäntsälä, Suomi, rekisteröity myös nimellä Ubropen<sup>®</sup>, Boehringer Ingelheim  
Animal Health, Saksa), joka sisältää öljysuspensiossa, pieninä partikkeleina 600 000 IU  
100 (vastaa 600 milligrammaa) prokaiinibentsyylipenisilliiniä per 10 ml. Valmiste annettiin  
koepäivänä aamulypsyn jälkeen utareensisäisesti kunkin lehmän vasempaan  
etuneljännekseen. Ryhmässä 1 (200 000 IU penisilliiniä) ja ryhmässä 2 (300 000 IU  
penisilliiniä) kaksi kolmasosaa tai puolet Carepen<sup>®</sup> /Ubropen<sup>®</sup> -tuubin sisällöstä poistettiin  
ennen antamista, jotta saatiin oikea annos bentsyylipenisilliiniprokaiinia lehmää kohden.  
105 Ryhmä 3 sai valmistetta kokonaisen tuubin. Vajennetut tuubit punnittiin ennen ja jälkeen  
annostelun todellisen annoksen määrittämiseksi. Tutkimuksella oli kokeesta vastuussa  
olevan toimijan Avogadron (Fontenilles, Ranska) eettisen arviointikomitean lupa  
(tutkimuksen viitekoodi: A051143).

## 110 *Näytteet ja aineiston käsittely*

Päivää ennen koevalmisteen antamista jokaiselta lehmältä kerättiin kaikkien neljännesten  
yhteismaitonäytteet. Lääkkeen antamisen jälkeen otettiin käsitellyistä neljänneksistä  
maitonäytteet aseptisesti 12, 24, 48 ja 72 tunnin kuluttua. Lehmän koko maitomäärä  
mitattiin näytteenoton yhteydessä. Näytteet siirrettiin laboratorioon (Avogadro, Fontenilles,  
115 Ranska), jossa ne pakastettiin (-20 °C) niin pian kuin mahdollista. Verinäytteet otettiin  
lehmien kaula- tai häntälaskimosta ennen lääkkeen antoa ja 3, 6, 12, 15, 18 ja 24 tuntia  
sen jälkeen. Veri (10 ml) kerättiin litiumhepariiniputkiin, putket sentrifugoitiin ja näytteistä  
erotettiin plasma.

*Bentsyylipenisilliinipitoisuuden määrittäminen ja tulosten tilastollinen käsittely*

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

120 Näytteet analysoitiin viiden päivän kuluessa niiden saapumisesta. Bentsyylipenisilliinin säilyminen plasmassa tutkittiin ja todettiin, että pitoisuus säilyi stabiilina -20 °C:ssa vähintään 9 vuorokauden ajan (korkeintaan 20% hävikki). Näytteet analysoitiin HPLC-MS/MS menetelmällä. Analyysimenetelmän herkkyys (LLOQ, lower limit of quantification) bentsyylipenisilliinipitoisuuden määrittämiseksi maidossa ja plasmassa oli 2 ng/ml.

125 Vertailun vuoksi mainittakoon, että Euroopan unionissa penisilliinijäämien enimmäisraja-arvo (MRL) maidolle on 4 µg/kg (4 ng/g).<sup>12</sup> Kokeessa käytetty menetelmä maidon ja plasman bentsyylipenisilliinipitoisuuden määrittämiseen validoitiin. Tulokset olivat lineaarisia pitoisuuksilla 2 ng/ml - 400 ng/ml bentsyylipenisilliiniä plasmassa.

Kalibroitikäyrien laatimisessa ja analysoinnissa käytettiin Statgraphics Plus<sup>®</sup>-ohjelmaa  
130 (Statistical Graphics, Rockville, USA) ja pienimmän neliösumman regressiomenetelmää. Tulosten lineaarisuus maidossa ja plasmassa arviotiin kolmen kalibroitikäyrän perusteella.

Plasman ja maidon bentsyylipenisilliinipitoisuuksille laskettiin AUC-arvot käyttäen Microsoft Excel<sup>®</sup>-ohjelmaa. Pitoisuuksille laskettiin aritmeettinen ja geometrinen keskiarvo. Maidon  
135 bentsyylipenisilliinipitoisuuksilla käytettiin logaritimuunnosta, mikä helpotti niiden visuaalista tulkintaa. Aineiston tarkempaan tilastolliseen analyysiin käytettiin SAS<sup>®</sup> -ohjelman versiota 9.4 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Tulokset olivat merkitseviä tasolla  $\alpha=0,05$ . Yksinkertainen lineaarinen regressiomalli sovitettiin AUC-arvot vastemuuttujana ja annettu annos selittävänä muuttujana. Tulokset analysoitiin myös ei-  
140 parametrisella testillä (Jonckheere-Terpstra testi)<sup>13</sup> maidossa ja plasmassa havaittujen bentsyylipenisilliinipitoisuuksien erojen löytämiseksi eri hoitoryhmien välillä.

Yksityiskohtainen menetelmäkuvaus on luettavissa alkuperäisessä artikkelissa.

## TULOKSET

145 Haittavaikutuksia, näkyviä oireita tai muutoksia päivittäisessä maidontuotossa ei lehmillä havaittu lääkkeen antamisen jälkeen. Kunkin hoitoryhmän plasman keskimääräinen penisilliiniannos annos ajan funktiona on esitetty taulukossa 1.

### *Pitoisuus plasmassa ja maidossa*

150 Keskimääräiset bentsyylipenisilliinipitoisuudet plasmassa 24 tunnin aikana lääkkeen annosta näkyvät kuvassa 1. Plasman bentsyylipenisilliinipitoisuuden keskimääräinen AUC-arvo kasvoi lineaarisesti annoksen suuretessa. Annoksen nostaminen lisäsi plasman bentsyylipenisilliinipitoisuutta merkitsevästi 6, 12, 15 ja 18 tuntia annostelemisen jälkeen ( $p = 0,0002$ ;  $p < 0,0001$ ;  $0,0001$ ; ja  $0,0037$ ). Penisilliinin pitoisuus plasmassa laski  
155 määritysrajan alapuolelle 24 tunnissa kaikilla annoksilla.

Taulukossa 2 näkyvät hoidettujen neljännesten maidon bentsyylipenisilliinipitoisuuden aritmeettiset ja geometriset keski-arvot ja kuvassa 2 logaritmiset keskiarvot.

Ensimmäisessä lypsyssä 12 tuntia intramammaarisen antamisen jälkeen maidon bentsyylipenisilliinipitoisuus oli suurimmalla annoksella merkitsevästi korkeampi kuin  
160 alemmilla annoksilla ( $p = 0,002$ ). Toisessa lypsyssä 24 tunnin kuluttua ja kolmannessa lypsyssä 48 tunnin kuluttua merkitsevää eroa ei havaittu ( $p=0,234$  ja  $p=0,500$ ). Maidon bentsyylipenisilliinipitoisuuden keskimääräiset AUC-arvot kasvoivat lineaarisesti annoksen noustessa ( $p=0,046$ ).

## POHDINTA JA JOHTOPÄÄTÖKSET

165 Intramammaarisen bentsyylipenisilliinihoidon tarkoituksena on saavuttaa kohdepatogeenien MIC-arvon yläpuolella oleva penisilliinipitoisuus. Terapeuttiset



pitoisuudet on ylläpidettävä infektiopaikassa (utareessa) niin kauan, että tartunta saadaan eliminoitua. Toisaalta on minimoitava normaalibakteeriston (esimerkiksi suolistobakteerien) altistuminen lääkelle, resistenttien bakteerien valikoitumisen vähentämiseksi. Tämä tutkimus on tietääksemme ensimmäinen validoitu tutkimus utareensisäisesti annetun bentsyylipenisilliinin farmakokinetiikasta.

*S. aureus* and *Streptococcus uberis* ovat Euroopassa tärkeimmät Gram-positiiviset utaretulehduksen aiheuttajat, joiden aiheuttamaa tartuntaa hoidetaan mikrobilääkkeillä.<sup>14-17</sup> Penisilliinille ei ole määritetty naudon utaretulehduksen hoidossa käytettäviä kliinisiä MIC-raja-arvoja. Euroopan mikrobilääkeherkkyyden testausta ohjeistavan komitean (EUCAST) määrittämä epidemiologinen raja-arvo bakteerien *in vitro* -penisilliiniherkkyydelle on 0,125 µg/ml stafylokokkeille (mukaan lukien *S. aureus*) sekä streptokokeille (ml. A- ja B-ryhmän streptokokit, *S. dysgalactiae* ja *S. agalactiae*). Epidemiologista raja-arvoa ei ole saatavilla *S. uberikselle*, mutta arvoa 0,125 µg/ml käytetään yleisesti.<sup>18</sup>

Useimmat utaretulehdusta aiheuttavat streptokokit ovat säilyttäneet herkkyuden bentsyylipenisilliinille.<sup>19-22</sup> Pienellä osalla *S. uberiksia* on raportoitu penisilliiniherkkyyden vähenemistä.<sup>20,23</sup> *S. aureus* on kehittänyt betalaktamaasin tuottoon perustuvan penisilliiniresistenssin. Euroopan maissa betalaktamaasipositiivisten isolaattien osuus utaretulehdusmaidosta eristetyistä *S. aureuksista* on vaihdellut alle 10 %:sta yli 50 %:in.<sup>18-20,24</sup> Koagulaasi-negatiivisten stafylokokkien (KNS) aiheuttamaa kliinistä utaretulehdustakin hoidetaan penisilliinillä. KNS-bakteereilla penisilliiniresistenssi on yleisempää kuin *S. aureuksella*.<sup>25</sup> On huomionarvoista, että pohjoismaat, jotka hoitavat utaretulehdusta lähes yksinomaan bentsyylipenisilliinillä, ovat jatkuvasti raportoineet erittäin alhaisia tai alenevia osuuksia penisilliiniresistenteille *S. aureuksille*.<sup>20,26-28</sup>

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

190 Tässä tutkimuksessa maidon penisilliinipitoisuus pysyi yleisimpien utarepatogeenien MIC-  
arvojen yläpuolella kaikilla annoksilla vähintään 24 tunnin ajan. On esitetty, että 24 tuntia  
on intramammaarille hyvä annosteluväli, koska lääkettä tarvitsee infusoida vetimeen vain  
kerran vuorokaudessa, mikä sopii kaikkiin lypsyrytmeihin (2 tai 3 kertaa päivässä tai  
automaattilypsy). Alimmalla annoksella (200 000 IU) 24 tuntia annostelusta pitoisuus  
195 maidossa oli jopa 20 x MIC, keskimmaisella annoksella (300 000 IU) 22 x MIC ja  
isoimmalla annoksella (600 000 IU) 70 x MIC. Suurimman annoksen ryhmässä oli  
neljännesten välillä suurin vaihtelu, joten geometrinen keskiarvo (35 x MIC) voi kuvata  
tulosta paremmin.

Aikariippuvaisten antibioottien, kuten bentsyylipenisilliinin, paras bakteereita tappava teho  
200 *in vitro* saadaan 3-4 kertaisella pitoisuudella MIC-arvoon nähden ja tärkein infektion  
paranemista ennustava tekijä on pitoisuuden pysyminen MIC-arvon yläpuolella.<sup>7</sup>  
Tuloksemme viittaavat siihen, että jopa kaikki tutkimamme annokset voisivat olla  
tarpeettoman suuria, kun otetaan huomioon korkeiden penisilliiniannoksien  
paradoksaalisesti alentunut bakterisidinen teho (ilmiön kuvasivat ensimmäisinä Eagle and  
205 Musselman<sup>29</sup>, tunnetaan nimellä "Eagle-vaikutus"). Huomattakoon, että suurten annosten  
paradoksaalisesti huonompi vaikutus on havaittu useimmilla beta-laktaamiantibiooteilla ja  
pääasiassa Gram-positiivisia bakteereita kohtaan, eikä se ole aina samanlainen klassisen  
Eagle-vaikutuksen kanssa.<sup>30,31</sup> Penisilliiniä on käytetty utaretulehduksen hoidossa yli 50  
vuoden ajan ja aikaisemmin nykyistä pienemmillä annoksilla.<sup>32</sup> Varhaiset tutkimukset  
210 osoittivat, että niinkin alhaisilla annoksilla kuin 100 000 IU/neljännes (jokaisen lypsyn  
jälkeen) saatiin hyviä paranemistuloksia.<sup>32,33</sup> Mainittujen tutkimusten aikana pääasiallinen  
kohdepatogeeni oli kuitenkin *S. agalactiae*, joka vastasi hoitoon todella hyvin.<sup>33</sup>

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

215 Moni perustelu tukee kuitenkin korkeamman annoksen käyttämistä utaretulehduksen hoidossa. Ensinnäkin tutkimuksemme tuloksia tulee tulkita tietyllä varovaisuudella, sillä näytteet otettiin vain ensimmäisistä maitosuihkeista. Toisella betalaktaamiantibiootilla (kefapiriinillä) tehdyt tutkimukset ovat osoittaneet, että lääkeainepitoisuudet ovat ensimmäisissä suihkeissa korkeampia kuin sen jälkeen lypsetyssä maidossa, joten koko utareessa saavutettavaa lääkeainepitoisuutta mahdollisesti yliarvioidaan.<sup>34</sup>

220 Tämän tutkimuksen tulokset osoittavat, että maidon bentsyylipenisilliinipitoisuus vaihtelee huomattavasti eri lehmien välillä samassa hoitoryhmässä. Bjorland ym.<sup>35</sup> vertasivat kahta intramammaarista bentsyylipenisilliiniannosta viidellä lehmällä ja tekivät saman havainnon. Yksi utaretulehdushoidon kohdepatogeeni, *S. aureus*, voi tunkeutua syvemmälle utarekudokseen.<sup>36</sup> Penisilliini leviää utarekudokseen farmakokinetiikan tavanomaisia lainalaisuuksia noudattaen.<sup>37</sup> Tässä tutkimuksessa ei mitattu utarekudoksen 225 penisilliinipitoisuutta, joten penisilliinin tunkeutumista syvemmälle utarekudokseen tai terapeuttisen pitoisuuden saavuttamista siellä voidaan vain arvailla. Ehinger ja Kietzmann<sup>10</sup> kuitenkin havaitsivat, että kudoksen bentsyylipenisilliinipitoisuus väheni eksponentiaalisesti vertikaalisen etäisyyden vetimestä kasvaessa. Tämä voi selittää sen, miksi *S. aureuksen* aiheuttamaa kliinistä utaretulehdusta koskevassa kenttäkokeessa 230 saatiin paremmat hoitotulokset, kun utareensisäistä hoitoa täydennettiin penisilliini-injektioilla.<sup>25</sup>

Bentsyylipenisilliinin farmakokinetiikka terveillä lehmillä voi erota merkitsevästi utaretulehdusta sairastavista lehmistä, mutta vaikuttavien aineiden farmakokineettiset tutkimukset tehdään vain terveillä eläimillä.<sup>11</sup> Patologiset muutokset kliinistä 235 utaretulehdusta sairastavien lehmien utareissa, esimerkiksi utareen turvotus ja maitotiehyiden tukkeutuminen, voivat johtaa penisilliinin epätasaiseen jakautumiseen ja

paikallisesti alhaisempiin lääkeainepitoisuuksiin.<sup>37,38</sup> Kokeellisessa *S. uberis* –infektiossa tulehdusmuutokset aiheuttivat utareen maitotiehyiden laajamittaisen tukkeutumisen.<sup>39</sup>

240 Utaretulehdus muuttaa maidon koostumusta ja lisää veri-maitoesteen läpäisevyyttä, mikä voi nopeuttaa lääkeaineiden poistumista utareesta.<sup>40,41</sup>

Tuloksemme osoittivat, että pienipartikkelisessa öljysuspensiossa intramammaarisesti annetun bentsyylipenisilliinin pitoisuus plasmassa ja maidossa nousee annosta lisättäessä. Pienemmilläkin annoksilla maidon penisilliinipitoisuudet olivat selvästi kohdepatogeenien MIC-arvojen yläpuolella, mutta vaikuttavan aineen jakautuminen 245 tulehtuneessa utareessa ja joidenkin patogeenien leviäminen utarekudokseen on otettava huomioon. Näillä perusteilla on päädytty siihen, että tutkitun valmistein ohjeannos on 600 000 IU/neljännes annettuna kerran vuorokaudessa. Olisi hyödyllistä tehdä lisätutkimuksia kliinistä utaretulehdusta sairastavien lehmien utareensisäisestä penisilliinihoidosta, jotta voitaisiin määrittää hoidon optimaalinen annos ja kesto.

250

Kirjoitus on muokattu ja lyhennetty seuraavasta julkaisusta: Abbeloos E, Pyörälä S, Rajala-Schultz P, Mylly V. Determination of the intramammary dose of benzylpenicillin required to maintain an adequate concentration in the milk to inhibit Gram-positive bacteria in the clinically normal udder for 24 hr. *J vet Pharmacol Therap.* 2018;41:691-698.

255

## Sidonnaisuudet

Elke Abbeloos ja Vesa Mylly työskennelevät yrityksissä, jotka markkinoivat kirjoituksessa tutkittua valmistetta.

## KIRJALLISUUSLÄHTEET

260

1. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AKM, Wertheim HFL, Sumpradit N, et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(12), 1057-1098. 2013;13(12):1057-98.
- 265 2. Pol M, Ruegg PL. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci.* 2007;90(1):249-61.
3. Stevens M, Piepers S, Supre K, Dewulf J, De Vliegher S. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *J Dairy Sci.* 2016;99(3):2118-30.
- 270 4. European commission. Commission Notice: Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine. *Official Journal of the European Union.* 2015;58(C299/04): 7-26.
5. Prescott JF. Beta-lactam antibiotics: Penam Penicillins In: Giguere S, Prescott JF, Dowling PM, editors. *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine.* 5th ed. ed. New York, United States: John Wiley & Sons Inc; 2013. p. 135-53.
- 275 6. Erskine RJ, Wagner S, DeGraves FJ. Mastitis therapy and pharmacology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2003;19(1):109-38.
7. Turnidge JD. The pharmacodynamics of beta-lactams. *Clin Infect Dis.* 1998;27(1):10-22.
8. Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;50(3):245-59.
- 280 9. Ziv G. Drug selection and use in mastitis: systemic vs local therapy. *J Am Vet Med Assoc.* 1980;176(10 Spec No):1109-15.
10. Ehinger AM, Kietzmann M. Tissue distribution of benzylpenicillin after intramammary administration in the isolated perfused bovine udder. *J Vet Pharmacol Ther.* 2000;23(5):303-10.
11. EMA/CVMP. Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species.; 2000.
- 285 12. European commission. Regulations on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of the European Union.* 2010;No 37/2010:L15/1-72.
13. Terpstra J, Magel R. A new nonparametric test for the ordered alternative problem. *Journal of Nonparametric Statistics.* 2003;15(3):289-301.
- 290 14. Santman-Berends IM, Lam TJ, Keurentjes J, van Schaik G. An estimation of the clinical mastitis incidence per 100 cows per year based on routinely collected herd data. *J Dairy Sci.* 2015;98(10):6965-77.

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

15. Tenhagen BA, Hansen I, Reinecke A, Heuwieser W. Prevalence of pathogens in milk samples of dairy cows with clinical mastitis and in heifers at first parturition. *J Dairy Res.* 2009;76(2):179-87.
16. Vakkamaki J, Taponen S, Heikkila AM, Pyorala S. Bacteriological etiology and treatment of mastitis in Finnish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2017;59.
- 295 17. Verbeke J, Piepers S, Supre K, De Vliegher S. Pathogen-specific incidence rate of clinical mastitis in Flemish dairy herds, severity, and association with herd hygiene. *J Dairy Sci.* 2014;97(11):6926-34.
18. Thomas V, de Jong A, Moyaert H, Simjee S, El Garch F, Morrissey I, et al. Antimicrobial susceptibility monitoring of mastitis pathogens isolated from acute cases of clinical mastitis in dairy cows across Europe: VetPath results. *Int J Antimicrob Agents.* 2015;46(1):13-20.
- 300 19. Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, et al. Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand.* 2008;50:28.
20. FINRES. FINRES-Vet 2010-2012 Finnish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring and Consumption of Antimicrobial Agents. Helsinki: Evira; 2015. Contract No.: 2/2015.
- 305 21. MARAN. Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in The Netherlands in 2008. 2008.
22. SVARM. Swedish Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring. Uppsala, Sweden: The National Veterinary Institute (SVA); 2010.
- 310 23. Haenni M, Galofaro L, Ythier M, Giddey M, Majcherczyk P, Moreillon P, et al. Penicillin-binding protein gene alterations in *Streptococcus uberis* isolates presenting decreased susceptibility to penicillin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):1140-5.
24. Kalmus P, Aasmae B, Karssin A, Orro T, Kask K. Udder pathogens and their resistance to antimicrobial agents in dairy cows in Estonia. *Acta Vet Scand.* 2011;53:4.
- 315 25. Taponen S, Nykasenoja S, Pohjanvirta T, Pitkala A, Pyorala S. Species distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitic milk. *Acta Vet Scand.* 2016;58:12.
26. Pitkala A, Haveri M, Pyorala S, Myllys V, Honkanen-Buzalski T. Bovine mastitis in Finland 2001 - Prevalence, distribution of bacteria, and antimicrobial resistance. *J Dairy Sci.* 2004;87(8):2433-41.
- 320 27. Swedres-SVARM. Consumption of antibiotics and occurrence of antibiotic resistance in Sweden. Solna/Uppsala; 2014.
28. NORM-VET. Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. . Tromso / Oslo; 2016.

# Julkaistavaksi hyväksytyt käsikirjoitukset

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020

29. Eagle H, Musselman AD. The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. The Journal of Experimental Medicine. 1948;88(1):99-131.
30. Odenholt-Tornqvist I. Pharmacodynamics of beta-lactam antibiotics: studies on the paradoxical and postantibiotic effects in vitro and in an animal model. Scandinavian Journal of Infectious Diseases. 1988;20:1-55.
31. Hamilton-Miller JM, Shah S. Effect of antibiotic concentration on the killing of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*: comparison of the novel penem, Men 10700, with other beta-lactam antibiotics. J Antimicrob Chemother. 1999;44(3):418-20.
32. Le Louedec C. Effectiveness of antibiotics in bovine staphylococcal and streptococcal mastitis. Annals of Veterinary Research. 1978;9:63-88.
33. Edwards S. Antibiotics in the treatment of mastitis. Antibiotics in Agriculture. In: Wood-Bine M, editor. Antibiotics in agriculture. London, UK: Butterworths; 1962. p. 43-57.
34. Stockler RM, Morin DE, Lantz RK, Hurley WL, Constable PD. Effect of milk fraction on concentrations of cephapirin and desacetylcephapirin in bovine milk after intramammary infusion of cephapirin sodium. J Vet Pharmacol Ther. 2009;32(4):345-52.
35. Bjorland J, Waage S, Oedegaard SY, M., Hormazabal V. Concentrations of benzylpenicillin in milk of dairy cows after intramammary administration. Norsk Veterinaertidsskrift. 1998;110:5-11.
36. Almeida RA, Matthews KR, Cifrian E, Guidry AJ, Oliver SP. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. J Dairy Sci. 1996;79(6):1021-6.
37. Ziv G. Practical pharmacokinetic aspects of mastitis therapy--3: intramammary treatment. Vet Med Small Anim Clin. 1980;75(4):657-70.
38. Ullberg S, Hansson E, Funke H. Distribution of penicillin in mastitic udders following intramammary injection; an auto-radiographic study. Am J Vet Res. 1958;19(70):84-92.
39. Pedersen LH, Aalbaek B, Rontved CM, Ingvarsen KL, Sorensen NS, Heegaard PM, et al. Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. J Comp Pathol. 2003;128(2-3):156-64.
40. Erskine RJ, Wilson RC, Tyler JW, McClure KA, Nelson RS, Spears HJ. Ceftiofur distribution in serum and milk from clinically normal cows and cows with experimental *Escherichia coli*-induced mastitis. Am J Vet Res. 1995;56(4):481-5.
41. Zhao X, Lacasse P. Mammary tissue damage during bovine mastitis: causes and control. J Anim Sci. 2008;86(13 Suppl):57-65.

## KIRJOITTAJIEN OSOITTEET

Elke Abbeloos VetMed, Boehringer Ingelheim Vetmedica. Germany

360 Satu Pyörälä ELT, professori emerita, kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto,  
eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto

Päivi Rajala-Schultz ELT, professori, kliinisen tuotantoeläinlääketieteen osasto,  
eläinlääketieteellinen tiedekunta, Helsingin yliopisto

Vesa Myllys ELT, Vetcare Oy, PL 26, 04601 Mäntsälä

[vesa.myllys@vetcare.fi](mailto:vesa.myllys@vetcare.fi)

365



## TAULUKKO 1 TABLE

Bentsyylipenisilliiniannos ja lehmien paino, ikä, lypsyvaihe ja maidontuotos kolmessa koeryhmässä. Kokeessa annettu lääkeannos, joka laskettiin punnitsemalla tuubi ennen ja  
 370 jälkeen annostuksen, näkyy viimeisessä sarakkeessa.

Dose of benzylpenicillin, mean body weight, age, days in milk, and daily milk yield for each treatment group. The last column shows the actual dose of benzylpenicillin administered, calculated by weighing the intramammary tubes after administration.

| Hoitoryhmä       | Bentsyylipe<br>nisilliinin<br>oletus<br>annos (IU) | Lehmän paino<br>(kg) |             | Ikä (kk)      |             | Lypsyvaihe (pv) |             | Päivittäinen<br>maitomäärä (kg) |            | Bentsyylipenisilliinin<br>todellinen annos (IU) |        |
|------------------|--|----------------------|-------------|---------------|-------------|-----------------|-------------|---------------------------------|------------|---|--------|
|                  |  | Keski<br>arvo        | SD          | Keski<br>arvo | SD          | Keski<br>arvo   | SD          | Keski<br>arvo                   | SD         | Keskiarvo                                       | SD     |
| 1                | 200 000  | 585,4                | 55,5        | 40,8          | 12,3        | 149,2           | 34,2        | 32,3                            | 7,9        | 189 832,0                                       | 4613,0 |
| 2                | 300 000  | 622,8                | 74,2        | 46,4          | 14,0        | 156,2           | 23,3        | 32,4                            | 5,1        | 289 994,0                                       | 8404,0 |
| 3                | 600 000  | 615,2                | 43,1        | 42,8          | 18,3        | 151,0           | 36,7        | 32,8                            | 7,4        | 610 244,0                                       | 5829,0 |
| <b>Keskiarvo</b> |  | <b>607,8</b>         | <b>57,1</b> | <b>43,3</b>   | <b>14,2</b> | <b>152,1</b>    | <b>29,7</b> | <b>32,5</b>                     | <b>6,4</b> |   |        |

375

380

## TAULUKKO 2 TABLE

Maidon bentsyylipenisilliinipitoisuuden aritmeettinen ja geometrinen keskiarvo penisilliinin intramammaarisen annostelun jälkeen (noin 200 000 IU, 300 000 IU tai 600 000 IU).

385 Mean, standard deviation, and geometric mean of the benzylpenicillin concentration in the milk after intramammary administration of approximately 200,000, 300,000, or 600,000 IU of benzylpenicillin.

| Aika<br>(h) | Ryhmä 1 (200 000 IU)              |          |          | Ryhmä 2 (300 000 IU)              |          |          | Ryhmä 3 (600 000 IU)              |          |          |
|-------------|-----------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|-----------------------------------|----------|----------|
|             | Keskiarvo                         | SD       | Geom. ka | Keskiarvo                         | SD       | Geom. ka | Keskiarvo                         | SD       | Geom. ka |
|             | (ng/mL)                           |          |          | (ng/mL)                           |          |          | (ng/mL)                           |          |          |
| 0           | 5/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          | 5/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          | 5/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          |
| 12          | 35345,24                          | 22572,37 | 30438,00 | 41351,25                          | 16982,59 | 38558,00 | 103476,36                         | 45736,28 | 96380,47 |
| 24          | 2519,24                           | 626,19   | 2459,06  | 2843,88                           | 1160,82  | 2648,71  | 8778,28                           | 12314,25 | 4486,51  |
| 48          | 13,86                             | 10,18    | 11,19    | 18,77                             | 19,36    | 11,12    | 20,09                             | 8,85     | 18,37    |
| 72          | 5/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          | 3/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          | 5/5 näytettä alle määrittäysrajan |          |          |

390 Kuvatekstit

## KUVA 1 FIGURE

Plasman bentsyylipenisilliinipitoisuus (keskiarvo ja keskiarvon keskivirhe) penisilliinin intramammaarisen annostelun jälkeen (noin 200 000 IU, 300 000 IU tai 600 000 IU).

395 Mean benzylpenicillin concentration (with SEM) in plasma specimens after intramammary administration of approximately 200,000, 300,000, or 600,000 IU of benzylpenicillin.

## KUVA 2 FIGURE

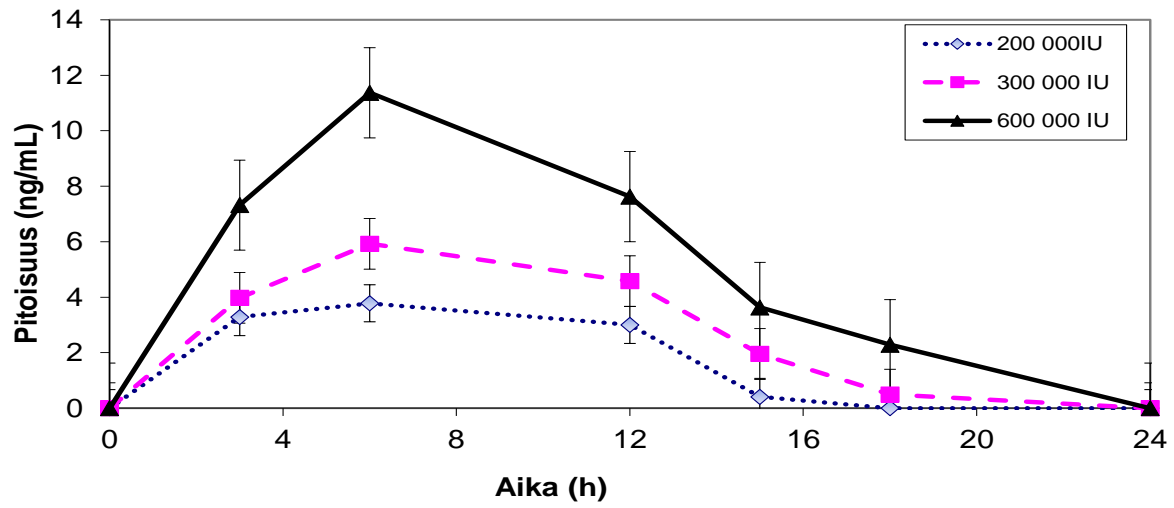
400 Maidon bentsyylipenisilliinipitoisuus logaritmisella asteikolla (keskiarvo ja SEM) penisilliinin intramammaarisen annostelun jälkeen (200 000 IU, 300 000 IU tai 600 000 IU).

Mean benzylpenicillin log concentrations (with SEM) in milk samples after intramammary administration of 200,000, 300,000, and 600,000 IU of benzylpenicillin

405

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

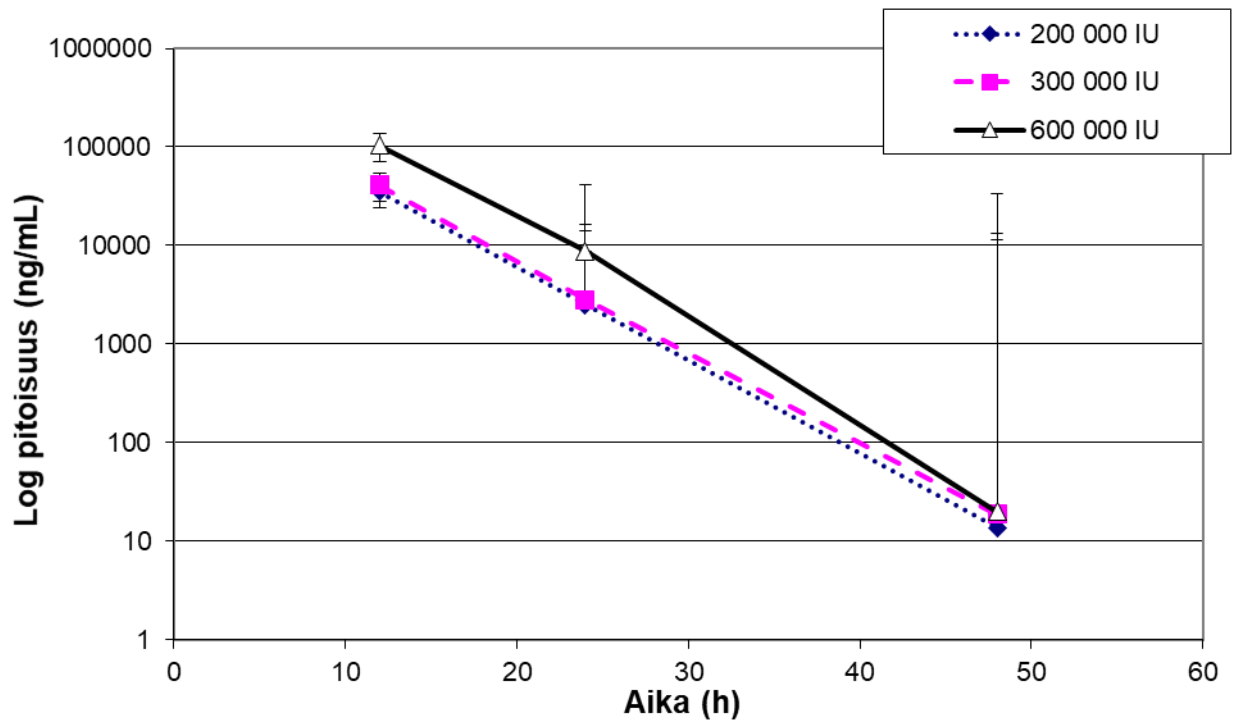
Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020



Kuva 1 Figure

# Julkaistavaksi hyväksytty käsikirjoitus

Suomen Eläinlääkärilehti 24.8.2020



410

Kuva 2 Figure