

Antimicrobiële resistentie: een vlag die vele ladingen dekt

Antimicrobial resistance: a multifaceted phenomenon

¹F. Boyen, ¹F. Pasmans, ^{1,2}P. Butaye, ¹F. Haesebrouck

¹Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

²Centrum voor Onderzoek in de Diergeneeskunde en Agrochemie(CODA/CERVA), Departement Biocontrole en Pathologie, Groeselenberg 99, B-1180 Brussel (Ukkel), België

filip.boyen@ugent.be

SAMENVATTING

Antibiotica chemotherapeutica met een antibacteriële werking zijn niet meer weg te denken uit de veterinaire geneeskunde. De opkomst van antimicrobiële resistentie vormt een bedreiging voor de gezondheid van zowel mens als dier en het voortbestaan van de dierlijke voedselproductie zoals wij die vandaag kennen. In dit overzicht worden enkele basistermen en begrippen met betrekking tot antimicrobiële resistentie toegelicht. Bovendien wordt er een samenvatting gegeven van de manier waarop resistentie kan worden bepaald en hoe de resultaten van gevoeligheidstesten dienen te worden geïnterpreteerd.

ABSTRACT

Antibiotics and chemotherapeutics with antibacterial activity are currently indispensable in veterinary medicine. The emergence of antimicrobial resistance poses a threat to the health of both humans and animals and to the animal food production as we know it today. The current review clarifies some basic terms and concepts with regard to antimicrobial resistance. Moreover, a summary is provided of how resistance can be determined and how the results of susceptibility testing should be interpreted.

INLEIDING

Antimicrobiële resistentie is een hot topic, zowel in de humane als de veterinaire geneeskunde. Hoewel er veel aandacht gaat naar antimicrobiële resistentie in de media en de wetenschappelijke wereld, wordt er soms overhaast met termen en begrippen gegoocheld die, gewild of ongewild, aanleiding geven tot verwarring of tot een eenzijdige benadering van dit fenomeen. Het is dan ook de bedoeling van dit artikel om inzicht te geven in de definitie, de nomenclatuur en de testmethodiek van antimicrobiële resistentie. Waar mogelijk wordt de link gelegd naar de praktijk.

ANTIBIOTICA EN CHEMOTHERAPEUTICA

Er bestaat geen wezenlijk verschil tussen antibiotica en chemotherapeutica met een antibacteriële werking. Beide antimicrobiële stoffen werken in op de ontwikkeling van bacteriën in een concentratie die door de gastheer (eukaryoot) kan verdragen worden. Het theoretische verschil tussen beide agentia is de oorsprong van de producten. Een antibioticum is een stof die oorspronkelijk geïsoleerd werd uit schimmels of bacteriën (bijvoorbeeld penicillinen, cefalosporinen, macroliden, aminoglycosiden, tetracyclinen). Achteraf

werden sommige van deze stoffen (semi)synthetisch nagemaakt en/of gewijzigd. Een chemotherapeutikum verschilt van een antibioticum doordat het niet geproduceerd wordt door bacteriën of schimmels, maar een zuiver synthetisch product is (bijvoorbeeld fluoroquinolonen, sulfonamiden).

Antibiotica zijn organische substanties die uitgescheiden worden door micro-organismen uit de natuur die als saprofieten leven in grond en in water. Het zijn dus in wezen natuurlijke producten. Deze substanties die antibiotische of levenshinderende eigenschappen hebben, worden door deze saprofieten niet alleen gebruikt als “biologische wapens” om concurrerende micro-organismen te doden of alvast hun vermeerdering af te remmen en zo een eigen voedselterrein te monopoliseren (D’Costa et al., 2007), maar ook als signaalmoleculen die een primitieve vorm van communicatie tussen bacteriën toelaten (Fajardo et al., 2008).

In 1928 merkte Fleming als eerste op dat *Penicillium*-schimmels die accidenteel waren terechtgekomen op een voedingsbodem beënt met stafylokokken, de groei van deze stafylokokken beletten in een brede zone rondom de schimmelkolonies. De schimmels produceerden dus een antibiotische stof (antibioticum) tegen stafylokokken. Het zou echter tot 1939 duren

vooraleer Florey en Chain er zouden in slagen om dit antibioticum (penicilline) in actieve vorm uit *Penicillium*-culturen te isoleren. De eerste patiënten werden behandeld in 1941 en dit met zeer goede resultaten.

Toen het concept antibioticum en de vindplaats ervan bekend raakten, begon een echte “antibiotica-rush” en trachtte men uit schimmels en andere micro-organismen die uit grond en water geïsoleerd werden nieuwe antibiotische substanties op te sporen met activiteit tegen andere bacteriën of met een breder activiteitsspectrum dan penicilline. In de beginjaren werden antibiotica onthaald als wondermiddelen “goed voor alles”, wat neerkwam op kwakzalverij. Op een tiental jaar tijd werden de meeste antibioticaklassen, die wij thans gebruiken, ontdekt en werden de eerste vertegenwoordigers ervan chemisch gezuiverd en therapeutisch aangewend.

Niemand leek verwonderd dat de typische mens- en dierpathogenen, alsook typische commensalen zo gevoelig bleken te zijn voor zoveel antibiotica die zo maar in de natuur te vinden waren. Maar spoedig zou blijken dat gevoeligheid voor antibiotica in de natuur eerder uitzondering was dan regel. Er werden soms zelfs resistente kiemen ontdekt voordat de antibiotica therapeutisch ingezet konden worden. De enige reden waarom typische mens- en diergeassocieerde commensalen en pathogenen zo gevoelig waren, lag in het feit dat ze miljoenen jaren geen reëel contact hadden met de antibioticaproducten uit de omgeving en dus ook geen nood hadden om afweermechanismen te ontwikkelen. Door de antibiotica in het lichaam van mensen en dieren te brengen, duurde het niet lang vooraleer een resistente minderheidspopulatie werd uitgeselecteerd en het aantal resistente pathogene en commensale bacteriën almaar frequenter werd.

ANTIMICROBIËLE RESISTENTIE DEFINIËREN

De begrippen antimicrobiële gevoeligheid en antimicrobiële resistentie zelf zijn niet zo gemakkelijk te definiëren. Omdat er geen eenvoudige definitie bestaat die antimicrobiële resistentie in alle omstandigheden correct kan omschrijven, is men genoodzaakt om meerdere criteria te gebruiken om een bepaalde bacterie als resistent of gevoelig aan te duiden. Deze zijn het microbiologisch of epidemiologisch criterium, het genetisch criterium, het farmacologisch criterium en het klinisch criterium. Dit houdt in dat bepaalde bacteriële stammen gevoelig kunnen zijn volgens één criterium, maar resistent volgens een ander. Deze vier criteria worden hieronder kort toegelicht. In Figuur 1 wordt de resistentie volgens de twee belangrijkste criteria, het microbiologisch en het klinisch criterium, verduidelijkt.

Een basisbegrip hierbij is minimum inhibitorische concentratie (MIC): de waarde gebruikt om het niveau van gevoeligheid te omschrijven. De MIC-waarde van een bepaald antimicrobieel agens voor een bepaalde bacteriestam is de laagste concentratie van deze stof die onder welbepaalde in-vitrocondities de groei van deze stam kan verhinderen. De MIC-waarde geeft dus

een idee van het bacteriostatisch en niet van het bactericide effect van een antimicrobiële stof. Het verwerven van resistentie resulteert in een verhoging van de MIC-waarde.

Het microbiologisch criterium

Iedere bacteriesoort vertoont een typische gevoeligheid met een soorteigen gevoeligheidsniveau tegenover de verschillende antimicrobiële agentia. Indien men deze gevoeligheden in een grafiek uitzet (Figuur 1) bekomt men een normale distributie van de kiemen behorend tot deze bacteriesoort. De breedte van deze distributie is afhankelijk van de kiem-antibioticum-combinatie en kan substantieel verschillen tussen de verschillende combinaties. Deze normaalverdeling van de populatie beschouwt men als de normale gevoeligheid van de betreffende bacteriesoort. De populatie van bacteriën die dit normale gevoeligheidsniveau vertonen, wordt ook wel de “wild-type” populatie genoemd. Kiemen met verworven resistentie vertonen een verhoogde MIC-waarde ten opzichte van de “wild-type” populatie, waardoor een tweede populatie van resistente kiemen kan ontstaan. Deze tweede populatie kan duidelijk afgezonderd zijn van de “wild-type” populatie, wat aanleiding geeft tot een bimodale verdeling van MIC-waarden of kan overlappen met de gevoelige populatie waardoor het fenomeen van “tailing” ontstaat: de samensmelting van de “wild-type” populatie met de resistente populatie.

Volgens het microbiologisch criterium wordt een bacteriestam dus als resistent aanzien wanneer ze minder gevoelig is voor een bepaald antimicrobieel middel (dit wil zeggen een hogere MIC-waarde vertoont) dan de “wild-type” populatie van de bacteriële species waartoe het behoort (Turnidge en Patterson, 2007; Schwarz et al., 2010). De grenswaarde die de gevoelige (“wild-type”) populatie en de resistente populatie van elkaar scheidt, noemt men de (“wild-type”) “cut-off” waarde. Deze grenswaarde is afhankelijk van de gebruikte methode en kan variëren tussen verschillende methoden. Eenmaal bepaald voor een specifieke methode staat deze “cut-off” waarde echter vast en kan die niet meer veranderen. Deze “cut-off” waarde is per antimicrobieel agens en gebruikte methode kiemsoortafhankelijk en wordt niet beïnvloed door bijvoorbeeld de diersoort waarbij de stam werd geïsoleerd. Deze “cut-off” waarde geeft ook geen informatie over de klinische gevoeligheid van de onderzochte stam. De behandeling van een gevoelige, maar ook van een resistente stam (volgens het microbiologisch criterium) met het bewuste antimicrobieel agens kan bijgevolg al dan niet tot genezing leiden. Beschrijvingen van “wild-type” populaties en “wild type cut-off” waarden kunnen worden gevonden op de website van de European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2011a).

Het genetisch criterium

Dit criterium is een variant op het microbiologisch

criterium. Hierbij wordt nagegaan of genen aanwezig zijn die coderen voor resistentie of er wordt nagegaan of bepaalde mutaties aanwezig zijn die geassocieerd worden met verworven resistentie. Dit criterium veronderstelt evenwel dat het resistentiemechanisme bekend is en kan opgespoord worden. Stammen die deze genen of mutaties bevatten, worden als resistent beschouwd. Sommige stammen die een resistentiegen bevatten, zijn in vivo wel nog gevoelig voor het antimicrobieel middel omdat het gen bijvoorbeeld niet tot expressie gebracht wordt of codeert voor een lage graad van resistentie.

Het farmacologisch criterium

Om resistentie volgens dit criterium te bepalen vergelijkt men de MIC van een antimicrobieel middel voor een bepaalde kiem met de bloedspiegels of weefselspiegels die men kan bereiken bij het dier. In grote lijnen beschouwt men een kiem als resistent tegenover een bepaald antimicrobieel middel wanneer de MIC-waarde hoger ligt dan de bloed- of weefselspiegel die men mits normale dosering (niet toxisch voor het dier of de mens; volgens een aanbevolen behandelingsprotocol) kan bereiken bij het dier (met andere woorden de concentratie van het antimicrobieel middel in de weefsels of in het bloed ligt lager dan de minimumconcentratie nodig om de kiemgroei te verhinderen) (Turnidge en Patterson, 2007; Schwarz et al., 2010).

Dit criterium sluit idealiter aan bij het klinisch criterium. Voor wat algemene (systemische) infecties betreft, ziet men inderdaad dat de klinische resultaten goed correleren met de definitie van gevoeligheid volgens het farmacologisch criterium. Wanneer een bacteriële stam gevoelig is voor een antimicrobiële concentratie die lager is dan de normaal bereikte bloedspiegel, dan mag men logischerwijze verwachten dat de kiem ook in vivo door het antimicrobieel agens zal geremd worden, tenzij de kiem zich in een toestand bevindt (bijvoorbeeld bij een abces) waarin zij moeilijk bereikt wordt. De relatie tussen de gevoeligheid volgens het farmacologisch criterium en de klinische resultaten gaat veel minder op voor lokale infecties, die in de diergeneeskunde wel zeer belangrijk zijn. De antimicrobiële spiegels die verkregen worden bij darmaandoeningen na perorale toedieningen, bij mastitis na intramammaire infusies, bij baarmoederontstekingen na intra-uteriene infusies en bij huidinfecties na lokale behandelingen, hebben weinig te maken met bloedspiegels. Bloedspiegels zijn ook minder belangrijk bij de behandeling van blaasinfecties, waarbij de concentraties in de urine naargelang het antimicrobieel agens aanzienlijk hoger of lager kunnen zijn dan de bloedspiegels. Hetzelfde geldt ook, maar in veel mindere mate, voor de concentraties in de luchtwegen en in de uieralveolen na systemische toediening. Voor al deze types infecties en antimicrobiële toepassingen zou men eigenlijk verschillende interpretatietabellen moeten opstellen, telkens gebaseerd op de verhouding gevoeligheidsniveau kiemplaatselijke weefselconcentratie. Met uitzondering van urine-

weginfecties is er in de diergeneeskunde echter geen dergelijke info beschikbaar. De plaatselijke concentraties zijn te variabel of te weinig bestudeerd om bruikbare interpretatietabellen op te stellen.

Het klinisch criterium

Eigenlijk is enkel het klinisch criterium van belang voor de praktijk. In het klinisch criterium correleert men de in-vitrogevoeligheid van een kiem voor een antimicrobieel middel (dus de MIC-waarde) met de kans op een al dan niet gunstige klinische reactie wanneer men een dier dat besmet is met deze bacterie, behandelt met de normale, aanbevolen dosis van dit antimicrobieel middel (Turnidge en Patterson, 2007; Schwarz et al., 2010). In de praktijk zijn de klinische resultaten van antimicrobiële behandelingen afhankelijk van tal van factoren die men moeilijk kan uniformiseren. Naast de eigenlijke gevoeligheid van de oorzakelijke kiem voor het product waarmee men behandelt, spelen ook volgende factoren dikwijls een rol: het al dan niet aanwezig zijn van andere primaire agentia, zoals virussen, of secundaire kiemen, de immuniteitstoestand van de dieren of het tijdstip in het ziekteverloop waarop de behandeling ingezet wordt. Vaak zijn er bij het begin van de therapie door de infectie reeds letsels gevormd die blijven bestaan ook wanneer het antimicrobieel agens erin slaagt de kiem te onderdrukken of te elimineren. Deze letsels die soms niet of traag herstellen, zijn voor het klinisch resultaat dikwijls belangrijker dan de gevoeligheid van de oorzakelijke kiem. Hieraan dient nog toegevoegd te worden dat men deze factoren in de praktijk meestal onvoldoende kent, geen zekerheid heeft omtrent de immuniteitstoestand bijvoorbeeld of zelfs niet weet welke kiem de infectie verwekt. Om deze redenen moet men klinische impressies en praktijkproeven omzichtig beoordelen als het gaat om resistentie van de oorzakelijke kiem.

Klinische breekpunten worden empirisch bepaald aan de hand van behandelingsproeven, waarbij experimenteel geïnfecteerde dieren behandeld worden met de aanbevolen dosis van het antimicrobiële middel. Wanneer de in-vitro-MIC-waarde van een bacteriestam lager ligt dan dit klinisch breekpunt, wordt een therapeutisch succes verwacht bij gebruik van de aanbevolen dosis en is de kiem (klinisch) gevoelig. Wanneer de in-vitro-MIC-waarde van een bacteriestam hoger ligt dan dit klinisch breekpunt, wordt een therapeutisch falen verwacht bij gebruik van de aanbevolen dosis en is de kiem (klinisch) resistent.

In sommige gevallen is er niet één klinisch breekpunt dat gevoelige en resistente populaties scheidt maar zijn er twee klinische breekpunten: één voor gevoeligheid (lagere MIC is gevoelig) en één voor resistentie (hogere MIC is resistent). De zone die daar tussen valt, wordt de intermediaire zone genoemd. De behandeling van bacteriestammen die een intermediaire MIC-waarde hebben, heeft een onzekere uitkomst. Therapeutisch succes kan bovendien verwacht worden voor stammen met een intermediaire (of soms zelfs re-

sistente) gevoeligheid wanneer hogere dosissen dan de aanbevolen dosis kunnen worden gebruikt (bijvoorbeeld bij β -lactamantibiotica en penicillineresistente streptokokken) of wanneer de infectie plaats vindt in organen of lichaamsholten waar het antimicrobieel agens waarvan sprake hogere concentraties bereikt omwille van de kinetiek van het antimicrobiële middel (bijvoorbeeld fluoroquinolonen in urine, macroliden in de darm). Daartegenover kan de behandeling van een “gevoelige” kiem in bepaalde omstandigheden toch niet het gewenste gunstige klinische effect opleveren, bijvoorbeeld omdat de kiem zich in abscessen (bijvoorbeeld *Rhodococcus equi*) of in een biofilm (bijvoorbeeld *Pseudomonas aeruginosa*) bevindt, of omdat permanente weefselschade werd toegebracht. De intermediaire zone wordt soms ook opgevat als een bufferzone om fysiologische verschillen tussen dieren en in-vitrotestafwijkingen die een groot effect zouden kunnen hebben op de interpretatie van de resultaten (gevoelig/resistent randgevallen), te overbruggen. De term “intermediaire gevoeligheid” kan dus enkel gebruikt worden wanneer de klinische breekpunten worden gehanteerd (klinisch criterium). De term “verminderde gevoeligheid” wordt gebruikt voor stammen met een MIC-waarde boven de “wild-type cut-off”, maar lager of gelijk aan het klinisch breekpunt voor gevoeligheid (CLSI, 2011).

De klinische breekpunten zijn niet enkel afhankelijk van de kiemsoort en het antimicrobieel agens, maar ze kunnen ook verschillen tussen diersoorten en zelfs tussen verschillende organen binnen één diersoort en zijn bovendien afhankelijk van het gebruikte behandelingsprotocol. De klinische breekpunten kunnen bijgevolg in de tijd wel veranderen (in tegenstelling tot de “wild-type cut-off”), bijvoorbeeld wanneer nieuwe wetenschappelijke inzichten leiden tot het aanpassen van een behandelingsprotocol.

Een voorbeeld

In Figuur 1 wordt een voorstelling gegeven van de resultaten van de MIC-waardebepaling van een bepaald antimicrobieel agens X voor enkele honderden stammen van één specifieke bacteriële pathogeen. De “wild-type” populatie bestaat uit stammen die een MIC-waarde hebben die, min of meer normaal verdeeld, varieert tussen 0,03 $\mu\text{g/ml}$ en 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Alle stammen die een MIC-waarde hebben hoger dan of gelijk aan 1 $\mu\text{g/ml}$, hebben in een bepaalde mate resistentie verworven tegen dit antimicrobieel agens. De epidemiologische “cut-off” waarde ligt dus in dit geval op 1 $\mu\text{g/ml}$.

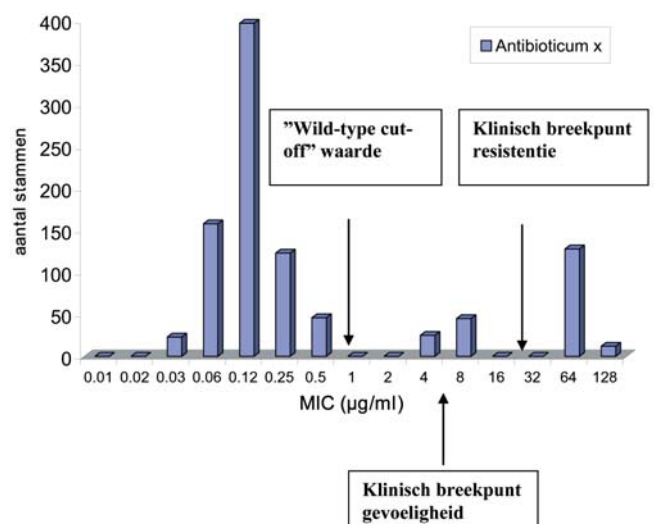
Uit uitgebreide farmacodynamische en klinische in-vivoproeven blijkt dat voor deze kiem en dit antimicrobieel agens (vaak ook in een bepaald doeldier of zelfs een bepaald orgaan), een therapeutisch succes van de standaardbehandeling mag verwacht worden indien de oorzakelijke bacteriën een MIC-waarde hebben kleiner dan of gelijk aan 4 $\mu\text{g/ml}$. Dit is het klinisch breekpunt voor gevoeligheid. Zo zien we dat de stammen met MIC-waarde 4 $\mu\text{g/ml}$ een zekere graad

van verworven resistentie (verminderde gevoeligheid) vertonen (MIC-waarde ligt boven de “wild-type cut-off” waarde), maar dat een infectie met deze stammen toch efficiënt kan behandeld worden mits het aanbevolen behandelingsschema wordt opgevolgd. De stammen met een MIC-waarde groter dan 16 $\mu\text{g/ml}$ zijn klinisch resistent. De kans op therapeutisch succes bij gebruik van het standaardprotocol is klein. De stammen met een MIC-waarde 8 $\mu\text{g/ml}$ of 16 $\mu\text{g/ml}$ zijn intermediair gevoelig. De kans op therapeutisch succes bij gebruik van het standaardprotocol voor deze kiemen is moeilijk te voorspellen.

Natuurlijke ongevoeligheid en verworven antimicrobiële resistentie

Kiemen die volgens het farmacologisch of klinisch criterium als resistent worden omschreven, kunnen dit zijn omwille van natuurlijke ongevoeligheid of verworven resistentie.

Natuurlijke ongevoeligheid of intrinsieke resistentie betekent dat antimicrobiële middelen aan dieren of mensen worden toegediend in hun normale (niet-toxische) dosis, niet tegenover alle bacteriën werkzaam zijn, ook al hebben deze bacteriën geen resistentiegenen verworven. Iedere bacteriesoort vertoont namelijk een typische normale of “wild-type” gevoeligheid met een soorteigen gevoeligheidsniveau voor de verschillende antimicrobiële middelen. De reden van deze lagere gevoeligheid van een bepaalde species in vergelijking met een andere species kan onder andere een mindere permeabiliteit van de celmembraan/celwand voor het antibioticum, de aanwezigheid van bepaalde effluxpompen met een fysiologische functie of de afwezigheid van het target zijn. Zo zijn *Escherichia coli* en *Salmonella enterica* weinig gevoelig voor macroliden. Het mechanisme voor deze natuurlijke on-



Figuur 1. Grafische voorstelling van de resultaten van de MIC-waardebepaling van een bepaald antimicrobieel agens X voor enkele honderden stammen van één specifieke bacteriële pathogeen met aanduiding van “wild-type cut-off” waarde en klinische breekpunten.

gevoeligheid berust op de lage permeabiliteit van hun celwand voor en actieve efflux van deze antimicrobiële middelen. Mycoplasmen zijn bijvoorbeeld niet gevoelig voor antimicrobiële middelen die interfereren met de bouw van de celwand (penicillinen, cefalosporinen) omdat deze kiemen geen celwand bezitten.

Verworven resistentie houdt in dat binnen een bacteriële species die normaal gevoelig is voor een antimicrobieel middel, een ongevoelige subpopulatie ontstaat ten gevolge van een wijziging in het genetisch materiaal.

Kruisresistentie en multiële resistentie

In verband met verworven antimicrobiële resistentie worden soms de begrippen kruisresistentie en multiële resistentie gehanteerd (Schwarz et al., 2010).

Kruisresistentie is het fenomeen waarbij een bacterie resistentie vertoont tegenover een groep van antimicrobiële middelen door eenzelfde resistentiemechanisme. Deze antimicrobiële middelen behoren meestal tot dezelfde scheikundige familie of binden op eenzelfde doelwit. Daarnaast werden er recent mechanismen beschreven die kruisresistentie veroorzaken tussen scheikundig niet-gerelateerde moleculen, zoals fluoroquinolonen en aminoglycosiden. Soms is deze kruisresistentie algemeen tegenover alle componenten van een bepaalde antimicrobiële groep, soms is ze beperkter. Voor streptokokken en stafylokokken codeert het *ermB* (erytromycine ribosoom methylase) gen voor resistentie tegenover zowel macroliden als lincosamiden. Het *mefA* (macrolidenefflux) gen daarentegen codeert enkel voor resistentie tegenover 14- en 15-ringmacroliden, terwijl 16-ringmacroliden en lincosamiden werkzaam blijven.

Bij de interpretatie van de resultaten van anti-biogrammen moet men rekening houden met het bestaan van kruisresistenties. Wanneer een kiem als resistent gerapporteerd wordt tegenover ampicilline, dan weet men automatisch dat deze kiem ook resistent is tegenover amoxicilline.

Multiële of multiresistentie is het fenomeen waarbij een bacterie resistent is tegenover verschillende antimicrobiële middelen waartussen geen kruisresistentie bestaat door middel van onafhankelijke resistentiemechanismen. Multiële resistentie ontstaat dus door een cumulatie van verschillende resistentiegenen in eenzelfde bacteriële stam. Mechanismen die aanleiding geven tot intrinsieke resistentie kunnen vanzelfsprekend niet worden beschouwd bij het beschrijven van multi-resistentie (Schwarz et al., 2010). Een groot probleem bij multiresistentie kan zijn dat wanneer men een antibioticum inzet waartegen resistentie aanwezig is, men ook voor een ganse resem andere antimicrobiële middelen resistentie selecteert.

Testen van antimicrobiële gevoeligheid

Om de gevoeligheid van een bacterie voor een bepaald antimicrobieel middel in vitro na te gaan, kan men verscheidene testen gebruiken. Bij genetische tes-

ten gaat men door middel van moleculair genetisch onderzoek na of resistentiegenen of genetische veranderingen aanwezig zijn die geassocieerd worden met verworven resistentie. Dit kan met behulp van PCR of hybridisatietechnieken. Deze testen worden in de veterinaire routinediagnostiek nog niet veel toegepast. Hierna worden enkel de fenotypische testmethoden besproken.

Men kent twee types fenotypische testen: de dilu-tietechnieken, waarbij verschillende concentratiever-dunningen van antibiotica in vaste of vloeibare media worden getest en de diffusietechnieken, waarbij de antibiotica door diffusie vanuit een drager een concentratiegradiënt veroorzaken in een vast medium. Al deze testen hebben hun voor- en nadelen. De disk dif-fusietest is eenvoudig en goedkoop maar is enkel kwalitatief, waardoor informatie verloren gaat. Bovendien kan de test niet voor alle bacteriesoorten gebruikt worden. De dilu-tiemethoden zijn dan weer kwantitatief en nauwkeurigere methoden die bij een brede waaier van bacteriën toepasbaar zijn. Ze zijn echter duurder en ingewikkelder, waardoor ze zelden als routinemethode worden aangewend in de diergeneeskunde.

Kwantitatieve dilu-tietesten

In dit geval ent men de te testen culturen op agar-platen waarin een antimicrobieel agens in verschillende (meestal tweevoudige) diluties of concentraties opgelost wordt (de agarplaatdilu-tiemethode) of men ent in microtiterplaten met verschillende concentraties van het antimicrobieel agens in een vloeibaar voedingsmilieu (de bouillon-of microtiterdilu-tiemethode). De laagste concentratie van het antimicrobieel agens waarbij de kiemgroei totaal of vrijwel totaal onderdrukt wordt, noemt men de MIC-waarde van het product tegenover de geteste stam. Dit is de laagste concentratie waarbij de kiemgroei volledig wordt geïnhibeerd. Deze MIC-waarde wordt uitgedrukt in µg/ml of mg/l.

Bij MIC-bepalingen meet men alleen de bacteriostatische activiteit. Met de bouillondilu-tietest kan men door overenting op een antimicrobieel agensvrij milieu uit de verdunningen die na incubatie niet gegroeid zijn, een minimum bactericide concentratie afleiden (MBC). Dit bepaalt de laagste antimicrobiële concentratie die het aantal kiemen van de oorspronkelijke cultuur minstens met een factor 1000 doet afnemen. Dergelijke testen worden slechts zelden uitgevoerd omdat ze afhankelijk zijn van talrijke in-vitrovariabelen en ook omdat het al dan niet bactericide werken slechts zelden belangrijk is in de diergeneeskunde. Endocarditis, encefalitis en immunodeficiëntie zijn belangrijke ziektecondities waarvan men weet dat een bactericide werking noodzakelijk is. In de andere gevallen is de bacteriostase of groeiremming door de antimicrobiële agentia, samen met de normale lichaamsafweer blijkbaar even veel of even weinig effectief als de bactericide.

Antimicrobiële agentia kunnen ook actief zijn be-

neden de MIC-waarde. Bij sommige infectietypes heeft men aanwijzingen dat kiemen door antimicrobiële agentia aan concentraties die lager liggen dan de MIC, “gehandicapt” zijn, bijvoorbeeld in hun adhesief vermogen. De laagste concentratie die nog antimicrobieel (in de meest ruime zin) actief is, noemt dan de minimum antibacteriële concentratie (MAC). Deze waarden zijn in vitro echter moeilijk tot niet na te gaan omdat de factor hier niet in rekening kan gebracht worden. Dit brengt met zich mee dat er geen gestandaardiseerde testen bestaan om dit te bepalen.

Kwalitatieve diffusietesten

De agardiffusietest of de kirby-bauermethode is de eenvoudigste en meest toegepaste antimicrobiële gevoeligheidstest in diergeneeskundige bacteriologische laboratoria. Het principe van de test berust op diffusie van het antimicrobiële agens vanuit een reservoir, zoals papierschijfjes of tabletten, in een onderliggend agar-medium. Dit agarmedium wordt voorafgaand geïnoculeerd met een gestandaardiseerde hoeveelheid micro-organismen. Het micro-organisme wordt dus blootgesteld aan een continue gradiënt van antimicrobiële concentraties, waarbij de concentratie vermindert naarmate de afstand tot het reservoir toeneemt. Op deze manier kan een groei-inhibitiezone ontstaan rond dit reservoir. Na overnachting incubatie leest men af. Naargelang de kiemen min of meer gevoelig zijn voor de antimicrobiële agentia, zijn min of meer grote groei-inhibitie zones te zien rond de schijfjes of tabletten, of is er helemaal geen inhibitie. De grootte of diameter van deze inhibitiezones kan men soms correleren met de MIC van dezelfde antimicrobiële agentia tegenover dezelfde stammen. Stammen met een lage MIC hebben inhibitiezones die groter zijn dan deze van stammen met een hoge MIC. Bij de introductie van een nieuw antimicrobieel agens voert men met dezelfde stammen kwantitatieve dilutietesten en kwalitatieve diffusietesten uit en correleert men de resultaten. Men kan dan een regressielijn construeren waarop af te leiden is met welke MIC een bepaalde inhibitiezonediameter overeenstemt.

Daar deze werkwijze onrechtstreeks is en doorgaans als minder accuraat wordt beschouwd dan de dilutiemethode, heeft men richtlijnen opgesteld die alleen kwalitatief aangeven dat een testuitslag van bijvoorbeeld 20 mm (of minder) duidt op resistentie terwijl een zonediameter van bijvoorbeeld 25 mm (of meer) duidt op gevoeligheid (meestal volgens het klinisch criterium). Meestal laat men ook een tussengebied toe waarover men zich niet goed durft uit te spreken. Dit noemt men dan intermediaire gevoeligheid. Dit komt doordat de diffusie van het antimicrobiële agens en de groeisnelheid van de kiem van veel verschillende factoren afhankelijk zijn en de inoculatie-dosis niet gemakkelijk, tot zelfs onmogelijk te standaardiseren is. Deze variatie kan resulteren in een verschillende inhibitiezone. De interpretatienormen die de breekpunten (zie klinisch criterium) voor gevoelige, intermediair gevoelige en resistente stammen

beschrijven, worden door onder andere het “Clinical and Laboratory Standards Institute” (CLSI; voorheen NCCLS) opgesteld in tabellen die verschillen van antimicrobieel agens tot antimicrobieel agens en soms ook van bacteriële species tot bacteriële species. Verscheidene andere normeringsinstituten stellen andere voorschriften voor en hebben dus andere interpretatieve criteria. Soms, maar lang niet altijd, resulteert dit in het anders klasseren van de stammen in gevoelig of resistent.

Een nadeel van deze methode is dat zij enkel kan gebruikt worden bij goed groeiende kiemsoorten en dat zij meestal slechte resultaten geeft voor antimicrobiële agentia die bestaan uit moleculen die niet goed diffunderen. Deze moeilijk diffunderende producten vertonen op een korte diffusieafstand een zeer groot concentratieverschil. Wanneer deze concentratiegradiënt niet werkbaar is, kan dit eventueel worden verholpen door het antimicrobiële agens meer tijd te gunnen om te diffunderen alvorens de agarplaat geïnoculeerd wordt met de te testen stam (diskprediffusietest) (Boyen et al., 2010), of er kan een kwantitatieve diffusietest worden gebruikt. Deze methoden kunnen bijvoorbeeld bij polymyxinen (colistine) en daptomycine worden toegepast.

Kwantitatieve diffusietesten

Kwantitatieve resultaten worden bereikt met behulp van de concentratiegradiënt strip (bijvoorbeeld E test®). Een continue concentratiegradiënt van een antimicrobieel agens diffundeert vanuit een kunststof strip in een agarmedium geïnoculeerd met een reïncultuur van de te testen bacteriestam. Deze strip bevat over zijn gehele lengte een vastgestelde continue concentratiegradiënt van een gestabiliseerd en gedroogd antimicrobieel agens en een concentratieschaal om de MIC-waarde te kunnen bepalen. Na incubatie kan men de MIC nagaan door de concentratie af te lezen op de plaats waar de inhibitiezone de strip raakt. Studies hebben aangetoond dat de resultaten die bereikt worden met deze test zeer goed overeenstemmen met de resultaten van dilutietesten.

Het testen van resistentie in de praktijk

Na de identificatie van een bacteriële stam die klinisch oorzakelijk of belangrijk geacht wordt, legt men meestal ook een antibiogram aan. Of er al dan niet een antibiogram wordt gemaakt, kan afhankelijk zijn van de vraag van de clinicus die het monster instuurt, maar het wordt in de eerste plaats bepaald door het resultaat van het bacteriologisch onderzoek, waarbij enkel een antibiogram van een oorzakelijk pathogene kiem zinvol is. De interpretatie van de pathogene rol van de geïsoleerde en te testen stam is dikwijls erg moeilijk. Gevoeligheidsbepalingen uitgevoerd op niet ter zake doende stammen zijn erg misleidend en veroorzaken grove fouten.

Het correct uitvoeren van diffusietesten is niet evident. Er kunnen gemakkelijk technische fouten gemaakt worden.

In eerste instantie is de dichtheid van de kiemsuspensie die getest wordt, belangrijk. Deze moet goed gestandaardiseerd worden. Te dichte suspensies geven te veel valsresistente uitslagen en te dunne suspensies geven te veel valsgevoelige uitslagen. De ideale densiteit geeft aanleiding tot een uniforme, matig dense maar niet volledig confluerende groei.

Daarnaast zijn ook de groeikarakteristieken van het micro-organisme van belang. Voor optimale resultaten moet de kwalitatieve agardiffusietest uitgevoerd worden met relatief snel groeiende kiemen. Ruime inhibitie-zones kunnen wijzen op gevoeligheid, maar evengoed op uitgestelde groei ingeval de geteste kiem een trage groeier is.

Sommige antimicrobiële agentia diffunderen bovendien sneller in agardiffusietesten en geven dus steeds grotere zones zonder dat dit duidt op grotere activiteit. Een zeer kleine zonediameter of helemaal geen inhibitiezone wijst echter ontegensprekelijk op resistentie. De aard en samenstelling van het agarmedium kunnen de oorzaak zijn van variabiliteit in de resultaten door beïnvloeding van de groeisnelheid van de bacterie en van de diffusiesnelheid en de activiteit van het antimicrobiële agens. Jammer genoeg zijn compleet gestandaardiseerde biologische agarmedia nagenoeg onmogelijk aan te maken. In de toekomst zou hierin verandering kunnen komen dankzij de ontwikkeling van volledig synthetische media. Voorlopig wordt meestal gebruik gemaakt van het muellerhintonagar- of isosensitestmedium, die toch vrij reproduceerbare resultaten geven.

Bovendien mag de invloed van de incubatietemperatuur niet onderschat worden. De aangelegde antibiogrammen dienen geïncubeerd te worden bij 35°C om goede kiemgroei te bekomen. Bij een lagere temperatuur spelen twee antagonistische effecten een rol. Enerzijds heeft de toegenomen viscositeit van het agarmedium een verkleinend effect op de zonediameter, omdat de aangewende antimicrobiële agentia zich trager verspreiden doorheen het medium dan onder gestandaardiseerde temperatuurvoorwaarden. Anderzijds heeft de afgenomen groeisnelheid van het micro-organisme een vergroterend effect op de zonediameter, omdat het micro-organisme trager en minder goed groeit bij een lagere temperatuur. Normaal gezien overweegt het effect van een verminderde groei zodat de inhibitiezone ruimer is bij een lagere temperatuur en eventueel tot een valsgevoelig resultaat leidt.

Het supplementeren van de atmosfeer met CO₂ om de groei van moeilijk groeiende kiemen toe te laten, kan de pH van de gebruikte media verlagen en daardoor de werkzaamheid van pH-afhankelijke antimicrobiële middelen versterken of verzwakken.

Verder dienen ook de tijdsintervallen tussen de enting van de platen, het aanbrengen van de antimicrobiële agentiaschijfjes en de incubatie zorgvuldig nageleefd te worden.

Alle bovenvermelde factoren kunnen aanleiding geven tot valsgevoelige of valsresistente uitslagen van agardiffusietesten. Daarnaast dient in acht genomen te worden dat de in-vivo-omstandigheden het klinisch re-

sultaat sterk kunnen beïnvloeden. Uitslagen die aangeven dat een kiem resistentie bezit tegenover een antimicrobieel agens, zijn meestal klinisch belangrijk en stemmen overeen met praktijkervaringen. Een intermediair resultaat kan betekenen dat bepaalde variabelen in de gevoeligheidstest dermate voor afwijkingen kunnen zorgen dat er geen conclusie kan getrokken worden.

Hoewel dilutietesten als meer accuraat beschouwd worden dan de kwalitatieve agardiffusiemethode, dient men toch te beseffen dat de dilutiemethode momenteel een variabiliteit in de resultaten van meestal één dilutiestap vertoont. Voor combinaties van bepaalde antibiotica en kiemen kan dit zelfs nog groter zijn. Dit wil zeggen dat een minimum inhibitorische concentratie van bijvoorbeeld 2 µg/ml bij herhaling van de test een MIC van 1, 2 of 4 µg/ml kan worden.

CONCLUSIE

Het onderscheid tussen gevoelige en resistente bacteriën is afhankelijk van het gebruikte criterium. Aangezien gevoeligheidstesten in vitro moeten gebeuren, is het niet evident om aan deze resultaten een klinische betekenis vast te knopen. Ondanks deze beperkingen probeert men middels de opgestelde normen en klinische breekpunten ervoor te zorgen dat een resultaat dat aan een clinicus doorgegeven wordt, een zo goed mogelijke reflectie is van wat er in de praktijk mag verwacht worden. De rol van de dierenarts in de keuze van het antimicrobiële middel blijft evenwel bepalend en is gebaseerd op de specifieke klinische situatie. Daarnaast is het ook niet evident om op een betrouwbare manier de gevoeligheid van bacteriën te bepalen en wordt dit het beste aan ervaren laboratoria overgelaten. Deze horen niet enkel de antibiogramtechniek te beheersen en behoorlijk toe te passen, ze moeten vooral ook in staat zijn de betekenis van de geteste stammen te interpreteren.

REFERENTIES

- Boyen F., Vangroenweghe F., Butaye P., De Graef E., Castryck F., Heylen P., Vanrobaeys M., Haesebrouck F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary Microbiology* 144, 359-362.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved standard, 3rd ed., M31-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011). *Generation, Presentation and Application of Antimicrobial Susceptibility Test Data for Bacteria of Animal Origin: a Report*. 1st ed. X08-R.
- D'Costa V.M., Griffiths E., Wright G.D. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology* 10, 481-489.
- EUCAST (2011a) MIC Distributions. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* http://www.eucast.org/mic_distributions/

EUCAST (2011b) MIC Distributions. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
 Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F., Martínez J.L. (2008). The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* 3, e1619.

Schwarz S., Silley P., Simjee S., Woodford N., van Duijkeren E., Johnson A.P., Gaastra W. (2010). Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology* 141, 1-4.

Turnidge J., Paterson D.L. (2007). Setting and revising antibacterial susceptibility breakpoints. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 391-408.



Diergeneeskundige analyses uitgevoerd onder toezicht van **ervaren dierenartsen**.

Een team van **diergeneeskundige pathologen**, zowel voor histologie als cytologie.

Persoonlijke service en klinische interpretatie.

medvet | diergeneeskunde

Emiel Vloorsstraat 9 BE-2020 Antwerpen
 T +32 3 30 30 800 F +32 3 30 30 880
 S www.medvet.be E info@medvet.be