

Methodenvergleich Agardiffusion versus Mikrodilution bei Carbapenemase-bildenden MRGN mit zusätzlich erweiterter Resistenzbestimmung

Céline, Thüler, 17-20B

Bildungsgang Biomedizinische Analytik HF

Institut für Labormedizin Kantonsspital Aarau, Mikrobiologie

1. Zusammenfassung

Im mikrobiologischen Labor des Kantonsspital Aarau (KSA) wird für die Resistenzbestimmung von Bakterien die Methode der Agardiffusion nach Kirby Bauer benutzt. Bei Carbapenemase-bildenden gramnegativen Bakterien reicht diese Methode oft nicht aus, denn diese Bakterien sind grösstenteils multiresistent und zu dessen Therapie muss auf das mit hohen Nebenwirkungen assoziierte Antibiotikum Colistin zurückgegriffen werden. Die Empfindlichkeitsprüfung von Colistin darf gemäss EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) nur mittels Mikrodilution erfolgen. Bei solchen Fällen müssen somit zwei verschiedene Methoden angewandt werden, was zu einer Zeitverzögerung führt. Das Ziel dieser Diplomarbeit ist der Methodenvergleich zwischen der herkömmlichen Agardiffusion nach Kirby Bauer und der Mikrodilution mittels MicroScan, um festzustellen, ob die Mikrodilution bei gramnegativen Erregern die Agardiffusion ersetzen und die Resistenzbestimmung vereinheitlicht werden könnte. Es wird gleichzeitig die Wirksamkeit des neuen Antibiotikums Ceftazidim/Avibactam und des altbekannten Colistin getestet. Für den Methodenvergleich werden 40 in den Jahren 2014 bis 2020 auf Carbapenemase-Bildung positiv getesteten gramnegativen Bakterien untersucht. Diese Diplomarbeit zeigt, dass die beiden Methoden mit einem Kappa-Wert von 0.822 eine hohe Übereinstimmung aufweisen. Die Mikrodilution mittels MicroScan könnte nach weiteren Test mit alternativer Inokulum-Herstellung und einer grösseren Stichprobe durchaus die Agardiffusion bei gramnegativen Erregern ersetzen. Das neue mitgetestete Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam zeigt bei 33.33% und das Colistin bei 61.5 % aller Bakterienisolate eine Wirkung.

2. Einleitung

Carbapenemasen gehören zu den Betalaktamasen. Ihre Bildung hat nicht nur eine Carbapenem-Resistenz zur Folge, sondern auch eine Resistenz gegenüber den meisten Beta-Laktam-Antibiotika. Carbapenem-Antibiotika sind Reserve-Antibiotika, welche vor allem bei einer Infektion mit multiresistenten gramnegativen Erregern (MRGN) zum Einsatz kommen.[1] Infektionen mit multiresistenten Erregern führen zu erhöhter Mortalität und auch zu hohen Kosten wegen Isolationsmassnahmen, längeren Hospitalisierungen und durch die Behandlung mit mehreren Antibiotika oder auch mit teuren Reserve-Antibiotika.[2] Antibiotika werden heutzutage bei Mensch und Tier übermässig und zum Teil falsch eingesetzt, was zur Bildung von solchen Antibiotika-Resistenzen führt.[1]

Wird im KSA bei einem Patienten oder einer Patientin eine schwere Infektion mit einem Carbapenem-resistenten MRGN detektiert, wird die Wirksamkeit von Colistin gemäss Richtlinien von EUCAST mittels Mikrodilution getestet. Colistin ist trotz seiner Neuro- und Nephrotoxizität häufig eines der letzten Antibiotika, welches noch wirkt.[4] Es wird also bis anhin zuerst das gesamte Antibiogramm mittels Agardiffusion und anschliessend bei einem multiresistenten Keim noch eine Mikrotiterplatte für das Colistin erstellt. Dies führt zu einem Zeitverlust und es müssen zwei verschiedenen Methoden benutzt werden. Bei gramnegativen Erregern wäre deshalb eine komplette Umstellung von der Agardiffusion nach Kirby Bauer auf die Mikrodilution mittels MicroScan eine deutliche Vereinfachung und würde auch einen Zeitgewinn für Patienten und Patientinnen bedeuten. Zudem kann auf der Mikrotiterplatte von MicroScan das neue Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam mitgetestet werden.

Dieses neue Antibiotikum enthält Avibactam, welches das mit enthaltene und bakterizid wirkende Ceftazidim vor enzymatischem Abbau durch β -Lactamasen und somit auch manchen Carbapenemasen schützt. [3]

3. Ziele und Fragestellungen

Zielsetzung 1

Resultate-Vergleich der Resistenzbestimmung bei Carbapenemase-bildenden MRGN mittels Agardiffusion nach Kirby-Bauer und mittels Mikrodilution nach MicroScan.

Fragestellung zur Zielsetzung 1

Werden mit den beiden Methoden deckungsgleiche Resultate erzielt?

Zielsetzung 2

MHK-Bestimmung des neuen Reserve-Antibiotikums Ceftazidim/Avibactam und des altbekannten Colistin mittels Mikrodilution.

Fragestellungen zur Zielsetzung 2

Wie viele dieser Carbapenemase-bildenden Bakterien lassen sich mit Ceftazidim/Avibactam oder Colistin behandeln?

Referenzen

[1] Elshamy, A.A. & Aboshanab K.M. (2020). A review on bacterial resistance to carbapenems : epidemiology, detection and treatment options. *Future Science OA*, 6(3), 1-4. doi: 10.2144/fsoa-2019-0098

[2] Gasser, M., Schrenzel, J., & Kronenberg, A. (2018). Aktuelle Entwicklung der Antibiotikaresistenzen in der Schweiz. *Swiss medical forum*, 18(46), 943 & 947. doi: 10.4414/smfm.2018.03404

[3] compendium.ch®. (kein Datum). *Zavicefta® Trockensub 2g/0.5g*. Abgerufen am 09.05.2020 von <https://compendium.ch/product/1380421-zavicefta-trockensub-2-g-0-5-g>

[4] StAR. (2018). *Faktenblatt zu Colistinresistenz*. Abgerufen am 09.05.2020 von <https://www.bag.admin.ch/bag/de/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-entwickelt-sich-die-antibiotikaresistenzlage---.html>

Abbildungen

Hintergrundbild <https://www.diepta.de/news/aktuell/forschung-gram-negative-bakterien-neue-antibiotikaklasse-seit-mehr-als-50-jahren-entdeckt-569936/>

Abb. 4.1 Thüler, C. (2020) *Vorgehen praktische Arbeit*. Herzogenbuchsee

Abb. 5.1 Thüler, C. (2020) *Wirksamkeit Colistin und Ceftazidim/Avibactam*. Herzogenbuchsee

4. Material, Methodik, Vorgehen

Als Testkollektiv dienen 40 im KSA auf Carbapenemase-Bildung positiv getesteten gramnegativen Bakterien. Es handelt sich dabei um Enterobacteriaceae und Nonfermenter, welche verschiedene Carbapenemasen (KPC, NDM, OXA-48 und VIM) bilden. Das Vorgehen der praktischen Arbeit ist in der Abbildung 4.1. graphisch dargestellt.

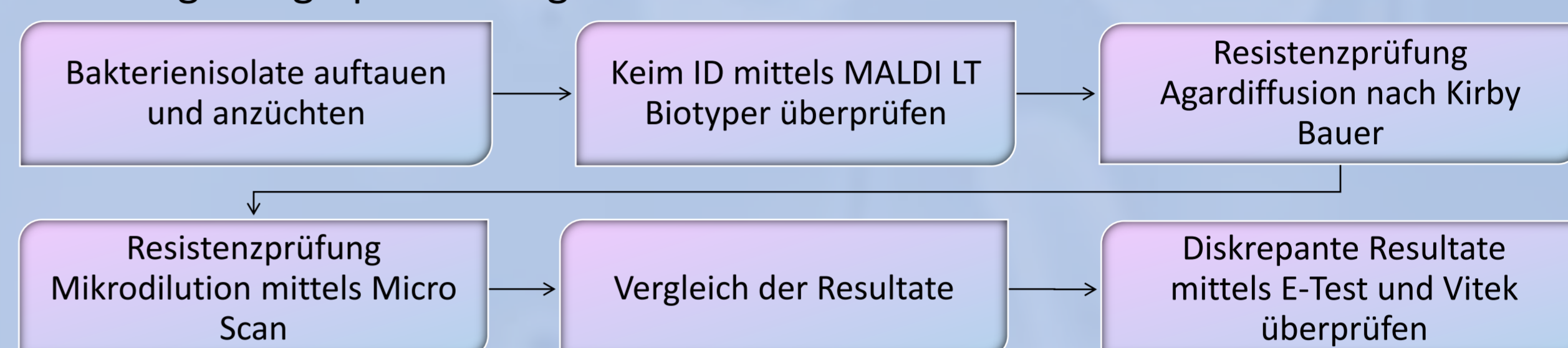


Abb. 4.1: Vorgehen praktische Arbeit (Thüler, 2020)

Für die Resistenzprüfung mittels Mikrodilution nach MicroScan werden vier Komponenten genutzt: Das Prompt® Inokulationssystem-D, das RENOK Rehydrator/Inokulator-System, das MicroScan Panel namens Neg Multidrug Resistant MIC 1 (NMDRM1), welches die 33 Antibiotika enthält und zur Auswertung der MHK das Ablesegerät MicroScan auto SCAN-4.

Die Erstellung des Inokulums wurde mittels Beimpungsstäbchen des Prompt® Inokulationssystem-D erstellt und nicht wie bei der Agardiffusion mittels Eintrübung auf einen McF-Wert von 0.5, da dies die aktuelle Vorgehensweise im KSA ist.

5. Ergebnisse/ Resultate

Insgesamt wird die Empfindlichkeit gemäss Tabelle 5.1 mit beiden Methoden 41 Mal identisch sensibel, 5 Mal identisch intermediär und 404 identisch resistent angegeben. Dies entspricht einem Anteil von 96% Übereinstimmung. Insgesamt weichen 18 Resultate also 4% voneinander ab. Davon haben 13 Resultate eine schwache Abweichung und 5 eine starke. Der Kappa-Wert der gesamten Resultate ergibt 0.822.

Tab. 5.1: 9-Felder Tafel Gesamtergebnis

Gesamtergebnis		Agardiffusion			
		S	I	R	T
Mikrodilution	S	41	0	0	41
	I	2	5	1	8
	R	5	10	404	419
	T	48	15	405	468

Kappa-Wert Interpretation:

- <0.1 keine Übereinstimmung
- 0.10 - 0.40 schwache Übereinstimmung
- 0.41 - 0.60 deutliche Übereinstimmung
- 0.61 - 0.80 starke Übereinstimmung
- 0.81 - 1.00 fast vollständige Übereinstimmung

Gemäss Abbildung 5.1 ist beim Antibiotikum Colistin zu sehen, dass es bei 24 (61.5%) Bakterienisolaten wirkt und bei 15 nicht. Das neue Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam zeigt hingegen bei 13 Bakterien eine Wirkung (33.33%) und bei 26 nicht. Werden die Metallo-Betalaktamasen (NDM und VIM) bei der Beurteilung der Wirkung von Ceftazidim/Avibactam nicht miteinbezogen, wirkt es bei 12 (75 %) Bakterien und bei 4 nicht.

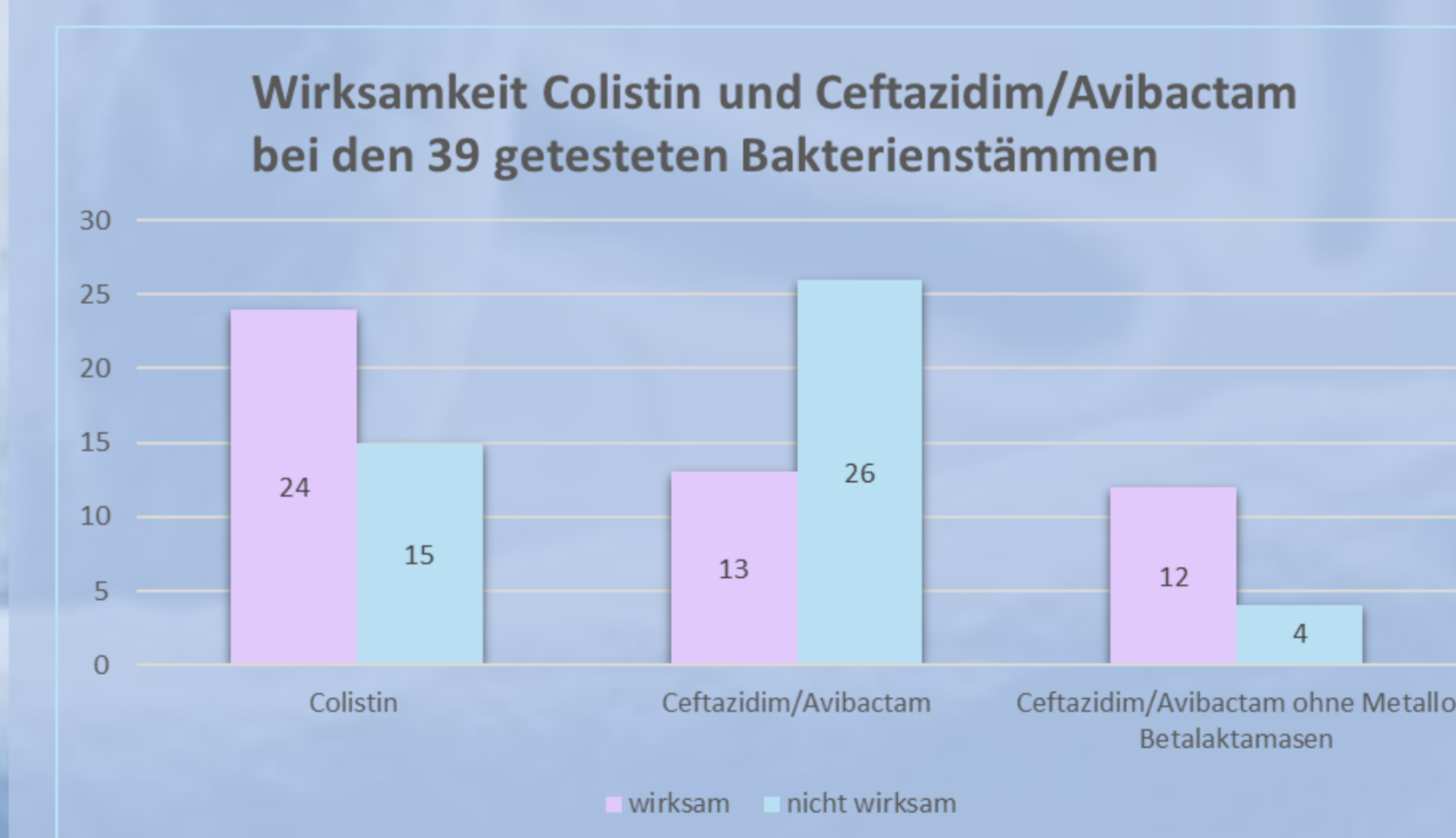


Abb. 5.1: Wirksamkeit Colistin und Ceftazidim/Avibactam (Thüler, 2020)

6. Diskussion

Zielsetzung 1

Der Cohens Kappa-Wert der Gesamtergebnisse von 0.822 zeigt, dass mit der Resistenzbestimmung mittels Agardiffusion nach Kirby Bauer wie auch mit der Mikrodilution nach MicroScan mit einer fast vollständigen Übereinstimmung deckungsgleiche Resultate erzielt werden konnten.

Bei den 18 Resultaten welche nicht übereinstimmen, wurden 17 bei der Mikrodilution resistenter eingestuft. Der Grund dafür, könnte mit einem Anwendungsfehler erklärt werden. Wird bei der Mikrodilution mit dem Beimpungsstäbchen zu viel Keimmaterial aufgenommen, stimmt die Keimmenge von 5×10^5 KBE/ml in der hergestellten Keimsuspension nicht. Das Verhältnis Antibiotikum/Keimmenge in den Vertiefungen würde somit nicht stimmen und das Resultat verfälschen.

Die diskrepanten Ergebnissen könnten jedoch schlichtweg einfach an den unterschiedlichen Methode oder auch an den Bakterien liegen. Die Expression der Carbapenemasen kann sich je nach Umgebungssituation des Bakteriums verändern.

Zielsetzung 2

Colistin zeigte in dieser Arbeit bei 61.5% der Fälle eine Wirkung. Das neue Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam kann bei allen Carbapenemase-bildenden Erregern lediglich bei 33.33% eine Wirkung erzielen. Werden beim Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam die Metallo-Betalaktamasen ausser Acht gelassen, bei welchen das Antibiotikum nachgewiesenermassen keine Wirkung zeigt, wirkt Ceftazidim/Avibactam in 75 % der Fälle. Da Ceftazidim/Avibactam deutlich geringere Nebenwirkungen hat als das Colistin, macht es bei Carbapenemase-bildenden Erregern (ausser bei Metallo-Betalaktamasen) Sinn das neue Antibiotikum Ceftazidim/Avibactam zu nutzen.