



LabTOPs

Wissenswertes aus der Laboratoriumsmedizin

13. Ausgabe – Januar 2013

Redaktion: Dr. med. Maria Shipkova

Zentralinstitut für Klinische Chemie
und Laboratoriumsmedizin
(Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. med. E. Wieland)

Empfindlichkeitstestung von Infektionserregern nach EUCAST

Dr. med. Wolfgang Reiter

Zur Toxikologie der Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB)

Dr.rer.nat. Thomas Plecko

Empfindlichkeitstestung von Infektionserregern nach EUCAST

Dr. med. Wolfgang Reiter

Die Testung der Empfindlichkeit angezüchteter Infektionserreger gegenüber Antibiotika ist eine der zentralen Aufgaben in der medizinischen Mikrobiologie. Hierbei werden die Keime für jedes getestete Antibiotikum in drei Kategorien eingeteilt:

Als **sensibel (S)** gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterium bezeichnet, wenn es *in vitro* von einer Konzentration des Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist.

Als **intermediär (I)** gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterium dann bezeichnet, wenn es *in vitro* von einer Konzentration des Hemstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis einhergeht.

Ein **resistentes (R)** Bakterium wird erst *in vitro* von Konzentrationen inhibiert, bei denen die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens hoch ist.

Intermediär getestete Erreger können durchaus in Kompartimenten, in denen das Antibiotikum hohe Konzentrationen erreicht (z.B. Urin) erfolgreich behandelt werden, während z.B. bei einer Meningitis keine ausreichende Wirkung erzielt werden kann.

Während diese Definitionen in der weltweit gültigen ISO 20776-1 festgehalten ist, unterscheiden sich die vielen nationalen Labormethoden und Bewertungskriterien zum Teil erheblich, nach denen eine Zuordnung der Erreger in eine der drei Kategorien erfolgt.

In unserem Labor erfolgte die Resistenztestung bisher nach den Bewertungskriterien, die der Arbeitsausschuss „Chemotherapeutische Untersuchungsmethoden“ im Deutschen Institut für Normung (DIN) festgelegt hatte, also nach der nationalen deutschen Methode.

Um die Resistenztestung im europäischen Raum zu vereinheitlichen, wurde eine Arbeitsgruppe zur Angleichung der europäischen Grenzwerte eingerichtet, die EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

Die EUCAST hat in den letzten Jahren europaweit einheitliche Labormethoden und Grenzwerte festgelegt, die die unterschiedlichen nationalen Methoden ablösen.

Die EUCAST veröffentlicht alle Informationen zu den Methoden und Grenzwerten sowie die Hintergründe, wie die Grenzwerte ermittelt wurden, allgemein zugänglich und kostenfrei im Internet unter www.eucast.org.

Die neuen Bewertungskriterien sind differenzierter und beurteilen nicht mehr alle Erreger nach den gleichen Grenzwerten. Auch wurden die Grenzwerte jetzt so gesetzt, dass die sogenannten „Wildtypen“, also Bakterien ohne spezielle Resistenzmechanismen von Stämmen mit Resistenzeigenschaften besser abgegrenzt werden. Bei manchen Keim-Antibiotika-Kombinationen gibt es auch indikationsabhängige Grenzwerte. So gelten für *Streptococcus pneumoniae* bei Testung gegen Cefotaxim bei Vorliegen einer Meningitis strengere Grenzen als bei anderen Erkrankungen.

Weltweit und auch in Deutschland verbreitet ist die Testung nach der amerikanischen CLSI-Methode (Clinical Laboratory Standards Institute). Deren Grenzwerte unterscheiden sich zum Teil deutlich von EUCAST, vor allem bei Cephalosporinen. So kann ein Erreger, der nach CLSI als sensibel bewertet wird, nach EUCAST durchaus als resistent gelten. Dies muss bei der Beurteilung von mikrobiologischen Befunden anderer Laboratorien ebenso berücksichtigt werden, wie bei einem Vergleich von Resistenzraten.

In unserem Labor wird die Resistenztestung mit drei verschiedenen Methoden durchgeführt:

Die meisten Keime werden mit dem Vitek 2 getestet. Dies ist ein Automat, der auf einer Karte die Wachstumskinetik der Erreger bei verschiedenen Antibiotikakonzentrationen misst und daraus die MHK bestimmt (minimale Hemmkonzentration, also die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die einen Keim noch an der Vermehrung hindert). Diese MHK-Werte werden nach den EUCAST-Kriterien beurteilt. So wird der Keim in eine der drei Kategorien S, I oder R eingeteilt.

Leider funktioniert diese automatisierte Methode nicht bei allen Keimen, z.B. nicht bei Streptokokken. Diese werden mit Agardiffusion getestet. Hierbei werden die Erreger in definierter Weise auf einer speziellen Agarplatte ausgestrichen und Plättchen mit einem festgelegten Antibiotikagehalt aufgelegt. Nach Bebrütung über Nacht werden die so entstandenen Hemmhofdurchmesser bestimmt und nach den EUCAST-Kriterien bewertet.

Einige wenige Keime können auch nach dieser Methode nicht bestimmt werden. Hier muss die MHK bestimmt werden. Wir machen das mit der E-Test-Methode. Dabei werden die Keime wie bei der Agardiffusion ausgestrichen, statt Antibiotika-Plättchen wird jedoch ein Streifen aufgelegt, auf dem sich ein Antibiotikum-Konzentrationsgradient befindet. Allerdings kann man nur einen Streifen pro Platte auflegen und die Materialkosten für die Testung liegen bei ca. 4 - 12 € pro getestetem Antibiotikum.

Daher werden wir diese Testung nur nach Rücksprache mit Ihnen durchführen.

Insgesamt ist die Resistenztestung für uns im Labor aufwändiger geworden. Wir sind dennoch von der neuen Methode überzeugt, da sie Antibiotika-Resistenzen zuverlässiger erkennen kann.

Zur Toxikologie der Gamma-Hydroxybuttersäure (GHB)

Dr.rer.nat. Thomas Plecko

Allgemeines

GHB wird als endogene Substanz im Gamma-Aminobuttersäure- (GABA) Stoffwechsel gebildet und ist in der Lage die Blut-Hirn-Schranke zu passieren. Therapeutisch wird GHB in Deutschland als *i.v.* Narkotikum (Somsanit®) und antikataplektisches Mittel (Xyrem®) eingesetzt. Missbräuchlich findet GHB Verwendung als Partydroge (Liquid Ecstasy, Liquid X, Salty Water, Fantasy u.v.a.) und seltener als Bestandteil von K.o.-Tropfen. Die Substanz ist, trotz des irreführenden Szene-Namens, weder chemisch noch pharmakologisch verwandt mit in Ecstasy enthaltenen Substanzen (MDA, MDMA).

Rechtliche Situation

GHB und seine Salze unterliegen in Deutschland seit 2002 dem Betäubungsmittelgesetz. Vorläufersubstanzen wie Gamma-Butyrolacton (GBL) und 1,4-Butandiol (BD) unterliegen nicht dem BtMG und werden nach Einnahme im Magen zu GHB umgesetzt oder können über eine einfache chemische Reaktion zu GHB umgesetzt werden. Da GBL und BD in der chemischen Industrie weit verbreitete Anwendung als Lösungsmittel finden, ist eine Aufnahme der GHB-Vorläufer in das BtMG nicht erfolgt und wohl auch nicht zu erwarten.

Konzentrationen

In der Literatur werden endogene GHB-Plasmakonzentrationen bei Personen ohne exogene GHB-Zufuhr von 0 bis 6,6 mg/l beschrieben, wobei die Mittelwerte bei ca. 1 mg/l liegen. Die gängigen cut-offs zur Differenzierung zwischen endogener Konzentration und exogener Zufuhr liegen bei 5 mg/l für Serum/Plasma und 10 mg/l für Urin. Forensisch tätige Toxikologen diskutieren diese Grenzwerte deutlich abzusenken um die hohe Dunkelziffer, insbesondere bei Strafdelikten zu reduzieren.

Kinetik

GHB wird nach oraler Aufnahme rasch absorbiert. Eine Wirkung tritt innerhalb von 15 Minuten ein. Die höchsten Plasmakonzentrationen werden nach 30-45 Minuten erreicht. Die Halbwertszeit liegt bei 20-60 Minuten. Weniger als 1% werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden. Durch Metabolisierung über Succinsemialdehyd und Succinat entstehen im Citratzyklus letztlich Kohlendioxid und Wasser. Somit sind keine Metaboliten nachweisbar. Dies reduziert die Dauer des analytischen Nachweises auf bis zu 6 Stunden im Plasma und bis 12 Stunden im Urin.

Wirkungen

In den letzten Jahren hat sich GHB aufgrund seiner leichten Zugänglichkeit und seines geringen Preises zu einer gängigen Droge in der Homosexuellen- und Partyszene entwickelt. Die Wirkung von GHB ist ähnlich der des Alkohols und führt abhängig von der Dosierung zu Amnesie, Verwirrtheit, Enthemmung, Schwindel und verstärkter sexueller Erregbarkeit. Einzeldosen von 1-2 g *p.o.* führen zu denen, in der Partyszene erwünschten Effekten wie Entspannung, Anxiolyse und Euphorie. Bei Dosen ab 2,5 g *p.o.* ist bereits mit einer Amnesie und Übelkeit zu rechnen, Dosen ab 3 g können zur Bewusstlosigkeit und größer 4 g zu Atemdepression und Koma führen. Im Unterschied zu Opioidvergiftungen zeigt sich keine Miosis und ein Nichtansprechen auf Naloxon, als auch auf das Benzodiazepin-Antidot Flumazenil.

Ein plötzliches Erwachen von Patienten die mit schwerer Bewusstseinsstrübung in die Klinik eingeliefert worden sind ist typisch für die Einnahme von GHB. Länger andauernde Nachwirkungen sind in der Regel nicht zu erwarten, so dass Patienten auch aufgrund der amnestischen Wirkung schnell das Krankenhaus verlassen wollen (*fast-in, fast-out*-Effekt).

GHB, GBL und BD sind farblose und nahezu geschmacklose Flüssigkeiten und lassen sich als solche unbemerkt in Getränke mischen. Die Wehrlosigkeit der Opfer und eine, insbesondere bei der Kombination mit Alkohol, auftretende anterograde Amnesie wird für sexuelle Übergriffe und Raubdelikte ausgenutzt. Die Verwendung von GHB als Bestandteil von K.o.-Tropfen ist in den USA weit verbreitet und findet sich zunehmend auch in Europa. Andere in K.o.-Mittel verwendete Substanzgruppen sind Benzodiazepine, Hypnotika (Zopiclon, Zolpidem, Zaleplon), Ketamin, Diphenhydramin.

Analytik

Der Nachweis von GHB aus Urin, Blut sowie Flüssigkeiten und Getränke- und Getränkeresten wird in unserem Institut mittels Gaschromatographie in Kombination mit Massenspektrometrie durchgeführt. Während der Routinezeiten kann eine Anforderung innerhalb 2 Stunden durchgeführt werden. Außerhalb der Routinezeiten (Nachts und am Wochenende) ist es ausreichend die gewonnenen biologischen Proben bei 2°C bis 8°C aufzubewahren. Wichtig ist nur die Proben aus oben genannten Gründen so schnell wie möglich zu gewinnen. Insbesondere bei der Aufklärung von vermuteten Straftaten ist eine frühe Probengewinnung unabdingbar. Zur Zeit evaluieren wir in unserem Institut einen enzymatischen „Schnelltest“, welcher bei Eignung auch rund um die Uhr angeboten werden könnte.

Wir laden herzlich ein zu:

FESTSYMPOSIUM AM 27.02.2013
50 JAHRE LABORMEDIZIN AM KLINIKUM STUTTGART
1963 - 2013

ZENTRALINSTITUT für
KLINISCHE CHEMIE und
LABORATORIUMSMEDIZIN

Klinikum Stuttgart

Labor Prof. Dr. Wieland
24h Analytik für Patienten

**Mehr Information über die Institutswebseite auf
www.klinikum-stuttgart.de**