

## LabTOPs

Wissenswertes aus der Laboratoriumsmedizin

19. Ausgabe – Januar 2016

### Verbesserung der Clostridium difficile Diagnostik

PD Dr.med Shneh Sethi<sup>1</sup> und Prof. Dr.med. Matthias Trautmann<sup>2</sup>

### Drug Monitoring von Méropenem, Cefepim und Linezolid bei Intensivpatienten

Dr. med. Maria Shipkova<sup>1</sup> und Isabella Christiane Bay<sup>2</sup>

## Verbesserung der Clostridium difficile Diagnostik

PD Dr.med Shneh Sethi und Prof. Dr.med. Matthias Trautmann

Clostridium difficile (C. difficile) ist ein häufiger Erreger nosokomialer und Antibiotika-assoziiierter Durchfallerkrankungen. Die C.difficile Infektion (CDI) korreliert oft mit einem verlängertem stationären Aufenthalt und vermehrten Hygienemaßnahmen, dementsprechend kommt es zu einer Steigerung der Behandlungskosten. Eine schnelle, zielgerichtete CDI Diagnostik ist daher nicht nur essentiell, um Patienten rasch antibiotisch zu behandeln, sondern auch um rechtzeitig Hygienemaßnahmen einzuführen, die ein Ausbreiten verhindern und somit Kosten sparen.

Die CDI-Diagnostik beruht einerseits auf einer Kombination von unterschiedlichen Symptomen, die durch den mikrobiologischen Nachweis von C.difficile-Toxin oder Toxinproduzierenden C.difficile in Stuhlproben in Abwesenheit einer anderen Ursache bestätigt wird oder dem koloskopischen oder histopathologischen Befund einer pseudomembranösen Kolitis.

Es gibt unterschiedliche Ansätze für die Labordiagnostik einer CDI, allerdings ist der beste Standard-Labortest für die Diagnostik noch nicht definiert worden. Zu den diagnostischen Verfahren die für die CDI-Diagnostik eingesetzt werden, gehören: der direkte Toxin-Nachweis in der Zellkultur, der Toxin-Nachweis mittels ELISA oder Membran-Immunoassay, Glutamat-Dehydrogenase (GDH)-Nachweis, die Toxigene-Kultur und PCR Methoden. Die aktuelle Leitlinie der „European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases“<sup>(1)</sup> empfiehlt einen 2 oder 3 Schritt Algorithmus, um die Diagnose CDI zu stellen. Hierbei sollte ein erster positiver Test durch einen oder 2 weitere Tests bestätigt werden. Auch deutsche Autoren <sup>(2)</sup> empfehlen einen mehrstufigen Diagnostikalgorithmus bestehend aus einem sensitiven Suchtest, der mit einem Bestätigungstest für die toxische Infektion kombiniert wird. Diese Empfehlungen werden ergänzt durch Literatur <sup>(3)</sup>, die zeigt dass neuere PCR-Verfahren für den Nachweis von C.difficile Toxin-Genen eine deutliche Überlegenheit gegenüber dem Toxin-Nachweis mittels ELISA oder Membran-Immunoassay zeigen.

Um diesen neuen Erkenntnissen gerecht zu werden, hat das Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin, den BD MAXTM Cdiff-Test eingeführt. Hierbei handelt es sich um eine Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (Real-time-PCR) die in der Lage ist, das Toxin B-Gen von C.difficile (tcdB) in Humanstuhlproben nachzuweisen. In Kürze wird der Test folgendermaßen durchgeführt: Eine flüssige oder weiche Stuhlprobe wird entnommen und ins Labor gebracht.

Hier werden die Zellen als Erstes enzymatisch lysiert, die freigewordenen Nukleinsäuren werden dann an magnetische Beads gebunden, um danach im Elutionspuffer eluiert zu werden. Die eluierte DNA wird dann neutralisiert, um mit den PCR-Reagenzien hydriert zu werden. Nach der Beladung der BD MAXTM PCR-Cartridge erfolgt die Amplifikation. Die amplifizierten DNA-Zielsequenzen werden dann mittels Hydrolyse-Sonden (TaqMan®) nachgewiesen. Die Besonderheit dieser Sonden ist, dass sie an einem Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (Fluorophor) und am anderen Ende mit einer Quencher-Gruppe markiert sind. Solange also die Sonden unverändert vorliegen wird die Fluoreszenz des Fluorophors durch den Quencher unterdrückt, sobald allerdings Ziel-DNA bindet, wird das Fluorophor von dem Quencher Molekül abgetrennt und Fluoreszenz wird emittiert. Die gemessene Fluoreszenz-Intensität korreliert also mit der Menge an tcdB Gen-DNA von C.difficile. Parallel wird eine interne Probenverarbeitungskontrolle (SPC) durchgeführt, um einzelne Schritte wie z.B. DNA-Extraktion, Thermocycling, Integrität der Reagenzien und Vorhandensein von Hemmstoffen zu prüfen. Danach erfolgt eine Interpretation der Testergebnisse und das Ergebnis „tcdB-Gen-DNA nachweisbar“ oder „kein Nachweis der tcdB-Gen-DNA“ wird an den Einsender übermittelt. Bei positivem Ergebnis erfolgt vorab eine telefonische Übermittlung.

Ein positives Ergebnis muss klinisch sorgfältig interpretiert werden. Wie bei jedem Labortest, der „totes“ Genmaterial nachweist, kann ein positiver Test auch bedeuten, dass Rest-DNA nach einer früheren C.difficile-Infektion noch im Stuhl vorhanden ist, oder dass eine für den aktuellen Erkrankungszustand des Patienten nicht kausal bedeutsame Besiedlung mit einem zur Toxinbildung befähigten C.difficile-Stamm vorliegt, der sein Gen aber gar nicht „angeschaltet“ hat. Kleinkinder < 2 Jahre sollten auf C. difficile gar nicht untersucht werden, da sie einerseits häufig mit toxinbildenden Stämmen besiedelt sind, andererseits aber noch gar nicht an einer C.difficile-Colitis erkranken können, da die Toxinrezeptoren im Colon noch nicht ausgebildet sind. Dieser neue Assay wird in Einklang mit internationalen Leitlinien zur Diagnostik einer toxischen CDI aus Stuhlproben in einem mehrstufigen Diagnostikalgorithmus eingebaut. Hierbei wird ein sensitiver Suchtest (Glutamat-Dehydrogenase (GDH) EIA) mit einem Bestätigungstest für die toxische Kultur kombiniert (BD MAXTM Cdiff-Test). Die toxische Kultur, also die anaerobe Kultur auf Spezialmedien, wird nur bei Nachfrage angelegt, wenn z.B. eine Antibiotikaresistenztestung oder eine Ribotypisierung erwünscht ist.

1. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases: Update of the treatment guidance document for Clostridium difficile infection: S. B. Debast, M. P. Bauer, E. J. Kuijper: Clinical Microbiology and Infection, Volume 20, Supplement 2, March 2014
2. Clostridium-difficile-Infektion: Lübbert C, John E, von Müller L, Deutsches Ärzteblatt, Jg111, Heft 43, 2014
3. Guidelines for Diagnosis, Treatment, and Prevention of Clostridium difficile Infections Christina M. Surawicz, Lawrence J. Brandt, David G. Binion et al., Am J Gastroenterol 2013; 108:478–498

## Drug Monitoring von Meropenem, Cefepim und Linezolid bei Intensivpatienten

Dr. med. M. Shipkova und Isabell-Christiane Bay

Die Pharmakokinetik von Antibiotika bei Intensivpatienten zeichnet sich sehr oft, insbesondere bei Sepsis, durch eine extreme intra- und inter-individuelle Variabilität aus. Dafür sind hauptsächlich die starken Veränderungen im Verteilungsvolumen und der Elimination der Medikamente verantwortlich. Komplexe, sich dynamisch verändernde und teilweise gegenläufige pathophysiologische Prozesse wie z.B. ein erhöhter Blutfluss, eine gesteigerte Permeabilität der Kapillaren, eine veränderte Proteinbindung, renale und/oder hepatische Dysfunktion, aber auch therapeutische Maßnahmen wie Infusionsbehandlungen und Organersatztherapien sind die Ursachen dieser Situation. Dies bedingt, dass unter Standarddosierung die Konzentrationen im Plasma breit streuen mit der Gefahr einer Unterdosierung sowie unzureichender therapeutischer Wirkung einerseits und andererseits überhöhter Plasmaspiegel, die das Risiko unerwünschter toxischer Wirkungen bergen. Unter diesen Umständen kann ein Drug Monitoring (TDM) zur besseren Therapiesteuerung eingesetzt werden. Die Expertenkommission der Paul Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (1) schreibt hierzu: „ Um die Gabe von Antibiotika bei septischen Patienten besser steuern zu können, wäre eine zeitnahe Spiegelmessung im Sinne eines therapeutischen Drug-Monitorings dringend zu empfehlen, ist aber nur in Ausnahmefällen verfügbar.“ In einer multidisziplinären Abstimmung zwischen Intensivmedizin, Apotheke und Labor wurde entschieden den bestehenden TDM-Service für Antibiotika im Klinikum-Stuttgart um die Substanzen Meropenem, Cefepim und Linezolid zu erweitern. Im Zentrallabor wurden chromatographische Methoden etabliert und Voraussetzungen geschaffen, die eine zeitnahe Messung ermöglichen. Die Apotheke bietet auf der Basis dieser Messungen auf der Station vor Ort eine auf den individuellen Patienten abgestimmte teilweise softwarebasierte Dosisvorhersage und Beratung an. Die therapeutischen Bereiche beruhen auf der Empfindlichkeit der Erreger gegenüber dem Antibiotikum, die

durch die minimale Hemmkonzentration (MHK) definiert ist. Diese wird im Idealfall im mikrobiologischen Labor bestimmt.

Bei Meropenem, Cefepim und Linezolid handelt es sich um sogenannte zeitabhängige Antibiotika, deren Wirkung von der Zeit abhängig ist, in der die Plasmaspiegel oberhalb der MHK der Bakterien liegen. Im Unterschied zu Aminoglykosiden erzielen hohe Spitzenspiegel keinen Vorteil zur Abtötung der Mikroorganismen. Es ist weiterhin zu empfehlen, dass die Konzentrationen über der sogenannten Mutanten-Präventionskonzentration liegen, um das Wachstum von therapieresistenten Mutanten nicht selektiv zu begünstigen (2), Abb. 1).

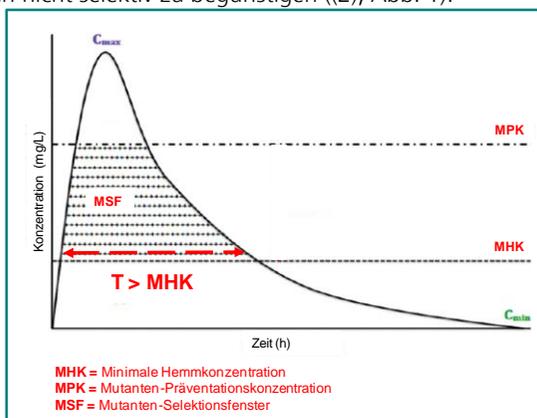


Abb. 1: Beziehung zwischen Pharmakokinetik und Pharmakodynamik bei Antibiotikatherapie mit Bolusgabe (modifiziert nach (2)).

Für eine klinisch effektive Beseitigung der Infektion werden folgende TDM-Ziele angestrebt (3):

	Plasmakonzentration
<b>Carbapeneme:</b>	54-100% der Zeit im Dosierungsintervall 4-5fach über der MHK
<b>Cephalosporine:</b>	60-100% der Zeit im Dosierungsintervall 4-5fach über der MHK
<b>Linezolid:</b>	85-100% der Zeit im Dosierungsintervall über der MHK Talspiegel >9 mg/l - Gefahr von Nebenwirkungen (Myelosuppression)

Bei intermittierender Gabe von Bolusinfusionen können diese Ziele oft nicht erreicht und damit keine effektive Antibiose gewährleistet werden. Alternativen sind eine erhöhte Dosisfrequenz und die Anwendung verlängerter Infusionen, insbesondere kontinuierliche Infusionen, wie das jetzt im Klinikum Stuttgart praktiziert wird. Berichte in der Literatur zeigen, dass mit einer kontinuierlichen Infusion tatsächlich der notwendige Zeitraum über der MHK besser zu erreichen ist (5,6). Als mögliche zusätzliche Vorteile einer Dauerinfusion wurden eine bessere Penetration der Antibiotika in die Gewebe und pharmakoökonomische Effekte diskutiert, da die gewünschten Effekte häufig mit niedrigeren Dosen erreicht werden können (2, 4).

Allerdings fehlen noch Ergebnisse gut kontrollierter Studien, welche die klinische Überlegenheit dieses Ansatzes demonstrieren. Entsprechende Studien sind unterwegs.

Die meisten Daten liegen im Klinikum für Meropenem vor, dessen Spiegelmessung im März 2014 eingeführt wurde. Im ersten Jahr nach Einführung wurden bei ca. 90 septischen Patienten auf der operativen und internistischen Intensivstation ca. 300 Konzentrationen gemessen (Abb. 2). Bei 31 Patienten wurden Nierenersatzverfahren eingesetzt. In 40% war eine Intervention mit Dosisanpassung notwendig. Eine Reduktion war in 54% der Fälle möglich, eine Erhöhung in 35% nötig. In 11% wurden andere Anpassungen durchgeführt (z.B. Einhaltung der maximalen Perfusion-Laufdauer). Eine Ausweitung des Service auf andere Stationen und für andere Medikamente ist möglich.

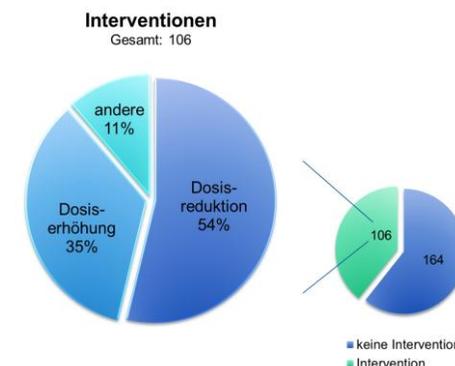


Abb. 2: Meropenemkonzentrationsbestimmungen im Klinikum Stuttgart im Zeitraum 03 /2014 – 04/ 2015.

1. Klaus-Friedrich Bodmann, Béatrice Grabein und die Expertenkommission der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2010
2. Abdul-Aziz MH et al. Semin Respir Crit Care Med.2015;36:136-53
3. Roberts JA et al. Lancet Infect Dis. 2014;14:498–509
4. Gonçalves-Pereira J & Póvoa P. Crit Care.2011;5:R206
5. Ariano RE et al. Ann Pharmacother 2005;39:32-8
6. De Pascale G et al. Intensive Care Med. 2015;41(1):103-10

Die Zusammenstellung aller Inhalte wurde mit Sorgfalt vorgenommen. Eine Haftung, auch für eventuelle Fehler kann nicht übernommen werden.

### Kontakt:

Redaktion: Dr. med. Maria Shipkova  
Zentralinstitut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin mit Laborpraxis,  
Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. Eberhard Wieland  
Zentrum für Diagnostik  
Klinikum Stuttgart, Kriegsbergstraße 60, 70174 Stuttgart  
Tel. 0711 278-34801  
E-Mail: [e.wieland@klinikum-stuttgart.de](mailto:e.wieland@klinikum-stuttgart.de)

[www.klinikum-stuttgart.de](http://www.klinikum-stuttgart.de)  
[www.labor-wieland.de](http://www.labor-wieland.de)