

Cefazolin-Therapie bei kritisch kranken Patienten

Ein LC-MS-basierter Ansatz für das Cefazolin-Monitoring auf den Intensivstationen der Klinikum Chemnitz gGmbH



T. Böhle¹, U. Georgi², A. Friedrich², G. Stamminger¹, D. Pohlers¹

¹ Zentrum für Diagnostik GmbH, ² Zentralapotheke
Klinikum Chemnitz gGmbH, Flemmingstr. 2, 09116, Chemnitz



Einleitung

Blutstrominfektionen durch MSSA (*Methicillin-sensible Staphylococcus aureus*) sind mit einer hohen Krankenhaussterblichkeit (15 - 40 %) assoziiert. Neben Flucloxacillin hat sich Cefazolin als effizientes Antibiotikum für die Therapie von MSSA-Blutstrominfektionen erwiesen. Eine TDM-gesteuerte Optimierung der Antibiotika-Therapie ist Teil der S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Infektiologie zum Antibiotic Stewardship (ABS). Dies setzt zunächst die adäquate Bestimmung des wirksamen Cefazolin-Spiegels voraus. Die Wirkung beruht auf dem freien (ungebundenen) Substanzanteil im Serum, auf welchen sich auch die MHK (minimale Hemmkonzentrationen) beziehen. Für Substanzen mit einer hohen Plasmaproteinbindung (PPB) wie Cefazolin (PPB ca. 80 %) können jedoch bereits kleine Variationen in der PPB zu signifikanten Änderungen des freien Anteils und damit der Wirkung führen. ■

Zielstellung

In aller Regel wird Cefazolin i. S. nach einer Proteinfällung als Gesamtkonzentration bestimmt. Ziel der Studie ist es zu untersuchen, ob diese gemessene Gesamtkonzentration bei kritisch kranken Patienten mit der Konzentration des freien Anteils hinreichend genau korreliert, um die wirksame Konzentration aus der Gesamtkonzentration ggf. unter Berücksichtigung der Menge an Serumalbumin abzuleiten. ■

Material und Methoden

Cefazolin (CFA) wird nach initialer Bolusgabe per Dauerinfusion verabreicht, Spiegelbestimmungen werden 3-mal wöchentlich durchgeführt. Die Vollblut-Proben sind bei 2 bis 8 °C für mindestens 6 Stunden stabil. Nach der Zentrifugation wird das Serum zur Bestimmung der Gesamtkonzentration an Cefazolin mittels Proteinfällung (Acetonitril/Methanol) und Verdünnung (1:25 mit 20 %-igem Methanol) aufgearbeitet. Die Bestimmung des freien Cefazolin-Anteils erfolgte nach Ultrafiltration (30 min, 1.700 G, 3 kD) des Serums mit anschließender Verdünnung des Filtrats (1:10). Um eine hohe Spezifität bei kurzen Messzeiten (2 min) zu ermöglichen, wird Cefazolin im MRM³-Modus anhand einer charakteristischen zweistufigen Fragmentierung (455→323→156) quantifiziert. Matrixeffekte werden durch die Verwendung von [¹³C₂, ¹⁵N]-Cefazolin als internem Standard (ISTD) kompensiert. Alternativ kann die Bestimmung auch im MRM-Modus erfolgen. Da alle Massenspektren des ISTD Interferenzen mit Cefotaxim ([³⁴S]-Cefotaxim-Isotop) aufweisen, muss eine chromatographische Trennung der Substanzen erfolgen, was mit verlängerten Laufzeiten (4 min) einher geht. Alle Messungen werden an einem Sciex 5500 QTRAP-Tandem-MS durchgeführt. ■

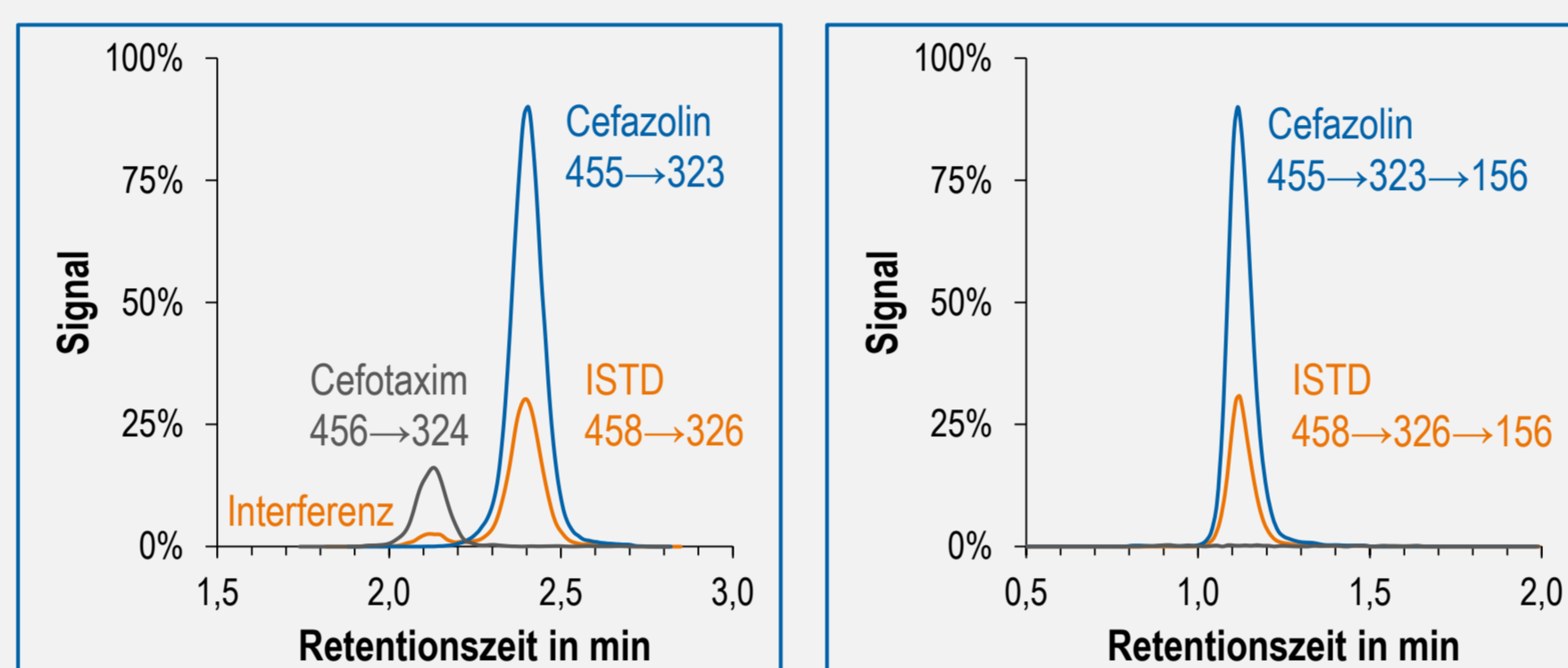
LC-MS und Validierung

Die Messungen erfolgen jeweils unter isokratischen Bedingungen. Da zur Vermeidung von Interferenzen in der MRM-Methode Cefotaxim (CFO) abgetrennt werden muss, wird ein niedriger Methanolanteil im Vergleich zur MRM³-Methode verwendet.

LC-Methode (isokratisch)

Säule	Luna® 3 µm PFP(2) 100 Å; 50 mm × 2 mm; 50 °C
Laufmittel (MRM)	H ₂ O + 0,1% FA (0,35 ml/min) CH ₃ OH (0,10 ml/min)
Laufmittel (MRM ³)	H ₂ O + 0,1% FA (0,35 ml/min) CH ₃ OH (0,15 ml/min)
Ionenquelle	ESI ⁺ : 4500V; TEM: 400 °C; CUR: 40 psi; CAD: low; Gas 1: 50 psi; Gas 2: 50 psi

Die Ionisierung erfolgt in beiden Fällen durch Elektronen-Spray-Ionisierung (ESI) in positiver Polarität.



Probe mit Cefazolin und Cefotaxim im MRM-Modus. Cefotaxim verursacht eine Interferenz in den Massenspektren des internen Standards. Probe mit Cefazolin und Cefotaxim im MRM³-Modus. Durch die zweistufige Fragmentierung wird die Interferenz mit Cefotaxim ausgelöscht.

Einstellungen MRM

Q1	Q3	ID	Dwell (ms)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
455	323	CFA 1	50	41	10	15	14
455	156	CFA 2	50	41	10	21	18
458	326	ISTD 1	50	41	10	15	14
458	156	ISTD 2	50	41	10	21	18
456	324	CFO	5	11	10	19	20

Einstellungen MRM³ (QTRAP)

Parameter	CFA	ISTD
Fragmentierung (m/z)	455→323→156	458→326→156
DP (V)	40	40
CE (V)	15	15
Q1 Resolution	unit	unit
Range (m/z)	154 - 158	154 - 158
Scan Rate (Da/s)	1.000	1.000
Q0-Trapping	nein	nein
Fill Time (ms)	dynamic	dynamic
Settling Time (ms)	25	25
Excitation Time (ms)	20	20
Q3 Entry Barrier (V)	8	8
AF2 (V)	0,1	0,1
CES (V)	0	0

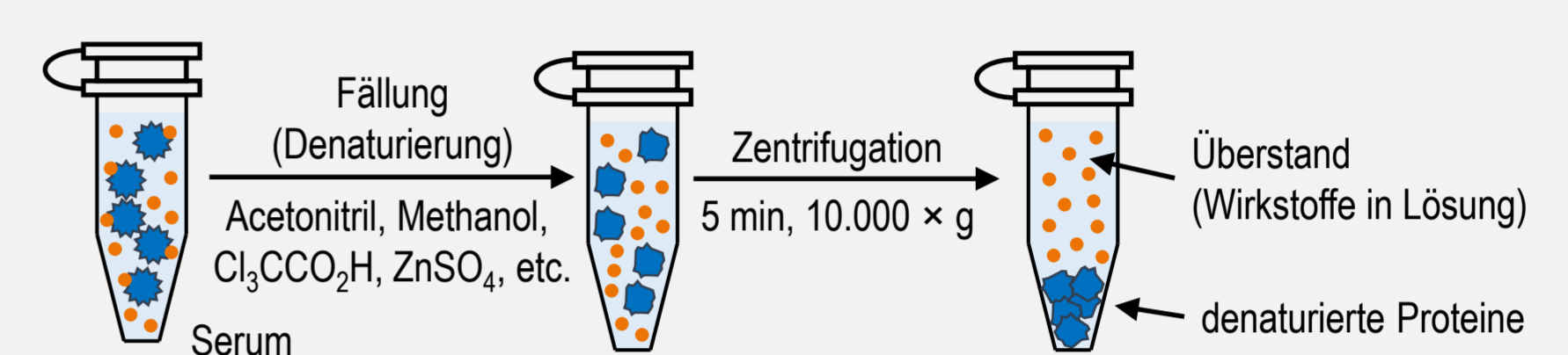
Im Vergleich mit dem MRM-Modus weist die MRM³-Methode einen deutlich größeren linearen Messbereich von 0,2 - 120 mg/l im Ultrafiltrat (MRM: 0,2 - 50 mg/l) bzw. 0,8 - 480 mg/l im Serum (MRM: 0,8 - 200 mg/l) auf.

	LC-ESI ⁽⁺⁾ -MRM ³	Ultrafiltrat	Serum		
LOB, mg/l		0,04	0,13		
LOD, mg/l		0,14	0,39		
LLOQ, mg/l		0,20	0,80		
ULOQ, mg/l		120	480		
nominelle Konzentration, mg/l	2,00	40,0	2,00	40,0	200
Bias, %	0,6	1,6	2,5	0,4	0,8
RDS _q , %	4,8	3,8	7,9	5,0	4,7
RDS _v , %	5,3	5,3	6,6	6,1	6,5

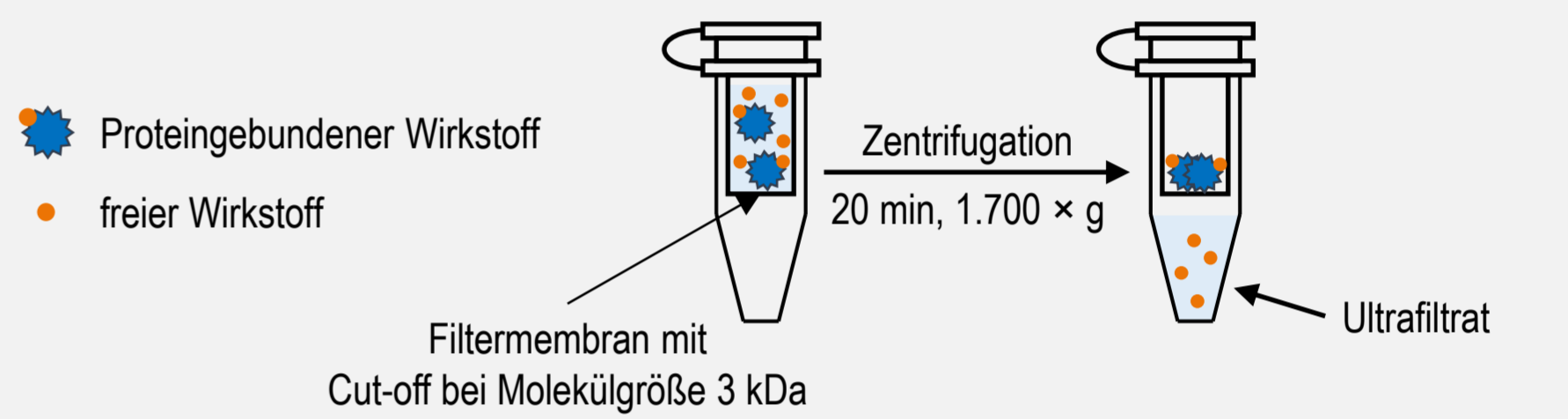
Beim Test auf Interferenzen mit 170 gängigen Medikamenten bzw. deren Metaboliten konnten im MRM³-Modus keine Überlagerungen der Massenspektren beobachtet werden. ■

Filtration vs. Proteinfällung

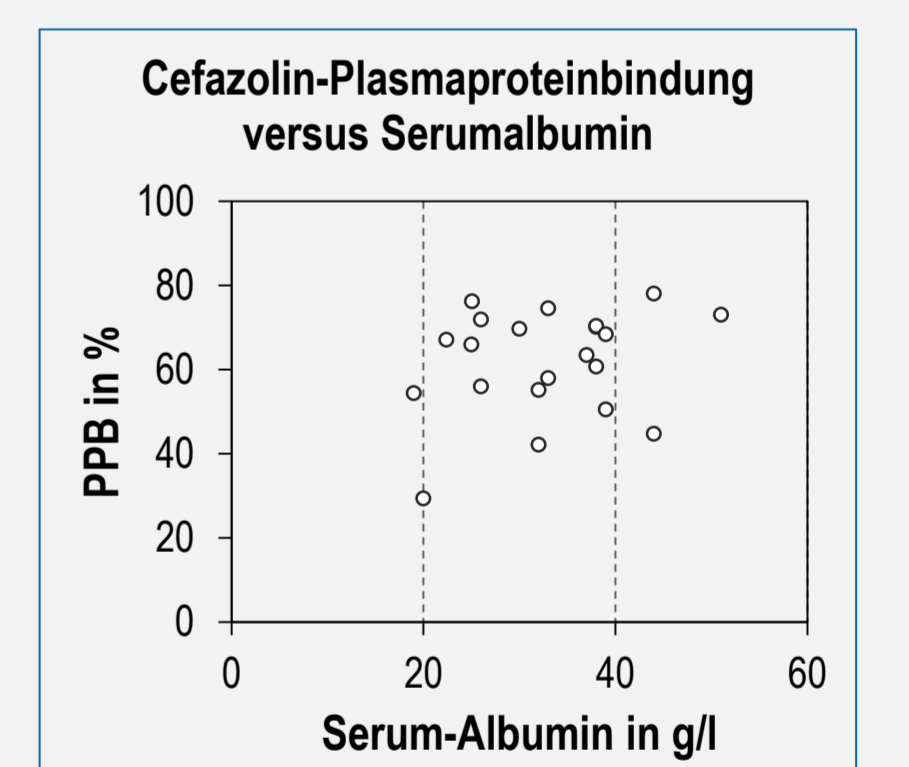
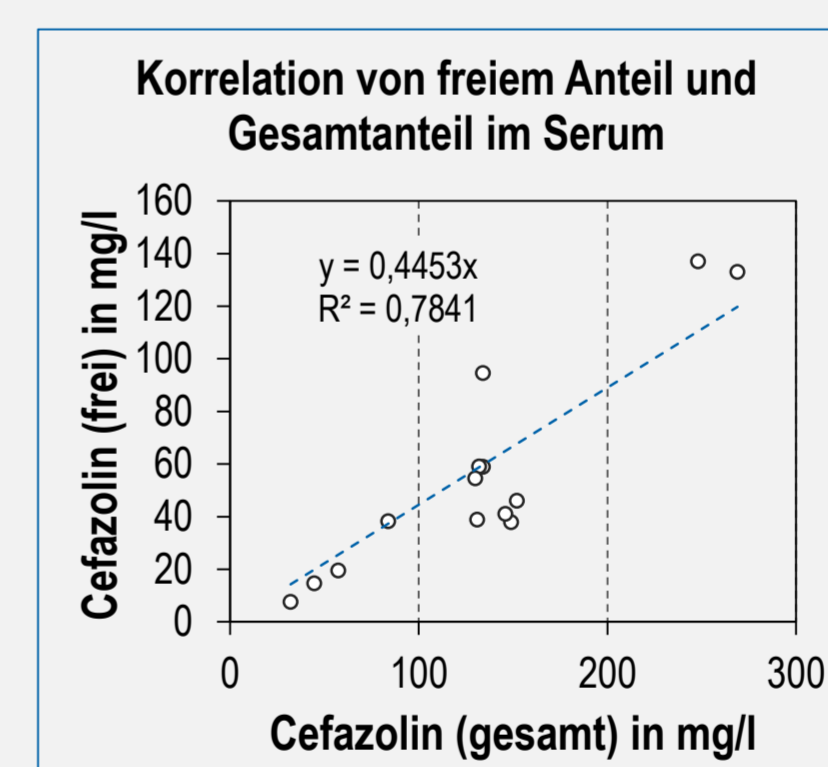
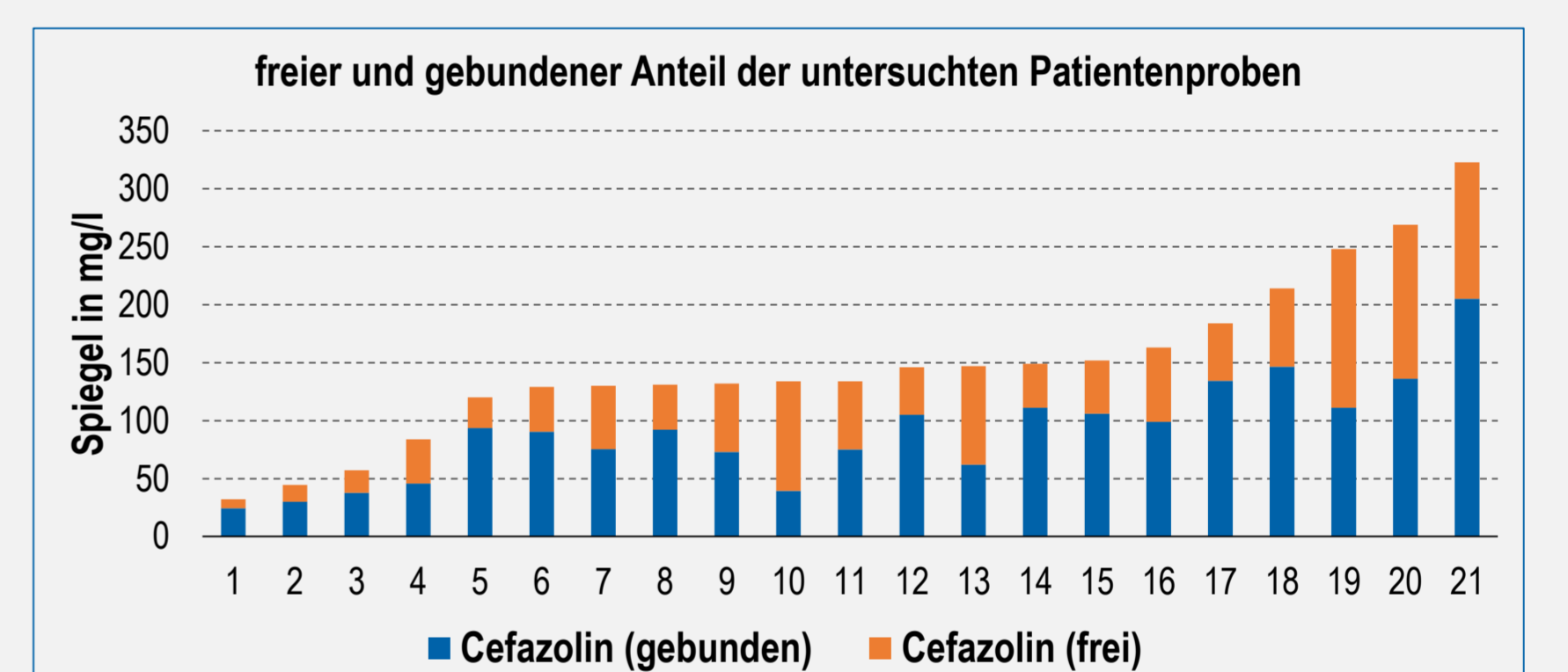
Mit der Proteinfällung erfolgt eine Denaturierung der Transportproteine. Der gebundene Anteil des Wirkstoffs wird von den Bindungsstellen abgelöst. Das Ergebnis spiegelt die Gesamtkonzentration der Probe (als Summe aus freiem und gebundenem Anteil) wieder.



Bei der Ultrafiltration werden Proteine (samt gebundener Wirkstoffe) durch Filtration über eine mikroporöse Membran abgetrennt. Im Filtrat befindet sich nur der freie Anteil des Wirkstoffs. ■



Ergebnisse



Die Auswertung der Patientenproben (n=21) zeigt, dass die freien Anteile von Cefazolin bei einer angegebenen PPB von 80 % in einem Bereich von 29 - 78 % (Mittelwert 62 %, Median 66 %) variieren. Ursächlich für die Abweichung zu den Literaturdaten ist v. a. das Patientenkollektiv aus kritisch kranken Erwachsenen, die häufig Störungen der PK/PD und des Proteinhaushalts aufweisen. Zwischen dem Grad der PPB und den parallel bestimmten Albumin-Spiegeln wurde keine Korrelation gefunden. ■

Zusammenfassung

Zwischen den gemessenen freien und Gesamtanteilen von Cefazolin i. S. findet sich keine hinreichend genaue Korrelation. Die Berechnung des freien und damit wirksamen Cefazolin-Anteils mithilfe der PPB aus dem Gesamtanteil i. S. ist stark fehlerbehaftet und kann nur eine grobe Näherung darstellen. Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass für die Bestimmung des wirksamen Cefazolin-Anteils i. S. der zusätzliche Aufwand einer Ultrafiltration notwendig und gerechtfertigt ist. ■