



Dr. Judith Rohde
Bischofsholer Damm 15
30173 Hannover
Tel. +49 511 856-7353
Fax +49 511 856-7697
e-mail:judith.rohde@tiho-hannover.de

Informationen zur Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien

Liebe Kolleginnen und Kollegen,

da uns immer wieder Anfragen zum Thema Resistenzprüfung erreichen, wollen wir Ihnen auf diesem Weg einige Informationen zu diesem Thema zur Verfügung stellen.

Antibiotika sind unverzichtbar zur Therapie und Gesunderhaltung von Tieren und Tierbeständen. Probleme entstehen, wenn ihr Einsatz nicht die gewünschte Wirkung zeigt. Kann das Krankheitsbild des Patienten sicher einer bakteriellen Ursache zugeordnet werden, ergibt sich die Frage nach der Empfindlichkeit des oder der ursächlichen Erreger gegenüber dem eingesetzten bzw. den einsetzbaren Antibiotika. Ein Blick „hinter die Kulissen“ der Empfindlichkeitsprüfung bei Bakterien, kann für den rationalen Umgang mit dieser Arzneimittelgruppe hilfreich sein.

Der **Begriff Resistenz** bezeichnet eine **graduell variierende Unempfindlichkeit** von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Der Grad der Unempfindlichkeit ist messbar als **minimale Hemmkonzentration (MHK)**.

Ziel der Resistenzprüfung **in der klinischen Mikrobiologie ist die zuverlässige Vorhersage des klinischen Erfolges einer antimikrobiellen Therapie durch Auswertung reproduzierbarer in vitro-Ergebnisse, an Hand derer Infektionserreger in die Kategorien sensibel bzw. resistent gegenüber einem bestimmten Wirkstoff eingestuft werden.**

In diese **Beurteilung als resistent bzw. empfindlich** gegenüber einem Antibiotikum gehen verschiedene Kriterien ein

- einerseits vom **Bakterium** aus die MHK (minimale Hemmkonzentration). Das ist die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums (in µg/ml), bei der unter definierten Bedingungen kein sichtbares Keimwachstum in vitro mehr erfolgt.
- andererseits vom **Wirtsorganismus** aus die erreichbare Konzentration des Antibiotikums im Serum bzw. am Ort der gewünschten Wirkung (betroffenes Organ).

Entsprechend bedeutet:

empfindlich (sensibel): Die in vitro gemessene MHK ist niedriger als der unter therapeutischen Bedingungen bei der üblichen Dosierung erreichbare Wirkstoffspiegel im Serum bzw. im Idealfall am Ort der gewünschten Wirkung.

resistent: Die in vitro gemessene MHK liegt in einem Konzentrationsbereich, der therapeutisch im Organismus nicht mehr erreicht werden kann.

intermediär: Aus verschiedenen labortechnischen und theoretischen Gründen ist keine Beurteilung hinsichtlich des zu erwartenden Therapieerfolgs möglich.

Die erreichbaren Wirkstoffspiegel im Organismus zu bestimmen, ist Aufgabe der Pharmaindustrie und teilweise Bestandteil des Zulassungsverfahrens. Einige Probleme, die damit besonders in der Veterinärmedizin verbunden sind, seien kurz angerissen:

- Unterschiedliche Pharmakokinetik und -dynamik in verschiedenen Tierarten, Altersgruppen, evtl. sogar Rassen
- Unterschiedliche Pharmakokinetik und -dynamik in gesunden und unterschiedlich kranken Tieren
- Unterschiedliche Wirkstoffspiegel in Serum, in Organen, in entzündlich veränderten Organen, in Makrophagen und Granulozyten usw.
- Bedeutung von Metaboliten des Therapeutikums
- Analysetechnologie

Für die **Bestimmung der MHK** stehen verschieden in vitro Verfahren zur Verfügung. Über Jahrzehnte wurde der Agardiffusionstest, verwendet. Bei diesem Verfahren wird ein geeigneter, fester Nährboden mit dem zu prüfenden Bakterienisolat rasenartig beimpft und vor dem Bebrüten mit antibiotikahaltigen Testblättchen belegt. Die Substanzen diffundieren in den Nährboden und ein Konzentrationsgradient baut sich um das Testblättchen auf. Die Größe der entstehenden Hemmhöfe im Bakterienrasen (Durchmesser in mm) kann indirekt mit MHK-Werten korreliert werden und für die Einteilung in empfindliche und resistente Bakterien genutzt werden. Dieses Verfahren kann nur für schnell wachsende, aerobe Bakterien verwendet werden und ist auch dann methodisch sehr anfällig und nur mäßig reproduzierbar.

Als Goldstandard gelten die Verdünnungsmethoden, entweder als Bouillondilutionsverfahren oder als Agardilutionsverfahren. Dabei werden verschiedenen Konzentrationsstufen des Wirkstoffs in flüssigem bzw. festem Medium mit einer normierten Menge Bakterien beimpft und nach dem Bebrüten das bakterielle Wachstum in den verschiedenen Konzentrationsstufen beurteilt. Die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums (in $\mu\text{g/ml}$), bei der unter diesen definierten

Bedingungen kein sichtbares Keimwachstum mehr erfolgt, wird als MHK bezeichnet. Dieses Verfahren kommt dank der Verfügbarkeit von kommerziell hergestellten Mikrotiterplatten, die mit verschiedenen Antibiotika in unterschiedlichen Verdünnungsstufen beschichtet sind, immer häufiger zum Einsatz.

In der Veterinärmedizin hat sich die DVG-Arbeitsgruppe „Antibiotikaresistenz“ darum bemüht geeignete Wirkstoffe und Wirkstoffkonzentrationen für die Resistenztestung mittels Mikrobouillondilution zusammenzustellen und solche Mikrotiterplatten für verschiedene Anwendungsbereiche (Isolate von Nutztieren, Mastitisisolate, Isolate von Kleintieren) kommerziell verfügbar zu machen. Bei Abnahme ausreichender Mengen können solche Platten auch nach laborspezifischen Bedürfnissen konfektioniert werden. Da die Zahl der prüfbaren Wirkstoffe und Konzentrationsstufen begrenzt ist, ist es unumgänglich sich auf Vertretersubstanzen für Substanzklassen oder Repräsentanten von Gruppen kreuzresistenter Wirkstoffe zu beschränken, auch wenn sich nach Herstellerangaben einzelne Arzneimittel hinsichtlich ihrer Galenik oder anderer Aspekte günstig von anderen der gleichen Substanzgruppe abheben sollen. Die Auswahl der Konzentrationsstufen erfolgt unter dem Aspekt, dass mindestens drei Konzentrationsstufen für ein aussagekräftiges Ergebnis geprüft werden müssen. In Abhängigkeit von den zu testenden Erregern liegen für manche Wirkstoffe sehr unterschiedliche Grenzwerte für die Klassifizierung in empfindlich bzw. resistent vor, so dass entsprechend mehr Konzentrationsstufen vorgegeben werden müssen. Insgesamt kann das Plattenlayout wegen der hohen Stückzahlen der produzierten Chargen nur mit Verzögerung den neu auf den Markt kommenden oder aus der Zulassung fallenden Wirkstoffen angepasst werden und individuelle Wünsche zur Prüfung bestimmter Wirkstoffe aus einer Substanzklasse in Abhängigkeit der in einer Praxis verwendeten Arzneimittel können nicht berücksichtigt werden. Problematisch ist außerdem nach wie vor die Übersetzung der im Labor ermittelten MHK-Werte in die Empfindlichkeitskategorien sensibel bzw. resistent, da Grenzwerte für die erreichbaren Wirkstoffspiegel nicht für alle Substanzen, nicht für alle Tierarten, nicht für alle Indikationen und/oder nicht für alle Erregergruppen vorliegen. Das führt dazu, dass bei der Mitteilung der Ergebnisse der Resistenzprüfung hinter der Angabe der ermittelten MHK-Werte nicht bei allen Wirkstoffen eine Kategorisierung des Erregers in empfindlich oder resistent vorgenommen werden kann.

Zusammenfassung: Der **Begriff Resistenz** bezeichnet eine **graduell variierende Unempfindlichkeit** von Mikroorganismen gegenüber antimikrobiellen Wirkstoffen. Der Grad der Unempfindlichkeit ist im Labor **messbar als minimale Hemmkonzentration (MHK)**. Im Hinblick auf die Therapierbarkeit einer bakteriellen Infektion muss die **MHK in Beziehung gesetzt werden zu den im Wirtsorganismus erreichbaren Wirkstoffspiegeln**. Liegt die MHK des Erregers unterhalb des therapeutisch erreichbaren Wirkstoffspiegels (inclusive Sicherheitsfaktoren) **kann** die Behandlung erfolgreich sein. Liegt die MHK darüber ist einer erfolgreichen Behandlung

mit diesem Wirkstoff **unwahrscheinlich**. Leider liegen nicht für alle Erreger-Tierart-Indikation-Kombinationen klinische Grenzwerte vor, so dass eine Vorhersage des therapeutischen Erfolgs anhand der MHK nicht immer möglich ist.

Zum Abschluss sei an einem Beispiel die Mitteilungsweise eines Resistenztestes aus unserem Labor erläutert:

Resistenztest für ein Isolat aus einer Harnprobe

Tieridentifikation	Hund Bello
U-Nr.	
Erreger	hämolyisierende Escherichia coli
Wirkstoff	
Amoxycillin / Clavulansäure	S 2/1
Ampicillin	R 2
Cefovecin	S 0,5
Ceftiofur	S <= 1
Cephalothin	I 16
Chloramphenicol	S 8
Clindamycin	R >= 8
Doxycyclin	S 2
Enrofloxacin	S <= 0,125
Erythromycin	>= 16
Gentamicin	S <= 1
Imipenem	S <=4
Marbofloxacin	S <= 0,125
Oxacillin	>= 8
Penicillin G	R >= 32
Trimethoprim / Sulfonamid	S <= 0,25/4,8

Bei diesen Wirkstoffen können die MHK-Werte den Empfindlichkeitskategorien S, R oder I zugeordnet werden. Wirkstoffe, die schon in vitro mit „R“ beurteilt werden, wirken in vivo i.d.R. nicht. Bei Wirkstoffe, die mit „S“ bewertet werden kann eine Wirksamkeit erwartet, aber nicht garantiert werden. Wirkstoffe, die mit „I“ beurteilt werden, können hinsichtlich ihrer potentiellen Wirksamkeit

Für diese Wirkstoffe liegen für diesen Erreger, diese Indikation und diese Wirtstierart keine Beurteilungskriterien vor anhand derer die MHK-Werte Empfindlichkeitskategorien zugeordnet werden können

Der Zahlenwert entspricht der Minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Wirkstoffes in µg/ml.

R: resistent, I: intermediär, S: sensibel. Ist für den MHK-Wert keine Interpretation in Form von R, I, S angegeben, so ist für die Erreger/Wirkstoff-Kombination keine Aussage möglich (DVG-Arbeitsgruppe "Antibiotikaresistenzen").

Haben Sie noch Fragen zum Thema Resistenzprüfung? Rufen Sie uns gerne an:

Dr. Jutta Verspohl 0511-856 7350

Dr. Judith Rohde 0511-856 7353

Dr. Ute Siesenop 0511-856 7530