

SZENT ISTVÁN EGYETEM

Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

**Az amoxicillin-klavulánsav kombináció összehasonlító
farmakokinetikája brojlercsirkében és pulykában,
valamint baktérium-érzékenységi és stabilitási vizsgálata**

PhD értekezés

Tézisek

Készítette:

Dr. Jerzsele Ákos

**Budapest
2009**

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola

Iskolavezető

Dr. Huszenicza Gyula
egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezető

Dr. Gálfi Péter
tanszékvezető egyetemi tanár, az MTA doktora
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Témabizottsági tagok

Dr. Lehel József
egyetemi docens, az ao. tud. kandidátusa
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Dr. Csikó György
egyetemi adjunktus, az ao. tud. kandidátusa
SZIE-ÁOTK Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

Jelen disszertáció célja az amoxicillin-klavulánsav kombinációnak a baromfi-gyógyászatban való potenciális alkalmazásához tudományos eredményekkel szolgálni. Jelenleg a kombináció az Európai Unióban és az USA-ban nem rendelkezik baromfira hivatalos MRL-értékkel, így élelmiszer-termelő állatokban nem alkalmazható. Az amoxicillinnel szemben széleskörben kialakult rezisztencia miatt azonban a jövőben esetlegesen szóba jöhet a baromfi bizonyos fertőző kórképeinek kezelésére, a megfelelő engedélyezési eljárást követően. Vizsgálataink az alábbi három cél köré csoportosultak, melyek mindegyike fontos információval szolgálhat a kombináció jövőbeni alkalmazásához:

1. Célunk volt a két hatóanyag farmakokinetikájának megismerése házityúokban és pulykában intravénás és szájon át való alkalmazást követően. Összehasonlítottuk továbbá a hatóanyagok kinetikai viselkedését az adott állatfajon belül, mivel a kombináció hatékonyságának megítéléséhez ezen információk ismerete is szükséges.
2. Érzékenységi vizsgálatainkban *E. coli*, *S. enterica* és *P. multocida* törzseket vizsgáltunk, célunk volt ezekre a baktériumfajokra az aktuális MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek meghatározása, valamint az érzékeny törzsek arányának meghatározása amoxicillinre, illetve a klavulánsavval potenciált hatóanyagra.
3. Stabilitási vizsgálatainkban a hatóanyagok bomlékonyságát vizsgáltuk különböző keménységi fokú ivóvízmintákban, különböző pH-értékeken, valamint fém- és műanyag itatóedényben, ivóvízben. Ezen vizsgálataink eredményei a baromfi- és sertésenyésztésben leggyakrabban alkalmazott, ivóvízben való alkalmazhatósággal kapcsolatban hordoznak fontos információkat.

1. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikája házityúkban és pulykában intravénás és szájon át való alkalmazást követően

Házityúkban és pulykában az amoxicillin-klavulánsav kombináció szájon át való adását követő biológiai hasznosulásáról és farmakokinetikai paramétereiről nem áll rendelkezésre irodalmi adat, holott a két hatóanyag felszívódása és diszpozíciója a szervezetben döntően meghatározza klinikai alkalmazhatóságukat, a beadás lehetséges módjait, a dózist és az alkalmazási gyakoriságot.

Az amoxicillin-klavulánsav kombináció farmakokinetikáját mindkét állatfajban kétfázisú, kéthetes cross-over vizsgálatban elemeztük. Kísérleteinkben 12, Ross fajtajú, tojó brojlercsirkét és 12, BUT-6 hibrid, hathetes tojó pulykát használtunk. Az állatokat két csoportra osztottuk, és 6-6 állatot intravénásan és per os kezeltük 10 mg/ttkg amoxicillin és 2,5 mg/ttkg klavulánsav dóziséval, majd több időpontban (5., 10., 20., 30., 45., 60., 90., 120., 150. perc, valamint 3., 4., 5., 6., 7. és 8. óra) vért vettünk heparinózott csövekbe. A mintákat centrifugáltuk, majd validált RP-HPLC módszerrel, UV-detektálással meghatároztuk a hatóanyagok plazmakoncentrációját. Az eredmények alapján a legjobban illeszkedő farmakokinetikai modellnek intravénás beadás esetén a kétrekeszes, per os beadást követően az egyrekeszes modell bizonyult. Ezen modellek és számítógépes szoftver (*Kinetica 4.4*) segítségével meghatároztuk az alábbi farmakokinetikai paramétereket.

A legfontosabb farmakokinetikai értékek intravénás beadást követően **brojlercsirkében** a következők voltak: a megoszlási felezési idő amoxicillin esetében $0,11 \pm 0,01$ h, klavulánsavnál $0,10 \pm 0,01$ h volt, az eliminációs felezési idők $1,28 \pm 0,05$ h és $1,15 \pm 0,06$ h voltak. A látszólagos megoszlási térfogat amoxicillin esetében $1,44 \pm 0,06$ l/kg, míg klavulánsavnál $1,17 \pm 0,08$ l/kg-os értéket mutatott. A clearance értékek $0,78 \pm 0,03$ l/h/kg és $0,71$ l/h/kg, az MRT $0,88 \pm 0,03$ h és $0,78 \pm 0,07$ h voltak az amoxicillin és a klavulánsav esetében. Per os applikációt követően a felszívódási felezési idők $0,15 \pm 0,01$ h és $0,16 \pm 0,01$ h, az eliminációs felezési idők $1,28 \pm 0,05$ h, illetve $1,27 \pm 0,07$ h voltak az amoxicillin és klavulánsav esetében, a maximális plazmakoncentrációnál a két hatóanyag aránya megfelelt a kombináció hatékony arányának (amoxicillin $3,46 \pm 0,11$ µg/ml, klavulánsav $1,08 \pm 0,05$ µg/ml; ~3,2:1). A szájon át való alkalmazást követően a biológiai hasznosulás brojlercsirkében amoxicillinnél $63,8 \pm 2,6\%$, míg klavulánsavnál $65,7 \pm 3,1\%$. **Pulykában** az amoxicillin és a klavulánsav megoszlási felezési ideje intravénás beadást követően $0,11 \pm 0,01$ h, illetve

0,12±0,02 h voltak, az eliminációs felezési idők 1,28±0,03 h, illetve 1,18±0,12 h-nak adódtak. A clearance értéke amoxicillin esetében 0,78±0,12 (l/h)/kg, míg klavulánsavnál 0,61±0,03 (l/h)/kg volt. A MRT-érték 0,89±0,05 h és 0,92±0,05 h volt amoxicillinnél és klavulánsavnál. A megoszlási térfogat amoxicillin esetében 1,45±0,03 l/kg, míg klavulánsav esetében 1,04±0,08 l/kg-os értéket mutatott. Per os beadás esetén a két hatóanyag felszívódási felezési ideje gyakorlatilag megegyezett (0,13±0,01 h), amoxicillin esetében 1,28±0,05 h, klavulánsavnál pedig 1,27±0,07 h eliminációs felezési időt tapasztaltunk. A maximális plazmakoncentráció a hatóanyagok fenti sorrendjében 3,20±0,12 µg/ml-nek, illetve 1,05±0,12 µg/ml-nek adódott, amelynek eléréséhez 0,48±0,01 h, illetve 0,48±0,02 h-ra volt szükség. Az amoxicillin szájon át való biológiai hasznosulása pulykában 60,2±2,6%-nak, míg a klavulánsavé 60,7±6,3%-nak bizonyult.

A két állatfajban a hatóanyagok farmakokinetikájának összehasonlításakor számos különbséget tapasztaltunk az amoxicillin és a klavulánsav szájon át való beadását követően, valamint a klavulánsav intravénás alkalmazásakor. Fontos megemlítenünk a két hatóanyag szájon át való biológiai hasznosulásában tapasztalt különbségeket, amely amoxicillin esetében szignifikánsan nagyobb ($p < 0,05$) volt csirkében ($F = 63,8 \pm 2,6\%$), mint pulykában ($F = 60,2 \pm 2,6\%$). A klavulánsav esetében hasonló jelenséget figyeltünk meg, a per os hasznosulás szignifikánsan nagyobb volt csirkében ($F = 65,7 \pm 3,1\%$), mint pulykában ($F = 60,7 \pm 6,3\%$). Ezek az eltérések ugyan matematikailag szignifikánsnak bizonyultak, klinikai szempontból viszont nem jelentősek. Vizsgálataink alapján kijelenthető, hogy farmakokinetikai szempontból a kombináció alkalmazásának a fenti két állatfajban nincs akadálya.

2. Baromfiból izolált *E. coli*, *S. enterica* és *P. multocida* baktériumtörzsek érzékenysége az amoxicillin-klavulánsav kombinációra

Baktérium-érzékenységi vizsgálataink során házityúkból és pulykából izolált *E. coli* (n=103), *P. multocida* (n=85) és *S. enterica* (n=118) fajba (*S. Enteritidis* (n=71), *S. Infantis* (n=18) és *S. Typhimurium* (n=29) szerovariánsok) tartozó törzsek amoxicillinnel, illetve amoxicillin-klavulánsavval szembeni érzékenységét vizsgáltuk agarhígítós módszerrel. A vizsgálat részeként meghatároztuk az adott törzsre jellemző MIC-értéket, továbbá az összes baktériumtörzs 50%-ának, illetve 90%-ának növekedését gátló antibiotikum-koncentrációkat is (MIC₅₀ és MIC₉₀ értékek). Ezen eredményeinket összevetettük a CLSI által meghatározott

ún. break-point-értékekkel, így meghatároztuk az adott baktériumfajon belül az érzékeny, mérsékelt érzékeny és rezisztens törzsek arányát.

Az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor *E. coli* esetében a MIC₅₀ értéke 8 µg/ml, a MIC₉₀ értéke pedig 32 µg/ml lett. Ebben a fajban nagyfokú és gyakori rezisztenciát tapasztaltunk. Az amoxicillinre érzékeny *E. coli* törzsek aránya 41,7%, míg a klavulánsavval potenciált hatóanyagra 64,1% volt. A rezisztens törzsek arányának csökkenése a klavulánsav széles spektrumú laktamázgátló tulajdonságának köszönhető. A további rezisztens törzsek feltételezhetően AmpC-típusú laktamázokat termelnek vagy a porinszatórnák csökkent expressziójával összefüggésben csökkent sejtfal-permeabilitással rendelkeznek. *S. enterica* esetében a klavulánsavval potenciózott amoxicillinre vonatkozó MIC₅₀ 1 µg/ml, míg a MIC₉₀ 2 µg/ml volt. Az amoxicillinre a törzsek 94%-a, míg az amoxicillin-klavulánsavra a törzsek 97,6%-a bizonyult érzékenynek. A *P. multocida* esetén az amoxicillin-klavulánsav kombináció alkalmazásakor a MIC₅₀ érték 1 µg/ml, a MIC₉₀ érték pedig 4 µg/ml volt. A vizsgálatunkba bevont törzseknél az amoxicillinre érzékeny törzsek aránya 82,3%, míg a kombinációra érzékenyeké 98,8% volt. A pasteurellák és egyéb tápigényes baktériumok körében megfigyelhető laktamáz-termelés okozta rezisztencia tehát nagyrészt áttörhető a kombináció alkalmazásával.

Elmondhatjuk, hogy pasteurellák (MIC₉₀=4 µg/ml) és salmonellák (MIC₉₀=2 µg/ml) esetében a kombináció a vizsgált 12,5 mg/ttkg dózisban mérsékelt hatékonyságú, és a dózis növelése nélkül nem képes biztos hatást elérni ezen kórokozók által okozott vérfertőzésekben. *E. coli* (MIC₉₀=32 µg/ml) okozta szisztémás fertőzésekben a gyógyszer szintén nem képes terápiás koncentrációt elérni a vérplazmában, csupán a bélbeli magasabb gyógyszer-koncentráció játszhat szerepet a baktériumok gyérítésében, és így a septicaemia megelőzésében. További megoldást jelenthet a dózis növelése is, amely magasabb C_{max} értékeket, így hosszabb T>MIC intervallumot biztosít. Így több, septicaemiát okozó *E. coli* törzs ellen is hatékonyá válna a kombináció, bár az erre a fajra jellemző MIC₉₀-érték (32 µg/ml) elérése csak jelentősen magasabb adaggal lenne elérhető, amely nem lenne gazdaságos. Pasteurellák és salmonellák esetében a dózis növelése jelentősen javíthatja a terápia sikerességét, hiszen így a C_{max} emelkedésével egyre több törzs válna érzékennyé az antibiotikumra. Összességében elmondható tehát, hogy az amoxicillin-klavulánsav kombináció 12,5 mg/ttkg-os dózisa csak korlátozottan alkalmazható a baromfi olyan, nagy gazdasági jelentőségű, baktérium okozta fertőzésében, mint az *E. coli*, salmonellák vagy pasteurellák okozta septicaemia.

3. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció stabilitás-vizsgálata

Vizsgálataink során két – amoxicillin-trihidrátot és kálium-klavulanátot 4:1 arányban tartalmazó – 62,5% össz-hatóanyagtartalmú vízdékony porkészítmény stabilitását vizsgáltuk. Célkitűzésünk három kérdés köré csoportosult a.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása különböző keménységű fokú ivóvízmintákban; b.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása különböző pH-jú oldatokban; c.) a hatóanyagok feloldást követő stabilitása ivóvízben, fém- és műanyag itatóedényben. Ezeknek megfelelően vizsgáltuk az amoxicillin és a klavulánsav bomlását különböző keménységi fokú ivóvízmintákban (német keménységi fok, $nk^\circ = 2, 6, 10$), különböző pH-jú pufferoldatokban (pH = 3,0, 7,0, 10,0, a foszfátpuffer molaritása 0,2 M), valamint műanyag- és fémedényben (csapvízzel, pH=7,09).

A porkészítmények feloldását követően az egyes oldatokból közvetlenül elkészítésük után („0.” óra, 100 % -os koncentráció), majd a 2., 6., 12. és 24. órákban mintát vettünk, majd a hatóanyagok koncentrációit validált RP-HPLC módszerrel, UV-detektálással határoztuk meg. A hatóanyagok koncentrációinak logaritmikus csökkenése az idő függvényében a vizsgált oldatokban lineárisnak bizonyult, tehát elsőrendű kinetikát követett. A környezeti tényezők hatásának vizsgálatokor a koncentráció-csökkenés logaritmikus görbéinek meredekségét hasonlítottuk össze kétmintás Student-féle t-próbával.

Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy mindhárom vizsgálati elrendezésben matematikailag és gyakorlati szempontból is jelentős különbségeket találtunk a hatóanyagok stabilitását illetően. A vízkeménység csupán enyhén befolyásolta a hatóanyagok bomlási sebességét, azonban mindkét hatóanyag stabilabb volt az alacsonyabb keménységi fokú ivóvízben. Az amoxicillin savas közegben volt a legstabilabb, a pH növelése jelentősen növelte bomlási sebességét. A klavulánsav bomlásának sebessége mindhárom vizsgált pH-értéken kifejezettebb volt az amoxicillinnél. Savas közegben a laktamáz-inhibitor kifejezett bomlásnak indult, ezért az itatóvíz savanyítása a kombináció ivóvízben való adagolásakor ellenjavallt. Megállapítottuk, hogy a kombináció stabilitása elsősorban a jóval bomlékonyabb klavulánsavtól függ. Az enzimgátló minden keménységi fokon (semleges pH-értéknél), mindhárom pH-értéknél (műanyag itatóban, semleges közegben) gyorsabban bomlott az amoxicillinnél. Fém itatóedényben azonban az amoxicillin bomlásának sebessége gyorsult fel jelentősen. A referencia-termék stabilabbnak bizonyult fémedényben, de ennek ellenére az amoxicillin-klavulánsav kombináció fém itatóedényben való alkalmazása nem javasolt. Ajánlásaink alapján a hatóanyagokat közel semleges kémhatású ivóvízben, műanyag itatóedényben kell feloldani, az ivóvíz savanyítása (pl. almaecettel) ellenjavallt. Ezen

körülmények között mindkét hatóanyag koncentrációja a kezdeti koncentráció 90%-a körüli értéken, illetve e felett marad kb. 6 órán keresztül. Számítani kell továbbá arra, hogy kemény vízben a hatóanyagok bomlása kismértékben felgyorsul. A fenti okok miatt csökkenő antibiotikum-koncentráció ugyanis hatástalan vérplazma-koncentrációk kialakulásához, az antibakteriális terápia sikertelenségéhez vezethet, továbbá hozzájárul a bakteriális rezisztencia terjedéséhez.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztuk brojlercsirkében és pulykában a két hatóanyag farmakokinetikai paramétereit intravénás és szájon át való alkalmazást követően, valamint az antibiotikumok per os biológiai hasznosulását mindkét baromfifajban. A szakirodalomban elsőként megadtuk az amoxicillin-klavulánsav kombináció per os biológiai hasznosulását pulykában és a klavulánsav per os hasznosulását brojlercsirkében.

2. Megállapítottuk, hogy az aminopenicillin és a laktamáz-inhibitor farmakokinetikai tulajdonságai igen hasonlóak mind intravénás, mind per os alkalmazást követően mindkét állatfajban, amely a kombináció egyik fontos jellemzője. A két állatfajban kapott paraméterek összehasonlításakor matematikailag szignifikáns, de biológiailag, klinikailag nem jelentős a per os biológiai hasznosulásban való eltérés, mely magasabb volt brojlercsirkében, mint pulykában.

3. Meghatároztuk továbbá Magyarországon izolált, fontos baromfi-pathogén baktériumok (*E. coli*, *S. enterica* és *P. multocida*) esetében az amoxicillinre és az amoxicillin-klavulánsav kombinációra az aktuális 50%-os és 90%-os minimális gátló-koncentráció-értékeket (MIC₅₀ és MIC₉₀), melyekről magyarországi szakirodalom nem áll rendelkezésre, sőt, nemzetközi szakirodalomban is csak elvétve található naprakész adat. Salmonellák (MIC₉₀=2 µg/ml) és pasteurellák (MIC₉₀=4 µg/ml) esetében relatíve alacsony, *E. coli* esetén igen magas, MIC₉₀=32 µg/ml értékeket tapasztaltunk.

4. Stabilitás-vizsgálataink során megállapítottuk, hogy különböző német keménységi fokú ivóvízben, különböző pH-értékeken, illetve műanyag és fém itatóedényben hogyan változik a kombinációs partnerek bomlékonysága. Tapasztalataink alapján kijelenthetjük, hogy a kombinációban a legtöbb esetben a klavulánsav bomlása jóval kifejezettebb. Ez igaz a különböző keménységi fokú ivóvízmintákban, a különböző pH-jú oldatokban és műanyag itatóedényben, ivóvízben is. Fém itatóedényben az amoxicillin bomlása jelentősen meghaladta az enzimgátló bomlási sebességét.

5. Az amoxicillin-klavulánsav kombináció ivóvízben való alkalmazásakor a vízdékony porkészítmények feloldásához az elméletileg optimális közeg a lágy, közel

semleges pH-jú ivóvíz, illetve a műanyag itatóedény. Ezen körülmények között a hatóanyagok koncentrációja 6 órán keresztül a kezdeti koncentráció-értékek 90%-a körüli, illetve e feletti értéken mérhető.

Az értekezés témájához kapcsolódó publikációk

Jerzsele Á., Semjén G.: Az amoxicillin-klavulánsav kombináció használata az állatgyógyászatban. Irodalmi összefoglaló. *Magyar Állatorvosok Lapja*. 2006. 7. 419-426.

A. Jerzsele, G. Nagy, J. Lehel, G. Semjen: Oral bioavailability and pharmacokinetic profile of the amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and oral administration in broiler chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 2009. *Közlésre elfogadva*

A. Jerzsele, G. Nagy: The stability of veterinary amoxicillin trihydrate and potassium clavulanate combinations in aqueous solutions. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2009. *Közlésre elfogadva*