

Pharmakokinetik von Penicillinen bei der Pute

von Sarah Bolda

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Pharmakokinetik von Penicillinen bei der Pute

von Sarah Bolda

aus Hamburg

München 2017

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Klinik für Vögel, Kleinsäuger, Reptilien und Zierfische

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Mitbetreuung durch: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Rüdiger T. Korbel

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Tag der Promotion: 11. Februar 2017

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Schrifttum	3
2.1 Penicilline	3
2.1.1 Geschichte	3
2.1.2 Grundstruktur	4
2.1.3 Wirkmechanismus	5
2.1.4 Wirkspektrum	6
2.1.5 Resistenzmechanismen	7
2.1.6 Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin	9
2.1.7 Anwendung von Penicillinen bei der Pute	11
2.2 Pharmakokinetik	14
2.2.1 Resorption	15
2.2.2 Verteilung	18
2.2.3 Plasmaproteinbindung	20
2.2.4 Metabolisierung	22
2.2.5 Ausscheidung	23
2.3 Pharmakologische Voraussetzungen für die therapeutische Wirk- samkeit von Antibiotika	28
2.4 Nachweisverfahren	31
2.4.1 Mikrobiologische Verfahren	31
2.4.2 Flüssigkeitschromatographie	32
Nachweis von Penicillinen in Körpergeweben	35
Nachweis von Penicillinen im Blut	35

2.4.3	Immunologische Verfahren	36
	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	36
	Nachweis von Penicillinen	37
3	Material und Methoden	39
3.1	Materialien	39
3.1.1	Chemikalien	39
3.1.2	Geräte	40
3.2	ELISA	42
3.2.1	Durchführung	42
3.2.2	Erstellung der Standardkurve	44
3.2.3	Verwendete Antikörper und Enzyme	46
3.2.4	Herstellung des Kaninchen-anti-Maus-IgG Antikörpers . . .	46
	Immunisierung	46
	Serumgewinnung	47
	Affinitätsreinigung	47
3.2.5	Puffer und Lösungen	48
3.2.6	Penicilline	49
3.2.7	Schachbretttitration	50
3.3	Validierung des ELISA-Systems	52
3.3.1	Spezifität	52
3.3.2	Linearität	53
3.3.3	Genauigkeit	54
	Richtigkeit/Wiederfindung	54
	Präzision (Intra- und Inter-Assay-Variabilität)	55
3.3.4	Leerwertgrenze (LoB)	57
3.3.5	Nachweisgrenze (LoD)	58
3.3.6	Bestimmungsgrenze (LoQ)	59
3.3.7	Arbeitsbereich	60
3.4	Lagerungsstabilität	60
3.5	Plasmaproteinbindung	61
3.5.1	Bestimmung der unspezifischen Bindungen	61
3.5.2	Bestimmung der Plasmaproteinbindung	62
3.6	Pharmakokinetik	63
3.6.1	Versuchsplan	64

3.6.2	Versuchstiere	64
3.6.3	Haltung der Tiere	65
3.6.4	Versuchsdurchführung	66
	Orale Eingabe	66
	Intravenöse Eingabe	67
	Blutentnahme	69
	Verarbeitung der Proben im Labor	69
	Versuchsprotokolle	69
3.7	Probenauswertung	70
3.8	Pharmakokinetische Analyse	71
4	Ergebnisse	72
4.1	Validierung des ELISA	72
4.1.1	Spezifität	72
	Kreuzreaktivität mit den Hauptmetaboliten	72
	Kreuzreaktivität mit den verwendeten Penicillinen	75
4.1.2	Linearität	77
4.1.3	Genauigkeit	80
	Richtigkeit/Wiederfindung	80
	Präzision (Intra- und Inter-Assay-Variabilität)	85
4.1.4	Leerwertgrenze (LoB) und Nachweisgrenze (LoD)	86
4.1.5	Bestimmungsgrenze (LoQ) und Arbeitsbereich	89
4.2	Lagerungsstabilität	90
4.3	Plasmaproteinbindung	92
4.4	Pharmakokinetische Untersuchungen	92
4.4.1	Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser Eingabe	93
4.4.2	Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven nach oraler Eingabe	94
4.4.3	Berechnung ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach intravenöser Eingabe	97
4.4.4	Berechnung ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Eingabe	103
5	Diskussion	106
5.1	Etablierung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von Penicillinen im Blutplasma	106

5.2	Pharmakokinetische Daten	112
5.3	Klinische Relevanz der gemessenen Blutplasmakonzentrationen . .	120
6	Zusammenfassung	127
7	Summary	129
	Literaturverzeichnis	131
	Anhang	154
	Anhang I: Versuchsprotokolle	154
	Anhang II: Pharmakokinetische Formeln	158
	Anhang III: Blutplasmakonzentrationen nach intravenöser Eingabe . . .	162
	Anhang IV: Blutplasmakonzentrationen nach oraler Eingabe	163
	Anhang V: Pharmakokinetische Daten, intravenös	164
	Anhang VI: Pharmakokinetische Daten, oral	167
	Danksagung	171

Abbildungsverzeichnis

2.1	Grundgerüst der Penicilline	5
2.2	Strukturformeln der drei untersuchten Penicilline	10
2.3	Beispielhafte Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurve eines antimikrobiellen Wirkstoffes im Blutplasma	30
2.4	Schematische Darstellung eines Chromatogramms	33
3.1	Darstellung von zwei typischen Standardkurven für Penicillin G/ Penicillin V und Amoxicillin	45
3.2	Schematische Darstellung der Anfärbung einer ELISA-Platte nach Schachbretttitration	51
3.3	Verhältnis zwischen LoB und LoD	59
4.1	Kreuzreaktivität von <i>mAk 1F1</i> mit Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure und von <i>mab 3B5</i> mit Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure	73
4.2	Kreuzreaktivität von <i>mAk 1F1</i> mit Amoxicillin und <i>mab 3B5</i> mit Penicillin G und Penicillin V	77
4.3	Wiederfindungsrate von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin in 7 Verdünnungsstufen von 3,125 – 200 ng/ml	82
4.4	Inter-Assay-Variabilität im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISA	87
4.5	Verlauf der Blutplasmakonzentrationen nach intravenöser Eingabe	95
4.6	Verlauf der Blutplasmakonzentrationen nach oraler Eingabe	98
9.1	Berechnete pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Eingabe	164
9.2	Berechnete pharmakokinetische Parameter nach oraler Eingabe . .	167

Tabellenverzeichnis

2.1	In Deutschland fürs Geflügel zugelassene Penicillin-haltige Arzneimittel (excl. Brieftauben)	13
2.2	Gewebeverteilung von Penicillin G zum Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration ($T_{\max} = 0,5$ h) und zwei Stunden nach Verabreichung einer Dosis von 30 mg/kg an Hühner	26
3.1	Messbereiche für die Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität . . .	56
3.2	Messbereiche für die Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität . . .	57
3.3	Übersicht über die 3 Versuchsgruppen	65
4.1	Relative Extinktionen von Amoxicillin und den Metaboliten Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure	74
4.2	Relative Extinktionen von Penicillin G und den Metaboliten Benzylpenicilloinsäure und Phenoxyethylpenicilloinsäure	75
4.3	Linearität von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich	80
4.4	Wiederfindungsrate von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin in 7 Verdünnungsstufen von 3,125 – 200 ng/ml	84
4.5	Intra-Assay-Variabilität von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin	85
4.6	Inter-Assay-Variabilität im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISA	87
4.7	Berechnete Leerwert- (LoB) und Nachweisgrenzen (LoD) der drei Penicilline	89
4.8	Bestimmung der Konzentration des internen Standards von Penicillin G über den Verlauf mehrerer Monate	91
4.9	Penicillinkonzentrationen bei wiederholter Analyse von Blutplasma-proben über einen Zeitraum von 3 – 4 Monaten	91
4.10	Mittelwert und Standardabweichung von ausgesuchten pharmakokinetischen Parametern nach intravenöser Eingabe	102
4.11	Mittelwert und Standardabweichung von ausgesuchten pharmakokinetischen Parametern nach oraler Eingabe	105

9.1	Zur Berechnung pharmakokinetischer Parameter genutzte Formeln	158
9.2	Blutplasmakonzentrationen nach intravenöser Eingabe	162
9.3	Blutplasmakonzentrationen nach oraler Eingabe	163

Abkürzungsverzeichnis

6-APA	6-Aminopenicillansäure
Abb.	Abbildung
Amoxi	Amoxicillin
Ampi	Ampicillin
AUC	<i>area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
BTK	Bundestierärztekammer
CL	Clearance
CV	<i>coefficient of variation</i> , Variationskoeffizient
Da	Dalton
EIA	<i>enzyme immunoassay</i> , enzymatisches Immunadsorptionsverfahren
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> , Enzym-gekoppelter Immunbindungsassay
EMA	European Medicines Agency
g	Gramm
x g	Vielfaches der mittlere Erdbeschleunigung (Newton/kg)
h	Stunden
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
IC₅₀	50 %-Wert, Testmittelpunkt
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
IgG	Immunglobulin G
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse, Körpergewicht
L	Liter

LC	<i>liquid chromatography</i> , Flüssigkeitschromatographie
LoB	<i>limit of blank</i> , Leerwertgrenze
LoD	<i>limit of detection</i> , Nachweisgrenze
LoQ	<i>limit of quantification</i> , Bestimmungsgrenze
M	Mol
mM	Millimolar
mab	<i>monoclonal antibody</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
max	maximal
MBC	<i>minimum bactericidal concentration</i> , minimale bakterizide Konzentration
mg	Milligramm
MIC	<i>minimum inhibitory concentration</i> , minimale Hemmstoffkonzentration
min	Minuten
ml	Milliliter
MS	Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
MWCO	<i>molecular weight cutoff</i>
NaCl	Natriumchlorid
NAG	N-Acetylglucosamin
NAM	N-Acetylmuraminsäure
NE	Nekrotisierende Enteritis
nm	Nanometer
OAT1	organischer Anionen-Transporter Typ 1
PAE	postantibiotischer Effekt
p. Appl.	nach Applikation
Pen G	Penicillin G, Benzylpenicillin
Pen V	Penicillin V, Phenoxymethylpenicillin
PBP	<i>penicillin-binding protein</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PPB	Plasmaproteinbindung
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung

t	Zeit
Tab.	Tabelle
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
USB	unspezifische Bindung
V.	<i>Vena</i>

1 Einleitung

Die antibiotische Therapie bakteriell bedingter Infektionen stellt einen festen Bestandteil der kommerziellen Geflügelhaltung dar. Zu den am häufigsten eingesetzten Antibiotika im Bereich der Mastputenhaltung zählen dabei die Penicilline, vor allem die für Puten zugelassenen Stoffe Penicillin G und Amoxicillin. Außerdem werden im Rahmen der Umwidmung von Medikamenten im Therapienotstand noch Penicillin V und Ampicillin eingesetzt, welche für Hühner zugelassen sind (LANUV NRW, 2014; VETIDATA, 2016). Trotz ihres häufigen Einsatzes sind nur wenige Daten zum pharmakologischen Verhalten der Penicilline bei der Pute verfügbar. Drei Untersuchungen beschäftigten sich mit Amoxicillin, darunter eine neuere Studie aus dem Jahr 2011 (JERZSELE et al., 2011; LASHEV, 1986a,b). Für Penicillin G ist lediglich eine ältere Studie verfügbar, in der die Blutplasmaspiegel nach intramuskulärer Injektion sowie die Eliminationshalbwertszeit bestimmt wurden (HIRSH et al., 1978). Die Pharmakokinetik von Penicillin V wurde bei der Pute bisher noch nicht untersucht. Entsprechende Daten für das Haushuhn können einem Gutachten der European Medicines Agency entnommen werden, welches Angaben zum pharmakokinetischen Verhalten nach intravenöser und oraler Eingabe bei Hühnern umfasst (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Weitere beim Haushuhn durchgeführte pharmakokinetische Studien beschäftigen sich vor allem mit Amoxicillin (ABO EL-SOUD et al., 2004; ANADÓN et al., 1996; KRASUCKA und KOWALSKI, 2010; JERZSELE et al., 2009).

Die Kenntnis der pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften antibiotischer Wirkstoffe stellt eine essentielle Voraussetzung für die Optimierung des Dosierungsschemas dar. Ziel ist hierbei nicht allein ein bestmöglicher Therapieerfolg, sondern ebenso eine Minimierung der Resistenzbildung (MOUTON et al., 2011). Dieser Aspekt der antibiotischen Therapie ist in den letzten Jahrzehnten sowohl in der Human- als auch der Tiermedizin verstärkt in den Fokus getreten. Maßnahmen, welche das Risiko einer Resistenzentwicklung senken sollen finden sich unter anderem in den von der Bundestierärztekammer herausgegebenen *„Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln“*

(BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2015). Hierzu gehören zum Beispiel eine Vermeidung prophylaktischer Antibiotikagaben, ein Einsatz nach fachgerechter Diagnosestellung sowie die Auswahl des geeigneten Antibiotikums anhand von definierten Auswahlkriterien. Außerdem sollte die antibiotische Therapie in ausreichender Dosierung und über einen ausreichend langen Zeitraum erfolgen. Die Entscheidung für ein geeignetes Dosierungsschema erfordert dabei die genaue Kenntnis der Dosis-Wirkungs-Beziehungen des verwendeten Antibiotikums in der Zieltierart. Die zum Erreichen der therapeutischen Wirksamkeit und zur Verhinderung der Resistenzselektion und -expansion benötigten Dosierungen sind dabei nicht allgemeingültig, sondern können deutliche tierartliche Unterschiede aufweisen (TOUTAIN et al., 2010).

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst die Etablierung eines ELISA-Verfahrens, welches einen sensitiven Nachweis und eine sichere Quantifizierung der beim Geflügel eingesetzten Penicilline im Blutplasma von Puten erlaubt. Die Validierung des Systems erfolgte für die drei bei der Pute häufig eingesetzten Wirkstoffe Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin. Im Anschluss daran wurden pharmakokinetische Studien an Puten durchgeführt. In diesen wurden die pharmakokinetischen Basisparameter der drei Penicilline nach intravenöser und oraler Applikation erarbeitet. Hierdurch soll eine bessere Einschätzung und Bewertung der aktuell genutzten Dosierungsschemata ermöglicht werden.

2 Schrifttum

2.1 Penicilline

2.1.1 Geschichte

Schon seit dem Altertum ist die Nutzung von Schimmelpilzen zur Behandlung und Prophylaxe von Wundinfektionen bekannt. Berichte hierzu finden sich in verschiedensten Kulturkreisen, von den alten Ägyptern über griechische, asiatische und indische Zivilisationen, bei afrikanischen und australischen Urvölkern und im jüdischen Talmud. Über die Jahrhunderte fanden sie auch immer wieder Erwähnung in der europäischen und nordamerikanischen Volksmedizin (WAINWRIGHT, 1989a,b).

Nachdem sich, vor allem in der zweiten Hälfte des 19ten Jahrhunderts, die Hinweise gemehrt hatten, dass verschiedene *Penicillium*-Stämme an der antimikrobiellen Wirkung des Schimmels beteiligt sein könnten, gelang Alexander Fleming im Jahre 1929 die erste Beschreibung der aktiven antibakteriellen Substanz Penicillin (FLEMING, 1929). Obwohl es Fleming gelang, den Penicillin-produzierenden *Penicillium*-Stamm zu isolieren und über Jahre hinweg weiter zu kultivieren, verhinderten Schwierigkeiten in der Gewinnung und Aufreinigung der Reinsubstanz und ihrer Stabilisierung in wässriger Lösung zunächst die weitere Entwicklung für den klinischen Einsatz. Erst im Jahre 1940 begann mit den Veröffentlichungen einer Oxforder Forschungsgruppe um E. Chain und H.W. Florey die klinische Erforschung und breitere therapeutische Anwendung des Penicillins. Sie entwickelten ein Protokoll für die Herstellung größerer Mengen des Penicillins aus den Fleming'schen *Penicillium*-Kulturen und eine Stabilisierung über eine ausreichend lange Zeit (ABRAHAM et al., 1941). Weiterhin bestätigten die Untersuchungen der Gruppe die geringe Toxizität der gefundenen Substanz sowie ihre *in-vitro* und *in-vivo* Wirkung gegen verschiedene Infektionserreger wie Clostridien, Streptokokken

und Staphylokokken (CHAIN et al., 1940). In den folgenden Jahren führte intensive Forschung, gestützt vor allem durch verschiedene pharmazeutische Unternehmen, zur Entwicklung von Methoden zur industriellen Produktion der Penicilline, die eine breite medizinische Anwendung ermöglichten (ELANDER, 2003).

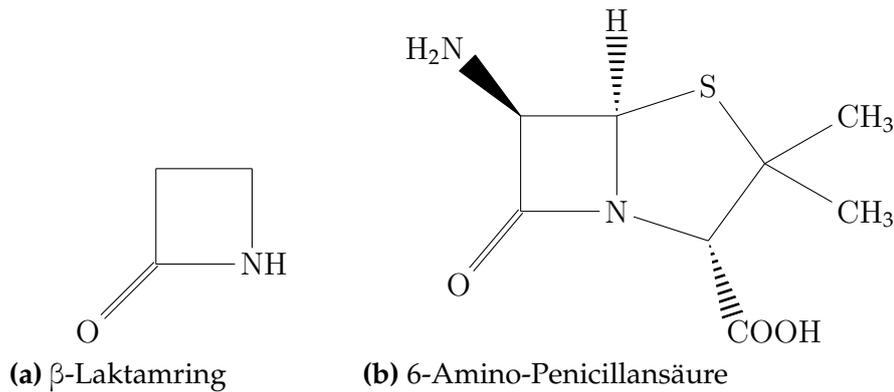
2.1.2 Grundstruktur

Die Penicilline gehören zu den β -Laktam-Antibiotika, welche als gemeinsames Merkmal einen β -Laktam-Ring in ihrem Molekül enthalten (Abb. 2.1a). Dieser ist verantwortlich für ihre antibakterielle Aktivität (DONOWITZ und MANDELL, 1988).

Neben den Penicillinen, welche in ihrer Grundform aus Kulturen von *Penicillium chrysogenum* gewonnen werden, sind in der Tiermedizin aus der Gruppe der β -Laktame vor allem die halbsynthetischen Cephalosporine von Bedeutung, deren Ursprungssubstanz, das Cephalosporin C, von dem Pilz *Cephalosporium acremonium* produziert wird. Auch einige β -Laktame ohne antibiotische Eigenwirkung, wie die Clavulansäure oder Sulbactam, werden als „ β -Laktamase-Inhibitoren“ in Kombination mit den Penicillinen genutzt, um deren Wirkungsspektrum zu verbreitern (STAHLMANN und LODE, 2013).

Gemeinsames Grundgerüst aller Penicilline ist die 6-Amino-Penicillansäure (6-APA; Abb. 2.1b). Ihr Kern besteht aus dem obligatorischen β -Laktamring, welcher mit einem Thiazolidinring fusioniert ist. Durch Modifizierungen der 6-APS-Seitenkette entstanden im Laufe der Zeit verschiedene halbsynthetische und synthetische Penicilline, welche im Vergleich zu den natürlichen Penicillinen veränderte Eigenschaften aufweisen (NATHWANI und WOOD, 1993). Diese Veränderungen führen zum Beispiel zu einem erweiterten Wirkspektrum, einer Stabilität gegenüber β -Laktamasen, oder zu einer erhöhten Säurefestigkeit und damit besseren Eignung für eine orale Medikation (PRESCOTT, 2013; SAMANIDOU et al., 2006a). Durch Veresterung des Benzylpenicillins mit Procain oder Benzathin lässt sich außerdem eine Depotwirkung erreichen (POTSCHKA et al., 2014).

Abbildung 2.1: Grundgerüst der Penicilline



2.1.3 Wirkmechanismus

Penicilline besitzen, bei ausreichend hoher Konzentration, eine bakterizide Wirkung, welche durch eine Störung der Zellwandsynthese der Bakterien vermittelt wird (DRAWZ und BONOMO, 2010). Hierbei binden die Penicilline an die sogenannten *penicillin-binding proteins* (PBPs). Dies sind bakterielle Enzyme, welche für die Verknüpfung von Peptidoglykan-Bestandteilen der Zellwand verantwortlich sind. Diese Transpeptidasen sind an der Außenseite der Cytoplasmamembran verankert und katalysieren die Quervernetzung des bakteriellen Peptidoglykans (WILKE et al., 2005), das aus alternierenden Einheiten von N-Acetylmuraminsäure (NAM) und N-Acetylglucosamin (NAG) aufgebaut ist (DRAWZ und BONOMO, 2010). In Gegenwart der Penicilline kommt es zu einer Blockade der Transpeptidierung und so zu einer Schwächung des Peptidoglykan-Gerüsts der Zellwand. Die resultierende Instabilität führt zu einer erhöhten Permeabilität der Zellwand, einem erhöhtem Wassereinstrom und schließlich zur Lyse des Bakteriums (WAXMAN und STROMINGER, 1983).

Die bakterizide Wirkung kann dabei nur auf Bakterienzellen ausgeübt werden, welche sich im Wachstum, also in der aktiven Phase der Zellwandbildung befinden (PRESCOTT, 2013).

2.1.4 Wirkspektrum

Das antibakterielle Wirkspektrum der natürlichen Penicilline umfasst vor allem grampositive Bakterien, während viele gramnegative Bakterien eine natürliche Resistenz aufweisen. Grund sind vor allem Unterschiede im Zellwandaufbau der Bakterien, da die Penicilline die Zellwand und den periplasmatischen Raum passieren müssen, um zu ihren Zielstrukturen, den an der äußeren Cytoplasmamembran gebundenen PBPs zu gelangen (POTSCHKA et al., 2014). Die grampositiven Bakterien besitzen neben ihrer inneren Membran zusätzlich eine dicke Zellwand, welche zu einem großen Teil aus Peptidoglykan und Teichonsäuren sowie weiteren Polysacchariden aufgebaut ist (SHOCKMAN und BARRETT, 1983). Die Zellwand der gramnegativen Bakterien enthält dagegen nur eine dünne Peptidoglykanschicht. Sie besitzt jedoch zusätzlich noch eine äußere Lipopolysaccharid-Membran. Außerdem befindet sich in ihrem periplasmatischen Raum eine gelförmige Matrix, das Periplasma (BEVERIDGE, 1999). Die Durchlässigkeit der äußeren Membran für viele Antibiotika sowie für andere Moleküle beruht im Wesentlichen auf dem Vorhandensein von Porinen (PAGES et al., 2008). Während die natürlichen Penicilline die Zellwand der grampositiven Bakterien ohne Schwierigkeiten durchdringen können, werden sie von der äußeren Membran der gramnegativen Bakterien zurückgehalten und können deshalb keine antibakterielle Wirkung entfalten. Penicilline mit erweitertem Wirkspektrum wie die Aminopenicilline (Ampicillin, Amoxicillin) können dagegen aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen die äußere Membran mithilfe der Porine durchdringen. Ihre Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien ist allerdings im Vergleich zu den natürlichen Penicillinen reduziert (STAHLMANN und LODE, 2013).

Gute Wirksamkeit besteht bei den natürlichen Penicillinen vor allem gegenüber den meisten grampositiven Erregern sowie gramnegativen Kokken. Zu den in der Tiermedizin bedeutenden Erregern zählen β -hämolyisierende Streptokokken, Staphylokokken (mit Ausnahme von β -Laktamase-Bildnern), *Actinomyces* spp., *Bacillus* spp., Clostridien, Corynebakterien, Listerien und *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Auch einige gramnegative Spezies wie *Bacteroides* spp., Fusobakterien, *Haemophilus* spp. und viele *Pasteurella* spp. sind grundsätzlich empfänglich (PRESCOTT, 2013). Das Wirkspektrum der Aminopenicilline ist auf zahlreiche gramnegative Erreger wie

E.coli, *Proteus mirabilis*, *Campylobacter* spp. und *Salmonella* spp. erweitert. Eine intrinsische Resistenz weisen dagegen einige Enterobacteriaceae wie *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. und *Citrobacter* spp. sowie *Pseudomonas* spp. auf, da diese Erreger β -Laktamasen bilden (NATHWANI und WOOD, 1993). Besonders in der Gruppe der Enterobacteriaceae sind außerdem erworbene Resistenzen weit verbreitet, die zur Abnahme der Effektivität der Antibiotika auch bei vormals sensitiven Erregern geführt haben (PRESCOTT, 2013).

Aufgrund ihres Wirkmechanismus sind alle Penicilline grundsätzlich wirkungslos gegenüber zellwandlosen Bakterien (z.B. Mykoplasmen), intrazellulär wachsenden Erregern (z.B. Chlamydien) und langsam wachsenden Bakterien wie Mykobakterien (STAHLMANN und LODE, 2013).

2.1.5 Resistenzmechanismen

Die erworbene Resistenz von Bakterien gegenüber β -Laktam-Antibiotika beruht im Wesentlichen auf drei Mechanismen: a) der Inaktivierung der β -Laktame durch Enzyme, b) strukturelle Veränderungen der PBPs, sodass die Penicilline nicht mehr an ihre Zielstrukturen binden können und c) Verringerung der Durchlässigkeit der Zellmembranen oder aktive Ausschleusung der Penicilline durch Effluxtransporter, sodass diese ihren Wirkort nicht erreichen können (WILKE et al., 2005).

Wichtigster Resistenzmechanismus ist, vor allem bei gramnegativen Bakterien, die Produktion von β -Laktamasen. Diese spalten den β -Laktam-Ring der Penicilline auf und führen so zu ihrer Inaktivierung (VAN KRIMPEN et al., 1987). Erste Berichte über die Fähigkeit der Bakterien zur Produktion Penicillin-spaltender Enzyme existieren schon seit Beginn der therapeutischen Nutzung der Penicilline (ABRAHAM und CHAIN, 1940). Zu Beginn zeigte nur ein geringer Anteil der Bakterienpopulation eine Resistenz gegenüber Benzylpenicillin, dieser stieg in der Folge aufgrund des weitverbreiteten Einsatzes der Penicilline und des so entstehenden Selektionsdrucks rapide an (LIVERMORE, 1998). Mittlerweile sind mehrere hundert β -Laktamasen bekannt, die in 4 Gruppen klassifiziert werden

(DRAWZ und BONOMO, 2010). Besonders im Fokus stehen zurzeit die *extended-spectrum* β -lactamases (ESBLs), welche eine erweiterte Resistenz gegenüber allen Penicillinen und Cephalosporinen sowie oft auch gegenüber weiteren Wirkstoffklassen (Aminoglykoside und Fluorchinolone) aufweisen (RODRÍGUEZ-BAÑO und PASCUAL, 2008). Eine Weitergabe der Gene, welche zur β -Laktamase-Bildung befähigen, erfolgt dabei vor allem über mobile genetische Elemente wie Plasmide und Transposons, wodurch eine schnelle Ausbreitung von Resistenzen in der Bakterienpopulation, sowohl innerhalb einer Spezies als auch speziesübergreifend, erfolgen kann. Über diese Mechanismen können auch Mehrfachresistenzen gegen eine Vielzahl verschiedener Antibiotika weitergegeben werden (FISHER et al., 2005). Die gebildeten β -Laktamasen befinden sich bei den gramnegativen Bakterien im periplasmatischen Raum, im Fall der grampositiven Bakterien werden sie nach außen abgegeben. Zum Teil bleiben sie außerdem an die cytoplasmatische Membran gebunden (WILKE et al., 2005).

Die Inaktivierung der Penicilline durch β -Laktamasen kann durch eine Kombination mit β -Laktamase-Inhibitoren wie Clavulansäure oder Sulbactam gehemmt werden. Diese gehören ebenfalls zu den β -Laktamen, weisen aber keine eigene antibakterielle Aktivität auf. Sie bewirken eine kompetitive Hemmung der β -Laktamasen. Aufgrund ihrer hohen Affinität zu den Enzymen in Verbindung mit ihrer hohen Stabilität, d.h. einem langsamen Abbau, besetzen sie langfristig ihre Bindungsstellen. Gleichzeitig verabreichte Penicilline können so nicht mehr angegriffen und inaktiviert werden (BABIC et al., 2006). Typische in der Praxis verwendete Kombinationen sind zum Beispiel Amoxicillin + Clavulansäure oder Ampicillin + Sulbactam (DRAWZ und BONOMO, 2010).

Außerdem wurde versucht, die Stabilität der β -Laktame gegenüber der Enzymaktivität durch strukturelle Änderungen am β -Laktam-Ring zu erhöhen. Dies führte zum Beispiel zur Entwicklung von Methicillin und Oxacillin, welche sich unempfindlich gegenüber der von Staphylokokken produzierten Penicillinase zeigen. Eine Resistenz gegen β -Laktamasen gramnegativen Ursprungs zeigen vor allem die Cephalosporine. Durch den fortwährenden Selektionsdruck auf die Bakterien und die Weiterentwicklung der von ihnen gebildeten β -Laktamasen kann diese erhöhte Stabilität allerdings auf Dauer nur schwer aufrechterhalten werden (LIVERMORE, 1998).

2.1.6 Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin

Das Benzylpenicillin, oder **Penicillin G** (Abb. 2.2a) entspricht dem ursprünglich von Fleming entdeckten Penicillin und war das erste therapeutisch eingesetzte β -Laktam (SAMANIDOU et al., 2006a). Es ist ein natürliches Penicillin, welches ohne zusätzliche Veränderung seiner Struktur im Labor aus *Penicillium chrysogenum*-Kulturen gewonnen werden kann. Wie alle natürlichen Penicilline weist es ein enges Wirkspektrum auf, das vor allem grampositive Bakterien und gramnegative Kokken umfasst (PRESCOTT, 2013). Außerdem ist es gekennzeichnet durch eine geringe Säurefestigkeit (MCDERMOTT et al., 1946), sodass für viele Spezies eine geringe orale Bioverfügbarkeit besteht.

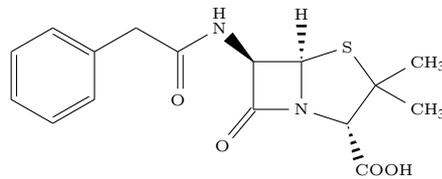
Phenoxymethylpenicillin, auch als **Penicillin V** bezeichnet (Abb. 2.2b), gehört zu den sogenannten Oralpenicillinen. Wie das Benzylpenicillin zählt es zu den natürlichen Penicillinen, das heißt es kann in *Penicillium*-Kulturen produziert werden, ohne weitere biotechnologische Veränderungen im Labor zu erfordern. Um die Schimmelpilzkulturen zur Produktion anzuregen, werden dem Kulturmedium Vorstufen der Seitenkette (Phenoxyessigsäure) zugegeben (SAMANIDOU et al., 2006a). Während sein Wirkungsspektrum dem von Penicillin G entspricht, zeichnet es sich durch eine erhöhte Säurefestigkeit aus und ist somit im Besonderen für eine orale Medikation geeignet (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2000).

Die Aminopenicilline weisen gegenüber den natürlichen Penicillinen ein erweitertes Wirkspektrum auf, das sowohl grampositive als auch gramnegative Erreger umfasst. Sie waren die ersten Penicilline, die eine therapeutische Effektivität gegenüber Enterobacteriaceae wie *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Shigella* spp. und *Salmonella* spp. zeigten (NATHWANI und WOOD, 1993). Im Vergleich zu den natürlichen Penicillinen ist allerdings die Wirkung auf grampositive Organismen in vielen Fällen vermindert, sodass bei diesen Erregern höhere Blutspiegel nötig sind, um einen bakteriziden Effekt auszulösen (POTSCHKA et al., 2014). Bei den Aminopenicillinen handelt es sich um halbsynthetische Verbindungen, bei denen der Grundstruktur der Penicilline eine Aminogruppe angefügt ist (Abb. 2.2c). Erstes genutztes Aminopenicillin war das Ampicillin (1961), im Jahre 1970 wurde dann **Amoxicillin**

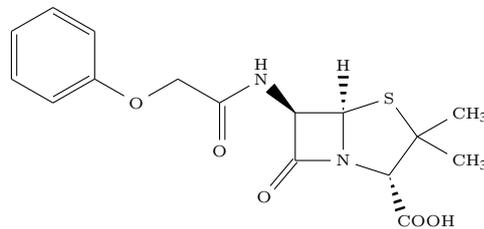
entwickelt, welches sich gegenüber Ampicillin durch eine gesteigerte Bioverfügbarkeit und damit eine bessere Eignung für den oralen Einsatz auszeichnet (KAUR et al., 2011).

Alle genannten Penicilline sind grundsätzlich empfindlich gegenüber β -Laktamasen.

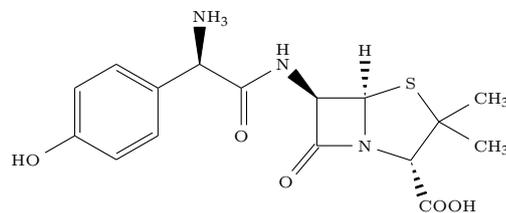
Abbildung 2.2: Strukturformeln der drei untersuchten Penicilline



(a) Benzylpenicillin (Pen G)



(b) Phenoxymethylpenicillin (Pen V)



(c) Amoxicillin

2.1.7 Anwendung von Penicillinen bei der Pute

Verschiedene Penicillinpräparate sind in Deutschland zur Anwendung beim Nutzgeflügel zugelassen (Tab. 2.1). Die Verabreichung erfolgt dabei in der Regel oral über das Trinkwasser (VETIDATA, 2016).

Bei der Pute werden Penicilline vor allem zur Bekämpfung von enteralen Infektionen mit Clostridien, insbesondere der Nekrotisierenden Enteritis (NE, *Clostridium perfringens*) und der Ulzerativen Enteritis (UE, *Clostridium colinum*) eingesetzt. Eine weitere Indikation ist die Behandlung von Infektionen mit *Erysipelothrix rhusiopathiae* (Rotlauf). Hier werden die Penicilline in Kombination mit Streptomycin verwendet (PRESCOTT, 2013). Für Amoxicillin bestehen weitere Anwendungsgebiete bei systemischen Infektionen, zum Beispiel Atemwegsinfektionen wie der ORT (Infektion mit *Ornithobacterium rhinotracheale*) (HAFEZ und HINZ, 2012).

Präparat	Wirkstoff	Geflügelspezies	Indikation
Amatib 800 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner	Infektionen Atemwege/ Verdauungstrakt
Amoxy Active 697 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner	Infektionen Respirations-/ Gastrointestinaltrakt
Biocillin 500 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner, Puten , Enten	Infektionen mit Amoxicillin-empfindlichen Keimen
Octacillin 800 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner	Respiratorische und gastrointestinale Erkrankungen, Behandlung und Metaphylaxe bei klinischen Symptomen
Solamocta 697 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner, Enten, Puten	Infektionen mit Amoxicillin-empfindlichen Erregern
Suramox 1000 mg/g	Amoxicillin-Trihydrat	Hühner, Enten, Puten	Infektionen mit Amoxicillin-empfindlichen Erregern
Ampicillin C20 GKS 200 mg/g	Ampicillin-Trihydrat	Hühner (Masthähnchen)	Infektiöse Blutvergiftungen, Infektionen Atemtrakt/ Rachenraum/ Magen-Darm-Trakt/ Gelenke, Rotlauf
Ampicillin P 1000 mg/g	Ampicillin-Trihydrat	Hühner (Masthähnchen)	Infektiöse Blutvergiftungen, Rotlauf, Infektionen Atmungstrakt/ Rachenraum/ Ohr/ Magen-Darm-Trakt/ Harn- und Geschlechtsorgane/ Gelenke/ Nabel/ Haut, Wunden, Abszesse, Sekundärinfektionen bei Viruserkrankungen

Ampicillin-Trihydrat 100, 1000 mg/g	Ampicillin-Trihydrat	Hühner (Broiler)	Infektionen Magen-Darm-Trakt/ Atemwege/ Harn- und Geschlechtsapparat
Ampiciph 1000 mg/g	Ampicillin-Trihydrat	Hühner (Broiler)	Infektionen Magen-Darm-Trakt/ Atemwege/ Harn- und Geschlechtsapparat
Apicin 10 g/100 g	Ampicillin-Trihydrat	Hühner (Masthähnchen)	Infektionen Magen-Darm-Trakt/ Atemwege/ Harn- und Geschlechtsapparat
Aviapien 250 mg/g	Benzylpenicillin-Kalium	Hühner (Junghennen, Broiler), Puten	Ulzerative und Nekrotisierende Enteritis
Baycubis 325 mg/g	Phenoxymethylpenicillin	Hühner	Prävention der Mortalität auf Gruppenebene infolge einer nekrotischen Enteritis bei Hühnern (<i>Clostridium perfringens</i>)
Phenoxyphen WSP, 325 mg/g	Phenoxymethylpenicillin	Hühner	Prävention der Mortalität auf Gruppenebene infolge einer nekrotischen Enteritis bei Hühnern (<i>Clostridium perfringens</i>)

Tabelle 2.1: In Deutschland fürs Geflügel zugelassene Penicillin-haltige Arzneimittel (excl. Brieftauben). Die Auflistung erfolgte in alphabetischer Reihenfolge des Wirkstoffes. Für die Pute zugelassene Präparate sind in Fettschrift hervorgehoben.

Quelle: vetidata.de, Stand 27.07.2016

2.2 Pharmakokinetik

Der klinische Einsatz antimikrobieller Chemotherapeutika erfordert neben der Kenntnis ihrer mikrobiologischen und pharmakodynamischen Wirkvoraussetzungen auch die Berücksichtigung ihrer pharmakokinetischen Eigenschaften. Diese beeinflussen die Aufnahme des Arzneimittels in den Körper (Resorption), seine Verteilung an den angestrebten Wirkort sowie die Geschwindigkeit seiner Metabolisierung und Ausscheidung (Elimination). Von diesen Faktoren ist das Erreichen eines therapeutischen Wirkstoffspiegels abhängig. Für die Entwicklung neuer Medikamente sind außerdem noch die toxikologischen Eigenschaften der Substanzen von besonderer Bedeutung, die ihre Verträglichkeit bestimmen (HODGSON, 2001). Die pharmakokinetischen Eigenschaften eines antimikrobiellen Wirkstoffes beschreiben also den zeitlichen Zusammenhang zwischen verabreichter Dosis und den erzielbaren Wirkstoffkonzentrationen in Blutplasma und den verschiedenen Geweben (ABDEL-RAHMAN und KAUFFMAN, 2004).

Außer im Rahmen der Arzneimittelentwicklung sind Kenntnisse der pharmakokinetischen Eigenschaften einer Substanz insbesondere von Bedeutung, wenn in der Praxis Dosisanpassungen vorgenommen werden müssen. Dies ist zum Beispiel bei Vorerkrankungen der Patienten (Leber-/Niereninsuffizienz), anderen pathophysiologischen Zuständen (Schock, Dehydratation, Resorptionsstörungen) oder im Fall einer Umwidmung der Spezies notwendig. Da für die meisten aviären Spezies sowohl im Wirtschaftsgeflügel als auch im Ziervogelbereich nur wenige pharmakokinetische Daten vorliegen, beruhen die verwendeten Dosierungen oft auf empirischen Annahmen sowie auf einer Extrapolation von bei verwandten Vogelspezies oder Säugetieren genutzten Protokollen (DORRESTEIN, 1991; VERMEULEN et al., 2002). Die Extrapolation zwischen verschiedenen Säugetierspezies, zum Beispiel zur Abschätzung von möglichen humanen Dosierungen nach Arzneimittelentwicklung im Laborsäuger, kann auf der Basis einer allometrischen Skalierung durchgeführt werden. Diese basiert auf der Annahme, dass Unterschiede im pharmakokinetischen Verhalten von Arzneistoffen bei verschiedenen Spezies mit Unterschieden in der Körpermasse/-größe des Organismus korrelieren und somit mithilfe von mathematischen Berechnungen vorhergesagt werden können (MAHMOOD, 2007). Während Vögel bezogen auf die Körpergröße grundsätzlich eine mit den Säugetieren vergleichbare metabolische Rate aufweisen (mit Ausnahme der

Passeriformes), existieren oft Unterschiede zum Beispiel in der Bioverfügbarkeit von Substanzen, ihrer Gewebeverteilung sowie der dominanten Metabolisierungs- und Exkretionswege (DORRESTEIN, 1991). Aus diesem Grund führt eine Extrapolation von Dosierungen allein auf der Basis von allometrischen Berechnungen zwischen Säuger und Vogel oft nicht zu zuverlässigen Ergebnissen (HUNTER et al., 2008; MAHMOOD, 2007). Auch zwischen den verschiedenen Vogelspezies bestehen Unterschiede in der Metabolisierung und Exkretion von Substanzen (CORTRIGHT und CRAIGMILL, 2006; HUNTER et al., 2008). Zur Erstellung rationaler Dosierungsschemata müssen deshalb speziesspezifische pharmakokinetische Daten erhoben werden (TOUTAIN et al., 2010).

2.2.1 Resorption

Die Resorption von Stoffen aus dem Magen-Darm-Trakt wird von den physikochemischen Eigenschaften der Substanzen wie ihrem pK_a -Wert, Lipidlöslichkeit und Molekülgröße bestimmt. Auch tragen die Bedingungen am Resorptionsort, vor allem die zur Verfügung stehende Resorptionsoberfläche und der pH-Wert bei (GRAMATTÉ, 2002b). Grundsätzlich gilt, dass eine Substanz schneller resorbiert wird, je höher ihre Lipidlöslichkeit und je größer ihr ungeladen vorliegender Anteil ist. Ionisiert vorliegende Stoffe können die Zellmembranen dagegen nicht überwinden (FREY, 2002). Dies gilt vor allem für die passive Diffusion, welche für die meisten Arzneistoffe den hauptsächlichsten Resorptionsmechanismus darstellt. Im Darm können Stoffe außerdem über einen aktiven Transport, also mit Hilfe von Carrier-Systemen, resorbiert werden (GRAMATTÉ, 2002b). In diesem Fall können auch hydrophile oder ionisierte Stoffe aufgenommen werden. Allerdings ist diese Form des Membrantransportes sättigbar (SUGANO et al., 2010), sodass keine unbegrenzt lineare Resorptionskinetik angenommen werden kann. In den meisten Fällen tritt die Sättigungsphase allerdings erst in sehr hohen Dosierungen auf, sodass die Resorption sich trotzdem über weite Bereiche proportional zur Stoffkonzentration darstellt (BYERS und SARVER, 2009). Außerdem kann es zu einer Inhibition der Medikamentenaufnahme durch andere im Darm vorliegende Substrate des Transporters kommen (SUGANO et al., 2010).

Hauptresorptionsort der Penicilline ist der Dünndarm (MCDERMOTT et al., 1946). Hier spielen sowohl passive Diffusion als auch aktive Transportprozesse eine Rolle. Der aktive Transport findet vor allem über den Oligopeptid-Transporter PEPT1 statt. Hauptsubstrat des PEPT1-Transporters sind alle Di- und Tripeptide aus der Nahrung. Einzelne Aminosäuren oder größere Proteine können dagegen nicht transportiert werden (DANIEL, 2004). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit (BRETSCHNEIDER et al., 1999; WALTER et al., 1996) können zusätzlich, allerdings oft mit geringerer Affinität, verschiedene Medikamente wie zum Beispiel einige β -Laktam-Antibiotika, ACE-Hemmer und antivirale Substanzen transportiert werden (BRANDSCH et al., 2008; BRETSCHNEIDER et al., 1999; SALA-RABANAL et al., 2006). Dies ist vor allem für die Aminopenicilline und Aminocephalosporine nachgewiesen worden. Auch für Penicillin G und V wird ein aktiver Transport über dasselbe Carrier-System angenommen. Dabei zeigen die verschiedenen β -Laktam-Antibiotika eine variierende Affinität zum Transporter (BRETSCHNEIDER et al., 1999; TSUJI et al., 1987). Die geringe Affinität von Penicillin G zum Transportsystem trägt dabei vermutlich, neben der geringen Säurestabilität, zu seiner niedrigen Bioverfügbarkeit bei (POSCHET et al., 1999).

Ausmaß und Geschwindigkeit der Resorption oral verabreichter Substanzen werden durch die pharmakokinetischen Parameter der Bioverfügbarkeit und der Resorptionshalbwertszeit beschrieben. Die Bioverfügbarkeit beschreibt den Anteil einer verabreichten Dosis, welcher den systemischen Blutkreislauf erreicht (SCHÄFER, 2002). Für das säurelabile Penicillin G wird dabei im Allgemeinen eine geringe Bioverfügbarkeit angenommen, da ein großer Teil der verabreichten Dosis im niedrigen pH des Magens hydrolysiert und somit inaktiviert wird (VAN KRIMPEN et al., 1987). McDermott et al. (1946) untersuchten bereits früh die Stabilität von Benzylpenicillin in Magensaft (37 °C) bei verschiedenen pH-Werten. Bei einem pH von 2 wurde das Penicillin rasch zerstört, innerhalb einer Stunde war kein Penicillin mehr nachweisbar. Bei einem pH zwischen 3 – 4 wurde eine beträchtliche Menge des Penicillins innerhalb von 15 min inaktiviert, danach lief die restliche Zerstörung über 4 h deutlich langsamer ab. Ein pH > 4 führte zu einer deutlich langsameren Inaktivierung. Ab einem pH von 7,2 fand über die untersuchten 4 h keine Inaktivierung mehr statt. Die Bioverfügbarkeit von oral verabreichtem Penicillin G hängt also sowohl von dem im Magen vorherrschenden pH-Wert, als

auch von der Aufenthaltsdauer im sauren Milieu, also der Passagegeschwindigkeit ab.

Beim Menschen wird die orale Bioverfügbarkeit von Penicillin G mit 20 % angegeben (FICHTL, 2001b). Untersuchungen an Pferden zeigten eine noch geringere Verfügbarkeit von 0.12 – 0.34 % (HORSPPOOL und MCKELLAR, 1995). Bei 7 Tage alten Kälbern wurde die Bioverfügbarkeit mit 10,2 % bestimmt (MUSSEK und ANDERSON, 2001). Bei älteren Rindern werden die Penicilline aufgrund der mikrobiellen Aktivität im Vormagensystem umfangreich degradiert, bevor sie den Drüsenmagen erreichen. Für Vögel liegen bislang keine Daten zur oralen Bioverfügbarkeit von Penicillin G vor. Bei einem durchschnittlichen pH von 3 – 4 im Muskelmagen (SVIHUS, 2011) kann auch beim Geflügel von einem schnellen Abbau des Penicillin G ausgegangen werden. Je nach Passagezeit müsste jedoch ein gewisser Anteil erhalten bleiben, welcher im Dünndarm für die Resorption zur Verfügung steht. Die Retentionszeit von Futter im Magen betrug in verschiedenen Studien beim Geflügel ca. 30 – 60 min (SVIHUS, 2014). In Lösung eingegebene Medikamente passieren den Magen dagegen schnell und können den Dünndarm schon einige Minuten nach Eingabe erreichen (TOUTAIN et al., 2010).

Penicillin V zeichnet sich gegenüber Penicillin G durch eine erhöhte Säurefestigkeit aus. Die Bioverfügbarkeit beträgt nach oraler Verabreichung von 50 mg/kg an Schweine 17 – 19 % (NIELSEN und GYRD-HANSEN, 1994), für Menschen sind Werte von 48 – 60 % (NATHWANI und WOOD, 1993; OVERBOSCH et al., 1985) ermittelt worden. Bei erwachsenen Pferden lag die Bioverfügbarkeit wiederum mit nur 1,65 % sehr niedrig (BAGGOT et al., 1990). Für Hühner wurde nach einer oralen Dosis von 15 mg/kg eine Bioverfügbarkeit von beachtlichen 69 % berechnet (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005).

Auch die Aminopenicilline weisen eine erhöhte Säurefestigkeit auf, wobei die Bioverfügbarkeit von Amoxicillin im Vergleich zu Ampicillin deutlich erhöht ist (LODE et al., 1974; PRESCOTT, 2013). Sie liegt bei Hunden für Amoxicillin bei 60 – 70 % (PRESCOTT, 2013), bei Schweinen bei 42 – 47 % (LASHEV, 1986a; MARTINEZ-LARRANAGA et al., 2004). Auch bei Hühnern wurde in mehreren Untersuchungen eine Bioverfügbarkeit von 61 – 64 % (ABO EL-SOUD et al., 2004; ANADÓN et al., 1996; JERZSELE et al., 2009) bestimmt. In einer weiteren Studie lag

sie allerdings nur bei 40 % (KANDEEL, 2015). Bei Puten lag die Bioverfügbarkeit ebenfalls bei 60 % (JERZSELE et al., 2011). Bei Tauben wurde hingegen nur eine Bioverfügbarkeit von 34 % gemessen (DORRESTEIN et al., 1984).

Die Resorptionshalbwertszeit wurde für Amoxicillin nach oraler Eingabe von jeweils 10 mg/kg an Hühner und Puten mit 9 bzw. 7,8 min bestimmt (JERZSELE et al., 2009, 2011). Vergleichbare Werte (9,6 min) lieferte eine weitere bei Hühnern durchgeführte Studie (ABO EL-SOUD et al., 2004). Für Penicillin V lag die Resorptionshalbwertszeit beim Menschen nach einer Eingabe von 500 mg/Patient bei 43 min (OVERBOSCH et al., 1985). Bei Hühnern wurde sie nach einer Dosis von 15 mg/kg mit 36 min bestimmt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005).

2.2.2 Verteilung

Die Verteilung einer Substanz im Körper ist von verschiedenen Faktoren abhängig wie der Durchblutung der Gewebe und ihrer Masse, dem vorherrschenden pH-Wert, der Durchlässigkeit der Membranen, der Bindung der Stoffe an Gewebe- und Plasmaproteine sowie ihrer Lipidlöslichkeit und Molekülgröße (MUTSCHLER et al., 2013). Eine Verteilung und Anreicherung von Medikamenten in den Körpergeweben geht mit einem Abfall ihrer Blutplasmakonzentration einher. Dadurch kann sie die Elimination der Stoffe verzögern und so zu einer Verlängerung der Wirkdauer beitragen (CALDWELL et al., 1995; FICHTL, 2001a).

Generell findet die Verteilung der Penicilline hauptsächlich in den extrazellulären Raum statt. Als schwache organische Säuren mit einem pK_a der Carboxylgruppe von 2,6 (Amoxicillin) bis 2,7 (Penicillin G und V) liegen sie im Blut zu einem großen Teil in ionisierter Form vor und können so biologische Membranen nur eingeschränkt passiv durchdringen (ALBARELLOS und LANDONI, 2009; TSUJI et al., 1978). Eine intrazelluläre Wirksamkeit ist daher nicht gegeben. Auch die intakte Blut-Liquor-Schranke wird nicht durchdrungen (STAHLMANN und LODE, 2013). Der extrazelluläre Körperwasserraum beträgt beim Geflügel etwa 26,2 % des Körpergewichts (DORRESTEIN et al., 1984), ähnlich den bei Säugetieren vorliegenden Werten von ca. 20 % (DERENDORF, 2002b).

Eine Einschätzung über das Ausmaß der Verteilung einer Substanz in die Körpergewebe wird durch die Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens (V_d) ermöglicht. Dieses entspricht dem theoretischen Flüssigkeitsvolumen, in welchem sich ein Stoff verteilen müsste, damit seine Konzentration überall der Plasmakonzentration entspricht (LEVISON und LEVISON, 2009). Anders ausgedrückt errechnet es sich aus dem Verhältnis der Dosis des Stoffes (bei einer Bioverfügbarkeit von 100 %) zur Plasmakonzentration unter Berücksichtigung der Eliminationsrate (SUMMIT RESEARCH SERVICES, 2005). Dieses Volumen ist eine theoretische Größe, dem kein realer Raum im Körper entspricht, sodass es bei einer hohen Anreicherung und Bindung von Stoffen an Plasma- und Gewebeproteine das Körpervolumen übersteigen kann (EICHELBAUM und SCHWAB, 2013b).

Bei Säugetieren zeigen die Penicilline im Allgemeinen ein geringes scheinbares Verteilungsvolumen, welches im Wesentlichen ihrer Verteilung innerhalb des extrazellulären Raumes entspricht. Das scheinbare Verteilungsvolumen von Penicillin G beträgt beim Menschen 0,3 L/kg, das von Amoxicillin 0,2 L/kg und das von Penicillin V 0,7 L/kg (FICHTL, 2001b). Ähnliche Angaben finden sich bei verschiedenen Haus- und Nutztieren für Penicillin G mit 0,35 – 0,54 L/kg für Equiden (HORSPPOOL und MCKELLAR, 1995) und 0,4 L/kg für Kühe (NOUWS und ZIV, 1978). Für Penicillin V wurde das scheinbare Verteilungsvolumen bei Schweinen mit 0,44 L/kg bestimmt (NIELSEN und GYRD-HANSEN, 1994). Das von Amoxicillin beträgt bei Hunden 0,31 L/kg (KUNG und WANNER, 1994). Bei einigen Vogelarten wurden dagegen deutlich höhere scheinbare Verteilungsvolumina gemessen. Nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg Amoxicillin wurde bei Puten ein V_d von 1,45 L/kg und bei Broilern von 1,44 L/kg erhoben (JERZSELE et al., 2009, 2011). In zwei weiteren Studien lag das scheinbare Verteilungsvolumen bei Hühnern bei einer vergleichbaren Dosis bei 1,12 L/kg (ABO EL-SOUD et al., 2004), nach doppelter Dosis (20 mg/kg) bei 1,61 L/kg (Puten) und 1,75 L/kg (Hühner) (CARCELES et al., 1995). Bei Tauben wurde für Amoxicillin nach 100 mg/kg iv. ein scheinbares Verteilungsvolumen von 1,51 L/kg gemessen (DORRESTEIN et al., 1987). In einer weiteren Studie wurde nach 25 mg/kg ein V_d von 1,77 L/kg bestimmt (ESCUADERO et al., 1998). Das scheinbare Verteilungsvolumen von Penicillin G bei Straußen und Emus lag dagegen im Bereich der für Säugetiere bestimmten Werte (CLARKE et al., 2001).

Die Verteilung der Penicilline im Körper findet innerhalb kurzer Zeit statt. Dies äußert sich durch eine kurze Verteilungshalbwertszeit. Sie lag in Studien an Puten und Hühnern für Amoxicillin bei 6,6 – 13,8 min (ANADÓN et al., 1996; JERZSELE et al., 2011). Für Hühner existieren unterschiedliche Angaben. Sie reichen von 2,8 min (ABO EL-SOUD et al., 2004) bis 18,6 min (KANDEEL, 2015). Bei Tauben wurde ebenfalls eine sehr schnelle Verteilung mit einer Halbwertszeit von 3,6 min gemessen (ESCUDERO et al., 1998).

Für Penicillin V wurde die Umverteilung in die Körpergewebe nach einer oralen Verabreichung von 20 mg/kg über 5 Tage an Hühner untersucht. 24 h nach der letzten Eingabe konnten in der Leber 346 µg/kg, in der Niere 428 µg/kg in der Haut 122 µg/kg, in der Muskulatur 69 µg/kg und im abdominalen Fett 68 µg/kg bestimmt werden (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Für die Rückstandsbestimmung von Amoxicillin wurden an 4 aufeinander folgenden Tagen 19 mg/kg oral an Hühner verabreicht. 48 und 96 h nach der ersten Behandlung wurden jeweils 3 Tiere entnommen und die Verteilung von Amoxicillin in Leber, Niere und Muskelgewebe untersucht. Nach 48 h konnten ca. 200 – 300 µg/kg in der Leber und ca. 70 – 100 µg/kg in der Niere identifiziert werden. Nach 96 h war die Wirkstoffkonzentration in der Leber auf ca. 50 – 100 µg/kg abgefallen, dagegen in der Niere auf 200 – 300 µg/kg gestiegen. Die Konzentration in den Muskelgeweben lag dauerhaft in einem niedrigen Bereich. 4 Tage nach dem Ende der Behandlung war bei zwei weiteren Tieren kein Amoxicillin mehr nachweisbar (HERMO et al., 2014).

2.2.3 Plasmaproteinbindung

Neben der Verteilung und Bindung an Gewebeproteine liegen die meisten Medikamente zu unterschiedlichen Anteilen auch im Blut reversibel an Plasmaproteine gebunden vor (EICHELBAUM und SCHWAB, 2013b). Wie groß der plasmagebundene Anteil eines Stoffes ist, kann dabei von Pharmakon zu Pharmakon auch innerhalb einer Stoffgruppe stark variieren. Für die Penicilline ist das Ausmaß der Plasmaproteinbindung vor allem vom Charakter ihrer Seitenkette abhängig (BERGOGNE-BEREZIN, 2002).

Generell gilt, dass nur der ungebundene, „freie“ Anteil eines Medikamentes eine pharmakologische Wirkung erzielen kann. Dies ist insbesondere für die antibakterielle Aktivität von β -Laktamen (*in-vitro*) mehrfach gezeigt worden (KUNIN, 1966; KUNIN et al., 1973). In diesen Studien korrelierten die Unterschiede in der antimikrobiellen Wirkung verschiedener Penicilline bei der Inkubation in humanem Serum und in serumfreiem Medium mit dem Grad ihrer Plasmaproteinbindung. Aus diesem Grund muss der Grad der Plasmaproteinbindung bei der Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit einer bestimmten Plasmakonzentration zusätzlich beachtet werden.

Auch das pharmakokinetische Verhalten von Pharmaka wird durch die Plasmaproteinbindung beeinflusst. So werden Stoffe bei einer hohen Plasmaproteinbindung tendenziell im intravasalen Raum gehalten, was ihre Verteilung in die Körpergewebe verringert (FREY, 2002). Wenn aber eine hohe Affinität sowohl zu Plasma- als auch zu Gewebeproteinen besteht, kann die Verteilung und Plasmaproteinbindung im Vergleich zu wenig gebundenen Stoffen gleichermaßen hoch sein (BENET, 1978; DERENDORF, 2002c). Da die Plasmaproteinbindung reversibel ist und eine Dissoziation der Stoffe vom Protein innerhalb kürzester Zeit (Millisekunden) eintritt, wird das Gleichgewicht zwischen ungebundener intravasaler und extravasaler Konzentration bei einer länger andauernden Perfusion der Organe immer wieder neu eingestellt (LINDUP und ORME, 1981; WISE, 1983). Eine pauschale Aussage, bzw. eine Vorhersage über das Verhalten verschiedener Substanzen einer Stoffgruppe ist aufgrund der vielen die Verteilung beeinflussenden Faktoren nicht möglich (BERGOGNE-BEREZIN, 2002). Auch der Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die Eliminationsrate einer Substanz muss differenziert betrachtet werden. Für Substanzen, die vor allem über eine glomeruläre Filtration ausgeschieden werden, ist die Elimination bei hoher Plasmaproteinbindung verringert, da nur der freie Anteil filtriert werden kann. Bei aktiver renaler Exkretion spielt die Plasmaproteinbindung in den meisten Fällen dagegen keine Rolle. Bei einem verringerten Verteilungsvolumen der Substanzen und damit einem erhöhten intravasalen Anteil kann die Elimination sogar beschleunigt sein (LINDUP und ORME, 1981). Im Fall der β -Laktam-Antibiotika scheinen die teilweise deutlichen Unterschiede in der Plasmaproteinbindung der verschiedenen Penicilline keinen Effekt auf die Elimination zu haben (WISE, 1983).

Insgesamt ist das Ausmaß der Plasmaproteinbindung nicht geeignet, Unterschiede der Pharmakokinetik zwischen verschiedenen Substanzen zu erklären. Sie ist jedoch bei der Extrapolation von Dosierungen zwischen den verschiedenen Spezies (BENET und HOENER, 2002) und bei Vorliegen von Krankheitsprozessen, die mit einem verminderten Proteinanteil im Blut einhergehen (Leber-/ Nierenerkrankungen) (DERENDORF, 2002c) zu berücksichtigen. Derartige Variationen der Plasmaproteinbindung spielen vor allem bei stark gebundenen Stoffen eine Rolle (> 80 – 85 % PPB), da hier schon eine geringe Änderung der Plasmaproteinbindung zu starken Veränderungen der frei vorliegenden Stoffkonzentrationen führt (SCHEIFFE, 1989). Die klinische Relevanz von Variationen in der Plasmaproteinbindung ist allerdings umstritten (BENET und HOENER, 2002).

Penicilline sind im Blut hauptsächlich an Albumin gebunden (CHOW und MCKEE, 1945; TOMPSETT et al., 1947). Bei Menschen wird die Plasmaproteinbindung mit 45 – 60 % für Penicillin G, 65 – 80 % für Penicillin V und 20 % für Amoxicillin angegeben (BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, 1991; EHRNEBO et al., 1971; STAHLMANN und LODE, 2013; WARREN, 1965). Keen (1965) untersuchte die Plasmaproteinbindung bei verschiedenen Nutztieren (Schwein, Ziege, Schaf, Rind, Pferd) und fand Werte von 36,6 (Schwein) – 62,1 % (Pferd) für Penicillin G und Werte von 55,8 (Schwein) – 68,2 % (Pferd) für Penicillin V. Für Amoxicillin wurde beim Pferd eine Plasmaproteinbindung von 38 % (MONTESISSA et al., 1988) und beim Kaninchen von 9,5 – 10 % gemessen (WOODNUTT et al., 1995). Eine weitere Studie fand beim Hund eine Plasmaproteinbindung von 34 % und bei Ratten und Mäusen von 18 bzw. 15 % (SAKAMOTO et al., 1985). Allerdings lag der in dieser Studie für den Menschen bestimmte Wert von 38 % weit über den üblicherweise angegebenen Werten. Auch die Plasmaproteinbindung beim Kaninchen (20 %) war erhöht. Bei Hühnern wurden von Abo El-Sooud et al. (2004) für Amoxicillin eine Plasmaproteinbindung von 1,63 – 15,5 % ermittelt.

2.2.4 Metabolisierung

Arzneistoffe werden im Körper in unterschiedlichem Ausmaß metabolisiert, das heißt in ihrer Struktur so verändert, dass sie in eine ausscheidungsfähige Form

überführt werden können. Diese chemische Veränderung ist vor allem bei stark lipophilen und unpolaren Substanzen nötig, da diese ansonsten nach ihrer Exkretion über die Niere oder Galle reabsorbiert werden können. (GRAMATTÉ, 2002a). Beim Vogel sind an der Metabolisierung wie auch beim Säugetier verschiedene Phase I und Phase II Reaktionen beteiligt. Allerdings können sich die bevorzugten Metabolisierungswege je nach Enzymausstattung deutlich von denjenigen anderer Spezies unterscheiden. So erfolgt zum Beispiel die Konjugation von vielen Stoffen beim Vogel vor allem an Ornithin, während bei Säugern Glucuronidierungsreaktionen dominieren (VERMEULEN et al., 2002).

Penicilline werden im Allgemeinen nur wenig metabolisiert, der größte Anteil wird unverändert über die Niere ausgeschieden (STAHLMANN und LODE, 2013). Beim metabolischen Abbau, der zum größten Teil in der Leber stattfindet, wird der β -Laktam-Ring hydrolytisch gespalten. Es entstehen inaktive Metaboliten, vor allem verschiedene Penicilloinsäuren. Außerdem können die Penicilline durch Entfernung ihrer Seitenketten modifiziert werden. Hierbei entsteht die 6-Aminopenicillansäure (6-APA) (COLE et al., 1973).

2.2.5 Ausscheidung

Die Elimination von Substanzen aus dem Körper erfolgt sowohl über den oben besprochenen Abbau der aktiven Komponenten auf dem Wege der Metabolisierung als auch über die endgültige Exkretion von aktiven und inaktiven Formen. Hauptwege der Ausscheidung von Arzneistoffen oder ihrer Metaboliten aus dem Körper sind vor allem die Exkretion über die Nieren oder die biliäre Ausscheidung über den Darm. Außerdem können Substanzen auch direkt über die Darmschleimhaut abgegeben werden. In seltenen Fällen spielt auch pulmonale Abgabe oder eine Exkretion in anderen Körperflüssigkeiten eine Rolle (DERENDORF, 2002a). Die renale Elimination kann über glomeruläre Filtration oder tubuläre Sekretion stattfinden, wobei letztgenannter Prozess auf aktiven Carriersystemen beruht und somit eine begrenzte Kapazität besitzt (FAN und DE LANNOY, 2014). Die tubuläre Sekretion ist also ein sättigbarer Prozess und kann in hohen Dosierungen oder bei Konkurrenz mit anderen gleichzeitig vorliegenden Substraten reduziert sein

(MORRISSEY et al., 2013). Außerdem kann es in den distalen Nierentubuli zu einer passiven Reabsorption von Substanzen kommen (FAN und DE LANNOY, 2014).

Beim Vogel ist die glomeruläre Filtrationsrate im Vergleich zum Säuger um etwa die Hälfte reduziert (Säuger: 4,8 ml/kg/min; Vögel 2,98 ml/kg/min) (DORRESTEIN, 1991). Eine tubuläre Rückresorption von filtrierten Medikamenten scheint kaum oder gar nicht stattzufinden (VERMEULEN et al., 2002). Ein weiterer wichtiger Unterschied zwischen aviären und Säugetiernieren ist außerdem das Vorliegen eines renalen Pfortadersystems beim Vogel. Blut aus den Venen der kaudalen Körperhälfte wird in die Niere umgeleitet und bildet dort ein zweites Kapillargebiet. Hierdurch wird eine erhöhte Rückresorption von Wasser und anderen Substanzen ermöglicht. Die Kapillaren des Nierenpfortadersystems umschlingen dabei lediglich die Nierentubuli, auf die glomeruläre Filtration haben sie keinen Einfluss. Das in die Niere geleitete Blutvolumen kann dabei stark variieren. Eine Regulation erfolgt unter anderem über eine Venenklappe, die *Valva portalis renalis* (BLACKBURN und PRASHAD, 1990; WAIBL und SINOWATZ, 2004). Bei geöffneter Klappe wird das Blut direkt in die *Vena cava* geleitet, während es bei geschlossener Klappe in die Niere gepresst wird. Die *Valva portalis renalis* ist vegetativ innerviert (BURROWS et al., 1983). Unter Einfluss von Acetylcholin kommt es zu einem Schluss der Klappe und einem Anstieg des Blutdrucks in der renalen Portalvene. Unter Adrenalineinfluss ist die Klappe dagegen geöffnet (BLACKBURN und PRASHAD, 1990). Es wird angenommen, dass es bei einer Injektion von tubulär sezernierten Arzneimitteln in die kaudale Körperhälfte, insbesondere die Hinterextremitäten, zu einer vorzeitigen Elimination im Sinne eines First-Pass-Effektes kommen könnte (VERMEULEN et al., 2002). Das Ausmaß dieses Effektes und sein möglicher Einfluss bei der Bestimmung pharmakokinetischer Parameter nach i.v. bzw. i.m. Injektion eines Stoffes in die Hinterextremität wurden bisher noch nicht abschließend untersucht.

Die meisten Penicilline werden beim Säugetier zum großen Teil unverändert über eine aktive tubuläre Sekretion renal eliminiert. Von den drei in dieser Studie untersuchten Penicillinen zeigt das Amoxicillin beim Menschen die geringste Metabolisierungsrate mit einer renalen Elimination von ca. 70 – 80 %. Auch für Penicillin G liegt die renale Elimination des unveränderten Wirkstoffes in einem Bereich von 50 – 90 %. Penicillin V wird dagegen in einem stärkeren Ausmaß metabolisiert.

Entsprechend der Literatur werden nur etwa 20 – 43 % einer Dosis in unveränderter Form renal ausgeschieden (NATHWANI und WOOD, 1993; STAHLMANN und LODE, 2001).

Auch beim Vogel findet die Elimination der Penicilline über die Niere vor allem über eine aktive tubuläre Sekretion statt. Wie beim Säuger kann die Ausscheidung von Penicillinen durch die gleichzeitige Gabe von Probenicid, eines selektiven Hemmstoffes des OAT1 (organischer Anionen-Transporter Typ 1), verzögert werden (ZIV et al., 1979). Allerdings gibt es Hinweise, dass bei Vögeln, im Gegensatz zum Säuger, auch die biliäre Exkretion unveränderter Penicilline eine Rolle spielen könnte. So wurde 2 h nach einer intramuskulären und oralen Verabreichung von 30 mg/kg KM Penicillin G an Hühner eine deutliche Anreicherung in der Galle gesehen. Nach intramuskulärer Applikation wurde das 80-fache der zur gleichen Zeit bestimmten Serumkonzentration gemessen, nach oraler Eingabe sogar der 160-fache Wert (Tab. 2.2). Hierbei ist zu beachten, dass die Serumkonzentration nach oraler Eingabe in einem niedrigeren Bereich liegt (YONEZAWA, 1973). Bei Menschen kommt es dagegen in der Galle nur zu einer 2 bis 4-fachen Anreicherung gegenüber den Plasmaspiegeln (NATHWANI und WOOD, 1993). Eine weitere Studie fand außerdem nach intramuskulärer Injektion von 100 mg/kg Ampicillin bei Hühnern eine hohe Konzentration des Penicillins im Dickdarm- und Dünndarminhalt sowie in der intestinalen Wand. Während eine Stunde nach der Applikation im Plasma nur Konzentrationen von 2,4 µg/ml gefunden wurden, lagen diese im Dickdarm bei 154 µg/g, im Dünndarm bei 39,6 µg/g und in der intestinalen Wand bei 9,2 bzw. 3,4 µg/g (EZHOV, 1978).

Die Eliminationshalbwertszeit der Penicilline ist im Allgemeinen kurz, sie liegt beim Menschen zwischen 30 – 40 (Penicillin G) bzw. 30 – 45 (Penicillin V) und 60 (Amoxicillin) min (NATHWANI und WOOD, 1993; STAHLMANN und LODE, 2013). Für die meisten Haus- und Nutztiere werden ähnliche Werte mitgeteilt (PRESCOTT, 2013). Allerdings schwanken die in verschiedenen Studien gemessenen Werte zum Teil erheblich. Bei Puten wurde für Penicillin G nach intravenöser Applikation von 50 mg/kg eine Halbwertszeit von 30 min gemessen (HIRSH et al., 1978). Eine ältere Studie fand bei Hühnern nach intramuskulärer Injektion von 12 mg/kg eine terminale Halbwertszeit von 33 min (SMITH, 1954). Beim Strauß wurde eine

Organ	Intramuskulär		Oral	
	T _{max}	2 h	T _{max}	2 h
Serum (µg/ml)	11,0	2,1	6,0	0,11
Niere	2,12	1,09	0,06	0,72
Leber	0,28	0,24	0,04	0,0
Galle	2,25	79,79	4,1	160,0
Lunge	0,81	0,44	0,03	1,5
Muskel	0,26	0,15	0,04	2,17
Gehirn	0,02	0,03	0,04	0,0

Tabelle 2.2: Gewebeverteilung von Penicillin G zum Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (T_{max} = 0,5 h) und zwei Stunden nach Verabreichung einer Dosis von 30 mg/kg an Hühner. Die dargestellten Organwerte beschreiben das Verhältnis von Organkonzentrationen (µg/g) zur Serumkonzentration (µg/ml). Daten entnommen aus Yonezawa (1973) und Dorrestein et al. (1984).

schnellere Elimination mit einer terminalen Halbwertszeit von 23 min gemessen. Beim Emu lag diese bei 44 min (CLARKE et al., 2001).

Für Penicillin V gibt es beim Vogel nur sehr wenige pharmakokinetische Daten. Nach einem Gutachten der EMA wurde bei Hühnern nach intravenöser Applikation von 15 mg/kg eine Eliminationshalbwertszeit von 35 min ermittelt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005).

Zur Pharmakokinetik von Amoxicillin beim Wirtschaftsgeflügel und bei Tauben gibt es verschiedene Untersuchungen, deren Ergebnisse sich in Bezug auf die Eliminationshalbwertszeit zum Teil deutlich unterscheiden. Nach intravenöser Injektion von 10 mg/kg Amoxicillin in Kombination mit 2,5 mg/kg Clavulansäure wurde die Eliminationshalbwertszeit sowohl bei Puten als auch bei Broilern mit 77 min bestimmt (JERZSELE et al., 2009, 2011). Eine etwas kürzere Eliminationshalbwertszeit von 64 min wurde bei Hühnern nach Eingabe der gleichen Dosis gemessen (ABO EL-SOUD et al., 2004). Nach Eingabe von 20 mg/kg wurde die Eliminationshalbwertszeit bei Puten mit 67, bei Hühnern mit 62 min bestimmt (CARCELES et al., 1995). Lashev (1986b; 1992) berichtet für Amoxicillin bei Puten über eine Halbwertszeit von 53 min, bei Hühnern von 35 min und bei Tauben von 32 min. Bei Anadón et al. (1996) wurde nach intravenöser Injektion von ebenfalls

10 mg/kg an Hühner dagegen eine Halbwertszeit von 8,17 h ermittelt. Bei Tauben betrug die Eliminationshalbwertszeit nach i.v.-Injektion von 25 mg/kg 73 min (ESCUDERO et al., 1998). In einer weiteren Studie lag sie nach i.v. Injektion von 100 mg/kg bei 46 min, nach i.m. Injektion bei 33 min (DORRESTEIN et al., 1987).

Ein weiterer pharmakokinetischer Parameter, der die Ausscheidungsgeschwindigkeit einer Substanz aus dem Körper beschreibt ist die Clearance (CL) (DERENDORF, 2002b). Wie auch bei der Eliminationshalbwertszeit kann hier nicht zwischen einer Elimination der Stoffe durch eine endgültige Exkretion oder einem Abbau durch Metabolisierung unterschieden werden (FAN und DE LANNOY, 2014). Die Clearance beschreibt die generelle Ausscheidungsrate eines Stoffes aus dem Organismus. Im Gegensatz zur Eliminationshalbwertszeit ist sie unabhängig vom Ausmaß der Verteilung eines Stoffes im Körper. So weist zum Beispiel ein stark im Körper verteilter Arzneistoff bei gleichbleibender Clearance eine verlängerte Halbwertszeit auf (FICHTL, 2001a).

Für Penicilline wurde bei den bisher untersuchten Säugetieren in den meisten Fällen eine Clearance von 200 – 600 ml/h/kg gemessen, zum Beispiel bei Pferd (ERRECALDE et al., 2001; HORSPOOL und MCKELLAR, 1995), Kuh (BENGTSSON et al., 1997), Schwein (MARTINEZ-LARRANAGA et al., 2004) und Hund (TEN VOORDE et al., 1990). Sie scheint beim Geflügel etwas höher zu liegen. Bei Hühnern und Puten wurde für Amoxicillin in zwei Studien eine Clearance von 780 – 800 ml/h/kg bestimmt (ABO EL-SOUD et al., 2004; JERZSELE et al., 2009, 2011). In einer früheren Publikation wurde für Puten sogar eine Clearance von 1.000 ml/h/kg und für Hühner von 1.190 ml/h/kg ermittelt (CARCELES et al., 1995). Bei Anadón et al. (1996) lag die Clearance für Amoxicillin lediglich bei 4 ml/h/kg. Dieser extrem niedrige Wert könnte jedoch auch experimentelle Ursachen besitzen, da gleichzeitig eine Eliminationshalbwertszeit von über 8 h und ein scheinbares Verteilungsvolumen von nur 0,049 L/kg bestimmt wurde. Für die Taube wird die Clearance von Amoxicillin mit 1.010 ml/h/kg mitgeteilt (ESCUDERO et al., 1998).

Für Penicillin V lag die Clearance bei Hühnern bei 7.100 ml/h/kg (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Da in derselben Studie eine Eliminationshalbwertszeit von 35 min ermittelt wurde, liegt hier vermutlich eine starke Verteilung des Penicillins vor (das Verteilungsvolumen wurde im Bericht nicht angegeben). Für Penicillin G

liegen bisher Daten für Strauße und Emus vor, hier wurde eine Clearance von 1.437 ml/h/kg bzw. 985 ml/h/kg bestimmt (CLARKE et al., 2001).

2.3 Pharmakologische Voraussetzungen für die therapeutische Wirksamkeit von Antibiotika

Die Dosis-Wirkungs-Beziehung eines antibiotischen Wirkstoffes im Körper wird sowohl von seinen pharmakokinetischen (PK) als auch seinen pharmakodynamischen (PD) Eigenschaften bestimmt. Die Pharmakokinetik beschreibt den Zusammenhang zwischen der verabreichten Dosis und dem zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort (CAWELLO und ANTONUCCI, 1997). Für die antibiotischen Arzneimittel sind hierbei insbesondere die Konzentrationen in der interstitiellen Gewebsflüssigkeit am Infektionsort relevant. Da diese nur schwer experimentell bestimmt werden können, wird eine Abschätzung über die erreichten Blutplasmakonzentrationen anhand der pharmakokinetischen Parameter der Wirkstoffe vorgenommen. Die Bestimmung der Wirkstoffkonzentrationen in Gewebehomogenaten ist dagegen oft weniger aussagekräftig, da es hier zu einer Vermischung der interstitiellen, intrazellulären und intravaskulären Kompartimente kommt (CRAIG, 1998). Die Pharmakodynamik beschreibt den antimikrobiellen Effekt, welcher durch die vorliegende Wirkstoffkonzentration hervorgerufen wird (CRAIG, 2003). Er wird nicht nur von der antimikrobiellen Potenz des Antibiotikums und der Gesamtexposition des Erregers, sondern auch von der Form und dem zeitlichen Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve beeinflusst (MOUTON et al., 2011).

Die antimikrobielle Aktivität von verschiedenen Wirkstoffen kann durch die Bestimmung der minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC) abgeschätzt werden. Hierbei wird jeweils die Effektivität eines bestimmten Antibiotikums gegenüber einer individuellen Bakterienspezies, bzw. gegenüber einem einzelnen Isolat oder Bakterienstamm bestimmt (TURNIDGE und PATERSON, 2007). Die MIC wird *in-vitro* bestimmt und ist definiert als die kleinste Konzentration eines antimikrobiellen Wirkstoffes, welche das sichtbare Bakterienwachstum noch hemmt. Die Inkubation der verschiedenen Wirkstoffverdünnungen mit den Bakterien erfolgt dabei in der Regel über Nacht (ANDREWS, 2001). Hierfür werden verschiedene Methoden,

insbesondere der Agar-Gel-Diffusionstest oder das Bouillon-Dilutions-Verfahren genutzt (WIEGAND et al., 2008). Während die MIC lediglich die Inhibition des Bakterienwachstums bei einer bestimmten Arzneimittelkonzentration anzeigt, kann der bakterizide Effekt von Stoffen zusätzlich noch durch die minimale bakterizide Konzentration (MBC) beschrieben werden. Hier werden die Bakterienpopulationen im Anschluss an eine Inkubation mit verschiedenen Verdünnungen des Antibiotikums in Abwesenheit des Wirkstoffes weiter kultiviert. Die MBC ist die kleinste Konzentration, welche ein erneutes Bakterienwachstum verhindert, die Erreger also abgetötet hat (ANDREWS, 2001). Die *in-vitro* bestimmten MIC und MBC-Werte können später mit den *in-vivo* im Blut oder in speziellen Geweben erreichten Wirkstoffspiegeln verglichen und so die therapeutische Effektivität der verabreichten Dosis abgeschätzt werden (TURNIDGE, 1998).

Eine erste Einteilung der antimikrobiellen Wirkstoffe erfolgt durch die Charakterisierung ihrer Wirkung auf Bakterien. Sie ist entweder bakteriostatisch oder bakterizid. Die bakteriostatischen Substanzen hemmen das Wachstum der Bakterien. Ihre endgültige Elimination muss aber durch körpereigene Abwehrmechanismen erfolgen. Bakterizide Antibiotika, zu denen auch die Penicilline gehören, bewirken dagegen in ausreichend hohen Konzentrationen eine Abtötung der Erreger (LEVISON und LEVISON, 2009). Für diese Wirkstoffe liegt die MBC üblicherweise in einem ähnlichen Konzentrationsbereich bzw. innerhalb einer 1:2 Verdünnungsstufe zur MIC (TURNIDGE, 1998). Die Effektivität der bakteriziden Antibiotika kann dabei entweder von der Dauer der Wirkstoffexposition (zeitabhängig bakterizide Wirkstoffe), der erreichten Spitzenkonzentration des Wirkstoffes (konzentrationsabhängig bakterizide Wirkstoffe) oder von beiden Parametern abhängen (Abb. 2.3).

Die Penicilline zählen zu den zeitabhängigen Antibiotika. Um eine antibakterielle Wirkung zu erzielen, muss am Infektionsort eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration über eine bestimmte Zeitspanne zwischen zwei Applikationsintervallen aufrechterhalten werden. Der maximale bakterizide Effekt wird bei einer Konzentration der 3 – 4fachen MIC erreicht. Eine weitere Erhöhung der Wirkstoffkonzentration führt zu keiner weiteren Zunahme der antibakteriellen Aktivität (TURNIDGE, 1998). Ein postantibiotischer Effekt (PAE), bei dem das Wachstum der Erreger auch nach dem Unterschreiten der MIC weiter gehemmt bleibt, ist

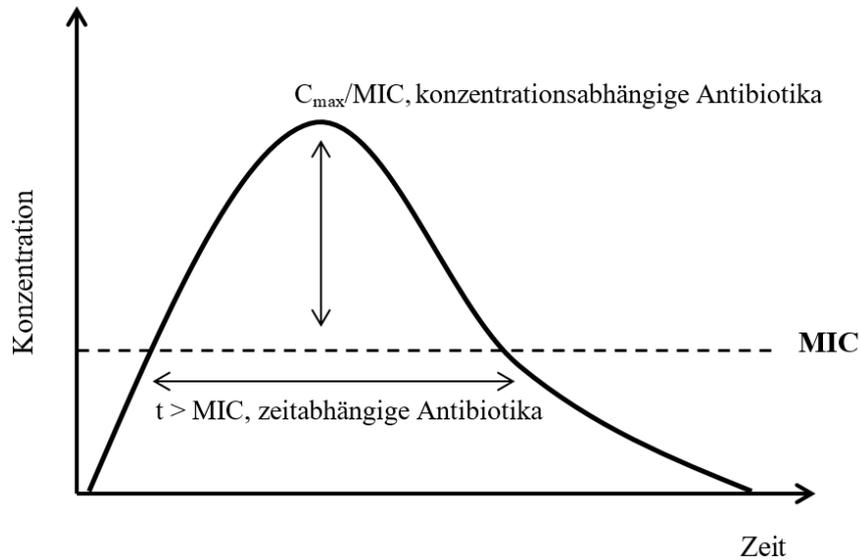


Abbildung 2.3: Beispielhafte Darstellung der Konzentrations-Zeit-Kurve eines antimikrobiellen Wirkstoffes im Blutplasma. Die Wirkung von zeitabhängigen Antibiotika wird vor allem durch den Zeitraum des Kurvenverlaufs oberhalb der minimalen Hemmstoffkonzentration ($t > \text{MIC}$) bestimmt. Die Wirkung konzentrationsabhängiger Antibiotika ist abhängig von der maximal erreichten Plasmakonzentration (C_{max}). Beim Mischtyp ist die Fläche unter der Kurve (AUC) oberhalb der MIC ausschlaggebend.

für Penicilline *in-vivo* nur für Staphylokokken beschrieben. Bei gramnegativen Erregern wird kein PAE beobachtet (CRAIG, 1998; ZHANEL et al., 1991). Um eine effektive Bekämpfung der Erreger zu ermöglichen, sollten die Wirkstoffkonzentrationen am Infektionsort nicht kontinuierlich sondern nur über einen Zeitraum von 40 – 50 % eines Dosierungsintervalls über der MIC liegen (FRIMODT-MOLLER, 2002; LEVISON und LEVISON, 2009). Hierdurch wird gewährleistet, dass nach dem Unterschreiten der MIC die Keime wieder zu proliferieren beginnen, damit sie aufgrund der Wirkvoraussetzungen der Penicilline bei der nächsten Dosis erfasst werden können. In der Regel kommt es hierdurch *in-vivo* zu einem ausreichend starken bakteriostatischen Effekt, um eine klinische und bakteriologische Heilung herbeizuführen (CRAIG, 1998). Nur bei Vorlage einer tiefen Neutropenie werden Blutplasmakonzentrationen oberhalb der MIC für einen Zeitraum von 90 – 100 % des Dosierungsintervalls benötigt. Für Staphylokokken ist die benötigte $t > \text{MIC}$ aufgrund des PAE verringert (TURNIDGE, 1998).

Zu den konzentrationsabhängigen Antibiotika zählen unter anderem die Aminoglykoside. Je höher die erreichte Spitzenkonzentration, desto stärker ausgeprägt ist ihr bakterizider Effekt. Eine Voraussage über die therapeutische Effektivität verschiedener Dosierungsschemata erlaubt hier die Bestimmung der C_{\max} im Verhältnis zur MIC (MCKINNON und DAVIS, 2004). Fluorchinolone schließlich bilden eine Mischgruppe. Für die Beurteilung ihrer therapeutischen Wirksamkeit wird das Verhältnis der AUC (*area under the curve*) zur MIC herangezogen. Fluorchinolone wirken umso besser, je größer die Gesamtmenge des Wirkstoffes oberhalb der MIC über einen bestimmten Zeitraum ist (AHMAD et al., 2016).

2.4 Nachweisverfahren

2.4.1 Mikrobiologische Verfahren

Mikrobiologische Verfahren zum Nachweis von Antibiotika beruhen im Wesentlichen auf der Hemmung des Wachstums eines Indikatorbakteriums in Anwesenheit antibiotischer Wirkstoffe. Diese Testverfahren wurden in der Mitte des letzten Jahrhunderts parallel zur Entwicklung kommerziell hergestellter Antibiotika eingeführt (HEWITT und VINCENT, 1989). Eine häufig genutzte Methode ist der Agar-Gel-Diffusionstest, bei dem zunächst das Indikatorbakterium flächig auf eine Agarplatte aufgebracht wird. In der Folge wird dann ein Antibiotikum bzw. das Probenmaterial, zum Beispiel Blutplasma oder Milch, an einzelnen Stellen der Platte aufgetragen. Dies kann entweder durch Auflegen von Plättchen (*disk diffusion*) (ZIESING et al., 2012) oder durch Auftragen antibiotikahaltiger Lösungen in ausgestanzte Vertiefungen im Agar (*well diffusion*) geschehen (MAGALDI et al., 2004). Soll flüssiges Probenmaterial zielgenau aufgetragen werden, können auch metallische Zylinder genutzt werden, welche auf den Agar gesetzt und dann befüllt werden. Während der folgenden Inkubationsphase diffundieren die aufgetragenen Substanzen im Agar und führen bei antibiotischer Wirkung zu einer Hemmung des mikrobiellen Wachstums (FINN, 1959). Der Durchmesser des ausgebildeten Hemmhofes ist proportional zu der in der Probe enthaltenen Wirkstoffmenge. Soll diese genauer quantifiziert werden, müssen gleichzeitig

Standardverdünnungen mit bekannter Antibiotikakonzentration untersucht werden. In einer frühen pharmakokinetischen Untersuchung wurde der Agar-Gel-Diffusionstest zur Quantifizierung von Penicillin G in Putenserum herangezogen (HIRSH et al., 1978). Als Indikatorbakterien dienten *Bacillus subtilis* und *Sarcina lutea*. Aus einer Standardverdünnungsreihe von Penicillin G wurde durch Auftragen der enthaltenen Penicillinkonzentration gegen den Durchmesser des gebildeten Hemmhofes eine Standardkurve erstellt und anhand dieser die in den Proben enthaltenen Penicillinkonzentrationen abgelesen. Auch eine 1987 bei Tauben durchgeführte Studie nutzte einen auf *Bacillus subtilis* basierenden mikrobiologischen Assay (DORRESTEIN et al., 1987).

Für die Arzneimittelzulassung wurden die mikrobiologischen Testverfahren weitgehend durch chromatographische (HPLC; LC-MS/MS) und immunologische Verfahren (ELISA) ersetzt. Mikrobiologische Verfahren sind weiterhin als Teil von Screening-Untersuchungen zum Nachweis von Arzneimittelrückständen in Lebensmitteln (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008; POPELKA et al., 2005) sowie bei der Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Antibiotika (BALOUIRI et al., 2016) und der Sensitivitätsprüfung von Erregern gegenüber verschiedenen antibiotischen Wirkstoffen relevant (TURNIDGE und PATERSON, 2007).

2.4.2 Flüssigkeitschromatographie

Für den Nachweis von Penicillinen in Körperflüssigkeiten, Geweben oder in wässriger Lösung werden vor allem flüssigkeitschromatographische Verfahren (LC, *liquid chromatography*; HPLC, *high performance liquid chromatography*) verwendet. In der modernen Analytik wird dabei in der Regel durch die Kopplung einer HPLC mit zwei Massenspektrometrie-Einheiten zu LC-MS/MS-Systemen eine hohe Sensitivität und Spezifität in Verbindung mit kurzen Analysezeiten erreicht. Flüssigkeitschromatographische Verfahren werden für unterschiedliche Zwecke eingesetzt, zum Beispiel zum Nachweis von Arzneimittelrückständen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs, in der Qualitätsprüfung für Arzneimittel und in der klinischen Diagnostik (CARVALHO, 2012; MASIÁ et al., 2016; SAMANIDOU

et al., 2006b). Auch im Rahmen der Arzneimittelzulassung gelten chemische Nachweismethoden wie die HPLC als bevorzugte Analyseverfahren zur Durchführung pharmakokinetischer Untersuchungen (EMA, 2000).

Wie alle chromatographischen Verfahren basiert die HPLC auf der Auftrennung von Stoffgemischen in ihre einzelnen Komponenten, welche anschließend von einem Detektionssystem individuell erfasst werden (HUPE, 1985). Die Auftrennung der verschiedenen Stoffe erfolgt dabei zwischen einer mobilen und einer stationären Phase. Die mobile Phase bewegt sich in einer konstanten Geschwindigkeit durch die stationäre Phase, die Interaktion der verschiedenen Stoffe mit den beiden Phasen bestimmt ihre Retentionszeit auf der Säule und damit den Zeitpunkt ihrer Detektion. Der qualitative Nachweis der Substanzen basiert auf ihren charakteristischen Retentionszeiten (Abb. 2.4). Eine Quantifizierung kann aufgrund der Fläche unter der Kurve des Chromatogramms erfolgen (FORNSTEDT et al., 2015).

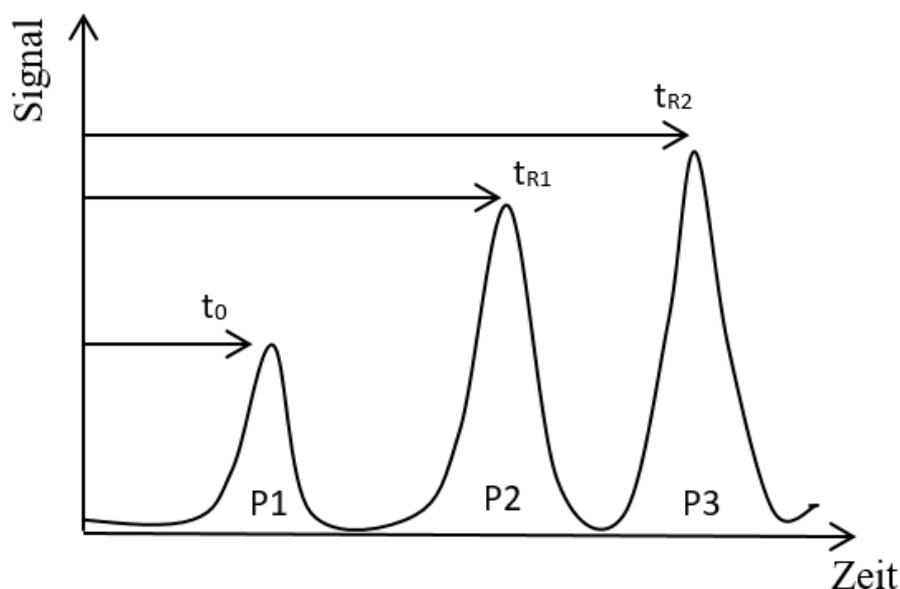


Abbildung 2.4: Schematische Darstellung eines Chromatogramms. Die Totzeit t_0 entspricht der Zeitdauer, welche eine nicht retardierte Substanz zum Durchwandern der stationären Phase benötigt. Sie ist für alle Substanzen gleich. P1 ist der Peak des nicht retardierten Lösungsmittels. P2 und P3 sind die Peaks zweier Analyten. Sie weisen jeweils typische Retentionszeiten auf (t_{R1}/t_{R2}), welche ihre qualitative Differenzierung ermöglichen. Eine Quantifizierung kann anhand der Fläche unter Kurve (AUC) erfolgen. Grafik modifiziert nach Hupe (1985)

Für die Detektion der Stoffe stehen verschiedene Systeme zur Verfügung, zum Beispiel UV-Detektoren, Fluoreszenz- oder Radioaktivitätsdetektoren oder eine Kopplung der HPLC mit Massen (MS)-, Infrarot (IR)- oder Kernspinresonanzspektrometrie (NMR). Die Auswahl des verwendeten Systems beruht auf den spezifischen Charakteristika der zu untersuchenden Substanz, der erforderlichen Sensitivität (gewünschte Nachweisgrenze), der Kompatibilität mit dem verwendeten HPLC-System sowie der Verfügbarkeit im jeweiligen Labor (SWARTZ, 2010).

In der Literatur ist eine Vielzahl von HPLC-Methoden zum Nachweis von Penicillinen u.a. in Blutplasma, Urin, Körpergeweben, Fermentationsbouillon, pharmazeutischen Formulierungen und Wasser beschrieben. Die genutzten Verfahren, Methoden der Probenvorbereitung, Nachweislimits und verwendete Detektionssysteme wurden in einem Übersichtsartikel verglichen (SAMANIDOU et al., 2006a). Hiernach werden bei 90 % der beschriebenen Methoden C₁₈-Säulen mit einer auf Silicagel basierenden stationären Phase genutzt. Als mobile Phase werden Mischungen von Methanol oder Acetonitril in verschiedenen biologischen Puffern verwendet. Die Vorbereitung der Proben erfolgt vor allem über Flüssig-Flüssig-Extraktion (42 %), Festphasenextraktion (38 %), Proteinpräzipitation (10 %) und Ultrafiltration (5 %). Als Detektionssystem wurde in 76 % der Fälle ein UV-Detektor genutzt, die verwendete Wellenlänge liegt üblicherweise in einem Bereich von 200 – 280 nm. Weitere Nachweismethoden umfassen die Massenspektrometrie, sowie elektrochemische, radiologische und fluoreszenzbasierte Detektionsmethoden. Bei der Nutzung von Fluoreszenz-Detektoren ist zu beachten, dass diese in vielen Fällen nicht zwischen den Penicillinen und ihren Metaboliten, den verschiedenen Penicilloinsäuren, diskriminieren, sodass hier höhere scheinbare Konzentrationen nachgewiesen werden können (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2008).

Für das Wirtschaftsgeflügel wurden HPLC-Verfahren bisher sowohl zum Nachweis von Penicillinen in verschiedenen Körpergeweben, hier vor allem im Hinblick auf Antibiotikarückstände in essbaren Geweben, als auch zur Quantifizierung von Blutplasma- und Serumkonzentrationen im Zuge von pharmakokinetischen Untersuchungen genutzt.

Nachweis von Penicillinen in Körpergeweben

Von Interesse sind insbesondere die gemäß EU-Verordnung Nr. 37/2010 in Bezug auf zulässige Rückstandshöchstmengen regulierten Penicilline (EU, 2010). Hierzu zählen Amoxicillin/Ampicillin und Penicillin G mit Höchstmengen von 50 µg/kg in Muskel, Leber, Niere und Fett (gilt für alle lebensmittelliefernden Tierarten). Für Penicillin V wurden für Geflügel und Schwein die Rückstandshöchstmengen auf jeweils 25 µg/kg für die o.g. Gewebe festgesetzt. Weiterhin existieren Rückstandshöchstmengen für die für das Wirtschaftsgeflügel irrelevanten Wirkstoffe Cloxacillin/Dicloxacillin, Oxacillin und Nafcillin.

Verschiedene HPLC-Methoden, sowohl zum Nachweis einzelner Penicilline als auch zur simultanen Messung mehrerer Wirkstoffe in einer Probe sind fürs Geflügel beschrieben. Macarov et al. (2012) entwickelten ein LC-MS/MS-Verfahren zur simultanen Bestimmung aller EU-regulierten Penicilline in Muskelgeweben von Schwein, Rind und Huhn. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen lagen fürs Huhn bei < 0,1 und 0,3 µg/kg für Penicillin G und Penicillin V, sowie bei < 1 und 3 µg/kg für Amoxicillin. Eine LC-MS/MS-Methode zum Nachweis von Penicillin V in essbaren Geweben (Muskel, Leber, Niere, Haut mit anheftendem Fett) zeigte eine Bestimmungsgrenze von 11,6 µg/kg beim Huhn und 11,2 µg/kg bei der Pute. Die Nachweisgrenze lag beim Huhn bei 0,6 ng/kg im Muskel, 0,7 ng/kg in der Niere, 1 ng/kg in der Leber und 0,9 ng/kg in der Haut (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Weitere Methoden zum Nachweis von Penicillinen in Körpergeweben des Geflügels sind u.a. von Berendsen et al. (2013), Hatano (2003) und Hermo et al. (2014) beschrieben. Auch diese basieren auf LC-MS-Verfahren.

Nachweis von Penicillinen im Blut

Mehrere Studien zum pharmakokinetischen Verhalten verschiedener Penicilline beim Geflügel nutzten HPLC-Verfahren zum Nachweis der Wirkstoffe im Blutplasma. Jerzsele et al. (2011) verwendeten eine Umkehrphasen-HPLC mit einer C₁₈-Säule und einem UV-Detektorsystem (220 nm) zum Nachweis von Amoxicillin im Plasma von Puten. Die Plasmaproben wurden vor dem Auftragen mit Methanol

deproteinisiert. Die Nachweisgrenze lag dabei bei 0,04 µg/ml, die Bestimmungsgrenze bei 0,12 µg/ml. Für Plasma von Hühnern wurde von denselben Autoren eine Bestimmungsgrenze von 0,16 µg/ml bestimmt (JERZSELE et al., 2009). Weitere Studien, die ebenfalls ein HPLC-System mit einem UV-Detektorsystem nutzten, zeigten in Hühnerplasma ähnliche Bestimmungsgrenzen von 0,09 – 0,15 µg/ml (ABO EL-SOUD et al., 2004; KANDEEL, 2015). Ermittelte Nachweisgrenzen lagen je nach Studie im Bereich von 0,08 – 0,1 µg/ml (ANADÓN et al., 1996; CARCELES et al., 1995; KANDEEL, 2015).

2.4.3 Immunologische Verfahren

Der Nachweis von Substanzen durch Immunoassays beruht auf spezifischen Antikörper-Antigen-Reaktionen. Der zu messende Analyt kann dabei als Antigen fungieren. Es können umgekehrt aber auch Antikörper mit spezifischen Antigenen nachgewiesen werden. Nach Mischung der beiden Komponenten kommt es zur Bildung von Antikörper-Antigen-Komplexen. Der nicht gebundene Anteil der Probe wird durch einen Waschschrift entfernt und anschließend die gebundene Menge des Analyten bestimmt (DARWISH, 2006). Die Messung des gebundenen Analyten erfolgte bei den ersten entwickelten Immunoassays durch eine Kopplung des Detektionsantikörpers an radioaktive Substanzen (RIA, Radioimmunoassay). Später wurden dann Verfahren entwickelt, welche auf einer Enzym-vermittelten Farbreaktion beruhen (EIA/ELISA, *enzyme immunoassay / enzyme-linked immunosorbent assay*) (LEQUIN, 2005). Weitere Nachweisverfahren beruhen auf Kopplung von fluoreszierenden (FIA, Fluoroimmunoassay) und chemielumineszierenden (CLIA, Chemielumineszenz Immunoassay) Substanzen oder von in Liposomen verpackten Markern (LIA, Liposom Immunoassay) (DARWISH, 2006).

Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Grundlage Enzym-basierter Immunoassays bildet eine feste Phase, zum Beispiel eine Mikrotiterplatte, an welche sich der Analyt entweder direkt bindet oder welche zuvor mit einem gegen den Analyten gerichteten Antikörper beschichtet wurde. Der Analyt befindet sich in einer flüssigen Phase. Je nach Probe können dies

z.B. Pufferlösungen, Blutplasma, Urin, Milch oder anderes flüssiges Probenmaterial sein. Nach dem Auftragen auf die Platte kommt es zur Bindungsreaktion und der immobilisierte Analyt kann durch einen Enzym-gekoppelten Detektionsantikörper nachgewiesen werden (**direkter** ELISA). Beim **indirekten** ELISA wird der Analyt nach Bindung auf der Platte zunächst an einen spezifischen primären Antikörper gebunden, welcher seinerseits mit einem sekundären, Enzym-gekoppelten Antikörper reagiert. In diesem Fall kann der Detektionsantikörper für verschiedene ELISAs genutzt werden, da er keine Antigen-Spezifität besitzen muss (SHAH und MAGHSOUDLOU, 2016). Von einem **Sandwich**-ELISA spricht man, wenn das Antigen (der Analyt) zwischen zwei Antikörpern gebunden wird. Hier ist die Mikrotiterplatte mit einem spezifischen, gegen den Analyten gerichteten Antikörper beschichtet. Die Detektion mit einem zweiten Antikörper kann wiederum direkt oder indirekt erfolgen (CROWTHER, 2001). Voraussetzung ist das Vorhandensein von zwei Antikörperbindungsstellen auf dem Antigen. Niedermolekulare Substanzen, wie die Penicilline, können daher nicht mit dieser Versuchsanordnung nachgewiesen werden (LITZ, 1995). Für ihre Bestimmung wird daher meist ein **kompetitiver** ELISA verwendet, bei dem der Analyt mit einem Enzym-gekoppelten Antigen um Bindungsstellen am Antikörper konkurriert. Je höher die Konzentration des Analyten in der Probe, desto weniger Enzym-gekoppeltes Antigen wird vom Antikörper gebunden und desto geringer ist die nach Zugabe des Enzymsubstrates entstehende Farbreaktion. Im Gegensatz zum Sandwich-ELISA ist die Farbintensität indirekt proportional zur Konzentration des Analyten (COX et al., May 2012 (Updated Dec 2014)).

Nachweis von Penicillinen

Immunoassays zum Nachweis von Penicillinen werden in der Tiermedizin bisher vor allem im Rahmen der Rückstandsuntersuchung von Lebensmitteln tierischen Ursprungs auf Antibiotika genutzt. Neben dem klassischen ELISA kommen hier unter anderem auch *lateral flow immunoassays* (LFA) zum Einsatz, welche eine schnelle und einfache Methode zum Screening von Proben darstellen (CHÁFER-PERICÁS et al., 2010; CHEN et al., 2016). Verschiedene neuere Publikationen beschäftigen sich vor allem mit dem Nachweis von Penicillinen in Milch (CHEN et al., 2016; GRUBELNIK et al., 2001; JIAO et al., 2013; STRASSER et al., 2003). Auch kommerzielle

ELISA-Kits zum Nachweis von Penicillinen in essbaren Geweben, Milch, Eiern und Shrimps sind verfügbar.

Zur Messung von Penicillin-Konzentrationen in Blutplasma oder -serum wurden bisher nur selten ELISA-Systeme verwendet. In zwei Untersuchungen wurde ein semiquantitativer ELISA genutzt, um Penicillin G, Ampicillin und Amoxicillin im Plasma von Schweinen und Rindern nachzuweisen. Die gemessenen Werte (positiv/negativ) sollten am lebenden Tier einen Rückschluss auf mögliche Rückstände in den anderen Körpergeweben ermöglichen (LEE et al., 2000, 2001). Hierfür wurde ein kommerzieller ELISA zum Nachweis von Penicillinen in Milch für die Nutzung mit Plasma adaptiert. Ein quantitativer ELISA zum Nachweis von Amoxicillin wurde außerdem im Rahmen einer pharmakokinetischen Studie im Taubenmodell zur Bestimmung der Penicillinkonzentrationen im Blutplasma und in der Pectoral- und Femoralmuskulatur (über Mikrodialyse) genutzt. Der selbstentwickelte ELISA wurde mit Rinderserum, -urin und -milch validiert. Im Serum wurde dabei eine Nachweisgrenze von 4,8 ng/ml und eine Wiederfindungsrate von 93 – 98 % bestimmt. Die Inter-Assay-Variabilität in PBS-Puffer lag bei 0,6 – 8,9 % (YEH et al., 2008).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Angaben zu den genutzten Antikörpern und Enzymen, den Penicillinen, sowie zur Herstellung der Pufferlösungen sind den jeweiligen Methodenkapiteln angegliedert (3.2.3 – 3.2.6, 3.6.4). Die Beschreibung der verwendeten Softwareprogramme und weiterer Verbrauchsmaterialien findet sich jeweils an relevanter Stelle im Text.

3.1.1 Chemikalien

Aceton (C_3H_6O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Casein	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	Merck KGaA, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat ($Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Chemie, Deisenhofen
Methanol (CH_4O)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcarbonat (Na_2CO_3)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure rauchend 37 % (HCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
3,3',5,5' – Tetramethylbenzidin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tris-HCl ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3 \cdot \text{HCl}$)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween [®] 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Tween [®] 80	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30 % (H_2O_2)	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.2 Geräte

Eismaschine AF 100	Scotsman ICE Systems Frimont S.P.A., Mailand, Italien
ELISA-Reader Tecan Spectra Rainbow	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C GFL	GFL (Gesellschaft für Labortechnik mbH), Burgwedel
Gefrierschrank -20 °C Liebherr	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen
Kleinschüttler KM 2	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Kühlschrank Liebherr	Liebherr Hausgeräte GmbH, Ochsenhausen

Magnetrührer Ikamag® Ret-GS	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen i. Br.
Mehrkanalpipette VWR Signature™ Ergonomic High Performance 8-Channel Pipettor 20-200 µl	VWR International GmbH, Darmstadt
Milli-Q® Reagent Water System	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
pH-Meter WTW ph522	Wissenschaftlich-technische Werkstätten, Weilheim
Pipetten Eppendorf Research® 0,5-5000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Spectrophotometer Hitachi U-3200	Scientific Instruments, Schwäb. Gmünd
Vortex Heidolph Reax 1	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach
Waage Mettler Toledo Feinwaage H54AR/9	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Waage Sartorius excellence E200D	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifuge Hettich Mikro 120	Hettich Lab Technology, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich Rotofix 32	Hettich Lab Technology, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Minifuge RF	Heraeus Sepatech GmbH, Hanau
Zentrifuge VWR MegaStar 600 R	VWR International BVBA; Leuven, Belgien

3.2 ELISA

Zur Bestimmung der Konzentration von drei verschiedenen Penicillinen – Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin – im Blutplasma von Puten wurde ein Enzymgekoppelter Immunbindungsassay (ELISA) genutzt.

Basis jeden ELISAs ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion. In diesem Fall wurden zwei monoklonale Antikörper verwendet, die ursprünglich gegen Ampicillin entwickelt wurden. Die Antikörper zeigen jedoch auch eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Kreuzreaktion gegenüber weiteren Penicillinen und können somit für deren Nachweis verwendet werden (DIETRICH et al., 1998). Für den Nachweis von Penicillin G und Penicillin V wurde der monoklonale Antikörper *mAk 1F1*, für den Nachweis von Amoxicillin der monoklonale Antikörper *mab 3B5* verwendet. Die Antikörper wurden in einem kompetitiven ELISA verwendet. Hierbei konkurriert ein an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gebundenes Ampicillin mit den in den Plasmaproben enthaltenen Penicillinen um die Bindungsstellen an den monoklonalen Antikörpern. Die Meerrettichperoxidase ist ein Enzym, welches nach Zugabe eines spezifischen Substrates eine Farbreaktion katalysiert. Nach fotometrischer Bestimmung der Farbintensität können so die Penicillinkonzentrationen der Proben bestimmt werden. Eine hohe Penicillinkonzentration in der Probe führt in diesem Nachweissystem durch Verdrängung des Antigen-Peroxidase-Konjugats von den Antikörperbindungsstellen zu einer geringeren Farbreaktion. Bei einer niedrigeren Konzentration kann eine stärkere Farbreaktion gemessen werden.

3.2.1 Durchführung

Zunächst wurden Mikrotiterplatten (*Nunc ImmunoTM-Plates, MaxiSorpTM, 96-well*) mit einem selbst hergestellten Kaninchen-anti-Maus-IgG Antikörper beschichtet. Der Antikörper wurde auf 10 µg/ml in Bicarbonatpuffer (pH 9,6) verdünnt und pro Well 100 µl der Lösung aufgetragen. Die Platten wurden für 2 Tage im Kühlraum inkubiert und anschließend bis zur Nutzung im Kühlschrank gelagert.

Zur Durchführung des ELISAs wurden die Platten dann zunächst mit 3 % Casein in PBS geblockt, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Nach einer Inkubation von 45 min wurde das Casein durch dreimaliges Waschen der Platte entfernt und der monoklonale Antikörper aufgetragen.

Verwendete Konzentrationen: *mAk 1F1* → 80 ng/ml in PBS

mab 3B5 → 400 ng/ml in PBS

Es wurden jeweils 100 µl/Well aufgetragen und die Platte für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem erneuten Waschschrift (4-mal) wurden Standardverdünnungen der Penicilline zur Erstellung einer Standardkurve sowie die zu untersuchenden Plasmaproben jeweils in Dreifachbestimmung aufgetragen (50 µl/Well). Direkt im Anschluss wurde die Ampicillin-gekoppelte Meerrettichperoxidase (*Ampi-C-HRP*) in 1 % Casein verdünnt und ebenfalls in die Vertiefungen pipettiert (je 50 µl).

Verwendete Konzentrationen: Pen G/V → 1 : 10.000 — 1 : 30.000

Amoxicillin → 1 : 10.000 — 1 : 15.000

Die Platte wurde wiederum für 60 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach folgte ein erneuter Waschschrift (5-mal) und das Aufbringen der Substratlösung (100 µl/Well).

Substratlösung: 550 µl TMB in 11 ml H₂O₂-Puffer

Es kommt zu einer durch die Peroxidase katalysierten Farbreaktion, welche nach ca. 20 min, bei Erreichen einer ausreichend hohen Farbintensität, durch Zugabe von 1 M Salzsäure gestoppt wurde. Anschließend wurde die Intensität der Färbung im Photometer (ELISA-Reader *Tecan Spectra Rainbow* mit Software *TECAN easyWIN kinetics V6.0a*) quantifiziert. Die Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 450 nm, mit einem Interferenzfilter von 620 nm.

Die für den ELISA verwendeten Puffer und Lösungen, Inkubationszeiten und aufgetragene Volumina orientierten sich an einem am Lehrstuhl für Hygiene und

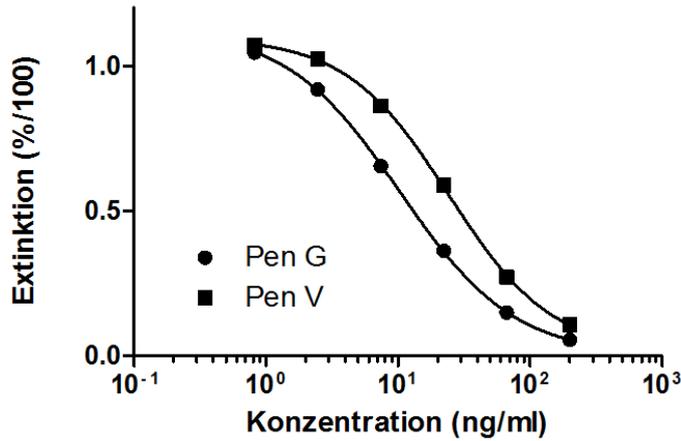
Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München entwickelten ELISA-Protokoll (LITZ, 1995), welches dort vor allem für den Nachweis von Penicillinrückständen in Milchproben verwendet wird.

Die benötigten Konzentrationen von Antikörpern und Meerrettichperoxidase (HRP) wurden mittels Schachbretttitration ermittelt.

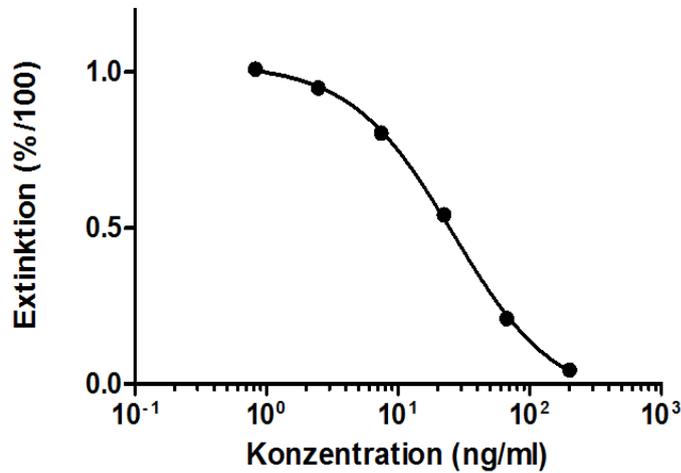
3.2.2 Erstellung der Standardkurve

Aus den im Photometer gemessenen Extinktionen wurden mithilfe einer Standardkurve die in den Proben enthaltenen Penicillinkonzentrationen berechnet. Für die Standardkurve wurde aus einer Stammlösung des jeweils untersuchten Penicillins eine 1:3 Verdünnungsreihe in PBS in einem Konzentrationsbereich von 0,823 – 200 ng/ml erstellt und auf jede Platte gleichzeitig mit den untersuchten Proben aufgetragen. Nach Auslesung der ELISA-Platten wurden die Extinktionswerte E durch Vergleich mit der Extinktion des Leerwerts E_0 (PBS-Puffer, entspricht 100 % Extinktion) in relative Extinktionen umgewandelt. Die Standardkurve ergibt sich dann durch Auftragung der dotierten Penicillinkonzentrationen gegen die gemessene relative Extinktion (Abb. 3.1). Nun können nach Berechnung der relativen Extinktionen der Plasmaproben die zugehörigen Konzentrationen anhand der Kurve interpoliert werden. Die Erstellung und Anpassung der Standardkurve über eine nichtlineare Regression, sowie die Interpolation der Penicillinkonzentrationen in den gleichzeitig untersuchten Plasmaproben wurde mit dem Softwareprogramm *GraphPad Prism 5.04* durchgeführt.

Ein Vergleich der Affinität der monoklonalen Antikörper gegenüber verschiedenen Penicillinen ist über die Bestimmung der IC_{50} oder 50 %-Werte möglich. Die IC_{50} beschreibt hierbei den Testmittelpunkt, also diejenige Konzentration, bei der 50 % der Antikörperbindungsstellen mit Penicillinen besetzt sind (LAMAR, 2007). Bei Betrachtung der Standardkurve entspricht dieser der interpolierten Konzentration bei einer relativen Extinktion von 50 %. Die anhand der in Abb. 3.1 dargestellten Standardkurven bestimmten 50 %-Werte waren für *mAk 1F1* und Penicillin G ein IC_{50} von 13 ng/ml, für *mAk 1F1* und Penicillin V ein IC_{50} von 29 ng/ml und für



(a) Pen G / Pen V - *mAk 1F1*



(b) Amoxicillin - *mab 3B5*

Abbildung 3.1: Darstellung von zwei typischen Standardkurven für Penicillin G/ Penicillin V und Amoxicillin. X-Achse: Konzentration in ng/ml. Y-Achse: Extinktion als Quotient aus E/E_0 .

mab 3B5 und Amoxicillin ein IC_{50} von 24,5 ng/ml. Penicillin G weist also die höchste Affinität zu seinem monoklonalen Antikörper auf.

Anhand der Standardkurve kann außerdem bereits der Arbeitsbereich des ELISAs grob abgeschätzt werden. Für alle drei Penicilline ist mit dem verwendeten ELISA prinzipiell eine Analyse von Proben in einem Arbeitsbereich von ca. 1 – 200 ng/ml

möglich. In höheren Konzentrationen sind die Antikörperbindungsstellen zunehmend mit Penicillin abgesättigt, so dass die Extinktion nicht weiter proportional zur Konzentrationszunahme absinken kann. Im niedrigen Konzentrationsbereich wird schließlich die Extinktion des Leerwerts erreicht. Ab diesem Punkt verläuft die Kurve horizontal (durch die abgebildeten Standardkurven nicht mehr dargestellt). Der genaue Arbeitsbereich, sowie der Einfluss der untersuchten Probenmatrix (Blutplasma) werden im Rahmen der Besprechung der Validierung des Testsystems definiert.

3.2.3 Verwendete Antikörper und Enzyme

Das zur Beschichtung der ELISA-Platten genutzte polyklonale anti-Maus-IgG wurde im Kaninchen hergestellt. Die monoklonalen Antikörper *mAk 1F1* und *mab 3B5* sowie die Ampicillin-gekoppelte Meerrettichperoxidase, *Ampi-C-HRP*, *3,84 mg/ml*, wurden am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Universität München entwickelt (DIETRICH et al., 1998) und von diesem zur Verfügung gestellt.

3.2.4 Herstellung des Kaninchen-anti-Maus-IgG Antikörpers

Immunisierung

Der für die Beschichtung der ELISA-Platten verwendete anti-Maus-IgG Antikörper wurde im Auftrag im Kaninchen hergestellt. Hierfür wurden 2 Kaninchen der Rasse ZIKA (Dr. Zimmermann GbR, Schweizerhof, 73453 Abtsgmünd-Untergröningen) mit je 200 µg gereinigtem Maus-IgG (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) emulgiert in 1 ml Freund's Inkomplettem Adjuvant (*Imject® Freund's Incomplete Adjuvans*, Thermo Scientific, Richmond, U.S.A.) grundimmunisiert. Anschließend wurden die Tiere 6-mal im Abstand von je 3 Wochen mit je 150 µg Maus-IgG gelöst in physiologischer Kochsalzlösung geboostet. Regelmäßige Blutentnahmen (20 ml, zentrale Ohrarterie) fanden jeweils 10 Tage nach der 3., 4. und 5. Injektion statt.

Nach dem 6. Boost wurden die Tiere durch Herzpunktion unter Narkose entblutet. Die Herstellung des Antikörpers wurde bei der Regierung von Oberbayern angezeigt (AZ: 55.2-1-54-2351.6-6-11).

Serumgewinnung

Das Blut wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Gerinnung inkubiert, mithilfe eines Rachenspatels von der Wand gelöst und über Nacht bei 4 °C gelagert. Die Röhrchen wurden anschließend bei 8.000 x g für 20 min zentrifugiert (Zentrifuge *Hettich Rotofix 32*), das Serum abgenommen, aliquotiert und bei -30 °C gelagert.

Affinitätsreinigung

Zur Isolierung des Antikörpers aus dem gewonnenen Kaninchenserum wurde eine säulen-chromatografische Affinitätsreinigung durchgeführt. Als Affinitätsmatrix diente an Cyanbromid-aktivierte Sepharose (*CNBr-activated SepharoseTM 4B*, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) gekoppeltes Maus IgG (1 mg/ml). Als Wasch- und Ladepuffer wurde 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) verwendet. Das Kaninchenserum wurde zunächst im Verhältnis 1:2 mit dem Phosphatpuffer verdünnt und mit einer Geschwindigkeit von 1 ml/min auf die Säule aufgetragen. Nach einem Waschschrift wurde der Antikörper mit 100 mM Citratpuffer (pH 2,5) eluiert. Das Eluat wurde aufgefangen, sofort mit 1 M Tris-HCl (pH 9,4) neutralisiert und die Konzentration im Photometer (*Hitachi U-3200 Spectrophotometer*) bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke des Messgefäßes von 1 cm entspricht der Antikörpergehalt in mg/ml dabei der gemessenen Extinktion / 1,35.

3.2.5 Puffer und Lösungen

Bicarbonatpuffer, pH 9,4 – 9,8	1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃ ad 1.000 ml H ₂ O
Casein 3 % in PBS	3 g Casein 100 ml PBS 1 Stunde bei 100 °C rühren Zweimalige Filterung
Citratpuffer, pH 2,5	Tri-Natriumcitrat-Dihydrat (0,1 M) mit Citronensäure-Monohydrat (0,1 M) eingestellt auf pH 2,5
H ₂ O ₂ -Puffer, pH 3,9 – 4	8,81 g Citronensäure-H ₂ O 40 ml 1 m KOH 160 ml aqua-dest pH einstellen mit KOH 65 µl H ₂ O ₂
5 x PBS, pH 7,3 – 7,5	40 g NaCl 1 g KCl 7,2 g Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 1 g KH ₂ PO ₄ ad 1.000 ml H ₂ O
Phosphatpuffer, pH 7,41	2 ml Na ₂ HPO ₄ (0,4 M, pH 8,9) 500 µl NaH ₂ PO ₄ (0,4 M, pH 4,25) ad 100 ml H ₂ O

Salzsäure	1 mol/L
Substratlösung	20 Teile H ₂ O ₂ - Puffer 1 Teil TMB-Lösung
TMB-Lösung	50,4 mg 3,3',5,5' - Tetramethylbenzidin 1 ml Aceton 9 ml Methanol
Tris-HCl 1 M, pH 9,4	60,5 g Tris-HCl ad 500 ml H ₂ O
Waschlösung	8,55 g NaCl 0,25 ml Tween [®] 20 ad 1.000 ml H ₂ O

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reinstwasser (Millipore) hergestellt.

3.2.6 Penicilline

Die Antibiotika-Stammlösungen zur Herstellung der Standardkurve wurden täglich neu hergestellt. Hierzu wurde jeweils ca. 1 mg der Penicilline abgewogen und nach Korrektur für den enthaltenen Salzanteil in einer entsprechenden Menge PBS gelöst, um eine Zielkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten. Hieraus wurden dann durch weitere Verdünnung in PBS die jeweils benötigten Konzentrationen hergestellt.

Verwendete Penicilline:

- Penicillin G potassium salt
CAS: 113-98-4
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Penicillin V potassium salt
CAS: 132-98-9
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- Amoxicillin
CAS: 26787-78-0
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.2.7 Schachbretttitration

Die Intensität der Farbreaktion im ELISA ergibt sich aus den verwendeten Konzentrationen des monoklonalen Antikörpers und der Peroxidase. Um das optimale Verhältnis der beiden Komponenten zu bestimmen, wurde eine Schachbretttitration durchgeführt. Hierbei wird eine Verdünnungsreihe des monoklonalen Antikörpers in PBS gegen eine Verdünnungsreihe der HRP, ebenfalls in PBS, aufgetragen. In jeder Vertiefung der ELISA-Platte liegen die Reagenzien also in einem unterschiedlichen Verhältnis zueinander vor. Nach dem Entwickeln des ELISAs können so diejenigen Kombinationen bestimmt werden, bei denen eine Extinktion im optimalen Bereich vorliegt (CROWTHER, 2001).

Zielvorgabe für den in dieser Arbeit genutzten ELISA war eine Extinktion von 1,0 – 1,3.

Durchführung:

Zunächst wurde eine 96-well Mikrotiterplatte nach dem Standardprotokoll mit *Kaninchen-anti-Maus-IgG* beschichtet und anschließend mit 3 % Casein geblockt. Im

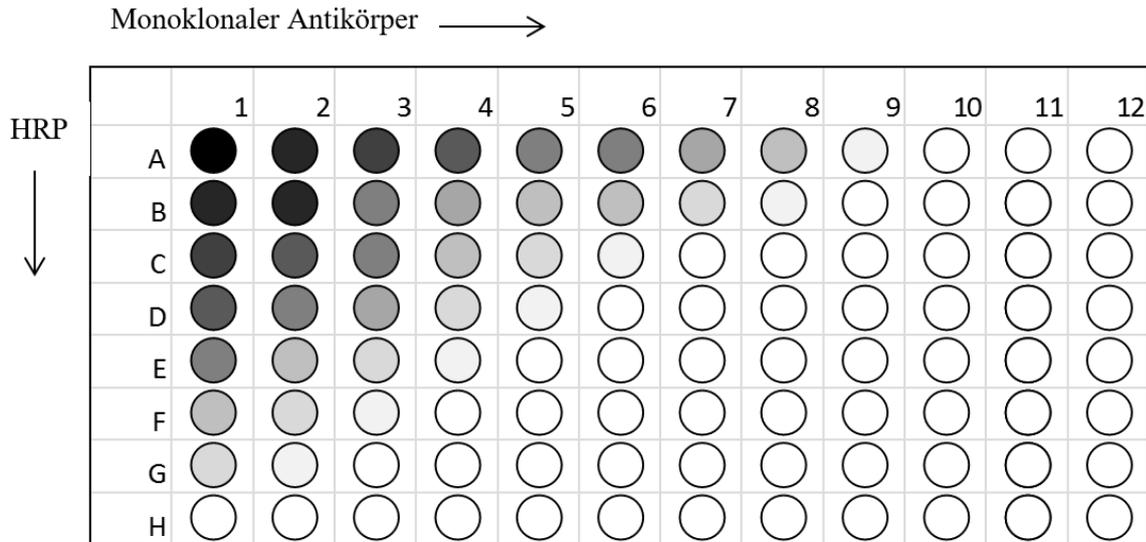


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Anfärbung einer ELISA-Platte nach Schachbrettitration

nächsten Schritt wurden in jeden Well 100 μ l PBS vorgelegt. Die beiden verwendeten monoklonalen Antikörper wurden in PBS auf jeweils 2,56 μ g/ml verdünnt und 100 μ l der Verdünnungen mit einer Mehrkanalpipette in jede Vertiefung der Spalte 1 pipettiert. Nach dem Vermischen der beiden Lösungen durch 5-maliges auf und ab pipettieren wurden je 100 μ l der Mischung entnommen und zu dem vorgelegten PBS in die Vertiefungen der Spalte 2 gegeben. Dies wurde bis zu Spalte 12 fortgesetzt, sodass am Ende eine 1:2 Verdünnungsreihe des Antikörpers vorlag.

Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Stunde wurde die ELISA-Platte gewaschen und das HRP-Konjugat aufgetragen. Zuvor wurden 50 μ l PBS in jede Vertiefung vorgelegt. Dies entspricht dem Volumen der Plasmaproben, welche später laut Protokoll zeitgleich mit dem Enzymkonjugat aufgetragen werden. Das HRP-Konjugat wurde in 1 % Casein zunächst auf 1:3.750 verdünnt und dann eine 1:2 Verdünnungsreihe angefertigt. Die Verdünnungen wurden von Zeile A zu Zeile G in abnehmender Konzentration aufgetragen. In Zeile H wurde keine Peroxidase aufgetragen. Diese dient als Kontrolle und zeigt die Hintergrundfärbung der Platte an. Die Platte wurde wiederum für eine Stunde inkubiert und dann nach Standardprotokoll angefärbt und ausgelesen.

3.3 Validierung des ELISA-Systems

Ziel von Validierungsverfahren ist es festzustellen, ob ein gewähltes Testsystem geeignet ist, den gewünschten Analyten in der jeweiligen Matrix (z.B. PBS, Blutplasma, Milch, Gewebe) mit ausreichender Genauigkeit nachzuweisen und zu quantifizieren. In dieser Arbeit wurde der verwendete ELISA für den Nachweis von Penicillinen im Blutplasma von Puten validiert. Die durchgeführten Validierungsschritte orientieren sich dabei an den Anforderungen nach den *Guidelines for the Conduct of Pharmacokinetic Studies in Target Animal Species*, welche von der EMA (European Medicines Agency) herausgegeben wurden (EMA, 2000). Genauere Definitionen und Anforderungen an die durchgeführten Validierungsmethoden finden sich in einer Leitlinie der ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use), der *ICH Harmonised Tripartite Guideline - Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology* (ICH, 1994/96).

3.3.1 Spezifität

Die Spezifität beschreibt die Fähigkeit eines Testsystems, die gesuchte Substanz eindeutig zu bestimmen und gegenüber anderen möglicherweise in der Probe enthaltenen Stoffen zu diskriminieren (ICH, 1994/96).

Für die Durchführung von pharmakokinetischen Untersuchungen ist es insbesondere wichtig, die Kreuzreaktivität des verwendeten Antikörpers mit den im Körper entstehenden Hauptmetaboliten der untersuchten Arzneistoffe zu bestimmen, da nur die Konzentration der aktiven Substanz im Blut erfasst werden soll. Aus diesem Grund wurde für den monoklonalen Antikörper *mAk 1F1* die Kreuzreaktivität zu Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure, für den monoklonalen Antikörper *mab 3B5* die Kreuzreaktivität zu Amoxicilloinsäure und Amoxicillin Diketopiperazin bestimmt. Zusätzlich wurde die Kreuzreaktivität von *mAk 1F1* mit Amoxicillin und von *mab3B5* mit Penicillin G und Penicillin V bestimmt.

Um die Kreuzreaktivität zu bestimmen, wurden verschiedene Standardkurven, sowohl für die Zielsubstanz des jeweiligen Antikörpers als Referenz (für *mAk 1F1* Penicillin G, für *mab 3B5* Amoxicillin), als auch für jeden der gewählten Metaboliten erstellt und im ELISA bestimmt. Die Standardkurven wurden für einen Bereich von 0,823 – 200 ng/ml angelegt, die Verdünnung erfolgte in PBS-Puffer. Anschließend wurde die relative Kreuzreaktivität der Testsubstanzen durch den Vergleich der Standardkurven ermittelt.

3.3.2 Linearität

Um eine Analyse der Plasmaproben im Arbeitsbereich des ELISAs zu ermöglichen, werden diese abhängig von ihrer Ausgangskonzentration in unterschiedlichem Maße mit PBS-Puffer verdünnt. Die gemessenen Konzentrationen einer jeden Probe sollten dabei analog zum Grad ihrer Verdünnung abfallen, sodass sich unabhängig von der Verdünnungsstufe die gleichen Endkonzentrationen berechnen lassen. In diesem Fall liegt eine Linearität von 100 % vor.

Zur Bestimmung der Linearität wurden Plasmaproben aus den pharmakokinetischen Untersuchungen genutzt, die eine hohe Konzentration der Penicilline aufwiesen. Von diesen wurden jeweils 1:2 Verdünnungsreihen in PBS erstellt. Dabei wurden diejenigen Proben ausgewählt, welche eine Messung der Linearität im angestrebten Arbeitsbereich des ELISAs (jeweilige Nachweisgrenze bis 200 ng/ml) im Rahmen von 4 – 6 Verdünnungsstufen ermöglichten. Außerdem sollten in diesem Bereich alle bei der Auswertung der Proben genutzten Verdünnungsgrade getestet werden. Dies war für Penicillin G ein Verdünnungsbereich von 1:10 bis 1:320, für Penicillin V und Amoxicillin Verdünnungsbereiche von 1:10 bis 1:640. Die Verdünnungsreihen wurden gemeinsam mit einer Standardverdünnung des Penicillins in PBS (zur Erstellung der Standardkurve) auf die ELISA-Platte aufgetragen und nach Standardprotokoll ausgewertet. Die Linearität jeder Verdünnungsstufe ergibt sich aus dem Verhältnis der berechneten zur erwarteten Konzentration. Diese entspricht 50 % der in der vorherigen Verdünnungsstufe gemessenen Konzentration.

Berechnung:

Linearität (%) = (gemessene Konzentration / (gemessene Konzentration der vorherigen Verdünnungsstufe / Verdünnungsfaktor)) * 100

Als Zielvorgabe für den ELISA wurde eine Linearität von 90 – 110 % angestrebt.

3.3.3 Genauigkeit

Die Genauigkeit beschreibt die Übereinstimmung eines mit Hilfe des Testsystems gemessenen Konzentrationswertes mit der tatsächlich in der Probe enthaltenen Konzentration. Sie setzt sich zusammen aus der Richtigkeit oder Wiederfindung und der Präzision des Testsystems. Während die Wiederfindungsrate die Abweichung der gemessenen von der tatsächlich in der Probe enthaltenen Konzentration des Analyten aufgrund von systematischen Fehlern misst, beschreibt die Präzision die Streuung der Messwerte aufgrund von zufälligen Fehlern (ISO 5725/1, 1994; WELLMITZ und GLUSCHKE, 2005).

Richtigkeit/Wiederfindung

In diesem Validierungsschritt wird bestimmt, welcher Anteil einer sich tatsächlich in einer Probe befindlichen Konzentration des Analyten vom Testsystem erfasst wird. Liegt die Richtigkeit oder Wiederfindung unter 100 %, kann dies zum Beispiel ein Hinweis darauf sein, dass Anteile des Analyten während der Durchführung des Tests degradiert oder inaktiviert werden. Liegt sie über 100 %, kann dies an einem erhöhten Hintergrund liegen, wenn Matrixbestandteile unspezifisch mit dem Testsystem reagieren. Sie ist damit auch ein Maß für den Matrixeffekt, zeigt also an, inwieweit das Testsystem von dem untersuchten Material (Blutplasma, Milch, wässrige Lösungen etc.) beeinflusst wird.

Die Richtigkeit eines Testverfahrens sollte, wenn möglich, durch die Verwendung eines zertifizierten Referenzmaterials bestimmt werden, welches eine festgesetzte Konzentration des zu untersuchenden Analyten enthält. Dieses Referenzmaterial

wird mit dem Testverfahren wiederholt analysiert und der Grad der Übereinstimmung der gemessenen Konzentrationen mit den wahren Werten bestimmt. Steht, wie im Fall der Penicilline, kein zertifiziertes Referenzmaterial zur Verfügung, kann stattdessen die Wiederfindungsrate mit dotierter Matrix bestimmt werden (2002/657/EG, 2002). Hierbei werden die Unterschiede zwischen einer Messung der Penicilline im Verdünnungsmedium der Kalibrierkurve (PBS-Puffer) und der Probenmatrix (Blutplasma) erfasst.

Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde für jedes Penicillin zunächst eine 1:2 Verdünnungsreihe in PBS-Puffer erstellt. Im nächsten Schritt wurden je 7 Aliquots PBS-Puffer und Blutplasma unbehandelter Puten (1:10 verdünnt in PBS) mit den Verdünnungen dotiert. Insgesamt wurden so 7 Verdünnungen in einem Messbereich von 3,125 – 200 ng/ml hergestellt. Beide Verdünnungsreihen wurden gemeinsam auf eine ELISA-Platte aufgetragen und die jeweiligen Konzentrationen nach dem Standardprotokoll gemessen und mithilfe der Standardkurve berechnet. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate der Penicilline im Blutplasma wurde dann das Verhältnis der im Blutplasma gefundenen Konzentration zu der im PBS bestimmten Konzentration herangezogen.

Berechnung:

Wiederfindung (%) = (gemessene Konzentration im Plasma / gemessene Konzentration in PBS) * 100

Für den ELISA wurde eine Wiederfindungsrate von 80 – 120 % angestrebt.

Präzision (Intra- und Inter-Assay-Variabilität)

Die Präzision beschreibt die zufällige Variabilität der Testergebnisse, welche bei mehrmaliger Analyse derselben Probe auftritt. Man unterscheidet hierbei die Streuung der Testergebnisse bei mehrfacher Analyse derselben Probe innerhalb eines Testdurchlaufs bzw. innerhalb einer ELISA-Platte (Intra-Assay-Variabilität) von der Streuung der Ergebnisse bei mehrmaliger Analyse der Probe während verschiedener Testdurchläufe (Inter-Assay-Variabilität). Die Inter-Assay-Variabilität kann dabei durch verschiedene Variablen in den Versuchsbedingungen (Versuchsperson,

Umgebungstemperatur, Geräte, Chemikalien, Streuung der Pipettiervolumina) bedingt sein. Bei der Validierung wurden diese verschiedenen Einflussfaktoren nicht individuell beurteilt, sondern durch die mehrfache Analyse derselben Probe an fünf verschiedenen Versuchstagen in Ihrer Gesamtheit erfasst.

Intra-Assay-Variabilität Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurden Plasmaproben von unbehandelten Kontrolltieren mit verschiedenen Konzentrationen der drei Penicilline dotiert. Hierdurch sollte die Variabilität über den gesamten angestrebten Arbeitsbereich des Testsystems erfasst werden.

Das verwendete Plasma wurde zunächst 1:10 mit PBS verdünnt und anschließend mit dem entsprechenden Volumen der jeweiligen Penicillinstammlösung versetzt, um jeweils eine Probe mit hoher, mittlerer und niedriger Penicillinkonzentration zu erhalten (Tab. 3.1). Die Proben wurden auf 3 (Penicillin G und V) bzw. 4 (Amoxicillin) verschiedenen Bereichen der ELISA-Platte aufgetragen, nach Standardprotokoll analysiert und mit Hilfe der Standardkurve die Konzentrationen in ng/ml berechnet. Zum Vergleich der drei Messungen pro Probe wurden jeweils der Mittelwert (MW) und die Standardabweichung (SD) der Penicillinkonzentration bestimmt und die Variabilität in Form des Variationskoeffizienten (CV) berechnet. Es gilt dabei: $CV = \text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}$.

	oberer Messbereich	mittlerer Messbereich	unterer Messbereich
	gemessene Konzentration		
Pen G	67 / 107 ng/ml	28 / 30 ng/ml	6,5 / 8,5 ng/ml
Pen V	85 ng/ml	37 ng/ml	6,8 ng/ml
Amoxicillin	100 ng/ml	45 ng/ml	15 ng/ml

Tabelle 3.1: Messbereiche für die Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität. Dargestellt sind jeweils die im Durchschnitt gemessenen Konzentrationen der dotierten Proben. Da die Messung für Penicillin G mit zwei Platten durchgeführt wurde sind hier jeweils zwei Konzentrationen angegeben.

Inter-Assay-Variabilität Auch für die Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität wurde 1:10 in PBS verdünntes Blutplasma unbehandelter Puten mit den drei

Penicillinen in entsprechender Menge dotiert, um Proben mit Wirkstoffkonzentrationen im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISAs zu erhalten (Tab. 3.2). Die Proben wurden jeweils in fünf Aliquots geteilt und bei -80 °C eingefroren. An fünf verschiedenen Versuchstagen wurde je ein Aliquot jeder Konzentration aufgetaut und im ELISA analysiert. Die Konzentration in ng/ml wurde jeweils mit Hilfe der Standardkurve bestimmt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Die Inter-Assay-Variabilität des Testsystems in den verschiedenen Konzentrationsbereichen entspricht dann wiederum dem errechneten Variationskoeffizienten.

Als Grenzwert wurde eine maximale Variabilität von CV = 15 % angestrebt.

	oberer Messbereich	mittlerer Messbereich	unterer Messbereich
	gemessene Konzentration		
Pen G	69 ng/ml	29 ng/ml	7 ng/ml
Pen V	93 ng/ml	40 ng/ml	9 ng/ml
Amoxicillin	109 ng/ml	47 ng/ml	11 ng/ml

Tabelle 3.2: Messbereiche für die Bestimmung der Inter-Assay-Variabilität. Dargestellt sind jeweils die im Durchschnitt gemessenen Konzentrationen der dotierten Proben.

3.3.4 Leerwertgrenze (LoB)

Die Leerwertgrenze (*Limit of Blank*, LoB) ist die höchste scheinbare Konzentration des Analyten, welche bei der Messung einer Leerwertprobe gefunden werden kann (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2004). Um sie zu bestimmen, wurden jeweils 10 Wiederholungen (n = 10) einer Leerwertprobe im ELISA analysiert. Nach der Berechnung des Mittelwertes (MW_{LW}) und der Standardabweichung (SD_{LW}) ergibt sich der Extinktionswert des LoB aus:

$$LoB = MW_{LW} - 1,645 * SD_{LW} \quad (ARMBRUSTER \text{ und } PRY, 2008)$$

Der erhaltene Extinktionswert wurde in die relative Extinktion (E/E_0) umgerechnet und mit Hilfe der Standardkurve die korrelierende Konzentration bestimmt. Die so

errechnete Leerwertgrenze umfasst, bei einer angenommenen Normalverteilung der Messwerte, 95 % der beobachteten Werte. In 5 % der Fälle kann es zu falsch positiven Messergebnissen kommen, bei denen Leerwertproben eine scheinbare Konzentration oberhalb des LoB erzeugen (ARMBRUSTER und PRY, 2008). Diese entsprechen dem in der Grafik dargestellten α -Fehler (Abb. 3.3).

Für jedes Penicillin wurde die Bestimmung der Leerwertgrenze in PBS sowie in 100 % und 1:10 in PBS verdünntem Blutplasma unbehandelte Puten durchgeführt.

3.3.5 Nachweisgrenze (LoD)

Die Nachweisgrenze (*Limit of Detection*, LoD) ist die niedrigste Konzentration eines Analyten in einer Probe, welche qualitativ noch nachgewiesen und somit sicher von den Messwerten einer Leerwertprobe unterschieden werden kann (ARMBRUSTER und PRY, 2008). Dies bedeutet allerdings nicht automatisch, dass ab dieser Konzentration bereits eine sichere Quantifizierung möglich ist. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze können, je nach Analyseverfahren, verschiedene Methoden verwendet werden. Eine Standardmethode ist die Abschätzung aufgrund der bei einer Analyse von Leerwertproben gemessenen Standardabweichung, welche ein Maß für den auftretenden Hintergrund ist (ICH, 1994/96). Die Nachweisgrenze entspricht dabei dem Mittelwert des Leerwerts minus 3,3 Standardabweichungen.

Die Bestimmung der Nachweisgrenze erfolgte parallel zur Bestimmung der Leerwertgrenze, es wurden also die Messwerte derselben Leerwertproben verwendet. Der Extinktionswert der Nachweisgrenze wurde jeweils aus gemessenem Mittelwert und der Standardabweichung der Leerwertproben nach der folgenden Formel berechnet:

$$\text{LoD} = \text{MW}_{\text{LW}} - 3,3 * \text{SD}_{\text{LW}} \quad (\text{CASE und EINERSON, 2004})$$

Mit Hilfe der Standardkurve wurde die Nachweisgrenze in einen Konzentrationswert (ng/ml) umgerechnet.

Bei der Analyse von Proben im Konzentrationsbereich der Nachweisgrenze kann es, analog zum α -Fehler der Leerwertgrenze, zu einem geringen Anteil von falsch negativen Ergebnissen kommen, welche unterhalb der Leerwertgrenze liegen, also scheinbar keinen Analyten enthalten. Diese sind in der Grafik (Abb. 3.3) als β -Fehler dargestellt.

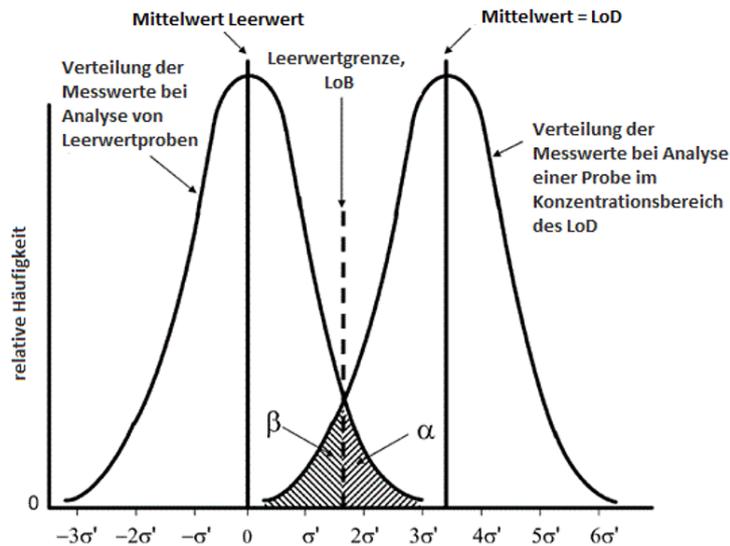


Abbildung 3.3: Verhältnis zwischen LoB und LoD. Die x-Achse beschreibt dabei die auftretenden Standardabweichungen (σ'), welche im konkreten Fall sowohl in absoluten Extinktionswerten als auch in Konzentrationswerten (ng/ml) dargestellt werden können. Die y-Achse beschreibt die relative Häufigkeit der auftretenden Messwerte. Ausgehend vom gemessenen Mittelwert bei der Analyse von Leerwertproben liegt das LoB bei 1,645 Standardabweichungen, das LoD bei 3,3 Standardabweichungen.

Grafik aus: Idaho National Engineering and Environmental Laboratory Site Environmental Report Calendar Year 2003, Appendix B (CASE und EINERSON, 2004), modifiziert.

3.3.6 Bestimmungsgrenze (LoQ)

Die Bestimmungsgrenze (*Limit of Quantification*, LoQ) ist die kleinste Konzentration eines Analyten in einer Probe, welche quantitativ mit einer ausreichend hohen Präzision und Richtigkeit gemessen werden kann (EURACHEM GUIDE, 1998).

Um sie zu bestimmen, wurden vor Beginn der Validierungstests Zielvorgaben an die Linearität, Wiederfindungsrate und Inter-Assay-Variabilität festgelegt. Die Bestimmungsgrenze entspricht dann der kleinsten untersuchten Konzentration, bei der alle Zielvorgaben eingehalten werden. Das LoQ kann dabei, abhängig von den spezifischen Eigenschaften des genutzten Testsystems, im Bereich des LoD oder deutlich darüber liegen (ARMBRUSTER und PRY, 2008).

3.3.7 Arbeitsbereich

Der Arbeitsbereich eines ELISAs ist derjenige Konzentrationsbereich, in welchem das Testsystem eine ausreichend hohe Präzision, Richtigkeit und Linearität aufweist (ICH, 1994/96). Für eine sichere Quantifizierung müssen später alle untersuchten Proben soweit verdünnt werden, dass die enthaltene Penicillinkonzentration innerhalb dieses Bereichs zu liegen kommt. Die untere Grenze des Arbeitsbereichs entspricht dabei der Bestimmungsgrenze. Die obere Grenze kann nach dem Abschluss der übrigen Validierungsschritte analog zur Erfassung der Bestimmungsgrenze abgeschätzt werden.

3.4 Lagerungsstabilität

Es sollte die Stabilität der in PBS oder in Blutplasma gelösten Penicilline im Falle einer längeren Lagerung bei -80 °C getestet werden. Hierzu wurden verschiedene Proben über einen Zeitraum von mehreren Monaten wiederholt analysiert und die Ergebnisse verglichen. Für die Versuche mit Verdünnungen der Penicilline in PBS wurde der interne Standard genutzt, welcher auf jeder verwendeten ELISA-Platte als Kontrolle eingesetzt wurde. Zur Bewertung der Stabilität standen so Messdaten über 8 Monate in einem Zeitraum von September 2015 bis Mai 2016 zu Verfügung. Die Lagerungsstabilität in Blutplasma wurde teilweise mit dotiertem Plasma unbehandelter Puten, sowie mit Proben aus den Versuchen durchgeführt, welche über einen Zeitraum von 4 Monaten wiederholt analysiert wurden.

3.5 Plasmaproteinbindung

Die Plasmaproteinbindung der drei untersuchten Penicilline wurde mittels Ultrafiltration bestimmt. Dabei wird eine definierte Menge der Penicilline mit Blutplasma vermischt und nach ausreichend langer Inkubation durch eine Membran filtriert, welche die Plasmaproteine und mit ihnen die gebundenen Penicilline zurückhält. Durch einen Vergleich der Penicillinkonzentration im Filtrat mit der vor der Filtration im Plasma vorliegenden Gesamtkonzentration kann der Anteil der Plasmaproteinbindung berechnet werden (DERENDORF, 2002c).

Die Ultrafiltration wurde mit *Amicon*[®] *Ultra-4 Centrifugal Filter Units* durchgeführt (Merck Millipore Ltd., Darmstadt). Sie enthalten eine Membran aus Regeneratcellulose mit einem *molecular weight cut off* (MWCO) von 30.000. Plasmaproteine, insbesondere Albumin (Molekulargewicht 66.000 Da) werden so effektiv zurückgehalten. Die Plasmaproteinbindung wurde für eine Blutplasmakonzentration der Penicilline von 6 µg/ml ermittelt.

3.5.1 Bestimmung der unspezifischen Bindungen

Zunächst wurde die unspezifische Bindung (USB) der Penicilline an die Filtereinheit bestimmt. Hierfür wurden jeweils Stammlösungen von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin mit einer Konzentration von 1 mg/ml in PBS frisch hergestellt. Die Stammlösungen wurden dann in PBS weiter verdünnt, im Fall von Amoxicillin auf 6 µg/ml, für Penicillin G und Penicillin V auf 2,4 µg/ml. Die Reduktion der getesteten Konzentrationen von Penicillin G und Penicillin V im Vergleich zur später verwendeten Plasmakonzentration von 6 µg/ml sollte eine Angleichung der durch die Membran filtrierten Stoffmenge unter Berücksichtigung der voraussichtlichen Plasmaproteinbindung bewirken. Hierfür wurde die erwartete Plasmaproteinbindung auf 60 % geschätzt. Da für Amoxicillin eine sehr viel geringere Plasmaproteinbindung von 10 – 20 % erwartet wurde, fand hier keine Angleichung statt. Die Filtereinheiten wurden jeweils mit 1,5 – 2 ml der Verdünnung befüllt und anschließend bei 20 °C für 10 min mit 3.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge *VWR MegaStar 600 R*). Direkt im Anschluss wurde die Penicillinkonzentration

im gewonnenen Filtrat, sowie in der ursprünglichen Lösung im ELISA bestimmt und das Ausmaß der unspezifischen Bindung berechnet.

Berechnung:

$$\text{USB (\%)} = (1 - (\text{Konzentration Filtrat} / \text{Ursprungskonzentration})) * 100$$

Für Amoxicillin konnte keine unspezifische Bindung festgestellt werden. Penicillin G und Penicillin V zeigten dagegen in zwei Messungen unspezifische Bindungen in Höhe von 11 – 27 bzw. 47 – 49 %. Da es bei einer unspezifischen Bindung in dieser Höhe zu einer Verfälschung der Testergebnisse kommen kann, wurden die Filtereinheiten für die folgenden Messungen von Penicillin G und Penicillin V in einem zusätzlichen Schritt vorbereitet. Nach Lee et al. (2003) kann eine Vorbehandlung der Membranen mit 5 % Tween[®] 80 die unspezifische Bindung signifikant verringern. Hierfür wurde jede Filtereinheit mit 1 ml 5 % Tween[®] 80 gefüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Zentrifugation mit 3.000 x g für 10 min. Die Filter wurden mit 2 x 3 ml PBS gespült und die Membran bis zur Verwendung mit PBS bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Durch diese Vorbehandlung konnte die unspezifische Bindung für Penicillin G an den Filter auf 0 % und für Penicillin V auf 8,7 % verringert werden.

3.5.2 Bestimmung der Plasmaproteinbindung

Für die Bestimmung der Plasmaproteinbindung wurde Blutplasma von unbehandelten Puten genutzt, welches bis zur Nutzung bei -20 °C gelagert wurde. Das Plasma wurde nach dem Auftauen zunächst zentrifugiert, um Kryopräzipitate zu entfernen. Dann wurde es für 3 min auf 41 °C erwärmt. Ausgehend von Penicillin-Stammlösungen in PBS (1 mg/ml) wurde das Plasma jeweils mit Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin versetzt, sodass eine Konzentration von 6 µg Penicillin/ml Plasma entstand. Die Mischung wurde bei 41 °C für 15 min im Wasserbad inkubiert, anschließend jeweils ein Volumen von 1,5 – 2 ml auf die Filtereinheit gegeben und für 10 min bei 20 °C mit 3.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurden

die Penicillinkonzentrationen im Filtrat und in der ursprünglichen Plasmaverdünnung bestimmt und unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung an die Filtrationseinheit die Plasmaproteinbindung berechnet.

Berechnung:

Plasmaproteinbindung (%) = $(1 - (\text{Konzentration Filtrat} / \text{Ursprungskonzentration}) * (1 + \text{USB})) * 100$

3.6 Pharmakokinetik

Pharmakokinetische Untersuchungen beruhen im Allgemeinen auf der ein- oder mehrmaligen Verabreichung des zu untersuchenden Wirkstoffes und nachfolgender Entnahme von Körperflüssigkeiten oder Gewebe nach einem festgelegten Zeitprotokoll. Aus dem so bestimmten zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Körper können dann die verschiedenen pharmakokinetischen Parameter abgeleitet werden. Einige zu beachtende Grundprinzipien sind in den *Guidelines for the Conduct of Pharmacokinetic Studies in Target Animal Species* definiert (EMA, 2000). So sollten unabhängig von der untersuchten Applikationsroute (oral, subkutan, i.m. etc.) parallel dazu Daten nach i.v. Applikation einer äquivalenten Dosis erhoben werden, um so die Bioverfügbarkeit der Substanz abschätzen zu können. Die Konzentrations-Zeit-Verläufe sollten wenn möglich an jedem einzelnen Tier der Versuchsreihe gesondert erfasst und die pharmakokinetischen Parameter individuell berechnet werden. Erst danach erfolgt eine Zusammenfassung der gewonnenen Parameter auf Gruppenebene. Die verwendete Menge des Wirkstoffes sollte der höchsten vorgesehenen therapeutischen Dosierung entsprechen. Die Konzentration der Wirkstoffe im Körper wird in der Regel im Blutplasma erfasst.

Versuchsziel:

Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter für Benzylpenicillin (Penicillin G), Phenoxymethylpenicillin (Penicillin V) und Amoxicillin im Blutplasma nach einmaliger oraler bzw. intravenöser Verabreichung an Puten.

Die Unterbringung der Versuchstiere sowie sämtliche Tierversuche fanden an der Klinik für Vögel, Reptilien, Amphibien und Zierfische der Tierärztlichen Fakultät der Universität München statt. Die Validierung des Testsystems, Analyse und Auswertung der Proben wurde am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät durchgeführt. Das Tierversuchsvorhaben wurde von der Regierung von Oberbayern unter dem Zeichen 55.2-1-54-2532-57-2013 genehmigt.

3.6.1 Versuchsplan

Die Wirkstoffe wurden den Tieren einmalig in therapeutischer Dosierung oral per Kropfsonde oder i.v. in die *V. metatarsalis* eingegeben. Die Dosierungsempfehlungen wurden den Zulassungsbestimmungen der einzelnen Präparate entnommen. Sie entsprachen für Penicillin G 16.000 IE/kg KM (= 9 mg/kg Benzylpenicillin), für Penicillin V 20 mg/kg KM und für Amoxicillin 17,4 mg/kg KM. Für die orale und i.v. Eingabe wurden jeweils dieselben Dosierungen, bezogen auf den reinen Wirkstoffgehalt, verwendet. Vor der Wirkstoffapplikation und zu den Zeitpunkten 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 und 12 h nach der Applikation wurde den Tieren jeweils 2 ml Blut aus der *V. ulnaris* entnommen und im Labor die Blutplasmakonzentration der Penicilline bestimmt. Für die Studie wurde ein Cross-over-Design verwendet, bei dem dieselben Tiere sowohl für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter nach oraler als auch nach i.v. Applikation verwendet wurden. Zwischen den beiden Versuchsreihen lag eine Auswaschperiode von 2 Wochen.

Für jeden Zeitpunkt wurden 6 Tiere und 1 Reservetier verwendet. Um im Falle des Ausscheidens eines Tiers gleiche Versuchsbedingungen zu erhalten, wurden die Reservetiere von Beginn an im Versuch mitgeführt.

3.6.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden insgesamt 21 männliche Mastputen der Linie B.U.T. 6 verwendet. Die Tiere wurden von 2 kommerziellen Putenmältern im Alter von 21

Tagen (7 Tiere) und 44 Tagen (14 Tiere) erworben. Nach Ablauf einer Eingewöhnungsphase von mindestens einer Woche fanden die Versuche im Alter von 6 – 11 Wochen statt (Tab. 3.3). In diesem Alter sind die Tiere besonders empfänglich für durch Clostridien verursachte Darminfektionen wie die Nekrotisierende Enteritis (DROUAL et al., 1994; HINZ, 2012).

Die Tiere wurden getrennt nach Versuchsgruppen aufgestellt, jede Gruppe wurde später mit einem der drei Penicilline behandelt. Sie zeigten in der Eingangsuntersuchung bei Ankunft in der Versuchstierhaltung (Allgemeinuntersuchung) sowie über die Dauer der Versuche keine klinischen Krankheitssymptome.

		Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Wirkstoff		Amoxicillin	Penicillin G	Penicillin V
Dosierung		17,4 mg/kg KM	9 mg/kg KM	20 mg/kg KM
Alter Wochen	oral	6	8	9
	i.v.	8	10	11
Versuchszeitraum (inkl. 1 Woche Eingewöhnung)		16.03. - 10.04.2015	27.04. - 23.05.2015	04.05. - 30.05.2015

Tabelle 3.3: Übersicht über die 3 Versuchsgruppen. Jede Gruppe besteht aus 7 männlichen Mastputen der Standardlinie B.U.T. 6 (je 6 Versuchstiere + 1 Ersatztier).

3.6.3 Haltung der Tiere

Die Unterbringung der Puten erfolgte im Einklang mit der *Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere* (2010 / 63 / EU, 2010) und ergänzend den *Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die zu Versuchszwecken und anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendet werden* (2007 / 526 / EG, 2007). Die Stallräume wurden mit Holzspänen eingestreut und waren jeweils mit Sitzstangen und Sandbädern ausgestattet. Die Versorgung mit Trinkwasser sowie mit einem kommerziellen Putenaufzucht- und Mastfutter (*Deuka Putenstarter P2, Deuka Putenmastfutter P3*) erfolgte *ad libitum*. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde

täglich adspektorisch überprüft und die Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit dokumentiert. Zusätzlich zu einem Tageslichtfenster wurde durch künstliche Beleuchtung eine ausreichende Lichtintensität über eine Tageslichtlänge von 14 h bei einer Dunkelperiode von 8 h gewährleistet.

3.6.4 Versuchsdurchführung

In der ersten Versuchswoche fanden die Untersuchungen zur Bestimmung der Pharmakokinetik nach oraler Eingabe statt. Die Versuche zur Bestimmung der Pharmakokinetik nach intravenöser Applikation folgten in Versuchswoche drei.

Es wurden jeden Tag 2 – 3 Tiere in den Versuch genommen. Alle Tiere wurden am Vorabend des ersten Versuchstages gewogen und eine Reihenfolge erstellt. Um möglichst gleichmäßige Gewichte zu erhalten, wurden die Tiere im Laufe der Woche dann nach absteigendem Gewicht behandelt. In Versuchswoche drei wurde dieselbe Reihenfolge befolgt, sodass für jedes Tier eine Auswaschperiode von 2 Wochen gegeben war. Am Morgen eines jeden Versuchstages wurden die zu behandelnden Tiere erneut gewogen und die individuelle Medikamentendosis berechnet. Zum gleichen Zeitpunkt wurde eine erste Blutentnahme aus der *V. ulnaris* durchgeführt, die als Kontrolle für den Zeitpunkt 0 (unbehandelte Tiere) diente. Zum Wiegen wurde eine Hängewaage genutzt, die eine Messung in 5 g Schritten bis zu einem Maximalgewicht von 10 kg erlaubt (*TEAM CORMORAN Mini-Fischwaage kompakt*, Daiwa-Cormoran Sportartikel-Vertrieb GmbH, Gröbenzell).

Orale Eingabe

Zur oralen Eingabe wurden die pulverförmigen Penicillinpräparate in Trinkwasser aufgelöst. Hierfür wurden ausreichende Tagesportionen für jedes Pulver zuvor im Labor abgewogen, sodass die Gebrauchslösung am Versuchstag direkt vor der Eingabe in der gewünschten Konzentration hergestellt werden konnte. Hierdurch wurde eine Degradation der Penicilline in wässriger Lösung vor der Eingabe verhindert.

Verwendete Präparate:

Penicillin G	Aviapen 250mg/g , Pulver zum Eingeben für Schweine (Saugferkel), Hühner (Junghennen, Broiler), Puten Wirkstoff: Benzylpenicillin-Kalium Serumwerk Bernburg AG
Penicillin V	Phenoxyphen WSP , 325 mg/g, Pulver zur Herstellung einer Lösung zum Eingeben für Hühner Wirkstoff: Phenoxymethylpenicillin-Kalium Dopharma Deutschland GmbH
Amoxicillin	Suramox 1000mg/g , Pulver zum Eingeben über das Trinkwasser für Hühner, Enten und Puten Wirkstoff: Amoxicillin-Trihydrat Virbac Tierarzneimittel GmbH

Das individuell zu verabreichende Lösungsvolumen wurde anhand der ermittelten Körpergewichte errechnet und das Medikament mithilfe einer Knopfkanüle direkt in den Kropf eingegeben. Danach wurde die Kanüle mit 2 ml Trinkwasser nachgespült, um eine vollständige Aufnahme der Arzneimittellösung zu gewährleisten.

Der Futterautomat wurde 2 h vor der Eingabe aus dem Gehege entfernt und die Tiere bis 2 h nach Eingabe nüchtern gehalten.

Intravenöse Eingabe

Für Penicillin G und Amoxicillin standen kommerzielle Fertigarzneimittel zur intravenösen Injektion zur Verfügung. Sie enthielten zwei Komponenten, ein

Lösungsmittel und Injektionsflaschen mit den pulverförmigem Penicillinen. Die beiden Komponenten wurden direkt vor der intravenösen Verabreichung gemischt und das benötigte Injektionsvolumen für jede Pute individuell errechnet.

Verwendete Präparate:

Penicillin G	Penicillin-G-Natrium 205 mg/ml Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung für Rinder, Schweine, Hunde und Katzen Wirkstoff: Benzylpenicillin-Natrium bela-pharm GmbH & Co. KG
Amoxicillin	Belamox , 200 mg/ml Pulver und Lösungsmittel zur Herstellung einer Injektionslösung für Rinder, Pferde, Schweine Wirkstoff: Amoxicillin-Natrium bela-pharm GmbH & Co. KG

Da für die intravenöse Eingabe von Penicillin V keine Fertigpräparate auf dem Markt verfügbar waren, wurde eine Injektionslösung aus reinem Penicillin V-Kalium (*Penicillin V potassium*, APOLLO Scientific Ltd., Manchester, UK) und Kochsalzlösung hergestellt.

Die intravenöse Injektion der Arzneimittel erfolgte in die *V. metatarsalia*. In der ersten Versuchsgruppe (Amoxicillin) wurde die Lösung direkt in die Vene injiziert. Nach der Injektion wurde die Kanüle für 5 Sekunden in der Vene belassen, um Wirkstoffverluste durch einen Rückfluss von Penicillin-haltigem Blut aus der Injektionsstelle zu vermeiden. Für Penicillin G und Penicillin V wurde zur Eingabe der Arzneimittellösung ein peripherer Venenverweilkatheter verwendet (*BD Insyte-WTM*, Becton Dickinson Infusion Therapy Systems, Utah, USA). Vor und nach der Injektion der Penicilline wurde der Katheter mit je 2 ml NaCl-Lösung gespült. Da die Tiere eine geringe Toleranz für den Katheter aufwiesen, wurde dieser kurz nach

der Injektion entfernt und konnte nicht für die folgenden Blutentnahmen genutzt werden.

Blutentnahme

Den Tieren wurde zu den Zeitpunkten 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 und 12 h nach Eingabe der Medikamente jeweils 2 ml Blut entnommen.

Die Blutentnahme erfolgte abwechselnd an den *Vv. ulnares* der beiden Flügelunterseiten. Das Blut wurde in 2 heparinisierte Blutentnahmeröhrchen (*Probengefäß 1,3ml LH*, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) überführt und sofort auf Eis gelagert. Die Blutproben wurden unverzüglich in das Kliniklabor verbracht und weiter verarbeitet.

Verarbeitung der Proben im Labor

Im Kliniklabor wurde das Blut zentrifugiert (Zentrifuge *Hettich Mikro 120*) und das Blutplasma gewonnen. Das Plasma wurde in neue Röhrchen überführt und bei -20 °C tiefgefroren.

Am Ende der Versuchswoche wurden die Plasmaproben auf Trockeneis zum Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie gebracht und bis zur Quantifizierung der Penicilline bei -80 °C gelagert.

Versuchsprotokolle

Sowohl über die Durchführung der praktischen Tierversuche als auch die Weiterverarbeitung der Blutproben im Labor wurde Protokoll geführt. In den Aufzeichnungsblättern zum Tierversuch wurden insbesondere die Markierung des Versuchstieres, das Gewicht, die errechnete Dosis des Wirkstoffes, das benötigte Eingabevolumen, die Zeitpunkte der Wirkstoffverabreichung und der Blutentnahmen sowie das Auftreten von Besonderheiten notiert. Hierzu gehören zum Beispiel Abweichungen

im Zeitplan oder bei den verwendeten Blutentnahmestellen, Probleme bei der Medikamenteneingabe und alle weiteren Auffälligkeiten, die an den Tieren selber oder in ihrem Verhalten auftreten können. Außerdem lag zum Zeitpunkt der Versuche ein *Score-Sheet* im Stallbereich aus, auf dem definierte Abbruchkriterien verzeichnet sind. Im Laborprotokoll wurden insbesondere Zeitpunkt der Plasmagewinnung, das gewonnene Plasmavolumen sowie das Auftreten von Besonderheiten, wie zum Beispiel Hämolyse oder Pfropfbildung, notiert. Blankovorlagen der Protokollblätter und das genutzte *Score-Sheet* finden sich in Anhang I.

3.7 Probenauswertung

Zur Analyse der gewonnenen Blutplasmaproben im ELISA wurden diese nach dem Auftauen zunächst zentrifugiert (Zentrifuge *Minifuge RF*, Heraeus Sepatech), um Sedimente zu entfernen. Anschließend wurden die Proben je nach der zu erwartenden Wirkstoffkonzentration soweit in PBS verdünnt, dass sich eine Penicillinkonzentration im Arbeitsbereich des ELISA ergab. Da nur wenig Daten zur Abschätzung der erwarteten Plasmakonzentrationen zur Verfügung standen wurden zunächst von jeweils zwei Tieren pro Zeitpunkt entsprechende Verdünnungsreihen über einen weiten Konzentrationsbereich erstellt. Für die nachfolgenden Tiere konnte die erwartete Konzentration anhand der ersten Messergebnisse dann genauer definiert werden. Für jeden Messpunkt wurden schließlich 2 – 3 Verdünnungsstufen ausgewählt, die eine Messung im Bereich der IC_{50} der Standardkurve ermöglichten. Die Plasmaproben wurden jeweils in Dreifachbestimmung auf die ELISA-Platte aufgetragen. Nach dem Auslesen der ELISA-Platte im Photometer wurde der Mittelwert der Dreifachbestimmung errechnet und mit diesem die weiteren Berechnungen zur Konzentrationsbestimmung durchgeführt (siehe Kapitel „Erstellung der Standardkurve“). Zusätzlich wurde auf jeder ELISA-Platte ein interner Standard mitgeführt. Dieser wurde zu Beginn der Probenauswertung für jedes Penicillin in größerer Menge durch Dotierung von PBS-Puffer auf eine Penicillinkonzentration von 40 ng/ml hergestellt und in Aliquots bei -80 °C gelagert. Bei einer Abweichung der berechneten Konzentrationen des internen Standards vom Mittelwert aller Messungen um mehr als 15 % wurde der ELISA für ungültig erklärt und die Bestimmung wiederholt.

3.8 Pharmakokinetische Analyse

Die pharmakokinetische Auswertung der Daten wurde mit dem Softwareprogramm pK Solutions (*PK Solutions 2.0TM Noncompartmental Pharmacokinetics Data Analysis*, Summit Research Services) durchgeführt, welches als Template auf der Basis von Excel (*Microsoft Excel 2010*) funktioniert. Dieses Programm erlaubt die Abschätzung von pharmakokinetischen Parametern nach oraler und i.v. Applikation über eine Nicht-Kompartiment-Analyse. Hierbei basieren die durchgeführten Berechnungen allein auf dem Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurve im Blut, ohne dass weitere Annahmen über die beteiligten Kompartimente getroffen werden. Wesentliche Techniken sind hierbei die Berechnung der *area under the curve* (AUC), sowie das *curve stripping*, bei dem die Halbwertszeiten der Resorption, Verteilung und Elimination eines Stoffes anhand der Kurvensteigung ermittelt werden (SUMMIT RESEARCH SERVICES, 2005). Eine Auflistung der von dem Programm genutzten Formeln zur Berechnung der verschiedenen pharmakokinetischen Parameter findet sich im Anhang II.

Die Versuche wurden für jedes Penicillin und jede Applikationsform jeweils mit 7 Tieren durchgeführt. Nach den Vorgaben der *Guidelines for the Conduct of Pharmacokinetic Studies in Target Animal Species* (EMEA, 2000) wurden die pharmakokinetischen Parameter für jedes Tier zunächst gesondert berechnet. Erst im Anschluss wurden dann die so gewonnenen Daten der jeweiligen Gruppe zusammengefasst und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Validierung des ELISA

4.1.1 Spezifität

Kreuzreaktivität mit den Hauptmetaboliten

Um die Spezifität des ELISAs zu bestimmen, wurde die Kreuzreaktivität von *mab 3B5* gegenüber Amoxicilloinsäure und Amoxicillin Diketopiperazin und von *mAk 1F1* gegenüber Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure untersucht.

Zunächst wurden die Standardkurven der getesteten Substanzen verglichen. Während sich für die Referenzsubstanzen, Amoxicillin und Penicillin G, ein typisch sigmoidaler Verlauf zeigte, bewegte sich die gemessene Extinktion der Metaboliten auf einem Plateau im Bereich der maximalen Extinktion (Abb. 4.1). Auch bei hohen Konzentrationen des Kompetitors ist hier keine Verdrängung des Konjugats vom Antikörper zu beobachten.

In Tab. 4.1 ist die relative Extinktion von Amoxicillin, Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure für jede Verdünnungsstufe dargestellt. Die relative Extinktion berechnet sich aus dem Quotienten der absoluten Extinktion der jeweiligen Verdünnung mit dem Mittelwert der Leerwertextinktion. Die relative Extinktion der letzten Verdünnungsstufe für die Amoxicillin-Standardkurve (0,823 ng/ml) dient dabei als Orientierung für die Leerwertgrenze (LoB) von Amoxicillin für *mab 3B5*, welche bei Messungen in PBS-Puffer bei 1,1 ng/ml liegt. Relative Extinktionen, welche über diesem Grenzwert, in diesem Fall 92,6 % liegen, entsprechen den Werten, die bei Messung einer Leerwertprobe entstehen können. Es wird deutlich, dass die Metaboliten keine Kreuzreaktivität zeigen, also in keiner der getesteten

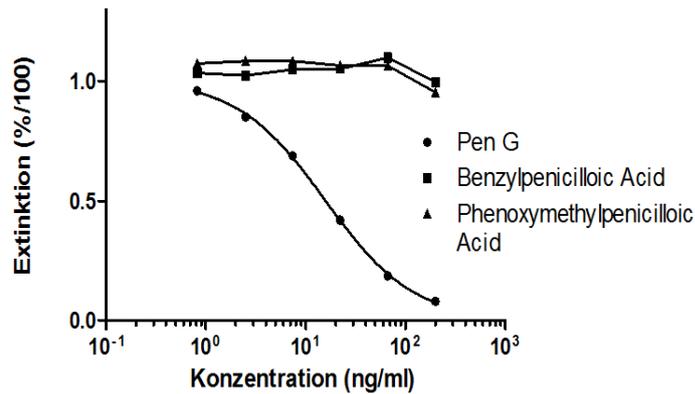
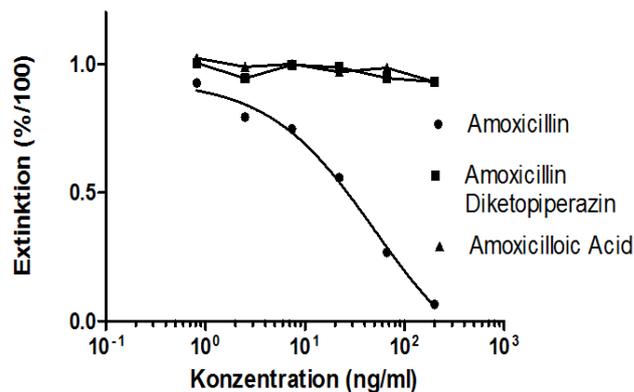
(a) Kreuzreaktivität *mAk 1F1*(b) Kreuzreaktivität *mab 3B5*

Abbildung 4.1: a) Kreuzreaktivität von *mAk 1F1* mit Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure. b) Kreuzreaktivität von *mab 3B5* mit Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure. Während es bei den Referenzsubstanzen Penicillin G und Amoxicillin mit zunehmender Konzentration zu einer Abnahme der Extinktion, d.h. einer Verdrängung des Enzym-Konjugats vom Antikörper kommt, zeigt sich für die Metaboliten unabhängig von der Konzentration eine konstante Extinktion im Bereich von 100 %

Konzentrationen mit dem Antikörper reagieren. Die gemessenen Schwankungen der relativen Extinktion von 93 – 102 % entsprechen der natürlichen Intra-Assay-Variabilität, welche auch bei Messung einer Leerwertprobe auftritt.

Tab. 4.2 zeigt die relative Extinktion von Penicillin G, Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure. Auch hier ist keine Kreuzreaktivität erkennbar. Die gemessenen Extinktionen liegen unabhängig von der Verdünnungsstufe weitgehend auf einem ähnlichen Niveau im Bereich von 102 – 110 %. Lediglich in der

letzten Verdünnungsstufe (200 ng/ml) kommt es zu einem leichten Abfall der gemessenen relativen Extinktionen auf 99 bzw. 95 %. Auch diese Werte liegen oberhalb des für *mAk 1F1* mit Pen G ermittelten LoB, welches in diesem Fall einer relativen Extinktion von 91,7 % entsprechen würde.

Konzentration	Amoxicillin	Amoxicillin Diketopiperazin	Amoxicilloin- Säure
	relative Extinktion der Proben (%/100) = E_P / E_0		
200 ng/ml	0,0651	0,9308	0,9308
66,7 ng/ml	0,2676	0,9448	0,9850
22,2 ng/ml	0,5574	0,9866	0,9680
7,4 ng/ml	0,7473	0,9962	0,9996
2,5 ng/ml	0,7921	0,9436	0,9889
0,823 ng/ml	0,9262	1,0035	1,0228
absolute Extinktion (E_P)			E_0
0,935 – 1,008			0,935 – 1,027
			1,004

Tabelle 4.1: Relative Extinktionen von Amoxicillin und den Metaboliten Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure. Die relative Extinktion entspricht dem Quotienten aus der absoluten Extinktion der Proben (E_P) und der Leerwertextinktion (E_0). Unabhängig von der betrachteten Verdünnung liegt die Extinktion der Metaboliten oberhalb der Leerwertgrenze (LoB). Diese befindet sich für Amoxicillin bei 1,1 ng/ml, entsprechend einer relativen Extinktion von 92,6 %.

	Penicillin G	Benzylpenicilloin- säure	Phenoxymethyl- penicilloinsäure
Konzentration	relative Extinktion der Proben (%/100) = E_P / E_0		
200 ng/ml	0,0793	0,9970	0,9541
66,7 ng/ml	0,1873	1,0988	1,0648
22,2 ng/ml	0,4195	1,0527	1,0667
7,4 ng/ml	0,6884	1,0493	1,0853
2,5 ng/ml	0,8507	1,0240	1,0850
0,823 ng/ml	0,9609	1,0356	1,0737
	absolute Extinktion (E_P)		E_0
	1,378 - 1,519		1,382

Tabelle 4.2: Relative Extinktionen von Penicillin G und den Metaboliten Benzylpenicilloinsäure und Phenoxymethylpenicilloinsäure. Die relative Extinktion entspricht dem Quotienten aus der absoluten Extinktion der Proben (E_P) und der Leerwertextinktion (E_0). Unabhängig von der betrachteten Verdünnung liegt die Extinktion der Metaboliten oberhalb der Leerwertgrenze (LoB). Diese befindet sich für Penicillin G bei 2,1 ng/ml, entsprechend einer relativen Extinktion von 91,7 %.

Kreuzreaktivität mit den verwendeten Penicillinen

Durch den Vergleich der Affinität der beiden verwendeten monoklonalen Antikörper zu den drei untersuchten Penicillinen (Penicillin G, Penicillin V, Amoxicillin) kann bestimmt werden, inwieweit diese sich für den Nachweis der Wirkstoffe eignen. Sollte einer der Antikörper eine hohe Kreuzreaktivität zu allen verwendeten Penicillinen zeigen, könnte dieser zum Beispiel für den Nachweis aller drei Penicilline genutzt werden. Die Sensitivität von *mAk 1F1* gegenüber Penicillin G und Penicillin V sowie von *mab 3B5* gegenüber Amoxicillin wurde bereits in Kapitel 3.2.2 bei Besprechung der Standardkurven beschrieben. Penicillin V weist dabei im Vergleich zu Penicillin G eine geringere Affinität zu *mAk 1F1* auf. Berechnet man die relative Kreuzreaktivität mit der unten beschriebenen Formel, so ergibt sich ein Wert von 44 %. Aus diesem Grund wurden nachfolgend Penicillin G und Amoxicillin als Referenzsubstanzen für die jeweiligen Antikörper eingesetzt (Reaktivität = 100 %).

Bei grafischer Betrachtung der gemessenen Penicillinkonzentrationen zeigen sich für Penicillin G bzw. Amoxicillin als Referenzsubstanzen wiederum idealtypische Standardkurven mit einem Testmittelpunkt (IC_{50}) in einem Bereich von 15 ng/ml und 24 ng/ml. Betrachtet man dagegen die Kreuzreaktivität von Amoxicillin mit *mAk 1F1* (Abb. 4.2a), so bleibt die gemessene Extinktion über lange Zeit auf einem Plateau im Bereich der maximalen Extinktion, erst in höheren Konzentrationen von Amoxicillin in der Probe (60 – 200 ng/ml) beginnt die Kurve langsam abzufallen. Bei der Bestimmung der Kreuzreaktivität von Penicillin G und Penicillin V gegenüber *mab 3B5* konnte eine deutliche Verdrängung beobachtet werden (Abb. 4.2b). Trotzdem liegt auch hier die gemessene Extinktion jeder Verdünnungsstufe deutlich über den Werten der Referenzsubstanz.

Um die Kreuzreaktivität der verschiedenen Penicilline zu quantifizieren, können ihre IC_{50} -Werte mit denjenigen der jeweiligen Referenzsubstanz verglichen werden. Die relative Kreuzreaktivität der Testsubstanzen ergibt sich dann aus:

$$\text{Relative Kreuzreaktion (\%)} = (IC_{50} \text{ Referenzsubstanz} / IC_{50} \text{ Testsubstanz}) * 100$$

Bei den eingesetzten Konzentrationen im Bereich von 0,823 – 200 ng/ml wurde für keine der Testsubstanzen eine relative Extinktion von 50 % oder weniger erreicht. Um dennoch eine Quantifizierung der Kreuzreaktivität zu ermöglichen, wurde die IC_{50} anhand der erstellten Kurven mathematisch geschätzt. Da die Kurven der Testsubstanzen sich in allen Fällen noch im Anfangsbereich des Steigungsabfalles befanden, ist die Einschätzung ihres weiteren Verlaufs allerdings mit Unsicherheiten behaftet. Die errechnete relative Kreuzreaktion erlaubt jedoch eine ungefähre Einschätzung der Affinität des jeweiligen Antikörpers zu den verschiedenen Penicillinen. Hieraus ergab sich für *mAk 1F1* und Amoxicillin eine relative Kreuzreaktivität von 2,82 %, für *mab 3B5* und Penicillin G eine relative Kreuzreaktivität von 3,22 % und für *mab 3B5* und Penicillin V eine relative Kreuzreaktivität von 6,15 %.

Prinzipiell kann, im Unterschied zu den Penicillinmetaboliten, jeder der beiden verwendeten Antikörper alle drei der zu bestimmenden Penicilline erkennen. Die Affinitäten sind jedoch nicht in jedem Fall ausreichend hoch, sodass für die Untersuchungen beide Antikörper benötigt wurden.

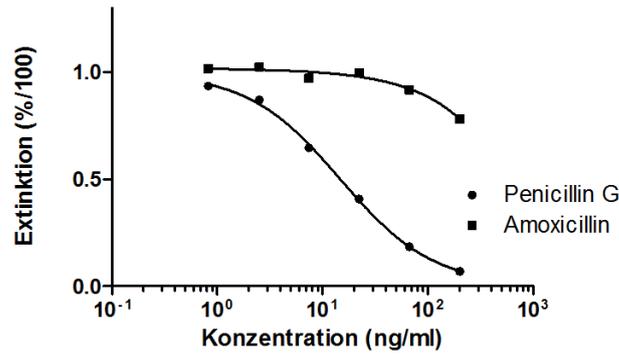
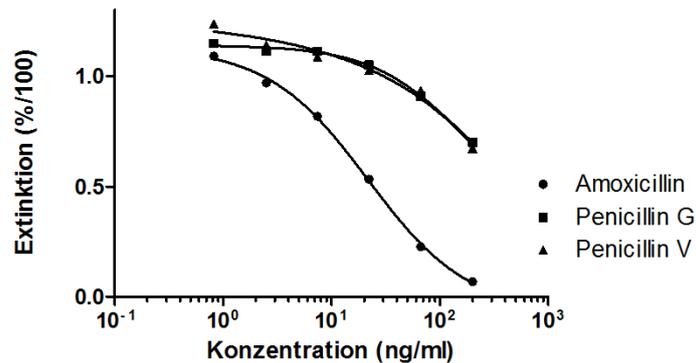
(a) Kreuzreaktivität *mAk 1F1*(b) Kreuzreaktivität *mab 3B5*

Abbildung 4.2: a) Kreuzreaktivität von *mAk 1F1* mit Amoxicillin. Erst bei sehr hohen Amoxicillinkonzentrationen kann eine geringe Verdrängung des Enzym-Konjugats vom Antikörper beobachtet werden. b) Kreuzreaktivität von *mab 3B5* mit Penicillin G und Penicillin V. Hier führt eine Erhöhung der Penicillinkonzentrationen zu einer Abnahme der gemessenen Extinktion. Insgesamt bleibt die Extinktion aber auf einem hohen Niveau oberhalb von 50 %, sodass keine typische sigmoidale Standardkurve ausgebildet wird.

4.1.2 Linearität

Für jedes Penicillin wurde die Linearität anhand von 4 Plasmaproben bestimmt. Die in den Proben enthaltenen Penicillinkonzentrationen sollten dabei die Bestimmung der Linearität über 4 – 6 Verdünnungsstufen im Arbeitsbereich des ELISAs ermöglichen. Außerdem sollten alle bei der Auswertung der Proben genutzten Verdünnungsstufen getestet werden. Als Zielvorgabe wurde eine Linearität von 90 – 110 % angestrebt.

Bei Messungen im hohen Konzentrationsbereich ($> 150 - 200$ ng/ml) kommt es häufig zu einer Unterschätzung der tatsächlich in der Probe vorliegenden Wirkstoffkonzentration. In diesem Bereich sind die Antikörperbindungsstellen des ELISAs zunehmend abgesättigt, was auch am Abflachen der Standardkurve sichtbar wird. In der Folge lag die Linearität bei 6 von 8 Messungen zum Teil deutlich oberhalb des Grenzwertes von 110 % (Tab. 4.3).

Im mittleren Konzentrationsbereich von 4 – 132 ng/ml (Penicillin G), 10 – 163 ng/ml (Penicillin V) und 19 – 112 ng/ml (Amoxicillin) zeigten alle Penicilline eine Linearität im Bereich der angestrebten Grenzwerte (Tab. 4.3). Die aufgetretenen Variationen zeigten keinen erkennbaren Trend, wie zum Beispiel ein Ansteigen oder Abfallen der Linearität mit zunehmender Konzentration, sondern schwankten um 100 %. Dies entspricht der bei jeder Messung auftretenden natürlichen Variabilität der Messwerte innerhalb einer ELISA-Platte (Intra-Assay-Variabilität). Ein Über- oder Unterschreiten der Zielvorgabe um maximal 3 Prozentpunkte trat nur in wenigen Einzelfällen auf. Die höchsten Abweichungen (87 bzw. 113 % Linearität) traten bei einer Kombination aus geringer Probenverdünnung und niedriger Wirkstoffkonzentration in der Probe auf. Unter diesen Bedingungen wird die höchste Variabilität der Messwerte beobachtet, weshalb es bei einzelnen Messungen zu Abweichungen kommen kann.

In den niedrigen Konzentrationsbereichen von < 4 (Penicillin G), 10 (Penicillin V) und 19 ng/ml (Amoxicillin) wurden zunehmend Abweichungen beobachtet. Im Gegensatz zu den Messergebnissen im hohen Konzentrationsbereich war allerdings keine allgemeine Tendenz, wie eine generelle Erhöhung und Erniedrigung der berechneten Linearitätswerte erkennbar. Vielmehr kommt es zu einer stärkeren Schwankung der Werte um 100 % (Tab. 4.3). Dies ist vor allem für Penicillin G und Penicillin V erkennbar, bei denen die gemessene Linearität zwischen 83 – 147 % bzw. 82 – 131 % schwankte. Eine größere Variabilität der Messungen ist auch bei Amoxicillin sichtbar. Hier kam es zusätzlich in einigen Fällen zu einer einseitigen Erhöhung der Linearität. Bei der Messung von Proben in niedrigen Konzentrationsbereichen kommt es also tendenziell zu einer Überschätzung der tatsächlich vorliegenden Penicillinkonzentrationen. Dies wird auch bei der Bestimmung der Wiederfindungsrate von Amoxicillin deutlich (Kapitel 4.1.3).

Penicillin	Probe	Konzentration (ng/ml)	Verdünnungsgrad	Linearität (%)
hoher Konzentrationsbereich				
Pen G	1	222 - 132	1:10 - 1:20	118
	2	482 - 232	1:10 - 1:20	96
Pen V	1	356 - 163	1:10 - 1:40	127 - 145 (136)
	3	377 - 200	1:10 - 1:20	106
Amoxi	1	425 - 254	1:10 - 1:40	142 - 168 (155)
	2	191 - 112	1:10 - 1:20	118
mittlerer Konzentrationsbereich				
Pen G	1	132 - 4	1:20 - 1:640	96 - 106 (100)
	2	232 - 8	1:20 - 1:640	98 - 108 (103)
	3	89 - 6	1:10 - 1:160	94 - 111 (104)
	4	17 - 8	1:10 - 1:20	87
		8 - 2	1:20 - 1:80	99 - 100 (100)
Pen V	1	163 - 10	1:40 - 1:640	95 - 106 (100)
	2	259 - 9	1:10 - 1:320	93 - 109 (103)
	3	200 - 6	1:20 - 1:640	98 - 110
	4	82 - 43	1:10 - 1:20	106
		43 - 25	1:20 - 1:40	113
		25 - 13	1:40 - 1:80	104
		13 - 7,1	1:80 - 1:160	112
Amoxi	1	254 - 19	1:40 - 1:640	97 - 111 (105)
	2	112 - 4	1:20 - 1:640	96 - 111 (103)
	3	96 - 8	1:10 - 1:160	101 - 112 (108)
	4	106 - 13	1:10 - 1:80	95 - 105 (100)
niedriger Konzentrationsbereich				

Penicillin	Probe	Konzentration (ng/ml)	Verdünnungsgrad	Linearität (%)
Pen G	1	4 - 0,35	1:640 - 1:5120	83-147 (95)
Pen V	1	10 - 2	1:640 - 1:5120	82 - 131 (115)
	2	9 - 2	1:320 - 1:1280	86 - 124 (105)
Amoxi	1	19 - 5	1:640 - 1:5120	111 - 145 (124)
	3	8 - 2	1:160 - 1:640	94 - 121 (107)
		2 - 0,4	1:640 - 1:1280	32
	4	13 - 2	1:80 - 1:640	86 - 113 (102)

Tabelle 4.3: Linearität von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin im hohen, mittleren und niedrigen Konzentrationsbereich. Die Linearität ergibt sich für jede Verdünnungsstufe aus dem Verhältnis der gemessenen zur erwarteten Konzentration. Die erwartete Konzentration entspricht dabei 50 % der in der vorherigen Verdünnungsstufe gemessenen Konzentration. Es wurden für jedes Penicillin 4 Plasmaproben (1:2 Verdünnungsreihe) analysiert. Die in den verschiedenen Konzentrationsbereichen für die jeweilige Probe berechneten Linearitätswerte sind in der Tabelle zur besseren Übersicht zum Teil zusammengefasst. Angegeben ist dann jeweils die gesamte Spannbreite der berechneten Linearitätswerte, sowie in Klammern der Mittelwert aller Werte.

4.1.3 Genauigkeit

Richtigkeit/Wiederfindung

Die Wiederfindungsrate beschreibt den Anteil der in einer Probe enthaltenen Penicillinkonzentration, welcher vom Testsystem wiedererkannt wird. Die tatsächlich enthaltene Konzentration kann dabei durch den Einfluss der Probenmatrix sowohl über- als auch unterschätzt werden. Besteht kein Unterschied zwischen den Messergebnissen einer gegebenen Penicillinkonzentration in Blutplasma und im Verdünnungsmedium der Standardkurve, in diesem Fall PBS-Puffer, liegt

eine Wiederfindungsrate von 100 % vor. Für den verwendeten ELISA wurde eine Wiederfindungsrate zwischen 80 – 120 % angestrebt.

Es wurde zunächst für jedes der untersuchten Penicilline je eine 1:2 Verdünnungsreihe in PBS und in 10 % Blutplasma (3,125 – 200 ng/ml) analysiert und die Wiederfindungsrate für jede Verdünnungsstufe berechnet. Für Amoxicillin wurde zusätzlich eine zweite Messung mit identischem Aufbau durchgeführt, da es hier, im Unterschied zu den anderen Penicillinen, bereits ab einer Konzentration von 25 ng/ml zu einem starken Anstieg der Wiederfindungsrate kam. Dieses Ergebnis sollte durch eine zweite Messung verifiziert werden. Für Penicillin G wurde in 4 Konzentrationen eine zusätzliche Messung durchgeführt, da die Wiederfindungsrate bei der ersten Bestimmung zum Teil zwar innerhalb der Zielvorgaben, aber in einem niedrigen Bereich von nur 85 – 89 % lag. Hierdurch sollte beurteilt werden, ob dies Ausdruck eines generellen Trends hin zu einer leichten Unterschätzung der tatsächlich vorliegenden Wirkstoffkonzentrationen war.

Eine grafische Übersicht über die berechneten Wiederfindungsraten für alle durchgeführten Messungen im Verhältnis zu den vorgegebenen Grenzwerten von 80 bzw. 120 % ist in Abb. 4.3 dargestellt.

Die Wiederfindungsrate von Penicillin G lag für alle untersuchten Konzentrationen im Bereich von 3,125 – 200 ng/ml innerhalb der Zielvorgaben. Bei der Messung von sehr niedrigen Penicillinkonzentrationen zeigte sich ein leichter Anstieg der Wiederfindungsrate. Während sie bei einer Konzentration von 12,5 ng/ml noch bei 98 bzw. 101 % lag, wurde bei 6,25 ng/ml eine Wiederfindungsrate von 110 – 111 % gemessen. Bei 3,125 war sie dann auf 117 % angestiegen. Eine Tendenz zu einer Unterschätzung der tatsächlich vorhandenen Konzentration, welche sich im ersten Messdurchgang insbesondere bei 100 und 25 ng/ml zeigte (89 bzw. 86 %), konnte bei einer zweiten Messung in diesem Konzentrationsbereich nicht bestätigt werden (Tab. 4.4).

Für Penicillin V lag die Wiederfindungsrate bei allen in einem Konzentrationsbereich von 6,25 – 200 ng/ml durchgeführten Messungen bei 91 – 107 % und damit deutlich innerhalb der definierten Grenzwerte. Erst bei einer Penicillinkonzentration von 3,125 ng/ml zeigte sich ein Anstieg der Wiederfindungsrate auf 132 %.

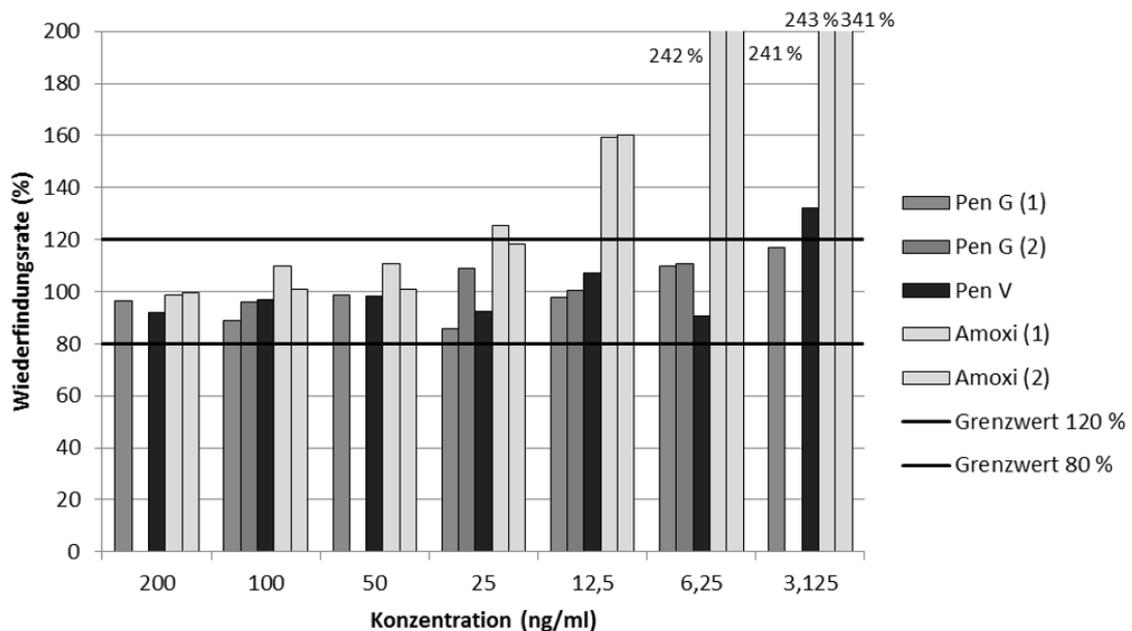


Abbildung 4.3: Wiederfindungsrate von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin in 7 Verdünnungsstufen von 3,125 – 200 ng/ml. Der obere und untere Grenzwert von 80 bzw. 120 % sind als horizontale Linien dargestellt. Für Penicillin G und Amoxicillin wurden zum Teil doppelte Messungen durchgeführt. In diesem Fall sind die Ergebnisse beider Messungen als gleichfarbige Balken nebeneinander aufgetragen. Die für Amoxicillin bei 6,25 und 3,125 ng/ml gemessenen Werte liegen oberhalb des dargestellten Diagrammbereiches. Eine Wiederfindungsrate innerhalb der Zielvorgaben wurde für Penicillin G zwischen 3,125 und 200 ng/ml, für Penicillin V zwischen 6,25 und 200 ng/ml und für Amoxicillin zwischen 25 und 200 ng/ml erreicht.

Diese Konzentration liegt allerdings bereits unterhalb der Leerwertgrenze (LoB) von 5,07 ng/ml. Unabhängig von der tatsächlichen Probenkonzentration (auch bei Analyse von Leerwertproben) werden unterhalb dieser Grenze definitionsgemäß Werte bis zu 5,07 ng/ml gemessen.

Eine Wiederfindungsrate innerhalb der Zielvorgaben konnte für Amoxicillin nur einem Bereich von 25 – 200 ng/ml gemessen werden. Unterhalb dieses Konzentrationsbereiches kam es zu einem sprunghaften Anstieg der Wiederfindungsrate auf 159 – 160 (12,5 ng/ml), 241 – 242 (6,25 ng/ml) und 243 – 341 % (3,125 ng/ml). Auch bei einer Amoxicillinkonzentration von 25 ng/ml bewegte sich die Wiederfindungsrate bereits im Bereich des oberen Grenzwertes. Bei der ersten Messung wurde hier eine Wiederfindung von 126 % gemessen, bei der zweiten Messung lag sie bei 118 %. Bei einer Messung von Proben in diesem Konzentrationsbereich muss

also tendenziell von einer leichten Überschätzung der tatsächlich vorliegenden Konzentrationen ausgegangen werden. Dies trifft vor allem bei einer geringen Verdünnung der Proben zu, da die hier durchgeführten Messungen sich auf 10%iges Plasma beziehen. Bei höherer Verdünnung des Plasmas nehmen dagegen der auftretende Hintergrund und die erhöhte Wiederfindungsrate wieder ab. Bei den nachfolgend durchgeführten pharmakokinetischen Untersuchungen lagen die Blutplasmakonzentrationen für Amoxicillin bei den meisten Messzeitpunkten deutlich oberhalb des Arbeitsbereichs des ELISAs. Ausgehend von der voraussichtlich enthaltenen Penicillinkonzentration konnten die Proben durch Verdünnung deshalb beliebig eingestellt werden, sodass in den meisten Fällen eine Messung im oberen Arbeitsbereich des ELISAs möglich war. Messungen von Proben im niedrigen Konzentrationsbereich mit einer geringen Verdünnung von 1:10 waren vor allem nach intravenöser Eingabe zum Zeitpunkt 2 h (letzter Zeitpunkt mit messbaren Konzentrationen) nötig. Hier lagen die gemessenen Konzentrationen bei 4 Tieren im Bereich von 23 – 35 ng/ml.

Betrachtet man die Wiederfindungsraten wird außerdem deutlich, dass das Testsystem die Gesamtmenge des in der Probe enthaltenen Penicillins erfasst. Es wird also sowohl der freie als auch der an Plasmaproteine gebundene Anteil erkannt. Bei einer Plasmaproteinbindung welche in der hier durchgeführten Studie für Amoxicillin mit 15 % und für Penicillin G und V mit 84 bzw. 80 % bestimmt wurde müsste die Wiederfindung der Stoffe in den dotierten Proben anderenfalls deutlich reduziert sein.

		dotierte Konzentrationen (ng/ml)						
		200	100	50	25	12,5	6,25	3,125
Penicillin G	Plasma (ng/ml)	197,26	84,57	50,38	21,98	11,76	7,21	3,61
	PBS (ng/ml)	204,24	95,36	51,03	25,61	12,05	6,56	3,09
	Wiederfindung (%)	96,58	88,68	98,73	85,83	97,63	109,97	117,03
	Plasma (ng/ml)		101,69		27,39	13,86	7,10	
	PBS (ng/ml)		105,79		25,20	13,79	6,41	
	Wiederfindung (%)		96,13		108,73	100,51	110,65	
Penicillin V	Plasma (ng/ml)	186,51	102,43	49,87	23,3	10,91	5,18	3,47
	PBS (ng/ml)	202,80	105,73	50,69	25,22	10,20	5,71	2,63
	Wiederfindung (%)	91,97	96,88	98,38	92,39	106,94	90,74	132,05
Amoxicillin	Plasma (ng/ml)	185,37	105,57	54,60	28,24	17,59	11,37	9,77
	PBS (ng/ml)	188,26	96,30	49,30	22,48	11,04	4,70	4,02
	Wiederfindung (%)	98,47	109,63	110,73	125,61	159,37	241,56	242,76
	Plasma (ng/ml)	226,74	123,30	59,76	30,20	17,73	12,62	8,72
	PBS (ng/ml)	227,34	121,91	59,31	25,55	11,07	5,24	2,56
	Wiederfindung (%)	99,74	101,14	100,75	118,21	160,21	240,92	340,81

Tabelle 4.4: Wiederfindungsrate von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin in 7 Verdünnungsstufen von 3,125 – 200 ng/ml. Dargestellt sind für jede untersuchte Konzentration die in Plasma (10%) und PBS-Puffer gemessenen Konzentrationen. Die Wiederfindungsrate ergibt sich jeweils aus dem Verhältnis dieser beiden Messwerte nach der Formel: Wiederfindung (%) = (gemessene Konzentration im Plasma/gemessene Konzentration in PBS) * 100.

Präzision (Intra- und Inter-Assay-Variabilität)

Intra-Assay-Variabilität Zur Bestimmung der Intra-Assay-Variabilität wurde Leerwertplasma mit 3 Konzentrationen der Penicilline im unteren, mittleren und oberen Arbeitsbereich des ELISAs dotiert. Die Proben wurden jeweils an 3 – 4 unterschiedlichen Bereichen der ELISA-Platte aufgetragen und die Variabilität zwischen den gemessenen Konzentrationen erfasst. Für Penicillin V und Amoxicillin wurde die Untersuchung mit je einer ELISA-Platte durchgeführt. Für Penicillin G wurden 2 ELISA-Platten mit jeweils 3 Konzentrationen untersucht.

Im oberen und mittleren Messbereich des ELISAs lagen die Variationskoeffizienten der Messergebnisse für alle drei Penicilline unterhalb von 10 %. Für Penicillin G wurden Werte von 2,6 – 8,6 %, für Penicillin V von 2,6 – 7,5 % und für Amoxicillin von 4,9 – 6 % bestimmt. Im unteren Messbereich kam es zu einem Anstieg der Variabilität auf 10 – 15 %.

	oberer Messbereich		mittlerer Messbereich		unterer Messbereich	
	Konzentration (ng/ml)	CV (%)	Konzentration (ng/ml)	CV (%)	Konzentration (ng/ml)	CV (%)
Pen G	66,7	2,9	29,7	8,6	6,5	11,4
	107,3	7,3	27,8	2,6	8,5	15,3
Pen V	85,4	2,6	36,7	7,5	6,8	11,6
Amoxi	99,2	4,9	46	6	15,6	10

Tabelle 4.5: Intra-Assay-Variabilität von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin.

Die Variabilität wurde jeweils im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISAs bestimmt. Sie ist als Variationskoeffizient (CV) dargestellt. $CV (\%) = (\text{Standardabweichung} / \text{Mittelwert}) * 100$.

Inter-Assay-Variabilität Die Inter-Assay-Variabilität wurde ebenfalls für jedes Penicillin im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISA bestimmt. Hierfür wurden zunächst dotierte Plasmaproben genutzt, die an fünf verschiedenen Versuchstagen analysiert wurden.

Im oberen und mittleren Konzentrationsbereich lag der Variationskoeffizient für alle drei Penicilline innerhalb der definierten maximalen Abweichung von 15 %. Im unteren Konzentrationsbereich war die Variabilität für Penicillin V und Amoxicillin allerdings deutlich erhöht. Im Falle von Penicillin V auf 28,83 %, bei Amoxicillin auf 28,14 %. Diese Stoffe können in niedrigen Konzentrationen in der Probe (7 – 11 ng/ml) demnach nicht mehr sicher quantifiziert werden. Der zulässige Arbeitsbereich des ELISAs musste daher weiter eingegrenzt werden. Der Variationskoeffizient für Penicillin G lag dagegen auch im unteren Konzentrationsbereich mit 13,44 % noch innerhalb des Grenzwertes (Abb. 4.4). Aus diesem Grund wurden die getesteten Konzentrationen des unteren Bereichs für Penicillin V und Amoxicillin auf 13 ng/ml erhöht und erneut Messungen an fünf Versuchstagen durchgeführt. Für Penicillin G wurde die getestete Konzentration dagegen auf 5,5 ng/ml erniedrigt, um eine Erweiterung des Arbeitsbereichs zu testen. Diese erneuten Messungen wurden für Penicillin G und Penicillin V an Plasmaproben behandelter Tiere durchgeführt, welche bei einer Verdünnung von 10 % in PBS eine entsprechende Penicillinkonzentration aufwiesen. Für die Untersuchungen für Amoxicillin wurde erneut dotiertes Blutplasma unbehandelter Tiere verwendet.

Aus den Daten ergibt sich für Penicillin G eine untere Messgrenze von 5,5 ng/ml und ein mittlerer Variationskoeffizient von 7,35 %. Für Penicillin V liegt die Grenze bei 13,5 ng/ml mit einem mittlerer Variationskoeffizienten von 6,06 %. Für Amoxicillin wurde eine Grenze von 19,5 ng/ml bei einem mittleren Variationskoeffizienten von 12,18 % bestimmt (siehe Tab. 4.6).

4.1.4 Leerwertgrenze (LoB) und Nachweisgrenze (LoD)

Die Bestimmung der Leerwert- und Nachweisgrenze wurde für jedes der drei Penicilline in PBS, 100 % Plasma und 10 % Plasma in PBS durchgeführt. Dabei wurde für PBS und 100 % Plasma je eine Leerwertprobe in 10 Wiederholungen untersucht. Für 10 % Plasma wurden 4 (Penicillin V, Amoxicillin) bzw. 7 (Penicillin G) Leerwertproben untersucht, insgesamt also 40/70 Wiederholungen. Für jede untersuchte Leerwertprobe wurde das LoB und LoD gesondert berechnet und

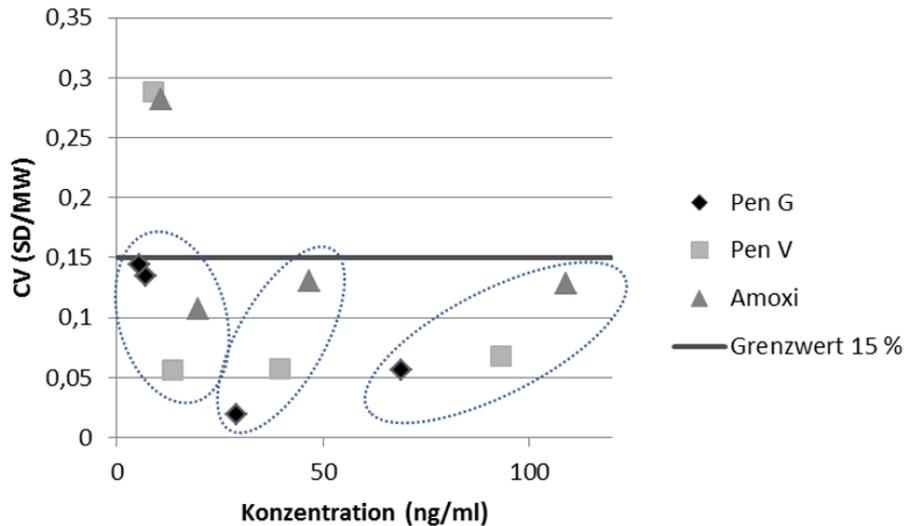


Abbildung 4.4: Inter-Assay-Variabilität im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISA. Die drei Konzentrationsbereiche sind durch Kreise gekennzeichnet. Bei den ersten Messungen im unteren Konzentrationsbereich lag die Variabilität von Penicillin V und Amoxicillin mit 29 bzw. 28 % CV deutlich oberhalb der definierten Grenzwerte. Bei den Wiederholungsmessungen mit erhöhter Testkonzentration lagen alle untersuchten Proben innerhalb der vorab definierten Grenze von 15 %. Zu beachten ist die für Amoxicillin generell erhöhte Variabilität im Vergleich mit den anderen getesteten Penicillinen, welche unabhängig von der Testkonzentration bei 10 – 13 % lag.

	oberer Messbereich		mittlerer Messbereich		unterer Messbereich	
	Konzentration (ng/ml)	CV (%)	Konzentration (ng/ml)	CV (%)	Konzentration (ng/ml)	CV (%)
Pen G	68,8	5,64	29	1,96	7	13,44
					5,5	14,46
Pen V	93	6,84	39,7	5,76	9	28,83
					13,5	5,58
Amoxi	109	12,82	46,6	13,05	10,8	28,14
					19,5	10,68

Tabelle 4.6: Gemessene Konzentrationen und Variabilitäten im oberen, mittleren und unteren Arbeitsbereich des ELISA. Die Konzentration ergibt sich jeweils als Mittelwert aus den 5 durchgeführten Messungen einer jeden Probe. Unterschiede zwischen der ursprünglich dotierten und der im Test gemessenen Konzentration im niedrigen Konzentrationsbereich ergeben sich aus der Wiederfindungsrate, welche in niedrigen Konzentrationen > 100 % liegt. Dies gilt vor allem für Amoxicillin. Hier wurde bei einer Dotierung auf 13 ng/ml eine Konzentration von 19,5 ng/ml gemessen.

bei Untersuchung mehrerer Proben (Plasma 10 %) anschließend die endgültige Leerwert- und Nachweisgrenze als Mittelwert aus diesen Ergebnissen bestimmt.

Die errechneten Leerwert- und Nachweisgrenzen sind in Tab. 4.7 dargestellt. Für die Validierung des Testsystems entscheidend sind dabei vor allem diejenigen Werte, die bei der Messung von 10 % Plasma ermittelt wurden. Dies ist die minimale Verdünnungsstufe, die bei der praktischen Anwendung des ELISAs zur Analyse der Blutproben verwendet wurde. Vergleicht man die Werte der drei Penicilline, so zeigt Penicillin G mit einem LoD von 3,8 ng/ml die höchste Sensitivität, gefolgt von Penicillin V mit 7 ng/ml und Amoxicillin mit 8,7 ng/ml. Zu beachten sind außerdem die, insbesondere im Falle von Amoxicillin, auftretenden Variationen der berechneten LoB- und LoD-Werte für die einzelnen untersuchten Proben. Diese werden durch die Standardabweichung ausgedrückt. Betrachtet man jeweils nur die maximale berechnete Nachweisgrenze, liegt diese für Penicillin G bei 5,6 ng/ml, für Penicillin V bei 7,6 ng/ml und für Amoxicillin bei 11,4 ng/ml. Die maximal berechnete Leerwertgrenze liegt für Penicillin G bei 4,2 ng/ml, für Penicillin V bei 5,6 ng/ml und bei Amoxicillin bei 8,6 ng/ml.

Bei einem Vergleich der drei untersuchten Matrices zeigt sich erwartungsgemäß ein Anstieg der Leerwert- und Nachweisgrenzen mit zunehmendem Plasmagehalt der Probe. Dieser Matrixeffekt begründet sich vor allem in einem erhöhten Hintergrund bei der Messung von Proben mit hohem Plasmagehalt, während die Variabilitäten, d. h. die ermittelten Standardabweichungen der einzelnen Wiederholungen, keine Unterschiede aufweisen. Ein erhöhter Hintergrund beruht dabei oft auf unspezifischen Bindungen zwischen der Probenmatrix und Antikörpern, Reagenzien oder der Oberfläche des Testsystems (RAUCH, 2005). Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt bei Amoxicillin. Vergleicht man die ermittelten Nachweisgrenzen bei der Verwendung von 10- und 100 %igem Plasma, so zeigt sich ein Anstieg von 8,7 ng/ml auf 63,5 ng/ml. Unabhängig von der Variabilität misst der ELISA bei Analyse einer Leerwertprobe hier eine scheinbare mittlere Konzentration von Amoxicillin von 34 ng/ml. Die Verwendung des ELISAs zum Nachweis von Amoxicillin in nicht oder nur wenig verdünnten Plasmaproben ist demnach nicht möglich, da die Nachweisgrenze oberhalb des IC_{50} liegt und bereits einen großen Teil des Arbeitsbereichs ausschließt (Arbeitsbereich: 25 – 100 ng/ml). Bei Penicillin

G und Penicillin V kommt es durch Verwendung von unverdünntem Plasma jeweils zu einem Anstieg der Nachweisgrenze um ca. 3 ng/ml.

	Penicillin G		Penicillin V		Amoxicillin	
	LoB	LoD	LoB	LoD	LoB	LoD
PBS	2,14	3,47	1,75	2,74	1,08	1,82
Plasma 100%	5,36	6,55	9,02	10,70	45,79	63,51
Plasma 10%	2,98 ± 0,91	3,79 ± 1,09	5,07 ± 0,38	7,02 ± 0,61	6,69 ± 2,12	8,74 ± 2,67

Tabelle 4.7: Berechnete Leerwert-(LoB) und Nachweisgrenzen (LoD) der drei Penicilline. Bestimmt wurden jeweils das LoB und LoD in PBS, 100 % Plasma und 10 % Plasma. Die Berechnungen für PBS und 100 % Plasma beruhen jeweils auf der Analyse einer einzelnen Probe in 10 Wiederholungen. Für 10 % Plasma ist der errechnete Mittelwert aus der Messung von 7 (Penicillin G) bzw. 4 (Penicillin V, Amoxicillin) Proben sowie die zugehörige Standardabweichung angegeben. Alle Angaben in ng/ml.

4.1.5 Bestimmungsgrenze (LoQ) und Arbeitsbereich

Zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze wurden im Vorfeld der Validierungstests folgende Zielvorgaben festgelegt: Linearität, 90 – 110 %; Wiederfindungsrate, 80 – 120 %; Intra- und Inter-Assay-Variabilität, < 15 % CV.

Es ergab sich für Penicillin G ein LoQ von 5,5 ng/ml, für Penicillin V von 13,5 ng/ml und für Amoxicillin von 25 ng/ml. Begrenzender Faktor war im Fall der beiden erstgenannten Penicilline die Inter-Assay-Variabilität, wobei für Penicillin V die Variabilität in diesem Konzentrationsbereich mit 5,6 % noch sehr niedrig liegt. Hier wurde aber keine geringere Konzentration getestet, da die erreichte Bestimmungsgrenze als ausreichend niedrig angesehen wurde. Die Bestimmungsgrenze von Amoxicillin wird dagegen von der Wiederfindungsrate begrenzt. Diese steigt bereits ab einer Konzentration von 25 ng/ml auf Werte oberhalb des definierten Rahmens an. Ursache ist ein im Vergleich zu den anderen Penicillinen stärker ausgeprägter Hintergrundeffekt, welcher mit abnehmender Penicillinkonzentration in den Proben eine immer stärkere Rolle spielt. Da diese Überschätzung der tatsächlich vorhandenen Penicillinkonzentrationen bei jeder Messung der Proben auftritt, lagen die Intra- und Inter-Assay-Variabilität von

Amoxicillin auch unterhalb der Bestimmungsgrenze noch innerhalb eines CV von 15 %.

Die hier gefundenen Unterschiede bezüglich der Bestimmungsgrenzen der drei Penicilline spiegeln sich auch in der Linearität des ELISA wieder. Eine Linearität zwischen 90 – 110 % wurde für Penicillin G bis zu einer Konzentration von 4 ng/ml und für Penicillin V bis zu 10 ng/ml erreicht. Unterhalb dieser Konzentrationen stieg die Variabilität der Messungen an, sodass die Linearitätswerte in einem größeren Bereich von ca. 80 – 150 % schwankten. Für Amoxicillin kam es bereits ab einer Konzentration von 19 ng/ml zu abweichenden Werten, welche sowohl durch eine erhöhte Variabilität als auch durch eine tendenzielle Überschätzung der Penicillinkonzentrationen geprägt waren.

Ausgehend von der Bestimmungsgrenze wurden für den ELISA folgende Arbeitsbereiche festgelegt:

Penicillin G	=	5,5 – 100 ng/ml
Penicillin V	=	13,5 – 100 ng/ml
Amoxicillin	=	25 – 100 ng/ml

Hinsichtlich der Linearität und Wiederfindungsrate wurden zum Teil noch oberhalb von 100 ng/ml Werte innerhalb der Zielvorgaben erreicht. Da die Untersuchungen zur Intra- und Inter-Assay-Variabilität aber nur bis zu einer maximalen Konzentration von 100 ng/ml durchgeführt wurden, wurde dies als Obergrenze des Arbeitsbereichs definiert.

4.2 Lagerungsstabilität

Zur Bestimmung der Lagerungsstabilität der Penicilline in PBS wurden die bei der Analyse des internen Standards gewonnenen Daten genutzt. Über einen Zeitraum von 8 Monaten zeigten sich keine über die natürliche Variabilität des ELISA hinausgehenden Veränderungen der in den Verdünnungen enthaltenen Penicillinkonzentrationen. Dies ist in Tab. 4.8 am Beispiel von Penicillin G dargestellt.

Auch bei der wiederholten Analyse von Blutplasmaproben über einen Zeitraum von 3 – 4 Monaten zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der enthaltenen Penicillinkonzentrationen (Tab. 4.9). Dies wurde durch eine wiederholte Analyse von einzelnen Blutproben bestätigt, welche stichprobenartig zur Kontrolle durchgeführt wurde.

Tag	Konzentration (ng/ml)	Tag	Konzentration (ng/ml)
1	51,945	23	49,463
4	47,004	24	46,641
7	42,855	28	49,405
8	40,894	29	44,821
9	45,599	37	47,384
14	42,995	65	47,001
15	49,798	126	49,523
16	39,329	133	41,096
20	43,232	176	40,81
21	46,323	210	50,838

Tabelle 4.8: Bestimmung der Konzentration des internen Standards von Penicillin G über den Verlauf mehrerer Monate. Mittelwert: 45,85 ng/ml. Variabilität: CV = 8,11 %

Amoxicillin		Penicillin G		Penicillin V	
Tag	Konzentration (ng/ml)	Tag	Konzentration (ng/ml)	Tag	Konzentration (ng/ml)
1	26,877	1	44,621	1	33,602
68	26,35	27	46,771	26	34,555
107	25,084	64	44,634	55	37,598
112	28,725	125	48,074	120	42,15

Tabelle 4.9: Penicillinkonzentrationen bei wiederholter Analyse von Blutplasmaproben über einen Zeitraum von 3 – 4 Monaten. Variabilität (CV): Amoxicillin = 5,65 %, Pen G = 3,7 %, Pen V = 10,4 %

4.3 Plasmaproteinbindung

Die Plasmaproteinbindung der Penicilline wurde mittels Ultrafiltrationsverfahren bestimmt. Für Amoxicillin wurde keine unspezifische Bindung an die Filtermembranen festgestellt. Das dotierte Plasma konnte so ohne weitere Vorbehandlung aufgetragen werden. Die berechnete Plasmaproteinbindung betrug 14,91 % bei einer Plasmakonzentration von 6 µg/ml.

Für Penicillin G und Penicillin V wurde in jeweils zwei Vorversuchen mit dotiertem PBS-Puffer eine unspezifische Bindung in Höhe von 11 – 27 % bzw. 47 – 49 % an die Filtermembran festgestellt. Für die Untersuchungen an Blutplasma wurden die Membranen daher vorab mit Tween® 80 abgesättigt. Hierdurch wurde die unspezifische Bindung auf 0 bzw. 8,67 % reduziert. Die im folgenden Versuch mit Blutplasma ermittelte Plasmaproteinbindung betrug 83,85 % für Penicillin G und 79,63 % für Penicillin V.

4.4 Pharmakokinetische Untersuchungen

Es wurde eine Reihe von pharmakokinetischen Parametern nach oraler sowie i.v. Verabreichung von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin an Puten bestimmt. Pro Penicillin wurde der Versuch dabei jeweils an einer Gruppe von 6 Tieren + 1 Ersatztier durchgeführt. Verschiedene Faktoren konnten nachträglich zu einem Ausschluss einzelner Tiere aus der Datenauswertung führen. Hierzu zählten sowohl Ereignisse im praktischen Versuchsteil wie Probleme bei der Dosierung oder Applikation der Medikamente (z. B. Regurgitieren, paravenöse Injektion) als auch Fälle, bei denen die Messwerte einzelner Blutproben aus unbekanntem Ursachen stark abwichen. Im Fall von Penicillin G wurde ein Tier (Tier Nr. 5) für den i.v. Versuchsteil ausgeschlossen, für Penicillin V zwei Tiere im i.v. Teil (Tiere Nr. 6 + 7) und für Amoxicillin ein Einzeltier aus beiden Versuchsteilen (Tier Nr. 6). Die für den oralen Versuchsteil gewonnenen Daten von aus dem i.v. Versuchsteil ausgeschlossenen Tieren wurden zusätzlich zu den Daten des Ersatztieres in die Auswertung miteinbezogen. Eine Beurteilung der Bioverfügbarkeit ist für diese

Tiere jedoch nicht möglich. Somit ergeben sich auswertbare Gruppengrößen von 6/7 Tiere für Penicillin G, 5/7 Tiere für Penicillin V und 6/6 Tiere für Amoxicillin.

Bei der Beurteilung der Daten ist weiterhin zu beachten, dass sich die pro kg KM eingegebenen Wirkstoffmengen für jedes Penicillin entsprechend der Zulassungsbedingungen unterschieden. Penicillin G wurde in einer Dosierung von 16.000 IE/kg KM (= 9 mg/kg KM), Penicillin V von 20 mg/kg KM und Amoxicillin von 17,4 mg/kg KM eingesetzt.

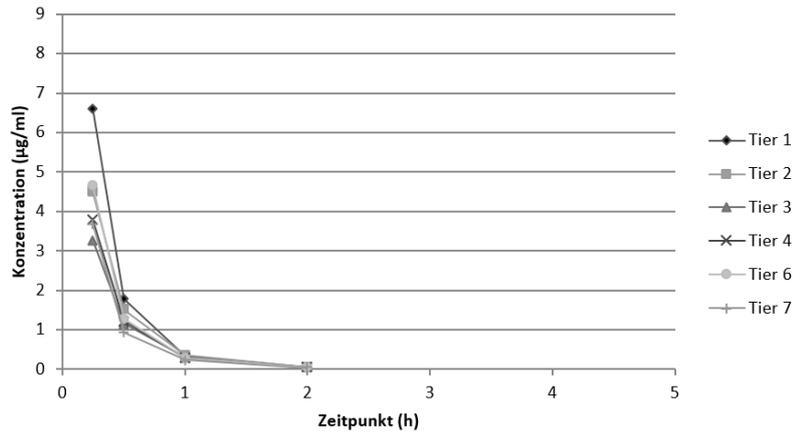
4.4.1 Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven nach intravenöser Eingabe

Jedes Tier wurde gesondert ausgewertet. Zur Erstellung der individuellen Blutplasmakurven wurde der Zeitpunkt der Blutentnahme (Applikation des Medikamentes = Zeitpunkt 0) gegen die Penicillinkonzentration aufgetragen, um so den zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentration zu beschreiben. In Abb. 4.5 sind die erstellten Blutplasmakurven der einzelnen Tiere für Penicillin G (a), Penicillin V (b) und Amoxicillin (c) zusammenfassend dargestellt. Zum letzten aufgetragenen Zeitpunkt (4 h) lagen die gemessenen Konzentrationen für Penicillin V und Amoxicillin in den meisten Fällen bereits unterhalb der Leerwertgrenze. Es konnten also keine Penicilline mehr nachgewiesen werden. Die Plasmakonzentrationen von Penicillin G waren schon zum Zeitpunkt 2 h unter den Bereich der Bestimmungsgrenze (55 ng/ml) abgefallen. Der Zeitpunkt 4 h ist hier nicht mehr dargestellt. Alle Kurven zeigen den nach i.v. Applikation von Medikamenten typischen Verlauf, mit einem steileren Abfall der Kurve im vorderen Bereich, welcher der Verteilungsphase des Stoffes entspricht und einem Abflachen der Kurve im hinteren Bereich. In dieser Phase ist die Umverteilung des Stoffes abgeschlossen und die Abnahme der Plasmakonzentration entspricht der Elimination aus dem Körper. Die beobachteten Steigungsunterschiede bleiben auch nach dem Logarithmieren der Kurven bestehen, sind also nicht allein Folge des exponentiellen Kurvenverlaufs, sondern durch die pharmakokinetischen Prozesse bedingt.

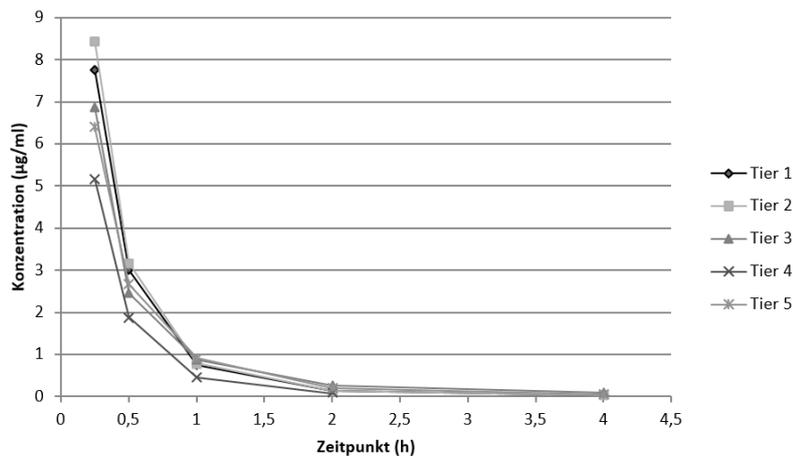
Alle Penicilline wurden nach i.v. Injektion schnell aus dem Organismus eliminiert. So konnte für Penicillin G schon nach 2 h, für Penicillin V und Amoxicillin nach 4 h nur noch ein geringer oder gar kein Wirkstoffspiegel mehr im Blut gemessen werden. Betrachtet man die Konzentrationen am ersten Messzeitpunkt (15 min) ist bei allen Penicillinen eine deutliche Variabilität sichtbar, die über der zu erwartenden analysebedingten Schwankungsbreite liegt. Für Penicillin G lagen die Konzentrationen zwischen 3,3 und 6,6 µg/ml, für Penicillin V zwischen 5,2 und 8,4 µg/ml und für Amoxicillin zwischen 15,5 und 22,7 µg/ml. Trotz direkter Verabreichung der Wirkstoffe in die Vene mithilfe eines Venenverweilkatheters zeigen sich hier deutliche individuelle Unterschiede, welche bereits in der primären Verteilungsphase, also schon vor der ersten Messung der Plasmakonzentrationen auftreten. Vergleicht man die erreichten Plasmakonzentrationen der Penicilline unter Berücksichtigung der jeweils verabreichten Dosis, so wurden für Amoxicillin die höchsten maximalen Wirkstoffkonzentrationen gemessen. Die maximalen Plasmaspiegel der beiden anderen Penicilline lagen deutlich niedriger. Dies war für Penicillin G, das in der geringsten Dosierung verabreicht wurde, zu erwarten gewesen. Allerdings zeigt auch Penicillin V, das in einer Dosis von 20 mg/kg KM verabreicht wurde, zum Zeitpunkt der maximalen Konzentration (15 min) einen im Vergleich zu Amoxicillin um mehr als die Hälfte niedrigeren Plasmaspiegel. Für Penicillin V müssen daher schon vor dem Zeitpunkt der ersten Blutentnahme umfangreiche Verteilungs- oder Eliminationsvorgänge stattfinden.

4.4.2 Verlauf der Konzentrations-Zeit-Kurven nach oraler Eingabe

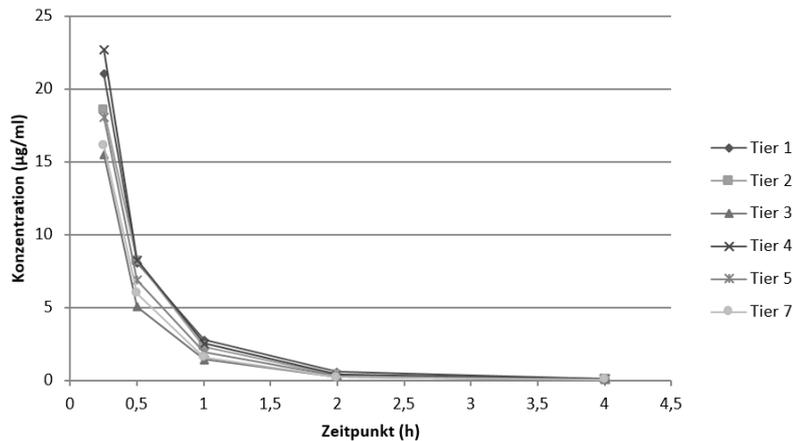
Zur Bestimmung der Blutplasmakonzentrationen nach oraler Applikation wurden die Penicillinlösungen mit einer Knopfsonde direkt in den Kropf eingegeben. Außerdem wurden die Puten in den auf die Eingabe folgenden 15 min weiter beobachtet, um ein eventuelles Regurgitieren der verabreichten Medikamente zu registrieren. Schwankungen der von jedem Tier erhaltenen Dosis der Penicilline wurden so verhindert. Trotzdem zeigten die erstellten Blutplasmakurven eine starke individuelle Variabilität. Hierbei entsprachen die nach oraler Eingabe von Amoxicillin gewonnenen Kurven am ehesten einer typischen Bateman-Kurve für eine



(a) Penicillin G (9mg/kg KM)



(b) Penicillin V (20 mg/kg KM)



(c) Amoxicillin (17,4 mg/kg KM)

Abbildung 4.5: Verlauf der Blutplasmakonzentrationen nach intravenöser Eingabe. Zum Zeitpunkt 4 h lagen die Konzentrationen für Penicillin V und Amoxicillin unterhalb der Nachweisgrenze. Für Penicillin G waren die Konzentrationen schon nach 2 h unter die Bestimmungsgrenze abgefallen. Zum Zeitpunkt 4 h wurde deshalb keine Analyse mehr durchgeführt. Die den Kurven zugrunde liegenden Messdaten finden sich in Anhang III.

Invasions- und Eliminationskinetik 1. Ordnung. Einem Anstieg der Konzentrationen direkt nach der Applikation, welcher der Resorption der Stoffe entspricht, folgt eine Abnahme der Konzentrationen aufgrund von Verteilungs- und Eliminationsvorgängen (Abb. 4.6c). Die erreichten maximalen Plasmaspiegel zeigten trotz des relativ homogenen Kurvenverlaufs starke Unterschiede. Die maximal bestimmten Konzentrationen von Amoxicillin lagen zwischen 1,6 (Tier Nr. 2) und 6,7 (Tier Nr. 1) $\mu\text{g/ml}$.

Betrachtet man die Kurven von Tier Nr. 1 und 3, welche die höchsten maximalen Plasmakonzentrationen (C_{max}) aufwiesen, zeigen diese im Vergleich zu den anderen Tieren sowohl eine schnellere Zu- als auch Abnahme der Wirkstoffkonzentrationen ($t_{\text{max}} = 30 \text{ min}$). Bei den übrigen Tieren wurde die maximale Konzentration erst zu einem späteren Zeitpunkt ($t_{\text{max}} = 1 \text{ h}$) erreicht. Im weiteren Verlauf zeigten diese Tiere allerdings auch ein langsames Absinken der Wirkstoffkonzentrationen, sodass ihre Blutspiegel nach 2 h höher als bei den Tieren Nr. 1 und 3 waren.

Die für Penicillin G und Penicillin V erstellten Kurven zeigten einen individuell stark variierenden Verlauf (Abb. 4.6a/b). Während einige Kurven bereits zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme (15 min) ihre maximale Plasmakonzentration erreicht hatten und in der Folge fallende Konzentrationen aufwiesen (z.B. Penicillin V, Tier Nr. 2/4), stiegen in anderen Fällen die Konzentrationen zunächst an (z. B. Penicillin G, Tier Nr. 2/6) oder schwankten über mehrere Messzeitpunkte (z. B. Penicillin G, Tier Nr. 5/7). Bei diesen Penicillinen tritt im Vergleich zu Amoxicillin eine verzögerte Resorption auf, die Resorptionsvorgänge finden also über einen längeren Zeitraum hinweg statt. In der Folge kommt es zu einer Überlagerung der stattfindenden Resorptions- Verteilungs- und Eliminationsprozesse, die nicht mehr getrennt betrachtet werden können.

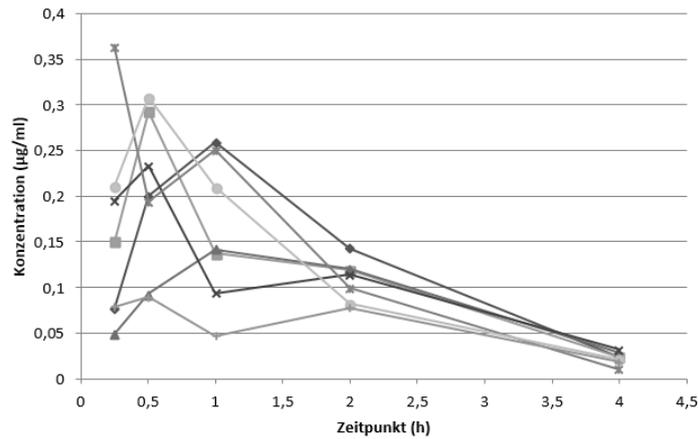
Alle Penicilline zeigten nach oraler Eingabe im Vergleich zur i.v. Injektion außerdem eine verlängerte Gesamthalbwertszeit (Verteilung und Elimination nicht getrennt betrachtet). Während nach i.v. Eingabe bei Penicillin G und Penicillin V nach 2 bzw. 4 h nur noch minimale Mengen oder gar kein Penicillin mehr nachgewiesen werden konnte, lagen nach oraler Eingabe die Konzentrationen noch in einem Bereich von 78 – 143 ng/ml bzw. 87 – 196 ng/ml. Nach 4 bzw. 8 h waren dann keine Penicilline mehr nachweisbar. Auch im Fall von Amoxicillin waren die nach oraler Applikation

gemessenen Werte zum Zeitpunkt 4 h im Vergleich zur i.v. Eingabe in drei Fällen auf 172 – 179 ng/ml erhöht. Im Verhältnis zu den zum Zeitpunkt 2 h gemessenen Werten von 930 – 1.470 ng/ml fiel hier die Plasmakurve allerdings bereits deutlich ab. Ein Abfall der Plasmakonzentrationen unter die Leerwertgrenze (max. LoB Amoxicillin = 8,6 ng/ml) ist bei gleichbleibender Eliminationsgeschwindigkeit innerhalb von ca. 45 min zu erwarten. Bei den drei übrigen Tieren lagen die Konzentrationen zum Zeitpunkt 4 h bereits unterhalb der Nachweisgrenze. Darunter waren zwei Tiere (Tier Nr. 1 und 3), welche die maximale Plasmakonzentration bereits zu einem frühen Zeitpunkt ($t_{\max} = 30$ min) erreichten. Für diese beiden Tiere war die errechnete Eliminationshalbwertszeit im Vergleich zur intravenösen Applikation nicht erhöht.

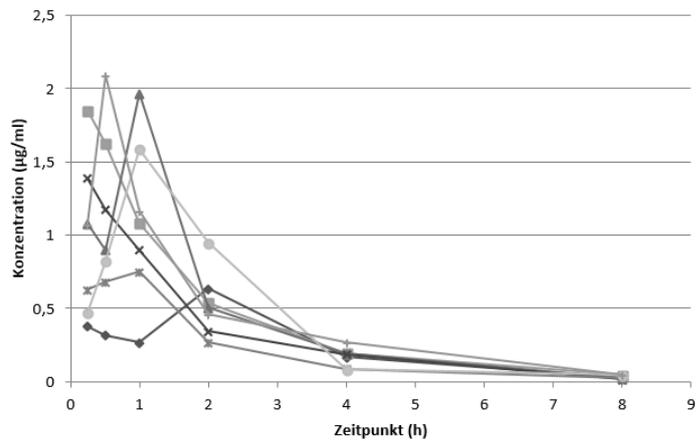
Vergleicht man die Plasmakurven der drei Penicilline, muss außerdem die unterschiedliche Skalierung der Ordinatenachse beachtet werden. Sie ist an das jeweilige Konzentrationsniveau angepasst, in dem sich die gemessenen Blutspiegel bewegen. So lagen die maximal gemessenen Konzentrationen für Amoxicillin wie oben bereits beschrieben bei 1,6 – 6,7 µg/ml, für Penicillin V bei 0,6 – 2 µg/ml und für Penicillin G bei 0,09 – 0,36 µg/ml. Eine abweichende Skalierung zeigt auch die Abszisse der für Penicillin V aufgetragenen Plasmakurve. Hier wurde eine Analyse der Plasmaproben bis zum Zeitpunkt 8 h durchgeführt.

4.4.3 Berechnung ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach intravenöser Eingabe

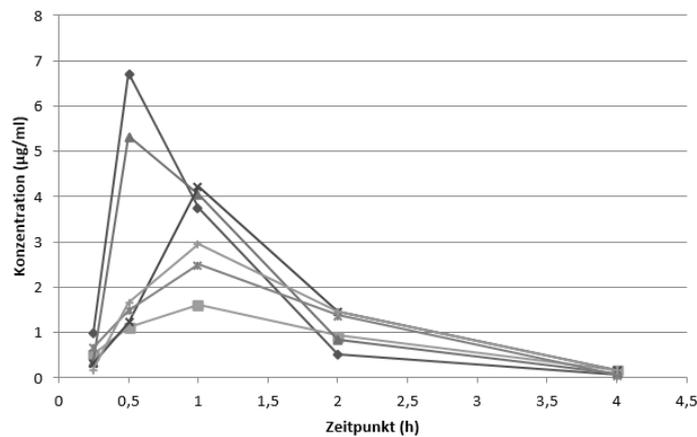
Für jedes Tier wurden zunächst die pharmakokinetischen Parameter anhand der individuellen Blutplasmakurven berechnet. Die erhaltenen Daten wurden dann für jede Gruppe zusammengefasst und jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Nachfolgend wird eine Auswahl der wichtigsten pharmakokinetischen Daten vorgestellt. Eine vollständige Übersicht aller für die Einzeltiere berechneten Parameter findet sich in Anhang V (i.v.) und VI (oral).



(a) Penicillin G (9mg/kg KM)



(b) Penicillin V (20 mg/kg KM)



(c) Amoxicillin (17,4 mg/kg KM)

Abbildung 4.6: Verlauf der Blutplasmakonzentrationen nach oraler Eingabe. Zum Zeitpunkt 4 bzw. 8 h lagen die Konzentrationen für Penicillin G und V bereits unterhalb des LoB. Für Amoxicillin wurden nach 4 h noch Konzentrationen bis zu 0,179 µg/ml nachgewiesen. Da diese bereits unter der Bestimmungsgrenze liegen, wurde für den Zeitpunkt 8 h keine Analyse mehr durchgeführt. Die den Kurven zugrunde liegenden Messdaten finden sich in Anhang IV.

Nach i.v. Eingabe wurden die Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeit, die initiale Wirkstoffkonzentration, die AUC (*area under the curve*), das Verteilungsvolumen und die Clearance berechnet.

Eine Übersicht über die wichtigsten pharmakokinetischen Parameter findet sich in Tab. 4.10. Alle Penicilline weisen eine schnelle Verteilung und Elimination, mit einer Verteilungshalbwertszeit (*D half-life*) von 5,8 (Penicillin G), 6,1 (Amoxicillin) und 7,1 min (Penicillin V) auf. Die Eliminationshalbwertszeit (*E half-life*) betrug für Penicillin G 22,4 min, für Amoxicillin 23,1 min und für Penicillin V 25,3 min. Dies führte zu einem schnellen Abfall der im Blutplasma gemessenen Penicillinkonzentrationen zwischen dem Zeitpunkt 15 min und der letzten nachweisbaren Konzentration bei 2 h. Im Fall von Penicillin G fielen die Werte von im Durchschnitt 4,4 µg/ml auf 0,048 µg/ml, bei Amoxicillin von 18,7 µg/ml auf 0,35 µg/ml und bei Penicillin V von 6,9 µg/ml auf 0,142 µg/ml. Dabei zeigte ein Tier in der Penicillin V-Gruppe aus unbekannter Ursache eine verlängerte Eliminationshalbwertszeit und wurde von der Berechnung des Mittelwertes ausgeschlossen. Die für dieses Tier gewonnenen Daten sind in Tab. 4.10 gesondert dargestellt. Während die verlängerte Eliminationshalbwertszeit schon rein mathematisch mit einer ebenso starken Abweichung des Verteilungsvolumens einhergeht, stimmen die restlichen Werte mit denen der übrigen der Gruppe gut überein.

Die initiale Wirkstoffkonzentration (*C initial*), also die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt 0, wird anhand des Kurvenverlaufs extrapoliert. Hierbei zeigte Amoxicillin den höchsten Wert mit 72,2 µg/ml. Für Penicillin G und Penicillin V lagen die Werte in einem ähnlichen Bereich, in Höhe von 21,7 (Pen G) bzw. 22,9 (Pen V) µg/ml. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass Penicillin V in einer mehr als doppelt so hohen Dosis verabreicht wurde. Hier bestätigen sich die schon bei der Betrachtung der Blutplasmakurven gemachten Beobachtungen einer stärkeren Verteilung bzw. Elimination von Penicillin V direkt nach der Applikation.

Ein ähnliches Bild ergibt sich auch bei der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve (AUC). Sie entspricht der Gesamtmenge des ins Blut gelangten Wirkstoffes (EICHELBAUM und SCHWAB, 2013a). Dieser Parameter wird zur Bestimmung der Bioverfügbarkeit eines Stoffes benötigt. Er ist auch für den Vergleich verschiedener Substanzen, insbesondere nach oraler Eingabe, von Bedeutung, da hier der Verlauf

der Blutplasmakurven sehr variabel sein kann. Bestimmt wird die AUC_{∞} , welche die Fläche unter der Kurve vom Zeitpunkt 0 bis zur Unendlichkeit darstellt. Neben der Flächenberechnung unter der tatsächlich gemessenen Kurve werden hier die Daten für den Bereich 0 bis 0,25 h sowie vom Zeitpunkt 2 h bis zu vollständigen Elimination extrapoliert. Auch bei diesem Parameter werden die höchsten Werte mit 18,5 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$ bei Amoxicillin erreicht. Für Penicillin V ergibt sich eine AUC_{∞} von 6,4 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$, für Penicillin G von 4,58 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$.

Deutliche Unterschiede zwischen den Penicillinen zeigen sich auch beim scheinbaren Verteilungsvolumen (V_d/kg), welches das Verhältnis zwischen der sich im Körper befindlichen Menge des Stoffes (Dosis \times Bioverfügbarkeit) und der im Blut gemessenen Konzentration ($AUC_{\infty} \times$ Eliminationsrate) beschreibt FICHTL (2001a). Den niedrigsten Wert zeigt hier Amoxicillin mit 534 ml/kg, was in etwa dem gesamten Körperwasserraum entspricht. Da die Penicilline Zellmembranen nicht penetrieren können, findet eine Verteilung allerdings nur in den extrazellulären Flüssigkeitsraum statt, welcher beim Geflügel ein Volumen von ca. 0,260 ml/kg aufweist (DORRESTEIN et al., 1984). Im Gegensatz zum Menschen (scheinbares Verteilungsvolumen = 0,2 ml/kg; (FICHTL, 2001b)), findet bei der Pute für Amoxicillin vermutlich zusätzlich zur extrazellulären Verteilung im Körperwasser eine Bindung an Gewebeproteine statt. Diese ist allerdings ungleich geringer ausgeprägt als bei Penicillin G und Penicillin V. Für diese liegt das scheinbare Verteilungsvolumen mit 1.108 (Penicillin G) bzw. 1.967 ml/kg (Penicillin V) deutlich höher. Besonders ausgeprägt ist dieser Effekt für Penicillin V. Hier ist das Verteilungsvolumen im Vergleich zu Penicillin G fast doppelt so groß. Außerdem zeigten sich bei diesem Parameter große individuelle Unterschiede zwischen den Tieren, die sich in einer hohen Standardabweichung äußern.

Die Clearance (CL/kg) beschreibt die Effektivität, mit der ein Stoff aus dem Körper eliminiert wird. Je höher die Clearance, desto schneller kann eine Substanz aus dem Körper ausgeschieden oder metabolisiert werden. Von den untersuchten Penicillinen weist Amoxicillin mit 966 ml/h/kg die niedrigste Clearance auf, es folgen Penicillin G mit 2.064 ml/h/kg und Penicillin V mit 3.237 ml/h/kg. Wie schon beim Verteilungsvolumen sind hier große tierindividuelle Variationen feststellbar. Trotz dieser unterschiedlichen Effizienz bei der Elimination lagen die Eliminationshalbwertszeiten der verschiedenen Penicilline in einem ähnlichen

Bereich von 22 – 25 min. Dies ist in ihren unterschiedlich großen Verteilungsvolumina begründet, welche die Elimination der Stoffe in unterschiedlichem Maße verzögern.

		Penicillin G	Amoxicillin	Penicillin V	Penicillin V Tier 3
E Half-life	h	0,374 ± 0,028	0,385 ± 0,028	0,421 ± 0,030	0,981
D Half-life	h	0,097 ± 0,012	0,103 ± 0,012	0,118 ± 0,006	0,126
C initial (iv)	µg/ml	21,661 ± 6,957	72,167 ± 17,215	22,943 ± 4,495	23,764
AUC _∞ (area)	µg/h/ml	4,583 ± 1,173	18,535 ± 3,480	6,402 ± 1,295	6,902
Vd (area) / kg	ml/kg	1.107,888 ± 262,638	534,051 ± 76,157	1.966,938 ± 457,210	4.101,326
CL (area) / kg	ml/h/kg	2.063,521 ± 500,045	966,045 ± 164,588	3.237,133 ± 751,731	2.897,503

Tabelle 4.10: Mittelwert und Standardabweichung von ausgesuchten pharmakokinetischen Parametern nach intravenöser Eingabe. Verabreichte Dosis: Penicillin G 9 mg/kg KM, Amoxicillin 17,4 mg/kg KM, Penicillin V 20 mg/kg KM. Die Berechnung des Mittelwertes wurde für Penicillin G und Amoxicillin aus den Daten von jeweils 6 Tieren vorgenommen. Für Penicillin V konnten nur 4 Tiere zur Berechnung des Mittelwertes verwendet werden. Tier Nr. 3 ist separat dargestellt. *E Half-life* und *D Half-life* sind die Eliminations- und Verteilungshalbwertszeit, *C initial (iv)* ist die berechnete maximale Konzentration nach intravenöser Injektion, *AUC_∞ (area)* ist die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 bis unendlich, *Vd (area)/kg* ist das scheinbare Verteilungsvolumen berechnet anhand der AUC bezogen auf das Körpergewicht, *CL (area)/kg* ist die systemische Clearance der Substanz berechnet anhand der AUC bezogen auf das Körpergewicht.

4.4.4 Berechnung ausgewählter pharmakokinetischer Parameter nach oraler Eingabe

Wichtige pharmakokinetische Parameter, die nach einer oralen Eingabe berechnet werden können, sind die Bioverfügbarkeit, die Resorptions- und Eliminationshalbwertszeit, der Verzögerungseffekt bis zum ersten Auftreten der Substanzen im Blut (*lag time*), die maximale Plasmakonzentration, der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration sowie die AUC (Tab. 4.11). Die Bestimmung der Verteilungshalbwertszeit ist nach oraler Applikation dagegen nur möglich, wenn die Geschwindigkeit der Resorption die der Verteilung deutlich übersteigt.

Die Resorptionshalbwertszeit (*A Half-life*) konnte in diesem Fall nur für Amoxicillin bestimmt werden, da der Kurvenverlauf der übrigen beiden Penicilline keine Einteilung in Resorptions- und Verteilungs-/Eliminationsphase erlaubte. Die errechnete Halbwertszeit der Resorption betrug dabei 15,2 min, wobei eine hohe interindividuelle Variabilität vorlag. Wie schon bei der Betrachtung der Plasmakurven deutlich wurde, zeigten die Tiere Nr. 1 und 3 eine sehr viel schnellere Resorption. Bei einer Halbwertszeit von 6,8 und 8,1 min erreichten sie schon nach 30 min ihre maximale Plasmakonzentration (T_{\max}), während die restlichen Tiere erst nach 1 Stunde maximale Blutspiegel aufwiesen. Bei allen Tieren lag eine Verzögerung vom Zeitpunkt der Eingabe der Stoffe bis zu ihrem ersten Nachweis im Blut vor, welche durch die *lag time* ausgedrückt wird. Sie betrug im Mittel 13,9 min. Hierbei handelt es sich um einen hybriden Parameter, welcher unter anderem durch den notwendigen Transport eines Stoffes vom Eingabe- zum Resorptionsort (Dünndarm), die Freisetzung des Wirkstoffes aus der Arzneiform, die molekulare Migration der Stoffe an die Resorptionsoberfläche sowie die Geschwindigkeit des Transfers durch die Enterozyten bestimmt wird (NERELLA et al., 1993).

Die Eliminationshalbwertszeit lag für alle Penicilline nach oraler Verabreichung deutlich über den Werten, die nach i.v. Eingabe ermittelt wurden. Dies ist durch die verzögerte Aufnahme der Substanzen in den Körper bedingt, wodurch es zu einer Überlagerung der Eliminationsphase mit der gleichzeitig bestehenden Resorption kommt. Dieser Effekt war für Penicillin G und Penicillin V besonders stark ausgeprägt. Der sehr variable Kurvenverlauf erschwerte hier zusätzlich

eine klare Phaseneinteilung. Im Fall von Penicillin G war bei einem Großteil der Tiere zum Zeitpunkt der letzten nachweisbaren Plasmakonzentration (2 h) noch kein klarer Abwärtstrend der Kurve erkennbar. In zwei Fällen stiegen die Konzentrationen zwischen 1 und 2 h sogar noch einmal an. Aus diesem Grund musste der Zeitpunkt 4 h, zu dem keine Penicilline mehr nachweisbar waren, als Nullpunkt für die Berechnung angenommen werden. Dadurch könnte eine zusätzliche Überschätzung der Eliminationshalbwertszeit entstehen. Auch für Penicillin V war der Abfall der Plasmakonzentrationen bei einigen Tieren bis zum Zeitpunkt 4 h erst schwach ausgeprägt. Bei diesen wurde der Zeitpunkt 8 h als Nullpunkt in die Analyse aufgenommen. Die ermittelten Halbwertszeiten betrugen für Penicillin G 52,5 min und für Penicillin V 70,4 min. Für Amoxicillin fiel die Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit geringer aus. Sie stieg von 23,1 min nach i.v. Injektion auf 33,8 min.

Betrachtet man die AUC_{∞} der drei Penicilline im Vergleich, bestätigen sich die bei Betrachtung der oralen Blutplasmakurven gemachten Beobachtungen. Diese zeigten unabhängig vom Kurvenverlauf starke Unterschiede beim jeweils erreichten Konzentrationsniveau. Die AUC_{∞} für Penicillin G lag im Durchschnitt bei 0,452 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$, diejenige für Penicillin V bei 2,853 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$ und diejenige für Amoxicillin bei 5,512 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$. Diese Unterschiede werden sowohl von den Verteilungsvolumina der Substanzen als auch durch eine unterschiedlich effektive Aufnahme der Stoffe in den Körper nach oraler Verabreichung bestimmt.

Der Anteil einer oral verabreichten Dosis, der insgesamt in den systemischen Blutkreislauf aufgenommen wird, wird durch die Bioverfügbarkeit (*Fraction dose absorbed*, F) angegeben. Die nach intravenöser Injektion erreichte Gesamtmenge entspricht dabei einer Bioverfügbarkeit von 100 %. Der nach oraler Eingabe erreichte Anteil wird durch einen Vergleich der oralen und intravenösen AUC_{∞} errechnet ($F = AUC_{\infty} \text{ oral} / AUC_{\infty} \text{ i.v.}$). Für Penicillin V wurde mit einem Anteil von 41,2 % die höchste Bioverfügbarkeit bestimmt, gefolgt von Amoxicillin mit 30,1 % und Penicillin G mit 10 %. Besonders beim Penicillin V zeigten sich individuelle Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren. Die maximal ermittelte Bioverfügbarkeit betrug 56 % (Tier Nr. 4), die minimale 26 % (Tier Nr. 5). Diese Unterschiede können sowohl durch Abweichungen der oral aufgenommenen Menge als auch durch Variationen der AUC nach intravenöser Eingabe bedingt

sein, da die Bioverfügbarkeit für jedes Einzeltier anhand seiner individuellen i.v. Daten errechnet wurde.

Die maximale Konzentration der Penicilline im Plasma (C_{max}) sowie der Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration (T_{max}) sind Beobachtungswerte, die direkt aus den gemessenen Konzentrationen bzw. den Konzentrations-Zeit-Kurven entnommen werden können. Die maximale beobachtete Plasmakonzentration wird dabei sowohl von der Bioverfügbarkeit als auch der Resorptionsgeschwindigkeit des Stoffes beeinflusst (SCHÄFER, 2002). Sie betrug für Penicillin G 0,241 µg/ml, für Penicillin V 1,486 µg/ml und für Amoxicillin 3,898 µg/ml. Ausgeprägte individuelle Unterschiede waren bei allen Penicillinen zu beobachten. Aufgrund des variablen Kurvenverlaufs wurde die maximale Plasmakonzentration, vor allem bei Penicillin G und V, zu verschiedenen Zeiten erreicht. Für Penicillin G waren dies je nach Tier zwischen 15 und 60 min, bei einem Mittelwert von 37 min und für Penicillin V zwischen 15 und 120 min, bei einem Mittelwert von 51 min. Für Amoxicillin lagen die Werte regelmäßiger verteilt zwischen 30 (2 Tiere) und 60 (4 Tiere) min.

		Penicillin G	Penicillin V	Amoxicillin
Fraction dose absorbed (F)		0,100 ± 0,029	0,412 ± 0,136	0,301 ± 0,067
E Half-life	h	0,875 ± 0,143	1,173 ± 0,317	0,563 ± 0,174
A Half-life	h			0,245 ± 0,114
Lag time	h			0,232 ± 0,031
C_{max} (obs)	µg/ml	0,241 ± 0,096	1,468 ± 0,578	3,898 ± 1,911
T_{max} (obs)	h	0,607 ± 0,283	0,857 ± 0,610	0,833 ± 0,258
AUC_{∞} (area)	µg/h/ml	0,452 ± 0,102	2,853 ± 0,830	5,512 ± 1,183

Tabelle 4.11: Mittelwert und Standardabweichung von ausgesuchten pharmakokinetischen Parametern nach oraler Eingabe. Verabreichte Dosis: Penicillin G 9 mg/kg KM, Amoxicillin 17,4 mg/kg KM, Penicillin V 20 mg/kg KM. In die Auswertung eingegangen: Penicillin G/V jeweils 7, Amoxicillin 6 Tiere. Berechnung der Bioverfügbarkeit (F) nur für Tiere mit ausreichenden intravenösen Daten möglich (Penicillin G = 6, Penicillin V = 5 Tiere). *E Half-life* und *A Half-life* sind die Eliminations- und Resorptionshalbwertszeit, *lag time* ist der Verzögerungseffekt bis zum ersten Erscheinen der Penicilline im Blut, C_{max} (obs) ist die beobachtete maximale Plasmakonzentration, T_{max} (obs) ist die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Plasmakonzentration, AUC_{∞} (area) ist die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve von 0 bis unendlich.

5 Diskussion

Trotz ihres weitverbreiteten Einsatzes bei der Behandlung von infektiösen Erkrankungen der Pute liegen für die Gruppe der Penicilline nur wenige Daten zu ihrem pharmakokinetischen Verhalten im Tier vor. Die Kenntnis dieser Eigenschaften stellt eine Grundvoraussetzung für die Auswahl eines geeigneten Wirkstoffes und die Entwicklung rationaler Dosierungsschemata dar, um im Sinne der Antibiotika-Leitlinien eine größtmögliche therapeutische Effektivität bei einem minimalen Risiko für die Entwicklung antibakterieller Resistenzen zu erzielen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst ein ELISA-Verfahren etabliert, welches eine sensitive und sichere Quantifizierung von den drei bei der Pute häufig eingesetzten Penicillinen - Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin - im Blutplasma von Puten ermöglicht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden dann die grundlegenden pharmakokinetischen Daten für die drei Penicilline nach i.v. und oraler Applikation bestimmt.

5.1 Etablierung eines ELISA-Verfahrens zum Nachweis von Penicillinen im Blutplasma

Ausgangspunkt für das Nachweisverfahren bildete ein am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickeltes ELISA-Protokoll (LITZ, 1995), das für den routinemäßigen Nachweis von Antibiotikarückständen in Milchproben entwickelt wurde. Basis des genutzten, kompetitiven ELISA-Systems sind zwei monoklonale Antikörper, welche ursprünglich gegen Ampicillin gezogen wurden. Diese erkennen und binden verschiedene Penicilline mit unterschiedlicher Affinität (DIETRICH et al., 1998; persönliche Mitteilung). Das ELISA-Protokoll wurde in der vorliegenden Arbeit für die Bestimmung von Penicillinen im Blutplasma adaptiert und für die drei untersuchten Penicilline ausführlich validiert. Hierfür wurden

insbesondere die Spezifität, Linearität, Genauigkeit sowie die Leerwert-, Nachweis- und Bestimmungsgrenzen des Systems bestimmt.

Sämtliche Validierungsschritte wurden mit 1:10 in PBS verdünntem Putenplasma durchgeführt. Für die Erhebung der Leerwert- und Nachweisgrenzen wurden zusätzlich PBS-Puffer und unverdünntes Blutplasma verwendet. Die Verdünnung des Plasmas führte zu einer höheren Genauigkeit des Nachweissystems, da sowohl die Intra- und Inter-Assay-Variabilität als auch der unspezifische Hintergrund verringert wurden. Gleichzeitig ergibt sich eine erhöhte Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die tatsächlich in der Probe enthaltenen Penicillinkonzentrationen. Bei einem LoQ von 5,5 ng/ml für Penicillin G in 10 % Plasma kann so in der gewonnenen Blutprobe tatsächlich nur eine Konzentration bis 55 ng/ml sicher erkannt werden. Dies wurde für die hier durchgeführten Untersuchungen in Kauf genommen, da die zu erwartenden Blutplasmaspiegel der Penicilline sich in den meisten Fällen in einem deutlich höheren Konzentrationsbereich bewegen. Die Proben konnten daher sehr viel stärker ausverdünnt werden, um eine Messung innerhalb des Arbeitsbereichs des ELISA-Systems zu erreichen. Eine niedrigere Nachweisgrenze würde in einem späteren Bereich der Plasma-Konzentrations-Zeitkurve aufgrund der schnellen Elimination der Penicilline keine zusätzlichen Messzeitpunkte für eine genauere pharmakokinetische Auswertung generieren. Auch lag die Nachweisgrenze unterhalb der MIC (*minimum inhibitory concentration*) der in Frage kommenden Krankheitserreger, sodass eine Abschätzung der therapeutischen Wirksamkeit bei der vorgenommenen Verdünnung der Plasmaproben möglich bleibt.

Der ELISA zeigte eine hohe Spezifität für die untersuchten Penicilline. Eine Kreuzreaktivität der beiden Antikörper mit den im Rahmen des Fremdstoffmetabolismus entstehenden Hauptmetaboliten Benzylpenicilloinsäure, Phenoxymethylpenicilloinsäure, Amoxicillin Diketopiperazin und Amoxicilloinsäure konnte in keinem Fall nachgewiesen werden. Dies ist insbesondere für die Bestimmung von pharmakokinetischen Parametern von Bedeutung, da hier nur die Blutspiegel der unveränderten, aktiven Wirkstoffe gemessen werden sollen. Dies ist für eine korrekte Bestimmung der Eliminationsrate eines Stoffes ausschlaggebend. Im Fall der Penicilline ist der intakte β -Laktamring, welcher als wichtigster Schritt in der hepatischen Elimination aufgespalten wird, zudem Grundvoraussetzung für

die antibakterielle Wirksamkeit (DONOWITZ und MANDELL, 1988). Somit wurde gewährleistet, dass die gemessenen Wirkstoffspiegel in der Tat den antimikrobiell aktiven Substanzen entsprechen.

Für die Linearität und die Wiederfindung wurden Zielvorgaben von 90 – 110 % bzw. 80 – 120 % definiert. Für die Intra- und Inter-Assay-Variabilität lag die Akzeptanzgrenze bei einem CV von max. 15 %. Diese Vorgaben orientieren sich an den internationalen Empfehlungen für die Validierung von Immunoassays und zur Festlegung der Bestimmungsgrenze (LoQ) (FINDLAY et al., 2000; ARMBRUSTER und PRY, 2008). Obwohl in diesen Empfehlungen z.B. eine Präzision von 20 – 25 % als ausreichend angesehen wird, wurden in der vorliegenden Arbeit die Grenzwerte für die Linearität und Präzision nach ersten eigenen Beobachtungen noch etwas enger gefasst. Damit wird gewährleistet, dass innerhalb des Arbeitsbereichs unabhängig von der jeweiligen Messkonzentration im Wesentlichen gleichartige Variabilitäten zu erwarten sind. Unterhalb der Bestimmungsgrenze war dagegen meist ein deutlicher Trend mit einem schnellen Anstieg der prozentualen Abweichungen sichtbar.

Die genannten Zielvorgaben wurden für Penicillin G in einem Arbeitsbereich von 5,5 – 100 ng/ml, für Penicillin V in einem Bereich von 13,5 – 100 ng/ml und für Amoxicillin in einem Bereich von 25 – 100 ng/ml erreicht. Die Unterschiede zwischen Penicillin G und Penicillin V, welche mit demselben monoklonalen Antikörper (*mAk 1F1*) nachgewiesen wurden, liegen dabei in der geringeren Empfindlichkeit des Antikörpers gegenüber Penicillin V begründet. Dadurch kommt es zu einer Rechtsverschiebung der Standardkurve (siehe Abb. 3.1a). Für Amoxicillin wurde ein zweiter monoklonaler Antikörper verwendet (*mab 3B5*). Der bei Verwendung dieses Antikörpers zu beobachtende starke Hintergrund führte im Vergleich zu den beiden anderen Penicillinen zu einer etwas höheren Bestimmungsgrenze von 25 ng/ml. Insbesondere führte der vorhandene Hintergrund zu einer Zunahme der Wiederfindungsrate im niedrigen Konzentrationsbereich. Hier werden aufgrund der zusätzlichen Erfassung unspezifischer Bindungen tendenziell höhere als die tatsächlich vorhandenen Penicillinkonzentrationen gemessen. Außerdem zeigten die Messwerte für Amoxicillin insgesamt eine stärkere Variabilität als die der beiden anderen Penicilline, welche aber mit 11 – 13 % (Inter-Assay-Variabilität) noch innerhalb der definierten Grenzwerte lag.

Wichtige Parameter bei einem Vergleich der verschiedenen zum Nachweis von Penicillinen verwendeten Testsysteme sind außerdem die Nachweis- und Bestimmungsgrenze. Sie stellen ein Maß für die Sensitivität des Verfahrens dar. Die Nachweisgrenze des hier validierten ELISA-Systems lag für Penicillin G bei 3,8 ng/ml, für Penicillin V bei 7 ng/ml und für Amoxicillin bei 8,7 ng/ml. Unter Berücksichtigung der notwendigen 10-fachen Verdünnung der Proben entspricht dies einer tatsächlichen Plasmakonzentration von 38, 70 und 87 ng/ml. Die Bestimmungsgrenze betrug für Penicillin G 5,5 (55) ng/ml, für Penicillin V 13,5 (135) ng/ml und für Amoxicillin 25 (250) ng/ml.

Bei einem Großteil der bisher durchgeführten Untersuchungen zur Pharmakokinetik von Penicillinen beim Nutzgeflügel wurden zum Nachweis der Wirkstoffe im Blutplasma HPLC-Systeme mit einem UV-Detektorsystem genutzt. Die Nachweisgrenze dieser Methode liegt für Amoxicillin in einem Bereich von 40 ng/ml (JERZSELE et al., 2011) bis etwa 100 ng/ml (ANADÓN et al., 1996; CARCELES et al., 1995; KANDEEL, 2015). Die Bestimmungsgrenze lag in einem Bereich von 90 – 160 ng/ml (ABO EL-SOUD et al., 2004; JERZSELE et al., 2011; KANDEEL, 2015). Demnach ist die Quantifizierung von Amoxicillin im Blutplasma mit der HPLC-Methode in einem im Vergleich zum ELISA geringfügig niedrigeren Konzentrationsbereich möglich. Ursache hierfür ist nicht eine zu geringe Sensitivität des verwendeten Antikörpers, sondern die bei Verwendung von Blutplasma auftretenden Matrixeffekte, die mit einer erhöhten Wiederfindungsrate in niedrigen Konzentrationsbereichen einhergehen. Bei der Messung von Amoxicillin in PBS-Puffer zeigt der verwendete Antikörper zum Beispiel eine deutlich höhere Sensitivität bei einer Nachweisgrenze von 1,8 ng/ml.

Für den Nachweis von Penicillin G und Penicillin V im Blut vom Geflügel existieren keine Untersuchungen, die entsprechende Nachweisgrenzen für HPLC-Systeme bei der Bestimmung pharmakokinetischer Daten mitteilen. In einer Übersichtsarbeit aus dem Jahr 2006 werden verschiedene Verfahren zum Nachweis von Penicillinen im Blutplasma und -serum bei verschiedenen Säugetieren und dem Menschen verglichen (SAMANIDOU et al., 2006a). Für Penicillin G lagen die angegebenen Nachweisgrenzen in den meisten Fällen in einem Bereich von 10 – 50 ng/ml, in einigen Fällen jedoch auch deutlich höher. Für Penicillin V wurden Werte zwischen 50 und 100 ng/ml angegeben. Für Amoxicillin lagen viele Werte, ähnlich den oben

beschrieben Studien, in einem Bereich von 50 – 200 ng/ml. Die Bestimmungsgrenzen der einzelnen Penicilline werden in dieser Arbeit nicht aufgeführt. Auch für Penicillin G und V bewegen sich die in der Vergangenheit mit HPLC-Systemen erzielten Nachweisgrenzen in etwa derselben Größenordnung des hier verwendeten ELISA-Systems. Um die Empfindlichkeit des ELISA-Systems zu erreichen, ist bei den HPLC-Methoden allerdings in der Regel eine aufwändige Probenaufarbeitung nötig (Festphasenextraktion, Präzipitation der Plasmaproteine). Beim verwendeten ELISA-System kann dagegen das Plasma nach Verdünnung in PBS direkt aufgetragen werden. Dies kann vor allem bei der Arbeit mit Penicillinen von Vorteil sein, da diese in wässriger Lösung nur über eine kurze Zeit stabil sind (HOU und POOLE, 1971). Die Bearbeitungszeit im Labor sollte daher möglichst kurz gehalten werden. Außerdem wird durch die Verdünnung der Plasmaproben in PBS-Puffer (pH 7 – 7,5) eine mögliche Beeinflussung der Stabilität durch weitere Komponenten (z.B. Lösungsmittel) ausgeschlossen.

Weitere Vorteile von ELISA-Verfahren im Vergleich zum Nachweis mittels chromatographischer Methoden sind die relativ einfache Durchführung und die geringen Kosten. Außerdem wird keine vergleichsweise aufwendige apparative Ausstattung benötigt. Einen Nachteil stellen dagegen die im Vergleich zu HPLC-Methoden häufig höhere Intra- und Inter-Assay-Variabilität sowie der begrenzte Arbeitsbereich des ELISAs dar. Stehen keine geeigneten Immunreagenzien, insbesondere spezifische Antikörper bereit, ist die Entwicklung eines ELISA-Systems zudem zeitintensiver. Bei Verfügbarkeit aller nötigen Reagenzien ist mit einem ELISA allerdings oft ein schnellerer Probendurchlauf erreichbar, da mehrere Plasmaproben in einem Testdurchlauf analysiert werden können (FINDLAY et al., 2000). Bei der Durchführung von pharmakokinetischen Untersuchungen können so zum Beispiel die zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Applikation entnommenen Plasmaproben eines Tieres gemeinsam analysiert werden. Durch den Ausschluss der Inter-Assay-Variabilität können so für jedes Tier einheitliche Plasmakonzentrations-Zeit-Kurven gewonnen werden. Das Potential des ELISA-Systems zur schnellen Analyse einer großen Probenanzahl konnte in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht vollständig ausgenutzt werden. Aufgrund fehlender Vergleichsdaten war es schwer, Voraussagen über die erwarteten Wirkstoffkonzentrationen zu den einzelnen Entnahmezeitpunkten zu treffen. Daher musste vor der eigentlichen Quantifizierung für zwei Tiere eines jeden Messzeitpunktes (jeweils gesondert für

Penicillin G, Penicillin V, Amoxicillin, orale, i.v. Verabreichung) die jeweils optimale Vorverdünnung mithilfe einer Serienverdünnung bestimmt werden. Dabei konnten nur jeweils 1 – 2 Proben pro ELISA-Platte in einer entsprechend hohen Anzahl von Verdünnungsstufen aufgetragen werden. Erst im Anschluss daran konnten die übrigen Proben in 2 – 3 adäquaten Verdünnungen gemessen werden.

Insgesamt erwies sich das hier verwendete ELISA-System als geeignet, die drei untersuchten Penicilline – Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin – im Blutplasma der Pute nachzuweisen. Die verwendeten Antikörper zeigten eine hohe Spezifität für die untersuchten Penicilline. Bezüglich der Linearität, Richtigkeit und Präzision konnten alle im Voraus definierten Zielvorgaben eingehalten werden. Die Sensitivität des Testsystems, bezogen auf die messbaren Blutkonzentrationen, liegt dabei im Bereich der bisher beschriebenen HPLC-Verfahren, wobei die Bestimmungsgrenze im Fall von Amoxicillin aufgrund von Matrixeffekten in einem etwas höheren Bereich liegt. Zu beachten ist jedoch, dass der verwendete ELISA bei der Messung der Penicilline in PBS oder in 1:10 in PBS verdünnten Plasmaproben eine deutlich höhere Sensitivität als die beschriebenen HPLC-Verfahren aufweist. Auch bei der Bestimmung von Penicillin G und Penicillin V in 100 % Blutplasma liegt die Nachweisgrenze in einem sehr niedrigen Bereich von 6,6 – 10,7 ng/ml. In diesem Fall ist allerdings die Genauigkeit der Messung reduziert, weshalb in den hier durchgeführten Untersuchungen grundsätzlich mit 10-fach verdünntem Plasma gearbeitet wurde. Weiterhin ist zu beachten, dass durch die ständige Weiterentwicklung und Modernisierung der zur Verfügung stehenden HPLC-Verfahren, insbesondere durch Kopplung mit Massenspektrometrie-Detektoren zu modernen LC-MS/MS-Einheiten, bei einer entsprechenden Aufarbeitung der Proben grundsätzlich noch niedrigere Nachweisgrenzen erreichbar sein werden. Zudem würden diese Methoden eine simultane Quantifizierung verschiedener Penicilline ermöglichen, was insbesondere für ein Screening von Proben zum Beispiel in der Rückstandsanalytik von Vorteil ist (CAZORLA-REYES et al., 2014). Diese Verfahren wurden allerdings bisher noch nicht für pharmakokinetische Bestimmungen genutzt.

5.2 Pharmakokinetische Daten

Die Pharmakokinetik von Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin wurde nach i.v. Verabreichung in die *V. metatarsalis* und nach oraler Eingabe per Kropfsonde untersucht. Diese Applikationsformen entsprechen nicht der in der Praxis vorherrschenden Verabreichung über das Trinkwasser (VERMEULEN et al., 2002), sind jedoch für die Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter erforderlich. Anhand der so gewonnenen Basisdaten können weitergehende Untersuchungen zur Ableitung geeigneter Dosierungsschemata geplant und die Eignung weiterer Applikationsmethoden im Vergleich zur direkten Eingabe bewertet werden. Nach den *Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species* (EMA, 2000) sollte unabhängig von der primär untersuchten Applikationsform (z.B. oral, i.m., subkutan) parallel immer auch die Pharmakokinetik der Substanzen nach i.v. Eingabe in gleicher Dosierung ermittelt werden, da nur so eine Abschätzung der Bioverfügbarkeit möglich ist. Außerdem ermöglicht nur die i.v. Eingabe, insbesondere bei Stoffen mit schneller Verteilung und Elimination, eine genaue Bestimmung der Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten. Diese Prozesse würden sich nach oraler Eingabe mit der Resorption der Stoffe überlagern und könnten davon nur schwer abgegrenzt werden. Auch das Verteilungsvolumen und die Clearance können nur nach i.v. Applikation ermittelt werden (FAN und DE LANNOY, 2014).

Durch die orale Eingabe der Penicilline direkt in den Kropf wurde sichergestellt, dass alle Tiere bezogen auf ihr Körpergewicht dieselbe Dosis des Wirkstoffes aufnahmen. Die dargestellten Unterschiede bzgl. der Resorptions- und Eliminationsgeschwindigkeit, der maximalen Plasmakonzentration sowie der insgesamt aufgenommenen Wirkstoffmengen, welche durch die Variabilität der Blutplasmakurven verdeutlicht werden, beruhen ausschließlich auf dem unterschiedlichen pharmakokinetischen Verhalten der Stoffe im Tier. Weitere Einflussfaktoren, welche nach einer oralen Verabreichung über das Trinkwasser auftreten könnten, wie Variationen im Trinkverhalten der Tiere oder eine scheinbar geringe Bioverfügbarkeit aufgrund einer Degradation des Medikamentes in der Lösung (VERMEULEN et al., 2002) werden so ausgeschlossen.

Zusätzlich wurden die Tiere 2 h vor und nach der oralen Eingabe der Medikamente nüchtern gehalten, da eine gleichzeitige Nahrungsaufnahme die Resorption der

Penicilline und damit die maximal erreichbaren Plasmaspiegel beeinflussen kann (GUGGENBICHLER und KIENEL, 1979; SALA-RABANAL et al., 2006; WATSON et al., 1986). Neben den bei Säugetieren beobachteten Effekten spielt bei Vögeln der Kropf als Nahrungsspeicher eine zusätzliche Rolle. Je nach Füllung von Drüsen- und Muskelmagen wird hier das Futter über unterschiedlich lange Zeiträume gespeichert (CHAPLIN et al., 1992; VOLLMERHAUS und SINOWATZ, 2004), was den Transport der Penicilline an ihren Resorptionsort (Dünndarm) verzögern kann. Im Kropf selber findet in der Regel keine Resorption von Medikamenten statt (VERMEULEN et al., 2002).

Die Verabreichung der Penicilline erfolgte jeweils in der laut Packungsbeilage der verwendeten Präparate empfohlenen Dosierung. Aus diesem Grund unterschied sich die pro kg Körpergewicht eingegebene Menge der drei Wirkstoffe. Für Penicillin G wurde eine Dosis von 16.000 IE/kg KM (= 9 mg/kg KM), für Penicillin V von 20 mg/kg KM und für Amoxicillin von 17,4 mg/kg KM eingesetzt. So sollte eine Bewertung der aktuell in der Praxis eingesetzten Dosierungen ermöglicht werden. Aufgrund ihres individuellen pharmakokinetischen Verhaltens können dabei für jeden Wirkstoff unterschiedliche Dosierungen zur Durchführung einer effektiven Therapie nötig sein. So zeigte Penicillin V in den hier durchgeführten Versuchen eine hohe Clearance, sowie ein hohes scheinbares Verteilungsvolumen. Es waren deshalb nach i.v. Applikation höhere Dosierungen nötig, um einen mit Penicillin G vergleichbaren Plasmaspiegel zu erzielen. Als Oralpenicillin wies es im Vergleich mit Penicillin G aber eine deutlich höhere Bioverfügbarkeit auf, wodurch diese Besonderheit nach oraler Verabreichung ausgeglichen wurde. Hier wurden für Penicillin V sogar deutlich höhere Plasmaspiegel beobachtet. Auch die Krankheitserreger können unterschiedliche Anforderungen an die Wirkstoffspiegel der drei Penicilline für eine vergleichbare Wirkung besitzen. Da Amoxicillin im Vergleich zu den beiden anderen Penicillinen eine reduzierte Wirkung auf grampositive Erreger aufweist, sind höhere Plasmakonzentrationen nötig, um den therapeutischen Effekt zu gewährleisten (POTSCHKA et al., 2014). Zur Bewertung der therapeutischen Effektivität einer verwendeten Dosierung muss deshalb der Blutplasmaspiegel im Verhältnis zur minimalen Hemmstoffkonzentration (MIC) des Erregers betrachtet werden. Voraussetzung hierfür ist das Vorliegen einer ausreichend großen Datenbasis von MIC-Werten der in Frage kommenden Krankheitserreger bei der Zieltierspezies.

Da die pharmakokinetischen Berechnungen in der vorliegenden Arbeit anhand einer Nicht-Kompartiment-Analyse durchgeführt wurden, ist keine Extrapolation der Wirkstoffspiegel auf höhere oder niedrigere Dosierungen möglich (FAN und DE LANNOY, 2014). Es können daher keine sicheren Vorhersagen über das pharmakokinetische Verhalten der Penicilline bei einer Änderung der Dosis gemacht werden.

Für jedes der drei untersuchten Penicilline wurde eine Vielzahl von pharmakokinetischen Parametern erhoben. Nach i.v. Eingabe zeigten die Penicilline ähnliche Verteilung- und Eliminationshalbwertszeiten, während sich die Clearance und das Verteilungsvolumen deutlich unterschieden. Während für Amoxicillin ein scheinbares Verteilungsvolumen von nur 534 ml/kg gemessen wurde, lag es für Penicillin G bei 1.108 ml/kg und für Penicillin V bei 1.967 ml/kg. Im Vergleich zu Mensch und anderen Säugetieren, bei denen das Verteilungsvolumen im Wesentlichen dem Volumen des Extrazellulärspaces entspricht, wurde in der vorliegenden Arbeit für Penicillin G und Penicillin V eine scheinbare Anreicherung im Gewebe nachgewiesen. Interessanterweise zeigt Penicillin V auch bei Menschen mit 700 ml/kg das höchste Verteilungsvolumen der drei Penicilline. Das scheinbare Verteilungsvolumen von Amoxicillin (200 ml/kg) und Penicillin G (300 ml/kg) ist auch beim Menschen nur halb so groß wie das von Penicillin V. Auch die beim Menschen im Vergleich zu Amoxicillin (ca. 20 %) und Penicillin G (ca. 10 – 50 %) erhöhte Metabolisationsrate von Penicillin V von bis zu 60 % deutet auf Unterschiede in der Gewebegängigkeit der drei Penicilline hin (FICHTL, 2001b; NATHWANI und WOOD, 1993).

Das niedrige scheinbare Verteilungsvolumen von Amoxicillin korreliert auch mit seiner geringen Plasmaproteinbindung von ca. 15 %. Für Penicillin G und Penicillin V liegt diese dagegen bei 84 und 80 %. Würden ähnliche Verhältnisse auch für die Bindung an Gewebeproteine zutreffen, so könnte sich die starke Anreicherung und das hohe scheinbare Verteilungsvolumen von Penicillin G und Penicillin V im Gewebe der Pute erklären.

Ein weiterer Faktor, der zu einer Erhöhung des gemessenen Verteilungsvolumens führen könnte, ist die vorzeitige, schnelle Elimination einer Substanz aus dem Kreislauf. Das scheinbare Verteilungsvolumen ist eine theoretische Größe, die keine

Aussage über die Art des Kompartiments erlaubt, in das sich der Arzneistoff im Körper verteilt. Die mathematische Berechnung des scheinbaren Verteilungsvolumens erfolgt bei der Nicht-Kompartiment-Analyse durch den Vergleich der verabreichten Wirkstoffmenge mit der im Körper gemessenen Wirkstoffkonzentration unter Berücksichtigung der Eliminationsrate (SUMMIT RESEARCH SERVICES, 2005). Tritt bereits vor dem ersten Messzeitpunkt nach der Applikation ein starker Abfall der Plasmakonzentrationen, zum Beispiel durch einen First-Pass-Effekt auf, so kann dies ebenfalls ein hohes scheinbares Verteilungsvolumen suggerieren. Da die Injektion in der vorliegenden Arbeit in die *V. metatarsalia* erfolgte, könnte theoretisch durch den beim Vogel vorliegenden renalen Portalvenenkreislauf ein renaler First-Pass-Mechanismus von Bedeutung sein. Ein möglicher Einfluss der venösen Nierendurchblutung auf die erreichten Plasmakonzentrationen von in die Hintergliedmaße verabreichten Wirkstoffen wurde bisher noch nicht abschließend diskutiert. Da Penicilline in der Niere vorwiegend tubulär sezerniert werden, kann eine vorzeitige renale Ausscheidung jedoch grundsätzlich in Betracht kommen. Dagegen spielt bei vorwiegend glomerulär filtrierte Stoffen ein renaler First-Pass-Effekt keine Rolle. Es ist allerdings fraglich, ob sich durch einen solchen Mechanismus die gefundenen Unterschiede zwischen den Penicillinen erklären lassen. Dies würde große Unterschiede im Ausmaß des First-Pass-Effektes bei der Elimination der Penicilline bedeuten. Dem widerspricht jedoch die Beobachtung, dass Amoxicillin beim Menschen ausgesprochen stark tubulär sezerniert wird, bei der Pute jedoch das geringste scheinbare Verteilungsvolumen aufweist. Im Vergleich mit Untersuchungen bei Huhn, Pute und Taube, bei denen die i.v. Injektion in die *V. brachialis/ulnaris* erfolgte, war das Verteilungsvolumen von Amoxicillin sogar deutlich niedriger. In diesen Studien wurde für Amoxicillin bei der Pute ein scheinbares Verteilungsvolumen von 1.400 – 1.750 ml/kg ermittelt (ABO EL-SOUD et al., 2004; CARCELES et al., 1995; ESCUDERO et al., 1998; JERZSELE et al., 2009, 2011). Dabei stimmte die ermittelte Clearance mit 780 – 1.200 ml/h/kg weitgehend mit derjenigen überein, die in dieser Untersuchung beobachtet wurde (966 ml/h/kg). Die Abweichung des scheinbaren Verteilungsvolumens ging in diesen Studien daher mit einer deutlich verlängerten Eliminationshalbwertszeit einher. Bei Penicillin G und Penicillin V war in dieser Studie die Clearance im Vergleich zu Amoxicillin analog zum Verteilungsvolumen erhöht. Hier wurden Werte von 2.064 bzw. 3.237 ml/h/kg bestimmt. Für diese beiden Penicilline liegen

nur wenige Literaturstellen vor, die einen Vergleich der ermittelten Werte ermöglichen würden. Bei einer im Summary Report der EMA zitierten Studie wird für Penicillin V bei Hühnern ebenfalls eine hohe Clearance von 7.100 ml/h/kg genannt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Angaben zum Verteilungsvolumen fehlen. Die Verbindung der hohen Clearance mit einer Halbwertszeit von 35 min weist hier aber ebenfalls auf eine starke Umverteilung des Stoffes in die Gewebe hin.

Aufgrund der gleichlaufenden Erhöhung von Verteilungsvolumen und Clearance zeigten die in dieser Studie untersuchten Penicilline trotz der starken Unterschiede in der Verteilung eine annähernd gleiche Eliminationshalbwertszeit von 22 – 25 min. Für Penicillin G und V entspricht dies in etwa der für den Menschen und andere Säugetiere bestimmten Größenordnung. Für diese wird im Allgemeinen eine Eliminationshalbwertszeit von ca. 30 – 40 min angegeben (STAHLMANN und LODE, 2013). Ähnliche Werte wurden für Penicillin G bereits für Puten (30 min), Hühner (33 min), und Strauße (23 min) berichtet (CLARKE et al., 2001; HIRSH et al., 1978; SMITH, 1954). Für Penicillin V existieren beim Vogel bisher nur wenige Daten. In einem Summary Report der EMA wird für Pen V bei Hühnern eine Halbwertszeit von 35 min mitgeteilt (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Die in dieser Studie für Amoxicillin bestimmte Halbwertszeit liegt dagegen deutlich unter derjenigen, die für den Menschen und das Nutzgeflügel mitgeteilt wird. Sowohl bei Hühnern als auch bei Puten wurden Halbwertszeiten im Bereich von 62 – 77 min ermittelt (ABO EL-SOUD et al., 2004; CARCELES et al., 1995; JERZSELE et al., 2011). Lediglich in den von Lashev (1986c) durchgeführten Untersuchungen lagen die Halbwertszeiten in einem niedrigeren Bereich von 53 min bei Puten bis zu 35 min bei Hühnern.

Da die Penicilline schnell aus dem Körper eliminiert wurden stand für die Erstellung der Blutplasmakurven, welche die Basis für eine Nicht-Kompartiment-Analyse bilden, nur eine begrenzte Anzahl von Messzeitpunkten zur Verfügung. Alle Penicilline konnten nach i.v. Injektion nur an 4 Zeitpunkten im Blut sicher nachgewiesen werden (0,25; 0,5; 1 und 2 h). Dabei lagen die Blutspiegel für Penicillin G zu diesem Zeitpunkt nur noch knapp über der Nachweisgrenze. Für Penicillin V und Amoxicillin lagen die Konzentrationen dagegen noch in Höhe von 130 – 260 ng/ml (Penicillin V), bzw. 250 – 566 ng/ml (Amoxicillin). Zum Zeitpunkt 4 h waren dann für diese beiden Penicilline keine Wirkstoffkonzentrationen mehr in

den Proben nachweisbar. Der Zeitpunkt, an dem die Nachweisgrenze unterschritten wurde, ist demnach unbekannt. Werden die Eliminationshalbwertszeiten dieser beiden Penicilline unter Einbeziehung des vermeintlichen Nullpunktes bei 4 h bestimmt, kommt es zu einer Überschätzung der Eliminationshalbwertszeit und damit des Verteilungsvolumens sowie zu einer Unterschätzung der berechneten initialen Konzentration. Unterschätzt wird, in geringerem Maße, ebenso die AUC_{∞} , da hier der Verlauf der Kurve vor und nach dem letzten Messzeitpunkt geschätzt und zur berechneten Fläche hinzuaddiert wird. Aus diesem Grund wurde die Analyse für alle Penicilline einheitlich aus den Messwerten der Zeitpunkte 0,25 – 2 h durchgeführt. Unklar ist, ob die Kurve sich zu den für die Berechnung der Eliminationshalbwertszeit verwendeten Zeitpunkten von 1 – 2 h bereits ausschließlich in der Eliminationsphase befanden, oder ob zu Beginn noch Verteilungsvorgänge stattfanden. In diesem Fall könnte es tendenziell zu gegenteiligen Effekten, also zu einer Unterschätzung der Eliminationshalbwertszeit und des Verteilungsvolumens sowie zu einer Überschätzung von initialer Konzentration und AUC kommen. Dies ist eine Unsicherheit, die mit Bestimmung der pharmakokinetischen Daten aus wenigen Messpunkten einhergeht, vor allem wenn zur Berechnung der Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten, wie in diesem Fall, je nur 2 Zeitpunkte genutzt werden können. Für eine sichere Bestimmung der Kurvensteigung wäre dagegen eine Anzahl von mindestens 3 Messpunkten pro linearem Kurvenabschnitt optimal. Ähnliche Unsicherheiten bestehen jedoch auch bei der Analyse der Plasmakonzentrationen über Kompartiment-Modelle, die in den oben genannten Studien verwendet wurden. Da auch bei einer nichtlinearen Regressionsanalyse verschiedene Vorannahmen getroffen werden müssen, sind sie im Vergleich mit Nicht-Kompartiment-Modellen stärker von subjektiven Entscheidungen abhängig (GILLESPIE, 1991). Bei alleiniger Bestimmung der pharmakokinetischen Basisparameter, wie zum Beispiel der Clearance, AUC, Eliminationshalbwertszeit, t_{\max} und C_{\max} werden deshalb bevorzugt Nicht-Kompartiment-Modelle genutzt (GABRIELSSON und WEINER, 2012).

Die hier gefundenen Unterschiede bezüglich der Eliminationshalbwertszeiten können allerdings alleine durch analysebedingte Faktoren nicht vollständig erklärt werden. So zeigte sich auch bei der Betrachtung des Plasmakurvenverlaufs, also unabhängig von der pharmakokinetischen Analyse der Daten, im Vergleich zu anderen Studien eine schnellere Abnahme der Blutplasmakonzentrationen. Im Vergleich

zu der von Jerzsele et al. (2011) durchgeführten Studie, in der eine niedrigere Dosierung von 10 mg/kg KM verwendet wurde, waren die Blutplasmakonzentrationen nach einer anfänglich höher berechneten initialen Konzentration von 72 µg/ml (im Vergleich zu 49 µg/ml) bei einer vergleichbaren Verteilungshalbwertszeit nach 2 h schon auf im Durchschnitt 350 ng/ml abgesunken. Nach 4 h war kein Amoxicillin mehr nachweisbar, während bei Jerzsele et al. (2011) noch Konzentrationen deutlich oberhalb des LoQ von 120 ng/ml gefunden wurden. Auch bei Abo El-Sooud et al. (2004) konnten noch bis 6 h nach der Eingabe von 10 mg/kg KM Amoxicillin entsprechend hohe Wirkstoffspiegel nachgewiesen werden. Nach 4 h lag die gemessene Plasmakonzentration noch in einem Bereich von ca. 400 ng/ml. Von Carceles et al. (1995) wurde eine Dosierung von 20 mg/kg KM verabreicht - diese ist in etwa der in dieser Studie verwendeten Dosis von 17,4 mg/kg vergleichbar. Hier lag die Plasmakonzentration nach 2 h noch bei ca. 3,5 µg/ml, nach 4 h noch bei ca. 1 µg/ml.

Die größten Unterschiede zwischen den bisher durchgeführten Studien und den eigenen Daten waren auf die Eliminationshalbwertszeit und das Verteilungsvolumen beschränkt, wobei zwischen diesen Parametern ein enger Zusammenhang besteht. Die Clearance sowie die Verteilungshalbwertszeiten lagen dagegen in dem aus der Literatur zu erwartenden Bereich. Für die AUC ist ein Vergleich der angegebenen Daten nicht sicher möglich, da sie von der eingegebenen Dosis abhängt und eine Extrapolation hier nicht ohne weiteres vorgenommen werden kann.

Nach oraler Eingabe konnte nur für Amoxicillin eine klare Resorptionsphase ausgemacht werden, während Penicillin G und V eine verzögerte Resorption ohne klar erkennbare Unterteilung der Kurven in eine Resorptions- Verteilungs- und Eliminationsphase zeigten. In der vorliegenden Studie glich die Blutplasmakurve für Amoxicillin den in den oben zitierten Veröffentlichungen abgebildeten Kurven, die ebenfalls eine deutlich abgegrenzte Resorptionsphase aufwiesen. Die berechnete Resorptionshalbwertszeit lag im Durchschnitt bei 15,2 min und war damit etwas höher als die in den anderen Studien bestimmte Halbwertszeit von 8 – 10 min. Allerdings lag hier eine hohe interindividuelle Variabilität vor. Bei zwei Tieren wurde eine deutlich schnellere Resorption mit einer Halbwertszeit von 6,8 und 8,1 min gemessen. Im Gegensatz dazu zeigte eine weitere bei Hühnern durchgeführte Untersuchung auch für Amoxicillin eine verzögerte Resorption (KRASUCKA

und KOWALSKI, 2010). In dieser Studie wurde die maximale Plasmakonzentration erst nach 2 h erreicht. Die gemessene C_{\max} nach einer Dosis von 20 mg/kg KM lag bei nur 1,38 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (vorliegende Studie: 3,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die AUC war aufgrund einer für die verzögerte Resorption typischen, verlängerten Eliminationsphase im Vergleich dazu allerdings nur wenig reduziert (4,5 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$ vs. 5,5 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$).

Die für Amoxicillin errechnete Eliminationshalbwertszeit lag nach oraler Eingabe bei 33,8 min, bestätigte also die nach i.v. Applikation festgestellte, schnelle Elimination. Für Penicillin G und Penicillin V konnten aufgrund des Kurvenverlaufs nach oraler Eingabe keine sicheren Eliminationshalbwertszeiten berechnet werden.

Die AUC_{∞} der drei Penicilline wies nach oraler Eingabe deutliche Unterschiede auf und bestätigte so, insbesondere im Fall von Penicillin G, die bisherigen Annahmen zur Bioverfügbarkeit. Für Penicillin G lag sie im Durchschnitt bei 0,452 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$. Im Vergleich mit den nach i.v. Applikation erreichten Werten entsprach dies einer Bioverfügbarkeit von ca. 10 %. Wie auch beim Menschen und bei anderen Säugetieren kommt es im Magen des Geflügels zu einem säurebedingten Abbau des Penicillins. Die AUC für Penicillin V und Amoxicillin war dagegen höher. Sie betrug 2,85 bzw. 5,51 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$. Im Vergleich mit den nach i.v. Applikation erreichten Werten entspricht dies für Penicillin V einer hohen Bioverfügbarkeit von 41,2 %. Dabei wurden jedoch große individuelle Unterschiede zwischen 26 % – 56 % beobachtet. Für Amoxicillin wurde eine Bioverfügbarkeit von 30,1 % bestimmt. Obwohl die orale AUC von Penicillin V im Vergleich zu Amoxicillin nur etwa die Hälfte beträgt, entspricht dies einer höheren Bioverfügbarkeit, da aufgrund seines hohen Verteilungsvolumens nach i.v. Eingabe eine wesentlich geringere AUC ermittelt wurde (6,4 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$ vs. 18,54 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{ml}$).

Die Bioverfügbarkeit lag damit für Penicillin V deutlich unterhalb derjenigen, die für Hühner bestimmt wurde (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2005). Bei diesen wurde nach oraler Verabreichung von 15 mg/kg KM Penicillin V eine Bioverfügbarkeit von 69 % mitgeteilt. Da hier die gemessene AUC für die i.v. und orale Eingabe nicht angegeben wurde, kann die Ursache für die Unterschiede nicht eingehender diskutiert werden. Auch für Amoxicillin wurde beim Geflügel bisher häufig eine höhere orale Bioverfügbarkeit beobachtet. Sie lag in den meisten Studien bei ca. 60 %. So wurde zum Beispiel nach Jerzsele et al. (2011) bei der Pute

nach Verabreichung einer niedrigen Dosis von 10 mg/kg KM (in der vorliegenden Studie: 17,4 mg/kg) eine vergleichbare maximale Plasmakonzentration erreicht (3,2 vs. 3,9 µg/ml). Die AUC lag sogar in einem höheren Bereich von 7,66 µg/h/kg. In einer weiteren Studie wurde bei einer maximalen Plasmakonzentration im gleichen Bereich von 3,5 µg/ml sogar eine AUC von 8,43 µg/h/kg bestimmt (ABO EL-SOUD et al., 2004). Die Ursache für die niedrigere Resorptionskapazität in der hier durchgeführten Studie ist unbekannt. Da die schnellere Eliminationsgeschwindigkeit sowohl nach i.v. als auch nach oraler Eingabe gleichermaßen zum Tragen kommt, sollten diese Unterschiede keinen Einfluss auf die errechnete Bioverfügbarkeit besitzen. Denkbar wäre, dass es ab einem bestimmten Konzentrationsbereich zu einer Sättigung des intestinalen PEPT1-Transporters kommt, die enterale Resorption von Amoxicillin also nicht linear zur eingegebenen Dosis ansteigt. Allerdings erscheint es unwahrscheinlich, dass diese Prozesse bereits bei den hier verwendeten Dosierungen eine größere Rolle spielen und ausreichend sind, die hier gefundenen Unterschiede der aufgenommenen Menge zu erklären. Bei einer im Jahr 2015 durchgeführten Studie an Hühnern wurde nach Verabreichung einer Dosis von 10 mg/kg KM bei ähnlichen maximalen Plasmakonzentrationen von 3,26 µg/ml ebenfalls eine etwas geringere Bioverfügbarkeit von 40,2 % bestimmt (KANDEEL, 2015). Auch bei Tauben lag die Bioverfügbarkeit von Amoxicillin in einem niedrigeren Bereich von nur 34 % (DORRESTEIN et al., 1984).

5.3 Klinische Relevanz der gemessenen Blutplasmakonzentrationen

Will man die therapeutische Effektivität einer Substanz bewerten und ein geeignetes Dosierungsschema bestimmen, sind die erreichten Blutplasmakonzentrationen für sich allein genommen nur von begrenzter Aussagekraft. Entscheidend ist, insbesondere bei einem Vergleich verschiedener antimikrobieller Wirkstoffe, die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber dem Wirkstoff. Eine Abschätzung der Empfindlichkeit wird dabei über die Bestimmung der MIC (*minimal inhibitory concentration*) der einzelnen Erreger vorgenommen (TURNIDGE und PATERSON, 2007). Diese kann sich zwischen den verschiedenen Isolaten eines Erregerstammes gravierend unterscheiden. Bei einem ausbleibendem Behandlungserfolg sollte

deshalb die Sensitivität der beteiligten Keime gegenüber den verschiedenen Antibiotika mit einem Antibiogramm bestimmt werden (BUNDESTIERÄRZTEKAMMER, 2015). Eine Klassifizierung der Erregerisolate in „sensitiv“ oder „resistent“ kann über den Vergleich ihrer MIC mit den sogenannten „Clinical Breakpoints“ vorgenommen werden. Diese werden in Europa zum Beispiel vom *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) veröffentlicht. Sie definieren diejenige MIC eines Erregers, bei der die Behandlung eines Patienten mit dem jeweiligen Antibiotikum mit hoher Wahrscheinlichkeit zu einem klinischen Behandlungserfolg führt. Isolate deren MIC oberhalb der definierten Grenzwerte liegen, gelten dagegen als resistent (BYWATER et al., 2006; TURNIDGE und PATERSON, 2007). Dieser Ansatz ist vor allem im klinischen Kontext, also zum Treffen individueller Behandlungsentscheidungen, relevant. Sollen dagegen, wie in der vorliegenden Studie, diejenigen Blutplasmakonzentrationen definiert werden, die für eine effektive Bekämpfung der Krankheitserreger erforderlich sind, so ist vor allem die Verteilung der MIC-Werte verschiedener Erregerisolate von Interesse. Hierdurch kann die Empfindlichkeit der Gesamtpopulation der relevanten Erreger, zum Beispiel innerhalb einer Spezies oder einer bestimmten Region, abgeschätzt werden. Voraussetzung ist die Bestimmung der MIC-Werte einer ausreichend hohen Anzahl von Isolaten aus der Zielpopulation. Häufig verwendete Bewertungsparameter sind die MIC₅₀ und MIC₉₀. Sie sind definiert als die niedrigsten Wirkstoffkonzentrationen, welche das Wachstum von 50 bzw. 90 % der untersuchten Stämme hemmen (SCHWARZ et al., 2010).

Wichtigste Indikation für den Einsatz von Penicillin G und Penicillin V bei der Pute ist die Bekämpfung von enteralen Infektionen mit *Clostridium perfringens*, dem Erreger der Nekrotisierenden Enteritis (NE). Die in dieser Studie gemessenen Blutplasmaspiegel der Penicilline sollten deshalb nachfolgend anhand der MIC₉₀ von aus Puten und Hühnern isolierten *Clostridium perfringens*-Stämmen bewertet werden. Zur Bestimmung dieser Grenzwerte standen allerdings nur begrenzte Informationen zur Verteilung der MIC-Werte von Erregerisolaten zur Verfügung. Die Sensitivität von insgesamt 100 *Clostridium perfringens*-Isolaten, welche aus kommerziellen Putenhaltungen in Deutschland stammten, gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Wirkstoffen wurde im Jahr 2011 untersucht (GAD et al., 2011). Hierbei wurde unter anderem die MIC₉₀ für Penicillin G und Amoxicillin bestimmt. Für Penicillin G lag die MIC₉₀ bei 0,250 µg/ml. Allerdings zeigten 86 %

der Isolate schon in einem Bereich von 0,125 µg/ml eine vollständige Wachstumshemmung. Dazwischenliegende Antibiotikakonzentrationen wurden nicht getestet. Bei Untersuchungen in Kanada wurde die MIC bei Isolaten aus Puten (50 Isolate) und Hühnern (100 Isolate) ermittelt (SLAVIĆ et al., 2011). Hier wurden bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,120 µg/ml 94 bzw. 97 % der Isolate im Wachstum gehemmt. Für Amoxicillin wurde die MIC von Gad et al. (2011) nur bis zu einer Konzentration von 2 µg/ml untersucht. In diesem Bereich waren noch 100 % der Isolate empfindlich. Bei Untersuchungen an Broilern in Belgien (n = 44) wurde für Amoxicillin eine bimodale Verteilung der MIC-Werte gesehen. Während die Mehrheit der Isolate (63 %) auch bei einer Wirkstoffkonzentration von 0,06 µg/ml noch eine vollständige Hemmung zeigte, wurde für ein Viertel der Isolate eine MIC von 0,250 µg/ml bestimmt. Die MIC₉₀ lag somit bei 0,250 µg/ml (MARTEL et al., 2004). Amoxicillin wird außerdem noch bei einer Reihe anderer systemischen Infektionen eingesetzt, wobei nicht für alle Erreger spezifische MIC-Werte bekannt sind. In einer im Jahr 2004 durchgeführten Studie an Hühnern wurde eine Konzentration von 0,250 µg/ml als therapeutischer Grenzwert festgelegt, welcher für eine Mehrheit aller relevanten Erreger gelten soll (ABO EL-SOUD et al., 2004). Für Penicillin V liegen für Erreger beim Geflügel keine Informationen über MIC-Werte vor, sodass kein Grenzwert festgelegt werden kann. In der Folge werden deshalb lediglich die erreichten Blutplasmakonzentrationen im Vergleich mit den beiden anderen untersuchten Penicillinen dargestellt. Eine Ableitung der therapeutischen Effektivität der erreichten Wirkstoffkonzentrationen ist daraus jedoch nicht möglich. Für Amoxicillin wird in der Folge als Grenzwert die MIC₉₀ von 0,250 µg/ml verwendet. Für Penicillin G wird eine Grenzkonzentration von 0,125 µg/ml festgelegt. Diese entspricht der MIC₉₀ der von Slavić et al. (2011) durchgeführten Untersuchungen. Nach Gad et al. (2011) werden bei diesen Wirkstoffkonzentrationen etwa 86 % der Erreger erfasst. Vergleichbare Werte für die MIC₉₀ wurden auch beim Menschen anhand von 10 *Cl. perfringens*-Isolaten ermittelt (GOLDSTEIN et al., 2003).

Neben der MIC eines Erregers sind auch die Anforderungen eines Wirkstoffes an den zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentration von Bedeutung. Penicilline zählen zu den zeitabhängigen Antibiotika. Um eine effektive Hemmung des Erregerwachstums zu erreichen, muss die Wirkstoffkonzentration oberhalb der MIC für einen ausreichend langen Zeitraum zwischen zwei Applikationsintervallen aufrechterhalten werden. *In-vivo* sind hierfür in der Regel Konzentrationen

oberhalb der MIC über 40 – 50 % des Dosierungsintervalles nötig (CRAIG, 1998; FRIMODT-MOLLER, 2002; LEVISON und LEVISON, 2009). Betrachtet man das beim Geflügel übliche Dosierungsintervall von 24 h, so entspricht das einem Zeitraum von 9,6 – 12 h. Bei stark immungeschwächten Patienten liegt die erforderliche $t > MIC$ zudem deutlich höher bei 90 – 100 % (TURNIDGE, 1998).

Nach intravenöser Eingabe wurde für Amoxicillin eine Plasmakonzentration oberhalb der festgelegten MIC von 0,250 µg/ml für mindestens 2 h erreicht. Zu diesem Zeitpunkt lagen die gemessenen Konzentrationen von Amoxicillin im Schnitt bei 0,350 µg/ml (0,230 – 0,566 µg/ml). Bei einer Eliminationshalbwertszeit von 23 min wird die MIC von 0,250 µg/ml im Durchschnitt nach ca. 2,2 h erreicht. Aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit fallen auch die Einzeltiere mit der zum Zeitpunkt 2 h noch höheren Plasmakonzentration voraussichtlich innerhalb von 25 min unter diesen Grenzwert. Die Plasmakonzentrationen von Penicillin G lagen zum Zeitpunkt 2 h mit durchschnittlich 0,047 µg/ml schon deutlich unterhalb der definierten MIC von 0,125 µg/ml. Da nach 1 h noch Konzentrationen von durchschnittlich 0,303 µg/ml (0,244 – 0,366 µg/ml) gemessen wurden, wird die MIC etwa nach ca. 1,3 – 1,5 h unterschritten. Bei der Beurteilung des Konzentrationsverlaufs ist jedoch zu berücksichtigen, dass Penicillin G mit 9 mg/kg KM im Vergleich zu Penicillin V (20 mg/kg KM) und Amoxicillin (17,4 mg/kg KM) in einer niedrigeren Konzentration eingesetzt wurde. Für Penicillin V lagen die gemessenen Konzentrationen zum Zeitpunkt 1 h bei durchschnittlich 0,757 µg/ml (0,455 – 0,909 µg/ml), nach 2 h bei 0,167 µg/ml (0,083 – 0,268 µg/ml).

Die orale Eingabe führte bei allen Penicillinen zu einer Verlängerung der Eliminationshalbwertszeit und somit zu einer langsameren Abflutung der Wirkstoffspiegel im Blut. Dieser Effekt war bei Penicillin V am stärksten sichtbar. Die 4 h nach der Behandlung gemessenen Konzentrationen lagen mit im Schnitt 0,169 µg/ml (0,084 – 0,266 µg/ml) im Bereich der nach i.v. Injektion schon nach 2 h erreichten Werte. Für Amoxicillin wurden 2 h nach der Behandlung noch Konzentrationen im Bereich von 1,103 µg/ml gemessen, wobei hier starke individuelle Unterschiede beobachtet wurden (0,515 – 1,471 µg/ml). Nach 4 h waren die Konzentrationen aller Tiere dagegen unter die MIC gefallen. Die MIC_{90} wird hier vermutlich individuell unterschiedlich im Schnitt nach ca. 3 h unterschritten. Bemerkenswert ist, dass für Penicillin G trotz der geringen oralen Bioverfügbarkeit von 10 %,

der geringeren Dosierung und den im Vergleich zu Penicillin V und Amoxicillin deutlich geringeren maximalen Plasmakonzentrationen für einen Zeitraum von ca. 2 h Konzentrationen im Bereich der MIC von 0,125 µg/ml erreicht wurden. Zum Messzeitpunkt 2 h lag die durchschnittliche Konzentration bei 0,108 µg/ml (0,078 – 0,143 µg/ml). Die Plasmakurven zeigten allerdings einen stark schwankenden Verlauf. Hierdurch wurde bei einigen Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb dieser Zeitspanne die MIC unterschritten, bevor es wieder zu einem Anstieg der Plasmakonzentrationen kam. Bei einem Einzeltier (Tier Nr. 7) wurde die Zielkonzentration zu keinem Zeitpunkt erreicht, die maximale Plasmakonzentration lag hier nach 30 min bei nur 0,09 µg/ml.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass für das Erreichen einer effektiven Wirkstoffkonzentration im Blutplasma bei der Pute die orale Eingabe der Penicilline der i.v. Injektion überlegen ist. Durch die verzögerte Resorption der Wirkstoffe werden nach oraler Eingabe Blutspiegel oberhalb der MIC über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten. Nach i.v. Verabreichung lag die $t > MIC$ für Amoxicillin bei ca. 2,2 h, für Penicillin G bei ca. 1,4 h. Die gefundenen Unterschiede beruhen hier vor allem auf der unterschiedlichen Dosierung der Wirkstoffe sowie dem höheren scheinbaren Verteilungsvolumen von Penicillin G. Die Verteilungs- und Eliminationshalbwertszeiten waren dagegen vergleichbar. Auch für Penicillin V ist das hohe scheinbare Verteilungsvolumen von Bedeutung. Dieses führt im Vergleich zu Amoxicillin bei ähnlicher Dosierung nach 2 h zu deutlich niedrigeren Wirkstoffspiegeln. Nach der oralen Verabreichung lag die $t > MIC$ für Amoxicillin bei durchschnittlich ca. 3 h, für Penicillin G bei 2 h. Trotz einer verlängerten Eliminationsphase wird im Falle von Penicillin G die Zeit oberhalb der MIC nach oraler Eingabe durch die geringe Bioverfügbarkeit begrenzt. Bei Penicillin V waren die zum Zeitpunkt 2 und 4 h erreichten Plasmaspiegel nach oraler Eingabe dagegen deutlich erhöht.

Bei einem üblichen Dosierungsintervall von 24 h konnte in keinem Fall die Minimalvorgabe von $t > MIC = 40 - 50 \%$, entsprechend 9,6 – 12 h erreicht werden. Allerdings ist zu beachten, dass in der Praxis keine einmalige orale Applikation, sondern eine kontinuierliche Medikation über das Trinkwasser erfolgt. Prinzipiell könnte hier durch die auf den Tag verteilte mehrmalige Aufnahme der Wirkstoffe die Zeit oberhalb der MIC verlängert werden. Puten nehmen während der nächtlichen

Dunkelperiode üblicherweise kein Trinkwasser auf, während der Tageslichtperiode dagegen im Schnitt alle 35 min (SANTOS et al., 1997). Entscheidend ist bei dieser tierartigen Besonderheit in der Flüssigkeitsaufnahme, ob tagsüber nach mehrmaliger Aufnahme kleiner Trinkwassermengen ausreichende Plasmakonzentrationen oberhalb der MIC erreicht werden. Dabei spielen neben der Wirkstoffkonzentration im Tränkwasser zusätzliche Einflussfaktoren eine Rolle, zum Beispiel die Löslichkeit und Stabilität der Wirkstoffe im Wasser, die Photoperiode, das verwendete Tränkesystem, Veränderungen der Palatabilität des Trinkwassers durch Zugabe der Wirkstoffe, Veränderungen der Umgebungstemperatur sowie individuelle, krankheitsbedingte und altersbedingte Unterschiede im Trinkverhalten (SANTOS et al., 1997; VERMEULEN et al., 2002). Um eine abschließende Beurteilung der derzeit verwendeten Dosierungen vornehmen zu können, wären weitere Untersuchungen mit Bestimmung der Blutplasmakonzentrationen nach Verabreichung der Penicilline übers Trinkwasser erforderlich.

Schließlich stellt der mögliche Einfluss der Plasmaproteinbindung auf die antimikrobielle Aktivität der Penicilline einen kritischen Aspekt dar. Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde eine Plasmaproteinbindung von 84 bzw. 80 % für Penicillin G und Penicillin V und von 15 % für Amoxicillin festgestellt. Da das verwendete ELISA-System die Gesamtkonzentration der Penicilline im Blut erfasst, *in-vivo* aber nur der ungebundene Anteil auf die Bakterien wirken kann, muss davon ausgegangen werden, dass die effektiven Plasmakonzentrationen, insbesondere für die stark gebundenen Penicilline G und V, deutlich niedriger als die hier bestimmten Werte liegen. Die Beeinflussung der antimikrobiellen Wirksamkeit von Antibiotika durch das Ausmaß ihrer Plasmaproteinbindung ist insbesondere für β -Laktame *in-vitro* gezeigt worden (KUNIN, 1966; KUNIN et al., 1973).

In der Praxis ist außerdem der gewünschte Wirkort der Penicilline, also der Ort der Infektion innerhalb des Tierkörpers von Bedeutung. Die erreichten Blutplasmaspiegel sind vor allem bei systemischen Erkrankungen mit vorliegender Bakteriämie oder bei septikämischem Verlauf von Bedeutung. Liegt die Infektion primär innerhalb bestimmter Körpergewebe, wie zum Beispiel bei Atemwegsinfekten oder einer Hepatitis, sind dagegen die hier erreichten Gewebespiegel der Medikamente entscheidend. Da die Konzentrationen in der interstitiellen Gewebsflüssigkeit

nur schwer bestimmt werden können, wird eine Abschätzung über die erreichten Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma unter Zuhilfenahme pharmakokinetischer Annahmen vorgenommen (CRAIG, 1998). Bei enteralen Infektionen sind zusätzlich die innerhalb des Magen-Darm-Inhaltes vorliegenden Penicillinkonzentrationen von Interesse. Im Falle der Clostridieninfektionen interessieren insbesondere die im Dünndarm gefundenen Konzentrationen. Die Penicilline können dabei das Darmlumen auf verschiedenen Wegen erreichen. Nach der oralen Verabreichung kann zum Beispiel aufgrund einer unvollständigen oder verzögerten Resorption ein Teil der verabreichten Menge im Darmtrakt verbleiben und hier seine Wirkung ausüben. In der apikalen Membran der Enterozyten liegende Efflux-Transporter können die Wirkstoffe zudem nach ihrer Aufnahme wieder zurück ins Darmlumen transportieren, bevor sie den systemischen Blutkreislauf erreichen (CHAN et al., 2004; HUNTER und HIRST, 1997). Durch die biliäre Exkretion in aktiver Form können Penicilline auch nach erfolgter Resorption oder nach parenteraler Applikation den Darm erreichen. Die bei Hühnern beschriebene Anreicherung von Penicillin G in der Galle könnte auf eine größere Bedeutung der biliären Elimination von Penicillinen beim Geflügel im Vergleich zum Säuger hinweisen (YONEZAWA, 1973). Eine weitere Möglichkeit der Ausscheidung stellt auch die intestinale Sekretion von Substanzen in das Darmlumen dar. Hierbei werden Stoffe aus dem systemischen Blutkreislauf aktiv zurück ins Darmlumen transportiert (CHAN et al., 2004; MUTSCHLER et al., 2013).

Da die Bekämpfung von enteralen Infektionen bei der Pute die häufigste Indikation für den Einsatz antibakterieller Wirkstoffe darstellt (LANUV NRW, 2014), sollen in aktuell laufenden weiterführenden Untersuchungen die Darmkonzentrationen der Penicilline im Zeitverlauf nach oraler Eingabe untersucht werden. Gleichzeitig werden auch die erreichten Konzentrationen in verschiedenen Körpergeweben erfasst. Hierdurch können weitere Erkenntnisse über die Verteilung der Penicilline gewonnen werden, welche sich in der hier vorgestellten Arbeit für die drei Stoffe sehr unterschiedlich darstellte. Ein weiterer Forschungsansatz wäre auch ein Vergleich der Darmkonzentrationen der Penicilline nach i.v. Applikation. Die in diesem Fall nachgewiesenen Konzentrationen wären dann alleine durch die biliäre Elimination und aktive Sekretion der Penicilline bedingt.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die pharmakokinetischen Parameter von drei häufig bei der Pute eingesetzten Wirkstoffe aus der Gruppe der Penicilline – Penicillin G, Penicillin V und Amoxicillin – bestimmt. Hierfür wurde ein sensitives ELISA-System etabliert, das den sicheren Nachweis der Penicilline im Blutplasma von Puten gewährleistet.

Obwohl die untersuchten Penicilline bei der Pute seit langem im großen Maßstab therapeutisch eingesetzt werden, erfolgt ihre Anwendung nach wie vor ohne Kenntnis der grundlegenden pharmakokinetischen Parameter, die den zeitlichen Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen am Wirkort abschätzen lassen. Diese sind jedoch für die Festlegung geeigneter Dosierungsschemata nötig, um eine möglichst umfassende Wirksamkeit bei gleichzeitiger Minimierung des Risikos einer Resistenzentwicklung zu erreichen. Für die sensitive und sichere Quantifizierung der Wirkstoffe wurde ein bisher für den Nachweis von Penicillinen in Milchproben genutztes ELISA-Protokoll für deren Nachweis in Putenplasma modifiziert und umfassend validiert. Die im ELISA eingesetzten monoklonalen Antikörper sind hochspezifisch für die aktive Form der jeweiligen Penicilline. Kreuzreaktivitäten zu Penicillinmetaboliten oder Bestandteilen des Plasmas lagen nicht vor. Die Nachweisgrenze des ELISA-Systems lag bei 3,8 (Penicillin G), 7,0 (Penicillin V) und 8,7 ng/ml (Amoxicillin). Der Arbeitsbereich des ELISA-Systems lag für Penicillin G in einem Bereich von 5,5 – 100 ng/ml, für Penicillin V bei 13,5 – 100 ng/ml und für Amoxicillin bei 25 – 100 ng/ml. In diesen Bereichen wurden die Zielvorgaben für die Linearität (90 – 110 %), Wiederfindungsrate (80 – 120 %) sowie Intra- und Inter-Assay-Variabilität ($CV \leq 15\%$) eingehalten. Der zeitliche Verlauf der Wirkstoffkonzentrationen im Blutplasma wurde im Tierversuch mit einer Gruppengröße von 6 + 1 Tier pro Wirkstoff und Verabreichungsform nach einmaliger intravenöser und oraler Applikation therapeutischer Dosierungen bestimmt. Aus diesen Daten wurden schließlich die grundlegenden pharmakokinetischen Parameter mithilfe einer Nicht-Kompartiment-Analyse abgeleitet. Alle Penicilline zeigten eine schnelle Verteilungs- und Eliminationsphase, mit Verteilungs- und

Eliminationshalbwertszeiten von 5,8 – 7,1 bzw. 22,4 – 25,3 min. Pharmakologisch relevante Unterschiede zwischen den einzelnen Penicillinen wurden insbesondere beim scheinbaren Verteilungsvolumen beobachtet. Dieses lag für Amoxicillin bei 543 ml/kg, während sich Penicillin G (1.108 ml/kg) und Penicillin V (1.967 ml/kg) offenbar stärker im Gewebe anreichern. Die gewonnenen pharmakokinetischen Daten erlauben nun eine Überprüfung der klinischen Wirksamkeit derzeitiger Dosierungsschemata für verschiedene bakterielle Infektionserreger.

7 Summary

Determination of Pharmacokinetic Parameters of Penicillins in Turkeys

In the present study, pharmacokinetic parameters for three penicillin antibiotics frequently used in turkeys – penicillin G, penicillin V and amoxicillin – were determined. Furthermore, a sensitive ELISA system for the detection and quantification of penicillins in turkey blood plasma was established.

Even though penicillins are among the most frequently used antibiotics in turkey medicine, information regarding their pharmacokinetic behavior and dose-response-relationships in this species are limited. These are essential for determination of appropriate dosage regimens, which allow for effective therapy while minimizing the risk of resistance selection in bacterial pathogens. For the sensitive and precise detection and quantification of the antimicrobials, we adapted an ELISA protocol, which had previously been used for detection of various penicillins in milk samples, for use with turkey blood plasma. The ELISA was validated for penicillin G, penicillin V and amoxicillin. The monoclonal antibodies used proved to be highly specific for the active penicillins. No cross-reactivity was observed with main penicillin metabolites or plasma components. The limit of detection for the system was determined to be 3,8 (penicillin G), 7 (penicillin V) and 8,7 ng/ml (amoxicillin). The working range of the ELISA-system was 5,5 – 100 ng/ml for penicillin G, 13,5 – 100 ng/ml for penicillin V and 25 – 100 ng/ml for amoxicillin. Within this range, target values for linearity (90 – 110 %), recovery (80 – 120 %) and intra- and inter-assay-variability ($CV \leq 15\%$) were met. Concentration-time-data of the penicillins in turkey blood plasma following oral and intravenous administration was determined in an animal trial. Groups were made up of 6 + 1 animals for each penicillin. Basic pharmacokinetic parameters were calculated from the obtained data using non-compartmental analysis. All penicillins showed rapid distribution and elimination, illustrated by short distribution and elimination half-lives of 5,8 – 7,1 and 22,4 – 25,3 min, respectively. Principle differences between the three penicillins could be seen regarding their apparent volume of distribution. This

was calculated to be only 543 ml/kg for amoxicillin, while much higher values were obtained for penicillin G (1.108 ml/kg) and penicillin V (1967 ml/kg), indicating an increased distribution into body tissues. The pharmacokinetic data obtained in this study can now be used to evaluate current dosage regimens for several bacterial pathogens.

Literaturverzeichnis

2002/657/EG (2002) *Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=CELEX:32002D0657>.

2007/526/EG (2007) *Empfehlung der Kommission vom 18. Juni 2007 mit Leitlinien für die Unterbringung und Pflege von Tieren, die für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendet werden*. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A32007H0526>.

2010/63/EU (2010) *Richtlinie 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere*. URL <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/HTML/?uri=CELEX:32010L0063&rid=1>.

ABDEL-RAHMAN S.M. und KAUFFMAN R.E. (2004) *The integration of pharmacokinetics and pharmacodynamics: understanding dose-response*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **44**: 111–36.

ABO EL-SOUD K., AL-TARAZI Y.H. und AL-BATAINEH M.M. (2004) *Comparative pharmacokinetics and bioavailability of amoxicillin in chickens after intravenous, intramuscular and oral administrations*. *Vet Res Commun* **28**(7): 599–607.

ABRAHAM E.P. und CHAIN E. (1940) *An enzyme from bacteria able to destroy penicillin*. *Nature* **146**: 837–837.

ABRAHAM E.P., CHAIN E., FLETCHER C.M., GARDNER A.D., HEATLEY N.G., JENNINGS M.A. und FLOREY H.W. (1941) *Originally published as Volume 2, Issue 6155 FURTHER OBSERVATIONS ON PENICILLIN*. *Lancet* **238**(6155): 177–189.

- AHMAD I., HUANG L., HAO H., SANDERS P. und YUAN Z. (2016) *Application of PK/PD Modeling in Veterinary Field: Dose Optimization and Drug Resistance Prediction*. Biomed Res Int **2016**: 5465678.
- ALBARELLOS G.A. und LANDONI M.F. (2009) *Current concepts on the use of antimicrobials in cats*. Vet J **180**(3): 304–316.
- ANADÓN A., MARTINEZ-LARRAÑAGA M.R., DIAZ M.J., BRINGAS P., FERNANDEZ M.C., MARTINEZ M.A. und FERNANDEZ-CRUZ M.L. (1996) *Pharmacokinetics of amoxicillin in broiler chickens*. Avian Pathol **25**(3): 449–58.
- ANDREWS J.M. (2001) *Determination of minimum inhibitory concentrations*. J Antimicrob Chemother **48**(suppl 1): 5–16.
- ARMBRUSTER D.A. und PRY T. (2008) *Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation*. Clin Biochem Rev **29 Suppl 1**: S49–52.
- BABIC M., HUJER A.M. und BONOMO R.A. (2006) *What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases*. Drug Resist Updat **9**(3): 142–56.
- BAGGOT J.D., LOVE D.N., LOVE R.J., RAUS J. und ROSE R.J. (1990) *Oral dosage of penicillin V in adult horses and foals*. Equine Vet J **22**(4): 290–1.
- BALOUIRI M., SADIKI M. und IBNSOUDA S.K. (2016) *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review*. J Pharm Anal **6**(2): 71–79.
- BENET L.Z. (1978) *Effect of route of administration and distribution on drug action*. J Pharmacokinet and Bioph **6**(6): 559–585.
- BENET L.Z. und HOENER B.A. (2002) *Changes in plasma protein binding have little clinical relevance*. Clin Pharmacol Ther **71**(3): 115–121.
- BENGTSSON B., JACOBSSON S.O., LUTHMAN J. und FRANKLIN A. (1997) *Pharmacokinetics of penicillin-G in ewes and cows in late pregnancy and in early lactation*. J Vet Pharmacol Ther **20**(4): 258–61.

- BERENDSEN B.J., GERRITSEN H.W., WEGH R.S., LAMERIS S., VAN SEBILLE R., STOLKER A.A. und NIELEN M.W. (2013) *Comprehensive analysis of ss-lactam antibiotics including penicillins, cephalosporins, and carbapenems in poultry muscle using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry*. *Anal Bioanal Chem* **405**(24): 7859–74.
- BERGOGNE-BEREZIN E. (2002) *Clinical role of protein binding of quinolones*. *Clin Pharmacokinet* **41**(10): 741–50.
- BEVERIDGE T.J. (1999) *Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles*. *J Bacteriol* **181**(16): 4725–33.
- BLACKBURN R. und PRASHAD D. (1990) *The avian renal portal system: a model for studying nephrotoxicity of xenobiotics*. *Toxicol Lett* **53**(1): 219–221.
- BRANDSCH M., KNÜTTER I. und BOSSE-DOENECKE E. (2008) *Pharmaceutical and pharmacological importance of peptide transporters*. *J Pharm Pharmacol* **60**(5): 543–585.
- BRETSCHNEIDER B., BRANDSCH M. und NEUBERT R. (1999) *Intestinal transport of beta-lactam antibiotics: analysis of the affinity at the H⁺/peptide symporter (PEPT1), the uptake into Caco-2 cell monolayers and the transepithelial flux*. *Pharm Res* **16**(1): 55–61.
- BRITISH SOCIETY FOR ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY (1991) *A guide to sensitivity testing. Report of the Working Party on Antibiotic Sensitivity Testing of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy*. *J Antimicrob Chemother* **27 Suppl D**: 1–50.
- BUNDESTIERÄRZTEKAMMER (2015) *Leitlinien für den sorgfältigen Umgang mit antibakteriell wirksamen Tierarzneimitteln*. URL http://www.bundestieraerztekammer.de/downloads/btk/leitlinien/Antibiotika-Leitlinien_01-2015.pdf.
- BURROWS M.E., BRAUN E.J. und DUCKLES S.P. (1983) *Avian renal portal valve: a reexamination of its innervation*. *Am J Physiol* **245**(4): H628–34.

- BYERS J.P. und SARVER J.G. (2009) *Pharmacokinetic Modeling*. HACKER M., MESSER W.S. und BACHMANN K.A., eds., *Pharmacology: Principles and Practice*, 201–278. Elsevier Inc.
- BYWATER R., SILLEY P. und SIMJEE S. (2006) *Antimicrobial breakpoints-definitions and conflicting requirements*. *Vet Microbiol* **118**(1-2): 158–9.
- CALDWELL J., GARDNER I. und SWALES N. (1995) *An introduction to drug disposition: the basic principles of absorption, distribution, metabolism, and excretion*. *Toxicol Pathol* **23**(2): 102–14.
- CARCELES C.M., VICENTE M.S. und ESCUDERO E. (1995) *Pharmacokinetics of amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and intramuscular administration to turkeys and chickens*. *Avian Pathol* **24**(4): 643–52.
- CARVALHO V.M. (2012) *The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **883-884**: 50–8.
- CASE M. und EINERSON J. (2004) Appendix B - Statistical Methods used in the Idaho National Engineering and Environmental Laboratory Annual Site Environmental Report. Report, U.S. Department of Energy Idaho Operations Office. URL <http://www.gsseser.com/annuals/2003/2003Annual.htm>.
- CAWELLO W. und ANTONUCCI T. (1997) *The Correlation Between Pharmacodynamics and Pharmacokinetics: Basics of Pharmacokinetics-Pharmacodynamics Modeling*. *J Clin Pharmacol* **37**(S1): 65S–69S.
- CAZORLA-REYES R., ROMERO-GONZALEZ R., FRENICH A.G., RODRIGUEZ MARESCA M.A. und MARTINEZ VIDAL J.L. (2014) *Simultaneous analysis of antibiotics in biological samples by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. *J Pharm Biomed Anal* **89**: 203–12.
- CHAIN E., FLOREY H.W., GARDNER A.D., HEATLEY N.G., JENNINGS M.A., ORR-EWING J. und SANDERS A.G. (1940) *Originally published as Volume 2, Issue*

- 6104PENICILLIN AS A CHEMOTHERAPEUTIC AGENT. *Lancet* **236**(6104): 226–228.
- CHAN L.M., LOWES S. und HIRST B.H. (2004) *The ABCs of drug transport in intestine and liver: efflux proteins limiting drug absorption and bioavailability*. *Eur J Pharm Sci* **21**(1): 25–51.
- CHAPLIN S.B., RAVEN J. und DUKE G.E. (1992) *The influence of the stomach on crop function and feeding behavior in domestic turkeys*. *Physiol Behav* **52**(2): 261–266.
- CHEN Y., CHEN Q., HAN M., LIU J., ZHAO P., HE L., ZHANG Y., NIU Y., YANG W. und ZHANG L. (2016) *Near-infrared fluorescence-based multiplex lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of four antibiotic residue families in milk*. *Biosens Bioelectron* **79**: 430–434.
- CHOW B.F. und MCKEE C.M. (1945) *INTERACTION BETWEEN CRYSTALLINE PENICILLIN AND HUMAN PLASMA PROTEINS*. *Science* **101**(2612): 67–8.
- CHÁFER-PERICÁS C., MAQUIEIRA A. und PUCHADES R. (2010) *Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples*. *Trends Analyt Chem* **29**(9): 1038–1049.
- CLARKE C.R., KOCAN A.A., WEBB A.I., WANG Z. und CUDD L.A. (2001) *Intravenous pharmacokinetics of penicillin G and antipyrine in ostriches (*Struthio camelus*) and emus (*Dromaius novaehollandiae*)*. *J Zoo Wildl Med* **32**(1): 74–7.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (2004) *Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation, Approved Guideline*. CLSI document EP17. Report, CLSI.
- COLE M., KENIG M.D. und HEWITT V.A. (1973) *Metabolism of penicillins to penicilloic acids and 6-aminopenicillanic acid in man and its significance in assessing penicillin absorption*. *Antimicrob Agents Chemother* **3**(4): 463–8.

- CORTRIGHT K.A. und CRAIGMILL A.L. (2006) *Cytochrome P450-dependent metabolism of midazolam in hepatic microsomes from chickens, turkeys, pheasant and bobwhite quail*. J Vet Pharmacol Ther **29**(6): 469–76.
- COX K.L., DEVANARAYAN V., KRIAUCIUNAS A., MANETTA J., MONTROSE C. und SITTAMPALAM S. (May 2012 (Updated Dec 2014)) *Immunoassay Methods*. SITTAMPALAM G., COUSSENS N., NELSON H. und ET AL., eds., Assay Guidance Manual (Internet). Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, Bethesda (MD). URL <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/>.
- CRAIG W.A. (1998) *Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters: Rationale for Antibacterial Dosing of Mice and Men*. Clin Infect Dis **26**(1): 1–12.
- CRAIG W.A. (2003) *Basic pharmacodynamics of antibacterials with clinical applications to the use of beta-lactams, glycopeptides, and linezolid*. Infect Dis Clin North Am **17**(3): 479–501.
- CROWTHER J.R. (2001) *The ELISA guidebook*. Humana Press, Totowa, NJ.
- DANIEL H. (2004) *Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport*. Annu Rev Physiol **66**: 361–84.
- DARWISH I.A. (2006) *Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances*. Int J Biomed Sci **2**(3): 217–235.
- DERENDORF H. (2002a) *Ausscheidung*. DERENDORF H., GRAMATTÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., *Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*, volume 2, 201–209. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- DERENDORF H. (2002b) *Grundlagen der Pharmakokinetik*. DERENDORF H., GRAMATTÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., *Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*, volume 2, 17–99. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

- DERENDORF H. (2002c) *Verteilung*. DERENDORF H., GRAMATTÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., *Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*, volume 2, 155–183. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- DIETRICH R., USLEBER E. und MÄRTLBAUER E. (1998) *The potential of monoclonal antibodies against ampicillin for the preparation of a multi-immunoaffinity chromatography for penicillins*. *Analyst* **123**(12): 2749–54.
- DONOWITZ G.R. und MANDELL G.L. (1988) *Beta-Lactam Antibiotics*. *New Engl J Med* **318**(7): 419–426.
- DORRESTEIN G.M. (1991) *The pharmacokinetics of avian therapeutics*. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* **21**(6): 1241–64.
- DORRESTEIN G.M., VAN GOGH H. und RINZEMA J.D. (1984) *Pharmacokinetic aspects of penicillins, aminoglycosides and chloramphenicol in birds compared to mammals. A review*. *Vet Q* **6**(4): 216–24.
- DORRESTEIN G.M., VAN GOGH H., RINZEMA J.D. und BUITELAAR M.N. (1987) *Comparative study of ampicillin and amoxycillin after intravenous, intramuscular and oral administration in homing pigeons (Columba livia)*. *Res Vet Sci* **42**(3): 343–8.
- DRAWZ S.M. und BONOMO R.A. (2010) *Three Decades of β -Lactamase Inhibitors*. *Clin Microbiol Rev* **23**(1): 160–201.
- DROUAL R., SHIVAPRASAD H.L. und CHIN R.P. (1994) *Coccidiosis and necrotic enteritis in turkeys*. *Avian Dis* **38**(1): 177–83.
- EHRNEBO M., AGURELL S., JALLING B. und BORÉUS L.O. (1971) *Age differences in drug binding by plasma proteins: Studies on human foetuses, neonates and adults*. *Eur J of Clin Pharmacol* **3**(4): 189–193.
- EICHELBAUM M. und SCHWAB M. (2013a) *Arzneistoffkonzentration im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit: Pharmakokinetik im engeren Sinn*. AKTORIES K.,

- FÖRSTERMANN U., HOFMANN F. und STARKE K., eds., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, volume 11, 63–77. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- EICHELBAUM M. und SCHWAB M. (2013b) *Wirkungen des Organismus auf Pharmaka: allgemeine Pharmakokinetik*. AKTORIES K., FÖRSTERMANN U., HOFMANN F. und STARKE K., eds., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, volume 11, 36–63. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- ELANDER R.P. (2003) *Industrial production of β -lactam antibiotics*. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**(5): 385–392.
- EMEA C.F.V.M.P. (2000) *Guidelines for the conduct of pharmacokinetic studies in target animal species*. Report. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/10/WC500004355.pdf.
- ERRECALDE J.O., CARMELY D., MARINO E.L. und MESTORINO N. (2001) *Pharmacokinetics of amoxicillin in normal horses and horses with experimental arthritis*. *J Vet Pharmacol Ther* **24**(1): 1–6.
- ESCUADERO E., VICENTE M.S. und CARCELES C.M. (1998) *Pharmacokinetics of amoxicillin/clavulanic acid combination after intravenous and intramuscular administration to pigeons*. *Res Vet Sci* **65**(1): 77–81.
- EU (2010) *Verordnung (EU) Nr. 37/2010 der Kommission vom 22. Dezember 2009 über pharmakologisch wirksame Stoffe und ihre Einstufung hinsichtlich der Rückstandshöchstmengen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs*. URL <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:DE:PDF>.
- EURACHEM GUIDE (1998) *The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*. Report. URL <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/valid.pdf>.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2000) Phenoxymethylpenicillin Summary Report. Report. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015627.pdf.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2005) Phenoxymethylpenicillin (Extension to poultry) Summary Report(2). Report. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015630.pdf.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2008) Penicillins Summary Report. Report. URL http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500015568.pdf.

EZHOV V.I. (1978) [*Ampicillin pharmacokinetics in the body of chickens*]. Veterinariia (1): 94–8.

FAN J. und DE LANNOY I.A. (2014) *Pharmacokinetics*. Biochem Pharmacol **87**(1): 93–120.

FICHTL B. (2001a) *Arzneistoffkonzentration im Organismus in Abhängigkeit von der Zeit: Pharmakokinetik im engeren Sinn*. FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., FÖRSTERMANN U. und STARKE K., eds., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, volume 8, 56–77. Urban & Fischer Verlag München - Jena.

FICHTL B. (2001b) *Pharmakokinetische Daten*. FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., FÖRSTERMANN U. und STARKE K., eds., Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, volume 8, 95–110. Urban & Fischer Verlag München – Jena.

FINDLAY J.W., SMITH W.C., LEE J.W., NORDBLOM G.D., DAS I., DESILVA B.S., KHAN M.N. und BOWSHER R.R. (2000) *Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective*. J Pharm Biomed Anal **21**(6): 1249–73.

- FINN R.K. (1959) *Theory of Agar Diffusion Methods for Bioassay*. Anal Chem **31**(6): 975–977.
- FISHER J.F., MEROUEH S.O. und MOBASHERY S. (2005) *Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity*. Chem Rev **105**(2): 395–424.
- FLEMING A. (1929) *On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae*. Br J Exp Pathol **10**(3): 226–236.
- FORNSTEDT T., FORSSÉN P. und WESTERLUND D. (2015) *Basic HPLC Theory and Definitions: Retention, Thermodynamics, Selectivity, Zone Spreading, Kinetics, and Resolution*. Analytical Separation Science. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- FREY H.H. (2002) *Schicksal von Arzneimitteln im Organismus (Pharmakokinetik)*. FREY H.H. und LÖSCHER W., eds., Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin, volume 2, 11–32. Enke Verlag, Stuttgart.
- FRIMODT-MOLLER N. (2002) *How predictive is PK/PD for antibacterial agents?*. Int J Antimicrob Agents **19**(4): 333–9.
- GABRIELSSON J. und WEINER D. (2012) *Non-compartmental analysis*. Methods Mol Biol **929**: 377–89.
- GAD W., HAUCK R., KRÜGER M. und HAFEZ H. (2011) *Determination of antibiotic sensitivities of Clostridium perfringens isolates from commercial turkeys in Germany in vitro*. Arch Geflügelkd **75**(2): 80–83.
- GILLESPIE W.R. (1991) *Noncompartmental Versus Compartmental Modelling in Clinical Pharmacokinetics*. Clin Pharmacokinet **20**(4): 253–262.
- GOLDSTEIN E.J.C., CITRON D.M., MERRIAM C.V., WARREN Y., TYRRELL K. und FERNANDEZ H.T. (2003) *In Vitro Activities of Dalbavancin and Nine Comparator Agents against Anaerobic Gram-Positive Species and Corynebacteria*. Antimicrob Agents Chemother **47**(6): 1968–1971.

- GRAMATTÉ T. (2002a) *Metabolismus*. DERENDORF H., GRAMATTÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie, volume 2, 184–200. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- GRAMATTÉ T. (2002b) *Resorption*. DERENDORF H., GRAMATTÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie, volume 2, 100–124. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- GRUBELNIK A., PADESTE C. und TIEFENAUER L. (2001) *Highly Sensitive Enzyme Immunoassays for the Detection of β -Lactam Antibiotics*. Food Agric Immunol **13**(3): 161–169.
- GUGGENBICHLER J.P. und KIENEL G. (1979) [*Bioavailability of orally administered antibiotics: influences of food on resorption (author's transl)*]. Padiatr Padol **14**(1): 69–74.
- HAFEZ H.M. und HINZ K.H. (2012) *Ornithobakteriose*. SIEGMANN O. und NEUMANN U., eds., Kompendium der Geflügelkrankheiten, volume 7, 270–272. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover.
- HATANO K. (2003) [*Simultaneous determination of five penicillins in muscle, liver and kidney from slaughtered animals using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry*]. Shokuhin Eiseigaku Zasshi **44**(1): 1–6.
- HERMO M.P., SAURINA J., BARBOSA J. und BARRÓN D. (2014) *High-resolution mass spectrometry applied to the study of metabolome modifications in various chicken tissues after amoxicillin administration*. Food Chem **153**: 405–413.
- HEWITT W. und VINCENT S. (1989) Theory and application of microbiological assay. Acad. Press, San Diego [u.a.].
- HINZ K.H. (2012) *Nekrotisierende Enteritis (NE)*. SIEGMANN O. und NEUMANN U., eds., Kompendium der Geflügelkrankheiten, volume 7, book section Bakterien,

273–276. Schlütersche Verlagsgesellschaft, Hannover.

HIRSH D.C., KNOX S.J., CONZELMAN J. G. M. und WIGER N. (1978) *Pharmacokinetics of penicillin G in the turkey*. Am J Vet Res **39**(7): 1219–21.

HODGSON J. (2001) *ADMET – turning chemicals into drugs*. Nat Biotech **19**(8): 722–726.

HORSPOOL L.J. und MCKELLAR Q.A. (1995) *Disposition of penicillin G sodium following intravenous and oral administration to Equidae*. Br Vet J **151**(4): 401–12.

HOU J.P. und POOLE J.W. (1971) *beta-lactam antibiotics: their physicochemical properties and biological activities in relation to structure*. J Pharm Sci **60**(4): 503–32.

HUNTER J. und HIRST B.H. (1997) *Intestinal secretion of drugs. The role of P-glycoprotein and related drug efflux systems in limiting oral drug absorption*. Adv Drug Deliv Rev **25**(2): 129–157.

HUNTER R.P., MAHMOOD I. und MARTINEZ M.N. (2008) *Prediction of xenobiotic clearance in avian species using mammalian or avian data: how accurate is the prediction?*. J Vet Pharmacol Ther **31**(3): 281–4.

HUPE K.P. (1985) *Fundamental Chromatographic Relationships*. HENSCHEN A., HUPE K.P., LOTTSPREICH F. und VOELTER W., eds., High Performance Liquid Chromatography in Biochemistry, 1–13. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.

ICH (1994/96) ICH Harmonised Tripartite Guideline – Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2R1. Report. URL <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>.

ISO 5725/1 (1994) *Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results — Part 1: General principles and definitions*. URL <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:5725:-1:ed-1:v1:en>.

- JERZSELE A., NAGY G., LEHEL J. und SEMJEN G. (2009) *Oral bioavailability and pharmacokinetic profile of the amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and oral gavage administration in broiler chickens*. J Vet Pharmacol Ther **32**(5): 506–9.
- JERZSELE A., NAGY G. und SEMJEN G. (2011) *Oral bioavailability and pharmacokinetic profile of the amoxicillin-clavulanic acid combination after intravenous and oral administration in Turkeys*. J Vet Pharmacol Ther **34**(2): 202–5.
- JIAO S.N., WANG P., ZHAO G.X., ZHANG H.C., LIU J. und WANG J.P. (2013) *Synthesis of novel hapten and production of generic monoclonal antibody for immunoassay of penicillins residues in milk*. J Environ Sci Health B **48**(6): 486–494.
- KANDEEL M. (2015) *Pharmacokinetics and oral bioavailability of amoxicillin in chicken infected with caecal coccidiosis*. J Vet Pharmacol Ther **38**(5): 504–7.
- KAUR S.P., RAO R. und NANDA S. (2011) *AMOXICILLIN: A BROAD SPECTRUM ANTIBIOTIC*. Int J Pharm Pharm Sci **3**(3): 30–37.
- KEEN P.M. (1965) *The binding of three penicillins in the plasma of several mammalian species as studied by ultrafiltration at body temperature*. Br J Pharmacol Chemother **25**(2): 507–14.
- KRASUCKA D. und KOWALSKI C.J. (2010) *Pharmacokinetic parameters of amoxicillin in pigs and poultry*. Acta Pol Pharm **67**(6): 729–32.
- KUNG K. und WANNER M. (1994) *Bioavailability of different forms of amoxycillin administered orally to dogs*. Vet Rec **135**(23): 552–4.
- KUNIN C.M. (1966) *Clinical pharmacology of the new penicillins. 1. The importance of serum protein binding in determining antimicrobial activity and concentration in serum*. Clin Pharmacol Ther **7**(2): 166–79.
- KUNIN C.M., CRAIG W.A., KORNGUTH M. und MONSON R. (1973) *Influence of binding on the pharmacologic activity of antibiotics*. Ann N Y Acad Sci **226**: 214–24.

- LAMAR J. (2007) Entwicklung, Optimierung und Validierung eines rezeptorproteingestützten Mikrotiterplatten-Tests zur Rückstandsanalytik von β -Laktam-Antibiotika. Thesis. URL <http://elpub.bib.uni-wuppertal.de/edocs/dokumente/fbc/chemie/diss2007/lamar/dc0702.pdf>.
- LANUV NRW (2014) Evaluierung des Einsatzes von Antibiotika in der Putenmast. LANUV-Fachbericht 58. Report, Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen. URL http://www.lanuv.nrw.de/uploads/tx_commercedownloads/30058.pdf.
- LASHEV L. (1986a) *Comparative pharmacokinetic research on amoxicillin in agricultural animals..* Vet Med Nauki **23**(10): 76–82.
- LASHEV L. (1986b) *[Pharmacokinetic research with poultry]*. Vet Med Nauki **23**(2): 65–70.
- LASHEV L. (1986c) *[Pharmacokinetic research with poultry]*. Vet Med Nauki **23**(2): 65–70.
- LASHEV L.D. und PASHOV D.A. (1992) *Interspecies variations in plasma half-life of ampicillin, amoxycillin, sulphadimidine and sulphacetamide related to variations in body mass.* Res Vet Sci **53**(2): 160–4.
- LEE H.J., LEE M.H. und HAN I.K. (2000) *Application of ELISA for the Detection of Penicillin Antibiotic Residues in Live Animal.* Asian Australas J Anim Sci **13**(11): 1604–1608.
- LEE H.J., RYU P.D., LEE H., CHO M.H. und LEE M.H. (2001) *Screening for Penicillin Plasma Residues in Cattle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.* Acta Veterinaria Brno **70**: 353–358.
- LEE K.J., MOWER R., HOLLENBECK T., CASTELO J., JOHNSON N., GORDON P., SINKO P.J., HOLME K. und LEE Y.H. (2003) *Modulation of nonspecific binding in ultrafiltration protein binding studies.* Pharm Res **20**(7): 1015–21.

- LEQUIN R.M. (2005) *Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)*. Clin Chem **51**(12): 2415–8.
- LEVISON M.E. und LEVISON J.H. (2009) *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Antibacterial Agents*. Infect Dis Clin North Am **23**(4): 791–vii.
- LINDUP W.E. und ORME M.C. (1981) *Clinical pharmacology: plasma protein binding of drugs*. Brit Med J (Clinical research ed) **282**(6259): 212–214.
- LITZ S. (1995) *Entwicklung und Charakterisierung enzymimmunologischer Verfahren zum Nachweis von Penicillinen*. Thesis.
- LIVERMORE D.M. (1998) *Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control*. J Antimicrob Chemother **41 Suppl D**: 25–41.
- LODE H., JANISCH P., KUPPER G. und WEUTA H. (1974) *Comparative clinical pharmacology of three ampicillins and amoxicillin administered orally*. J Infect Dis **129**(0): suppl:S156–68.
- MACAROV C.A., TONG L., MARTÍNEZ-HUÉLAMO M., HERMO M.P., CHIRILA E., WANG Y.X., BARRÓN D. und BARBOSA J. (2012) *Multi residue determination of the penicillins regulated by the European Union, in bovine, porcine and chicken muscle, by LC-MS/MS*. Food Chem **135**(4): 2612–2621.
- MAGALDI S., MATA-ESSAYAG S., HARTUNG DE CAPRILES C., PEREZ C., COLELLA M.T., OLAIZOLA C. und ONTIVEROS Y. (2004) *Well diffusion for antifungal susceptibility testing*. Int J Infect Dis **8**(1): 39–45.
- MAHMOOD I. (2007) *Application of allometric principles for the prediction of pharmacokinetics in human and veterinary drug development*. Adv Drug Deliv Rev **59**(11): 1177–92.
- MARTEL A., DEVRIESE L.A., CAUWERTS K., DE GUSSEM K., DECOSTERE A. und HAESEBROUCK F. (2004) *Susceptibility of Clostridium perfringens strains from broiler chickens to antibiotics and anticoccidials*. Avian Pathol **33**(1): 3–7.

- MARTINEZ-LARRANAGA M.R., ANADON A., MARTINEZ M.A., DIAZ M.J., FREJO M.T., CASTELLANO V.J., ISEA G. und DE LA CRUZ C.O. (2004) *Pharmacokinetics of amoxicillin and the rate of depletion of its residues in pigs*. Vet Rec **154**(20): 627–32.
- MASIÁ A., SUAREZ-VARELA M.M., LLOPIS-GONZALEZ A. und PICÓ Y. (2016) *Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review*. Anal Chim Acta **936**: 40–61.
- MCDERMOTT W., BUNN P.A., BENOIT M., DUBOIS R. und REYNOLDS M.E. (1946) *THE ABSORPTION, EXCRETION, AND DESTRUCTION OF ORALLY ADMINISTERED PENICILLIN*. J Clin Invest **25**(2): 190–210.
- MCKINNON P.S. und DAVIS S.L. (2004) *Pharmacokinetic and pharmacodynamic issues in the treatment of bacterial infectious diseases*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**(4): 271–88.
- MONTESISSA C., CARLI S., SONZOGNI O. und GARLAPPI R. (1988) *Pharmacokinetics of sodium amoxicillin in horses*. Res Vet Sci **44**(2): 233–6.
- MORRISSEY K.M., STOCKER S.L., WITTEWIT M.B., XU L. und GIACOMINI K.M. (2013) *Renal transporters in drug development*. Annu Rev Pharmacol Toxicol **53**: 503–29.
- MOUTON J.W., AMBROSE P.G., CANTON R., DRUSANO G.L., HARBARTH S., MACGOWAN A., THEURETZBACHER U. und TURNIDGE J. (2011) *Conserving antibiotics for the future: new ways to use old and new drugs from a pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective*. Drug Resist Updat **14**(2): 107–17.
- MUSSER J.M. und ANDERSON K.L. (2001) *Bioavailability and disposition of sodium and procaine penicillin G (benzylpenicillin) administered orally with milk to calves*. J Vet Pharmacol Ther **24**(3): 161–9.
- MUTSCHLER E., GEISLINGER G., KROEMER H.K., MENZEL S. und RUTH P. (2013) *Pharmakokinetik*. Mutschler Arzneimittelwirkungen – Pharmakologie, Klinische

- Pharmakologie, Toxikologie, volume 10, 5–54. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- NATHWANI D. und WOOD M.J. (1993) *Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use.* *Drugs* **45**(6): 866–94.
- NERELLA N.G., BLOCK L.H. und NOONAN P.K. (1993) *The Impact of Lag Time on the Estimation of Pharmacokinetic Parameters. I. One-Compartment Open Model.* *Pharm Res* **10**(7): 1031–1036.
- NIELSEN P. und GYRD-HANSEN N. (1994) *Bioavailability of penicillin V after oral administration to fed and fasted pigs.* *J Vet Pharmacol Ther* **17**(2): 160–2.
- NOUWS J.F. und ZIV G. (1978) *A kinetic study of beta-lactam antibiotic residues in normal dairy cows.* *Zentralbl Veterinarmed A* **25**(4): 312–26.
- OVERBOSCH D., MATTIE H. und VAN FURTH R. (1985) *Comparative pharmacodynamics and clinical pharmacokinetics of phenoxymethylpenicillin and pheneticillin.* *Br J Clin Pharmacol* **19**(5): 657–68.
- PAGES J.M., JAMES C.E. und WINTERHALTER M. (2008) *The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria.* *Nat Rev Microbiol* **6**(12): 893–903.
- POPELKA P., NAGY J., GERMUSKA R., MARCINCÁK S., JEVINOVÁ P. und DE RIJK A. (2005) *Comparison of various assays used for detection of beta-lactam antibiotics in poultry meat.* *Food Addit Contam* **22**(6): 557–62.
- POSCHET J., HAMMOND S. und FAIRCLOUGH P. (1999) *Characterisation of penicillin G uptake in human small intestinal brush border membrane vesicles.* *Gut* **44**(5): 620–624.
- POTSCHKA H., RICHTER A. und KROKER R. (2014) *Pharmaka zur Behandlung bakterieller Infektionen.* LÖSCHER W., RICHTER A. und POTSCHKA H., eds., *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*, volume 9. Enke Verlag in MVS Medizinverlage, Stuttgart.

- PRESCOTT J.F. (2013) *Beta-lactam Antibiotics. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, 133–152. John Wiley & Sons, Inc.
- RAUCH P. (2005) *Hintergrund bei Immunoassays*. BIOForum **11/2005**: 22–24.
- RODRÍGUEZ-BAÑO J. und PASCUAL A. (2008) *Clinical significance of extended-spectrum β -lactamases*. Expert Rev Anti Infect Ther **6**(5): 671–683.
- SAKAMOTO H., HIROSE T. und MINE Y. (1985) *Pharmacokinetics of FK027 in rats and dogs*. J Antibiot (Tokyo) **38**(4): 496–504.
- SALA-RABANAL M., LOO D.D., HIRAYAMA B.A., TURK E. und WRIGHT E.M. (2006) *Molecular interactions between dipeptides, drugs and the human intestinal H⁺-oligopeptide cotransporter hPEPT1*. J Physiol **574**(Pt 1): 149–66.
- SAMANIDOU V.F., EVAGGELOPOULOU E.N. und PAPADOYANNIS I.N. (2006a) *Chromatographic analysis of penicillins in pharmaceutical formulations and biological fluids*. J Sep Sci **29**(12): 1879–908.
- SAMANIDOU V.F., EVAGGELOPOULOU E.N. und PAPADOYANNIS I.N. (2006b) *Development of a validated HPLC method for the determination of four penicillin antibiotics in pharmaceuticals and human biological fluids*. J Sep Sci **29**(11): 1550–60.
- SANTOS M.D., VERMEERSCH H., REMON J.P., SCHELKENS M., DE BACKER P., DUCATELLE R. und HAESEBROUCK F. (1997) *Administration of doxycycline hydrochloride via drinking water to turkeys under laboratory and field conditions*. Poult Sci **76**(10): 1342–8.
- SCHEIFE R.T. (1989) *Protein binding: what does it mean?*. DICP **23**(7-8 Suppl): S27–31.
- SCHWARZ S., SILLEY P., SIMJEE S., WOODFORD N., VAN DUIJKEREN E., JOHNSON A.P. und GAASTRA W. (2010) *Editorial: Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals*. J Antimicrob Chemother .

- SCHÄFER H.G. (2002) *Bioverfügbarkeit und Bioäquivalenz*. DERENDORF H., GRAMATÉ T. und SCHÄFER H.G., eds., *Pharmakokinetik – Einführung in die Theorie und Relevanz für die Arzneimitteltherapie*, volume 2, 125–154. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.
- SHAH D. und MAGHSOUDLOU D. (2016) *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): the basics*. *Br J Hosp Med (Lond)* **77**(7): C98–C101.
- SHOCKMAN G.D. und BARRETT J.F. (1983) *Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria*. *Annu Rev Microbiol* **37**: 501–27.
- SLAVIĆ , BOERLIN P., FABRI M., KLOTINS K.C., ZOETHOUT J.K., WEIR P.E. und BATEMAN D. (2011) *Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario*. *Can J Vet Res* **75**(2): 89–97.
- SMITH H.W. (1954) *Serum levels of penicillin, dihydrostreptomycin, chloramphenicol, aureomycin and terramycin in chickens*. *J Comp Pathol* **64**(3): 225–33.
- STAHLMANN R. und LODE H. (2001) *Beta-Laktam-Antibiotika*. FORTH W., HENSCHLER D., RUMMEL W., FÖRSTERMANN U. und STARKE K., eds., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, volume 8, 805–28. Urban & Fischer Verlag München - Jena.
- STAHLMANN R. und LODE H. (2013) *Beta-Laktam-Antibiotika*. AKTORIES K., FÖRSTERMANN U., HOFMANN F. und STARKE K., eds., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, volume 11, 753–772. Urban & Fischer in Elsevier, München.
- STRASSER A., USLEBER E., SCHNEIDER E., DIETRICH R., BÜRK C. und MÄRTLBAUER E. (2003) *Improved enzyme immunoassay for group-specific determination of penicillins in milk*. *Food Agric Immunol* **15**(2): 135–143.
- SUGANO K., KANSY M., ARTURSSON P., AVDEEF A., BENDELS S., DI L., ECKER G.F., FALLER B., FISCHER H., GEREBTZOFF G., LENNERNAES H. und SENNER

- F. (2010) *Coexistence of passive and carrier-mediated processes in drug transport*. Nat Rev Drug Discov **9**(8): 597–614.
- SUMMIT RESEARCH SERVICES (2005) PK Solutions Pharmacokinetics Data Analysis Version 2.0 User Guide.
- SVIHUS B. (2011) *The gizzard: function, influence of diet structure and effects on nutrient availability*. Worlds Poult Sci J **67**(02): 207–224.
- SVIHUS B. (2014) *Function of the digestive system*. J Appl Poult Res **23**(2): 306–314.
- SWARTZ M. (2010) *Seeing is Believing: Detectors for HPLC*. LCGC North America **28**(10): 880–889.
- TOMPSETT R., SHULTZ S. und MCDERMOTT W. (1947) *The Relation of Protein Binding to the Pharmacology and Antibacterial Activity of Penicillins X, G, Dihydro F, and K*. J Bacteriol **53**(5): 581–95.
- TOUTAIN P.L., FERRAN A. und BOUSQUET-MELOU A. (2010) *Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. Handb Exp Pharmacol (199): 19–48.
- TSUJI A., NAKASHIMA E., HAMANO S. und YAMANA T. (1978) *Physicochemical properties of amphoteric beta-lactam antibiotics I: Stability, solubility, and dissolution behavior of amino penicillins as a function of pH*. J Pharm Sci **67**(8): 1059–66.
- TSUJI A., TAMAI I., HIROOKA H. und TERASAKI T. (1987) *β -Lactam antibiotics and transport via the dipeptide carrier system across the intestinal brush-border membrane*. Biochem Pharmacol **36**(4): 565–567.
- TURNIDGE J.D. (1998) *The pharmacodynamics of beta-lactams*. Clin Infect Dis **27**(1): 10–22.
- TURNIDGE J.D. und PATERSON D.L. (2007) *Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints*. Clin Microbiol Rev **20**(3): 391–408, table of contents.

- VAN KRIMPEN P.C., VAN BENNEKOM W.P. und BULT A. (1987) *Penicillins and cephalosporins. Physicochemical properties and analysis in pharmaceutical and biological matrices*. Pharm Weekbl Sci **9**(1): 1–23.
- VERMEULEN B., DE BACKER P. und REMON J.P. (2002) *Drug administration to poultry*. Adv Drug Deliv Rev **54**(6): 795–803.
- VETIDATA (2016) URL www.vetidata.de.
- VOLLMERHAUS B. und SINOWATZ F. (2004) *Verdauungsapparat*. NICKEL R., SCHUMMER A. und SEIFERLE E., eds., Lehrbuch der Anatomie der Haustiere – Band V – Anatomie der Vögel, volume 3, 176–223. Parey Verlag, Stuttgart.
- TEN VOORDE G., BROEZE J., HARTMAN E.G. und VAN GOGH H. (1990) *The influence of the injection site on the bioavailability of ampicillin and amoxycillin in beagles*. Vet Q **12**(2): 73–9.
- WAIBL H. und SINOWATZ F. (2004) *Kreislaufapparat und Lymphatisches System*. NICKEL R., SCHUMMER A. und SEIFERLE E., eds., Lehrbuch der Anatomie der Haustiere – Band V – Anatomie der Vögel, volume 3, 283–330. Parey Verlag, Stuttgart.
- WAINWRIGHT M. (1989a) *Moulds in ancient and more recent medicine*. Mycologist **3**(1): 21–23.
- WAINWRIGHT M. (1989b) *Moulds in Folk Medicine*. Folklore **100**(2): 162–166.
- WALTER E., KISSEL T. und AMIDON G.L. (1996) *The intestinal peptide carrier: A potential transport system for small peptide derived drugs*. Adv Drug Deliv Rev **20**(1): 33–58.
- WARREN G.H. (1965) *The prognostic significance of penicillin serum levels and protein binding in clinical medicine. A review of current studies*. Chemotherapy **10**(6): 339–58.

- WATSON A.D., EMSLIE D.R., MARTIN I.C. und EGERTON J.R. (1986) *Effect of ingesta on systemic availability of penicillins administered orally in dogs*. J Vet Pharmacol Ther **9**(2): 140–9.
- WAXMAN D.J. und STROMINGER J.L. (1983) *Penicillin-binding proteins and the mechanism of action of beta-lactam antibiotics*. Annu Rev Biochem **52**: 825–69.
- WELLMITZ J. und GLUSCHKE M. (2005) Leitlinie zur Methodvalidierung. Umweltbundesamt, Qualitätssicherungsstelle im Bund/Länder-Messprogramm Nord- und Ostsee (BLMP), Berlin. URL <http://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/publikation/long/2832.pdf>.
- WIEGAND I., HILPERT K. und HANCOCK R.E. (2008) *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. Nat Protoc **3**(2): 163–75.
- WILKE M.S., LOVERING A.L. und STRYNADKA N.C. (2005) *Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective*. Curr Opin Microbiol **8**(5): 525–33.
- WISE R. (1983) *Protein binding of beta-lactams: the effects on activity and pharmacology particularly tissue penetration. II. Studies in man*. J Antimicrob Chemother **12**(2): 105–18.
- WOODNUTT G., BERRY V. und MIZEN L. (1995) *Effect of protein binding on penetration of beta-lactams into rabbit peripheral lymph*. Antimicrob Agents Chemother **39**(12): 2678–83.
- YEH L.C., LEE W.M., KOH B.W., CHAN J.P., LIU C.H., KAO J.P. und CHOU C.C. (2008) *Development of amoxicillin enzyme-linked immunosorbent assay and measurements of tissue amoxicillin concentrations in a pigeon microdialysis model*. Poult Sci **87**(3): 577–87.
- YONEZAWA S. (1973) *Studies on the distribution of antibiotics in the chicken body and food hygienic evaluation for antibiotic residues after administration*. Bull Azabu Vet Coll .

ZHANEL G.G., HOBAN D.J. und HARDING G.K. (1991) *The postantibiotic effect: a review of in vitro and in vivo data*. DICP **25**(2): 153–63.

ZIESING S., HEIM A. und VONBERG R.P. (2012) *Methoden der mikrobiologischen Diagnostik*. SUERBAUM S., HAHN H., BURCHARD G.D., KAUFMANN S.H.E. und SCHULZ T.F., eds., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*, volume 7. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

ZIV G., NEUMANN J., FRIDMAN J., ZIV E., SINGER N. und MESHORER A. (1979) *Effects of probenecid on blood levels and tissue distribution of ampicillin in fowls and turkeys*. Avian Dis **23**(4): 927–39.

Projekt: Pharmakokinetik von Penicillinen bei der Pute
Projektleitung: Sarah Bolda

Versuchsprotokoll – Teilversuch 1

Labor

Wirkstoff:

Datum:

Probennummer Uhrzeit Plasma (ml) Besonderheiten

Probennummer	Uhrzeit	Plasma (ml)	Besonderheiten

Durchführende Personen:

Unterschrift: _____

Definition von Abbruchkriterien (Score Sheet):

Kriterium	Bewertung (Score)		
	+	++	+++
Stressreaktionen beim Einfangen der Tiere			übermäßig starke Auslösung des Fluchtreflexes.
			übermäßige Abwehrreaktion mit Auftreten von deutlich forcierter Atmung und Dunkelfärbung der unbefiederten Kopfhaut (deutliche Zyanosezeichen).
i.v. Applikation			Befreien aus den Fixationsgriffen mit unbeherrschbaren umfangreichen Abwehrbewegungen mit den Schwingen und Hintergliedmaßen.
			übermäßig forcierter Atmung sowie Auftreten deutlicher Zyanosezeichen.
			Paravenöse Wirkstoffapplikation
			Nachblutungen mit Hämatombildung
Einführen der Sonde und Arzneimittelapplikation			Befreien aus den Fixationsgriffen mit unbeherrschbaren umfangreichen Abwehrbewegungen mit den Schwingen und Hintergliedmaßen.
			übermäßig forcierter Atmung sowie Auftreten deutlicher Zyanosezeichen.
Blutentnahme aus der V. <i>brachialis</i>			Befreien aus den Fixationsgriffen mit unbeherrschbaren umfangreichen Abwehrbewegungen mit den Schwingen und Hintergliedmaßen.

			übermäßig forcierter Atmung sowie Auftreten deutlicher Zyanoseanzeichen.
			Nachblutungen mit Hämatombildung
Unerwünschte Arzneimittelwirkungen			
Allergische Hautreaktionen	einzelne umschriebene Rötungen und Pusteln (+)		generalisiertes Exanthem. (+++)
Anaphylaxie			(+++)

Die Tiere werden bei einem kumulativen Gesamtscore von +++ aus dem Versuch genommen.

Anhang II: Pharmakokinetische Formeln

Tabelle 9.1: Zur Berechnung pharmakokinetischer Parameter genutzte Formeln.
 Auszug aus dem Benutzerhandbuch der verwendeten Software *PK Solutions 2.0TM*
 (SUMMIT RESEARCH SERVICES, 2005).

General Disposition Parameters and Constants

Dose Amount	D
Fraction of dose absorbed	F
Exponential expression for 1 st order kinetics	$C = \sum C_n e^{-\lambda_n t}$
Y-Intercept. Coefficient of each exponential term	C_n
Slope	$s = \frac{-\lambda_n}{2.303}$
Rate constant	$\lambda_n = -2.303s$
Elimination rate constant	λ_z
Absorption rate constant	λ_a
Half-life	$t_{\frac{1}{2}} = \frac{0.693}{\lambda_n}$

 Descriptive Curve Parameters

C_{initial}	$C_0 = \sum C_n$
$C_{\text{max (obs)}}$	$C_{\text{max}} = \text{maximum observed conc}$
$T_{\text{max (obs)}}$	$T_{\text{max}} = \text{time point at } C_{\text{max}}$
$C_{\text{max (calculated)}}$	$C_{\text{max}} = \frac{FD}{V} e^{-\lambda_z t_{\text{max}}}$
$T_{\text{max (calculated)}}$	$t_{\text{max}} = \frac{2.303}{\lambda_a - \lambda_z} \log \frac{\lambda_a}{\lambda_z}$
Lag time	$t_{\text{lag}} = \frac{\log C_a - \log C_z}{\frac{\lambda_a}{2.303} - \frac{\lambda_z}{2.303}}$

 Curve Area Calculations

$AUC_{(0-t)} \text{ (obs area)}$	$AUC_{0-t} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+a} - t_i}{2} (C_i + C_{i+1})$
$AUC_{\infty} \text{ (area)}$	$AUC_{\infty} = AUC_{0-t} + \frac{C_n}{\lambda_z}$
$AUC_{\infty} \text{ (expo)}$	$AUC_{\infty} = \sum \frac{C_n}{\lambda_n}$
% of $AUC_{\infty} \text{ (expo)}$	$\%AUC_{\infty} = 100 \frac{(C_n/\lambda_n)}{AUC_{\infty}}$

 Statistical Moment Calculations

$$AUMC_{\infty} \text{ (area)} \quad AUMC_{0-t} = \sum_{i=0}^{n-1} \frac{t_{i+1} - t_i}{2} (C_i t_i + C_{i+1} t_{i+1}) + \frac{C_{last} * t_{last}}{\lambda_z} + \frac{C_{last}}{\lambda_z^2}$$

$$AUMC_{\infty} \text{ (expo)} \quad AUMC_{\infty} = \sum \frac{C_n}{\lambda_n^2}$$

$$MRT \text{ (area)} \quad MRT = \frac{AUMC_{\infty}}{AUC_{\infty}}$$

$$MRT \text{ (expo)} \quad MRT = \sum \frac{1}{\lambda_n}$$

 Volume of Distribution Calculations

$$V_c \text{ (initial central compartment)} \quad V_c = \frac{D}{\sum C_n}$$

$$V_d \text{ (obs area)} \quad V = \frac{FD}{AUC_{0-t} \lambda_z}$$

$$V_d \text{ (area)} \quad V = \frac{FD}{AUC_{\infty} \lambda_z}$$

$$V_d \text{ (area) / kg} \quad V_{normalized} = \frac{V}{BodyWeight (kg)}$$

$$V_d \text{ (expo)} \quad V = \frac{FD}{\lambda_z \sum \frac{C_n}{\lambda_n}}$$

$$V_{ss} \text{ (area)} \quad V_{ss} = \frac{D * [AUMC_{\infty}]}{[AUC_{\infty}]^2}$$

$$V_{ss}(\text{expo}) = D * \frac{\sum \frac{C_n}{\lambda_n^2}}{\left(\sum \frac{C_n}{\lambda_n}\right)^2}$$

Systemic Clearance Calculations

$$CL(\text{sys})(\text{obs area}) = \frac{FD}{AUC_{0-t}}$$

$$CL(\text{area}) = \frac{FD}{AUC_{\infty}}$$

$$CL(\text{area}) / \text{kg} = \frac{CL}{\text{BodyWeight (kg)}}$$

$$CL(\text{expo}) = \frac{FD}{\sum \frac{C_n}{\lambda_n}}$$

Anhang III: Blutplasmakonzentrationen nach intravenöser Eingabe

Tabelle 9.2: Im ELISA gemessene Blutplasmakonzentrationen der Penicilline. Alle Angaben in µg/ml.

	0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h
Penicillin G					
Tier 1	6,611	1,779	0,327	0,055	
Tier 2	4,509	1,517	0,366	0,062	
Tier 3	3,273	1,150	0,306	0,038	
Tier 4	3,792	1,222	0,280	0,051	
Tier 6	4,668	1,275	0,297	0,046	
Tier 7	3,692	0,930	0,244	0,034	
Penicillin V					
Tier 1	7,751	2,995	0,751	0,143	0,037
Tier 2	8,423	3,171	0,788	0,137	0,031
Tier 3	6,867	2,457	0,880	0,268	0,096
Tier 4	5,160	1,887	0,455	0,083	0
Tier 5	6,387	2,671	0,909	0,204	0,050
Amoxicillin					
Tier 1	21,012	8,097	2,786	0,566	0,081
Tier 2	18,581	8,196	2,304	0,351	0,065
Tier 3	15,509	5,069	1,426	0,251	0,061
Tier 4	22,738	8,262	2,517	0,410	0,086
Tier 5	18,09	6,854	1,918	0,294	0,048
Tier 7	16,138	5,968	1,583	0,230	0,041

Anhang IV: Blutplasmakonzentrationen nach oraler Eingabe

Tabelle 9.3: Im ELISA gemessene Blutplasmakonzentrationen der Penicilline. Alle Angaben in µg/ml.

	0,25 h	0,5 h	1 h	2 h	4 h	8 h
Penicillin G						
Tier 1	0,077	0,200	0,259	0,143	0,024	
Tier 2	0,150	0,293	0,138	0,119	0,024	
Tier 3	0,049	0,093	0,142	0,121	0,028	
Tier 4	0,196	0,234	0,094	0,114	0,032	
Tier 5	0,363	0,194	0,251	0,099	0,010	
Tier 6	0,211	0,309	0,210	0,082	0,021	
Tier 7	0,079	0,090	0,047	0,078	0,018	
Penicillin V						
Tier 1	0,377	0,319	0,269	0,636	0,172	0,023
Tier 2	1,852	1,628	1,083	0,539	0,196	0,049
Tier 3	1,078	0,899	1,970	0,507	0,192	0,023
Tier 4	1,390	1,171	0,897	0,349	0,187	0,015
Tier 5	0,627	0,683	0,753	0,270	0,087	0,022
Tier 6	0,465	0,823	1,584	0,948	0,084	0,044
Tier 7	1,072	2,088	1,166	0,459	0,266	0,046
Amoxicillin						
Tier 1	0,995	6,736	3,760	0,515	0,085	
Tier 2	0,531	1,111	1,619	0,932	0,171	
Tier 3	0,364	5,336	4,056	0,842	0,087	
Tier 4	0,325	1,225	4,233	1,471	0,179	
Tier 5	0,667	1,492	2,509	1,394	0,072	
Tier 7	0,192	1,657	2,953	1,463	0,172	

Anhang V: Pharmakokinetische Daten, intravenös

Abbildung 9.1: Berechnete pharmakokinetische Parameter nach intravenöser Eingabe.

Description:	Pen G iv. Tier 1	Pen G iv. Tier 2	Pen G iv. Tier 3	Pen G iv. Tier 4	Pen G iv. Tier 6	Pen G iv. Tier 7
Data Setup & Analysis						
Dose Route	IV Dose					
Calculation Mode	Data Set					
Terms Used	2 Terms					
Single Dose Parameters						
<u>General disposition parameters:</u>						
Dose Amount μg	51366,0000	51994,0000	50108,0000	47414,0000	52892,0000	52219,0000
Dosage $\mu\text{g}/\text{kg}$	8980,0699	8979,9655	8979,9283	8979,9242	8979,9660	8980,0516
Fraction dose absorbed (F)	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
E Intercept $\mu\text{g}/\text{ml}$	1,9442	2,1606	2,4641	1,5373	1,9176	1,7511
E Slope 1/hr	-0,7742	-0,7711	-0,9059	-0,7396	-0,8100	-0,8559
E Rate 1/hr	1,7829	1,7758	2,0864	1,7033	1,8654	1,9712
E Half-life hr	0,3887	0,3902	0,3322	0,4069	0,3715	0,3516
D Intercept $\mu\text{g}/\text{ml}$	29,3312	15,5356	11,6345	13,7323	23,0745	24,8803
D Slope 1/hr	-2,9507	-2,7871	-3,2320	-2,7700	-3,2937	-3,9088
D Rate 1/hr	6,7955	6,4187	7,4434	6,3792	7,5854	9,0019
D Half-life hr	0,1020	0,1080	0,0931	0,1086	0,0914	0,0770
<u>Descriptive curve parameters:</u>						
C initial (iv) $\mu\text{g}/\text{ml}$	31,2753	17,6962	14,0986	15,2695	24,9921	26,6314
<u>Curve area calculations:</u>						
AUC(0-t) (obs area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	6,5020	4,2137	3,2603	3,5504	5,0149	4,8007
AUC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	6,5329	4,2486	3,2785	3,5804	5,0395	4,8179
AUC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	5,4067	3,6371	2,7441	3,0552	4,0699	3,6522
% of AUC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>						
AUMC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	1,1260	0,9922	0,7328	0,8046	0,8621	0,6654
AUMC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	1,2467	1,0622	0,7761	0,8673	0,9521	0,7577
% of AUMC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
MRT (area) hr	0,1724	0,2335	0,2235	0,2247	0,1711	0,1381
MRT (expo) hr	0,7080	0,7189	0,6136	0,7439	0,6679	0,6184
<u>Volume of distribution calculations:</u>						
Vc (initial central comp) ml	1642,3798	2938,1425	3554,1221	3105,1420	2116,3477	1960,8090
Vd (obs area) ml	4430,8510	6948,5777	7366,3868	7840,4474	5653,9302	5518,2867
Vd (area) ml	4409,9289	6891,4763	7325,4640	7774,8785	5626,2647	5498,5306
Vd (area) / kg ml/kg	770,9666	1190,2377	1312,8072	1472,5149	955,2232	945,5771
Vd (expo) ml	5328,5325	8050,1744	8752,1421	9111,4075	6966,6687	7253,5313
Vss (area) ml	1355,1962	2858,1450	3416,3269	2975,9265	1795,4133	1496,8382
Vss (expo) ml	2190,7530	4175,1028	5164,2368	4405,7056	3040,1440	2966,2767
<u>Clearance calculations:</u>						
CL (obs area) ml/hr	7899,9778	12339,4155	15369,0440	13354,4054	10546,9931	10877,4416
CL (area) ml/hr	7862,6748	12238,0137	15283,6636	13242,7238	10495,3851	10838,4991
CL (area) / kg ml/hr/kg	1374,5935	2113,6466	2739,0078	2508,0916	1781,8990	1863,8863
CL (expo) ml/hr	9500,4974	14295,6516	18260,2490	15519,1947	12995,8106	14297,8912

Description:	Amoxicillin i.v.Tier 1	Amoxicillin i.v.Tier 2	Amoxicillin i.v.Tier 3	Amoxicillin i.v.Tier 4	Amoxicillin i.v.Tier 5	Amoxicillin i.v.Tier 7
Data Setup & Analysis						
Dose Route	IV Dose					
Calculation Mode	Data Set					
Terms Used	2 Terms					
Single Dose Parameters						
<u>General disposition parameters:</u>						
Dose Amount	62922,0000	63968,0000	65711,0000	61092,0000	55776,0000	56473,0000
Dosage	17429,9169	17429,9728	17429,9735	17429,9572	17430,0000	17429,9383
Fraction dose absorbed (F)	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
E Intercept	13,7085	15,1237	8,1015	15,4519	12,5127	10,8952
E Slope	-0,6921	-0,8172	-0,7544	-0,7881	-0,8145	-0,8378
E Rate	1,5939	1,8820	1,7375	1,8150	1,8758	1,9293
E Half-life	0,4348	0,3682	0,3989	0,3818	0,3694	0,3592
D Intercept	72,7124	36,3719	63,0501	82,4266	53,8498	48,8002
D Slope	-3,1577	-2,4007	-3,1539	-3,2190	-2,8800	-2,8591
D Rate	7,2722	5,5288	7,2634	7,4134	6,6327	6,5844
D Half-life	0,0953	0,1253	0,0954	0,0935	0,1045	0,1052
<u>Descriptive curve parameters:</u>						
C initial (iv)	86,4209	51,4956	71,1516	97,8785	66,3625	59,6953
<u>Curve area calculations:</u>						
AUC(0-t) (obs area)	22,1111	16,4752	16,1791	23,6063	17,3156	15,3077
AUC _∞ (area)	22,1619	16,5097	16,2142	23,6537	17,3411	15,3289
AUC _∞ (expo)	18,5994	14,6147	13,3432	19,6321	14,7894	13,0585
% of AUC _∞ (expo)	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>						
AUMC _∞ (area)	7,1777	5,8956	4,1469	6,6476	5,0442	4,2649
AUMC _∞ (expo)	6,7710	5,4600	3,8787	6,1904	4,7802	4,0525
% of AUMC _∞ (expo)	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
MRT (area)	0,3239	0,3571	0,2558	0,2810	0,2909	0,2782
MRT (expo)	0,7649	0,7122	0,7132	0,6859	0,6839	0,6702
<u>Volume of distribution calculations:</u>						
V _c (initial central comp)	728,0878	1242,2030	923,5347	624,1616	840,4749	946,0201
V _d (obs area)	1785,4080	2063,1122	2337,5575	1425,8744	1717,2168	1912,1495
V _d (area)	1781,3139	2058,7961	2332,4961	1423,0181	1714,6828	1909,4986
V _d (area) / kg	493,4387	560,9799	618,6992	405,9966	535,8384	589,3514
V _d (expo)	2122,5038	2325,7462	2834,3583	1714,5225	2010,5319	2241,4898
V _{ss} (area)	919,5474	1383,5920	1036,5020	725,8615	935,5954	1025,0047
V _{ss} (expo)	1231,5680	1635,2021	1431,5389	981,2360	1218,9654	1342,0853
<u>Clearance calculations:</u>						
CL (obs area)	2845,7185	3882,6840	4061,4798	2587,9518	3221,1491	3689,1967
CL (area)	2839,1929	3874,5613	4052,6856	2582,7676	3216,3959	3684,0823
CL (area) / kg	786,4800	1055,7388	1074,9829	736,8809	1005,1237	1137,0624
CL (expo)	3383,0073	4376,9494	4924,6655	3111,8460	3771,3486	4324,6079

Description:	Pen V iv Tier 1	Pen V iv Tier 2	Pen V iv Tier 3	Pen V iv Tier 4	Pen V iv Tier 5
Data Setup & Analysis					
Dose Route	IV Dose				
Calculation Mode	Data Set				
Terms Used	2 Terms				
Single Dose Parameters					
<u>General disposition parameters:</u>					
Dose Amount µg	133600,0000	137200,0000	137400,0000	141200,0000	126000,0000
Dosage µg/kg	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000
Fraction dose absorbed (F)	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000
E Intercept µg/ml	3,9441	4,5324	1,4703	2,4943	4,0504
E Slope 1/hr	-0,7203	-0,7598	-0,3068	-0,7389	-0,6489
E Rate 1/hr	1,6589	1,7498	0,7065	1,7018	1,4945
E Half-life hr	0,4178	0,3960	0,9809	0,4072	0,4637
D Intercept µg/ml	20,7838	23,5798	22,2935	15,1643	17,2218
D Slope 1/hr	-2,4251	-2,5299	-2,3892	-2,5322	-2,7195
D Rate 1/hr	5,5851	5,8263	5,5024	5,8317	6,2630
D Half-life hr	0,1241	0,1189	0,1259	0,1188	0,1106
<u>Descriptive curve parameters:</u>					
C initial (iv) µg/ml	24,7278	28,1123	23,7639	17,6586	21,2721
<u>Curve area calculations:</u>					
AUC(0-t) (obs area) µg-hr/ml	6,9666	7,6364	6,7666	4,5877	6,2951
AUC∞ (area) µg-hr/ml	6,9889	7,6541	6,9025	4,6365	6,3286
AUC∞ (expo) µg-hr/ml	6,0989	6,6373	6,1328	4,0660	5,4600
% of AUC∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>					
AUMC∞ (area) µg-hr ² /ml	2,2889	2,3280	3,4738	1,2268	2,5500
AUMC∞ (expo) µg-hr ² /ml	2,0995	2,1749	3,6822	1,3072	2,2525
% of AUMC∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
MRT (area) hr	0,3275	0,3041	0,5033	0,2646	0,4029
MRT (expo) hr	0,7819	0,7431	1,5972	0,7591	0,8288
<u>Volume of distribution calculations:</u>					
Vc (initial central comp) ml	5402,8208	4880,4284	5781,8863	7996,1184	5923,2382
Vd (obs area) ml	11560,4755	10267,5866	28741,9337	18085,9317	13392,7769
Vd (area) ml	11523,5812	10243,8216	28176,1095	17895,6783	13321,9760
Vd (area) / kg ml/kg	1725,0870	1493,2685	4101,3260	2534,7986	2114,5994
Vd (expo) ml	13205,2846	11813,1078	31712,3631	20406,4459	15441,3591
Vss (area) ml	6260,6190	5451,8464	10017,8377	8057,9143	8022,1135
Vss (expo) ml	7541,0914	6773,3610	13451,7356	11164,2985	9520,4295
<u>Clearance calculations:</u>					
CL (obs area) ml/hr	19177,2089	17966,5558	20305,5922	30777,9766	20015,4294
CL (area) ml/hr	19116,0066	17924,9710	19905,8489	30454,2103	19909,6179
CL (area) / kg ml/hr/kg	2861,6776	2612,9695	2897,5035	4313,6275	3160,2568
CL (expo) ml/hr	21905,7168	20670,9590	22404,1402	34726,9428	23077,0239

Anhang VI: Pharmakokinetische Daten, oral

Abbildung 9.2: Berechnete pharmakokinetische Parameter nach oraler Eingabe.

Description:	Pen G oral Tier 1	Pen G oral Tier 2	Pen G oral Tier 3	Pen G oral Tier 4	Pen G oral Tier 5	Pen G oral Tier 6	Pen G oral Tier 7
Data Setup & Analysis							
Dose Route	Oral Dose						
Calculation Mode	Data Set						
Terms Used	1 Terms						
Single Dose Parameters							
<u>General disposition parameters:</u>							
Dose Amount μg	32822,0000	32687,0000	32642,0000	30981,0000	31116,0000	35740,0	34483,0000
Dosage $\mu\text{g}/\text{kg}$	8980,0274	8979,9451	8979,9175	8980,0000	8980,0866	8979,9	8979,9479
Fraction dose absorbed (F)	0,0852	0,1138	0,1224	0,1286		0,0980	0,0515
E Intercept $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,6322	0,5900	0,5229	0,4061	0,7898	0,494	0,3380
E Slope $1/\text{hr}$	-0,3505	-0,3477	-0,3178	-0,2759	-0,4710	-0,388	-0,3184
E Rate $1/\text{hr}$	0,8073	0,8007	0,7319	0,6353	1,0848	0,893	0,7333
E Half-life hr	0,8584	0,8655	0,9468	1,0907	0,6388	0,776	0,9450
<u>Descriptive curve parameters:</u>							
Cmax (obs) $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,2590	0,2930	0,1420	0,2340	0,3630	0,3	0,0900
Tmax (obs) hr	1,0000	0,5000	1,0000	0,5000	0,2500	0,5	0,5000
<u>Curve area calculations:</u>							
AUC(0-t) (obs area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	0,5270	0,4534	0,3631	0,4103	0,5103	0,5	0,2238
AUC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	0,5567	0,4833	0,4014	0,4606	0,5195	0,4937	0,2483
AUC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	0,7831	0,7369	0,7144	0,6392	0,7280	0,6	0,4609
% of AUC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>							
AUMC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	0,9173	0,7781	0,8073	0,8774	0,6297	0,7	0,4947
AUMC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	0,9701	0,9204	0,9761	1,0061	0,6711	0,6	0,6286
% of AUMC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0	100,0000
MRT (area) hr	1,6477	1,6099	2,0113	1,9048	1,2122	1,4	1,9925
MRT (expo) hr	1,2387	1,2489	1,3663	1,5739	0,9219	1,1	1,3637
<u>Volume of distribution calculations:</u>							
Vd (obs area) ml	6573,0915	10247,1071	15032,6490	15285,4311	0,0000	8346,9	10823,4860
Vd (area) ml	6222,0873	9611,6405	13599,8971	13614,0393	0,0000	7949,1	9753,4783
Vd (area) / kg ml/kg	1702,3495	2640,5606	3741,3747	3946,0983	0,0000	1997,3	2539,9683
Vd (expo) ml	4423,2601	6304,2677	7640,9168	9810,1732	0,0000	7083,0	5254,0666
Vss (area) ml	97138,4901				72608,6797	99596,0	
Vss (expo) ml	51916,1979	55397,7826	62425,7906	76284,3952	39399,6573	72275,9	
<u>Clearance calculations:</u>							
CL (obs area) ml/hr	5306,3271	8204,6443	11002,7698	9711,5335	0,0000	7450,189	7936,8693
CL (area) ml/hr	5022,9683	7695,8395	9954,1031	8649,6218	0,0000	7095,112	7152,2319
CL (area) / kg $\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$	1374,2731	2114,2416	2738,4052	2507,1368	0,0000	1782,691	1862,5604
CL (expo) ml/hr	3570,8106	5047,6952	5592,5771	6232,8517	0,0000	6322,117	3852,8104

Description:	Amoxicillin oral Tier 1	Amoxicillin oral Tier 2	Amoxicillin oral Tier 3	Amoxicillin oral Tier 4	Amoxicillin oral Tier 5	Amoxicillin oral Tier 7
Data Setup & Analysis						
Dose Route	Oral Dose					
Calculation Mode	Data Set					
Terms Used	2 Terms					
Single Dose Parameters						
<u>General disposition parameters:</u>						
Dose Amount µg	31025,0000	33378,0000	31635,0000	29108,0000	26929,0000	26145,0000
Dosage µg/kg	17429,7753	17429,7650	17429,7521	17429,9401	17429,7735	17430,0000
Fraction dose absorbed (F)	0,2931	0,2141	0,4033	0,2651	0,2779	0,3530
E Intercept µg/ml	27,4517	5,080	19,538	12,1347	26,9894	12,4440
E Slope 1/hr	-0,8634	-0,368	-0,683	-0,4579	-0,6435	-0,4649
E Rate 1/hr	1,9884	0,848	1,572	1,0544	1,4819	1,0706
E Half-life hr	0,3485	0,817	0,441	0,6572	0,4676	0,6473
A Intercept µg/ml	-72,0448	-7,135	-46,118	-13,6352	-31,8290	-19,3142
A Slope 1/hr	-2,6462	-1,095	-2,223	-0,7220	-0,9364	-1,1536
A Rate 1/hr	6,0943	2,521	5,120	1,6628	2,1566	2,6566
A Half-life hr	0,1137	0,275	0,135	0,4168	0,3213	0,2609
<u>Descriptive curve parameters:</u>						
Cmax (obs) µg/ml	6,7360	1,6190	5,3360	4,2330	2,5090	2,9530
Tmax (obs) hr	0,5000	1,0000	0,5000	1,0000	1,0000	1,0000
Cmax (calculated) µg/ml	7,5071	1,7251	6,0930	3,0020	3,1323	3,1365
Tmax (calculated) hr	0,2728	0,6514	0,3328	0,7489	0,5562	0,5731
Lag time hr	0,2347	0,2028	0,2418	0,1914	0,2442	0,2769
<u>Curve area calculations:</u>						
AUC(0-t) (obs area) µg-hr/ml	6,4523	3,3326	6,4840	6,1009	4,7710	5,2506
AUC _∞ (area) µg-hr/ml	6,4950	3,5343	6,5393	6,2706	4,8196	5,4113
AUC _∞ (expo) µg-hr/ml	1,9844	3,1601	3,4185	3,3082	3,4539	4,3535
% of AUC _∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>						
AUMC _∞ (area) µg-hr ² /ml	6,2227	5,9802	7,1957	9,3938	6,9003	8,4072
AUMC _∞ (expo) µg-hr ² /ml	5,0036	5,9414	6,1428	5,9828	5,4465	8,1209
% of AUMC _∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
MRT (area) hr	0,9581	1,6920	1,1004	1,4981	1,4317	1,5536
MRT (expo) hr	0,6670	1,5759	0,8312	1,5498	1,1385	1,3105
<u>Volume of distribution calculations:</u>						
Vd (obs area) ml	708,7943	2528,7222	1251,3379	1199,5271	1058,4745	1641,8677
Vd (area) ml	704,1291	2384,4420	1240,7507	1167,0534	1047,8040	1593,1203
Vd (area) / kg ml/kg	395,5782	1245,1394	683,6092	698,8344	678,1903	1062,0802
Vd (expo) ml	2304,6309	2666,7641	2373,4691	2212,1193	1462,1294	1980,1850
Vss (area) ml	4576,4765	15979,8281	5323,2572	6953,9235	7999,6296	7506,4867
Vss (expo) ml	39421,9982	19858,5127	16629,0720	15912,0714	12295,1233	11202,3122
<u>Clearance calculations:</u>						
CL (obs area) ml/hr	1409,3421	2144,3246	1967,6736	1264,8236	1568,5536	1757,7307
CL (area) ml/hr	1400,0661	2021,9767	1951,0256	1230,5822	1552,7410	1705,5433
CL (area) / kg ml/hr/kg	786,5540	1055,8625	1074,9453	736,8756	1005,0103	1137,0289
CL (expo) ml/hr	4582,4487	2261,3824	3732,1753	2332,5365	2166,7298	2119,9224

Description:	Pen V oral Tier 1	Pen V oral Tier 2	Pen V oral Tier 3	Pen V oral Tier 4	Pen V oral Tier 5	Pen V oral Tier 6	Pen V oral Tier 7
Data Setup & Analysis							
Dose Route	Oral Dose						
Calculation Mode	Data Set						
Terms Used	1 Terms						
Single Dose Parameters							
<u>General disposition parameters:</u>							
Dose Amount μg	88100,0000	88800,0000	88800,0000	88900,0000	83500,0000	85000,0000	91600,0000
Dosage $\mu\text{g}/\text{kg}$	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000	20000,0000
Fraction dose absorbed (F)	0,2814	0,4543	0,5085	0,5603	0,2565		
E Intercept $\mu\text{g}/\text{ml}$	2,3517	1,4823	1,6028	2,3313	0,8379	10,6989	1,5382
E Slope 1/hr	-0,2840	-0,2197	-0,2304	-0,2739	-0,2459	-0,5263	-0,1905
E Rate 1/hr	0,6540	0,5059	0,5306	0,6309	0,5664	1,2120	0,4388
E Half-life hr	1,0597	1,3699	1,3061	1,0985	1,2236	0,5718	1,5793
<u>Descriptive curve parameters:</u>							
Cmax (obs) $\mu\text{g}/\text{ml}$	0,6360	1,8520	1,9700	1,3900	0,7530	1,5840	2,0880
Tmax (obs) hr	2,0000	0,2500	1,0000	0,2500	1,0000	1,0000	0,5000
<u>Curve area calculations:</u>							
AUC(0-t) (obs area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	1,9316	3,3803	3,4666	2,5739	1,4696	3,1189	3,5040
AUC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	1,9668	3,4771	3,5100	2,5977	1,6232	3,1882	3,6088
AUC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}/\text{ml}$	3,5961	2,9300	3,0207	3,6953	1,4795	8,8275	3,5055
% of AUC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
<u>Statistical moment calculations:</u>							
AUMC ∞ (area) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	4,9603	6,9526	6,3349	4,7381	2,7757	4,8858	7,7156
AUMC ∞ (expo) $\mu\text{g}\cdot\text{hr}^2/\text{ml}$	5,4988	5,7917	5,6931	5,8573	2,6123	7,2835	7,9889
% of AUMC ∞ (expo) %	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000	100,0000
MRT (area) hr	2,5220	1,9995	1,8048	1,8240	1,7100	1,5325	2,1380
MRT (expo) hr	1,5291	1,9767	1,8847	1,5851	1,7657	0,8251	2,2790
<u>Volume of distribution calculations:</u>							
Vd (obs area) ml	19625,4421	23591,1665	24548,9649	30675,3388	25732,1185	0,0000	0,0000
Vd (area) ml	19274,5040	22934,0085	24245,7898	30394,5665	23296,9956	0,0000	0,0000
Vd (area) / kg $\mu\text{ml}/\text{kg}$	4375,5968	5165,3172	5460,7635	6837,9227	5580,1187	0,0000	0,0000
Vd (expo) ml	10541,7865	27216,6234	28172,7539	21366,3545	25560,2778	0,0000	0,0000
Vss (area) ml		51064,8998	45661,0838	62422,7639	87961,2860	40857,0872	54266,3114
Vss (expo) ml	37461,9279	59908,9222	55403,6458	38133,7756	99650,2058	7944,7738	59551,1335
<u>Clearance calculations:</u>							
CL (obs area) ml/hr	12834,4477	11934,5729	13025,5796	19352,4044	14573,6157	0,0000	0,0000
CL (area) ml/hr	12604,9448	11602,1222	12864,7162	19175,2713	13194,4621	0,0000	0,0000
CL (area) / kg $\mu\text{ml}/\text{hr}/\text{kg}$	2861,5085	2613,0906	2897,4586	4313,8968	3160,3502	0,0000	0,0000
CL (expo) ml/hr	6894,0107	13768,6611	14948,3472	13479,5686	14476,2922	0,0000	0,0000

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Rüdiger Korbel für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas und die stets hervorragende fachliche und wissenschaftliche Betreuung der durchgeführten Studie danken.

Außerdem geht mein Dank an Herrn Prof. Hermann Ammer für die sachkundige Begleitung und die vielen wertvollen Anmerkungen, Hinweise und Ideen in allen Stadien der durchgeführten Arbeit.

Unverzichtbar war auch die Hilfe aller Mitarbeiter und Doktoranden der Vogelklinik bei der Durchführung meines praktischen Versuchssteils. Vielen Dank euch allen für die tolle Unterstützung.

Den Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie danke ich für die nette Aufnahme ins Team sowie insbesondere Sarah Koutnik für die fotografische Dokumentation meiner Versuche.

Ein großer Dank geht außerdem an meine Familie, für die stets uneingeschränkte Unterstützung all meiner Entscheidungen und Pläne.