

Diplomarbeit

**Ermittlung von Breakpoints für Amoxicillin/Clavulansäure
und Ampicillin/Sulbactam für Escherichia coli durch die
beschleunigte Sensibilitätstestung von Bakterien aus
positiven Blutkulturen nach EUCAST**

eingereicht von

Juliane Magdalena Iser

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor(in) der gesamten Heilkunde
(Dr. med. univ.)**

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Universitätsklinikum für Innere Medizin
Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin
und**

D&F Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof.ⁱⁿ Priv.-Doz.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med.univ. Ines Zollner-Schwetz
und**

Univ.-Ass.ⁱⁿ Dr.ⁱⁿ med. univ. Elisabeth König

Graz, 01.12.2020

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 01.12.2020

Juliane Magdalena Iser eh

Danksagung

An dieser Stelle gebührt mein aufrichtiger Dank Frau Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Ines Zollner-Schwetz und Frau Univ.-Ass.in Dr. med. univ. Elisabeth König, die mich unermüdlich auf dem Weg zu meiner Diplomarbeit begleitet und mich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich begeistert haben. Selbst in Phasen des Arbeitens, die mehr als nur einen Nerv gekostet haben, konnte ich mich stets mit meinen Anliegen und Sorgen an meine Betreuerinnen wenden. Besonders die tolle Betreuung hat aus einer wissenschaftlichen Arbeit bzw. aus einem Arbeitsauftrag eine wertvolle Erfahrung gemacht, welche ich keinesfalls missen möchte.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Christina Strepfl MSc und Annika Hauer BSc für die tolle und lehrreiche Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Zu guter Letzt ein großes Dankeschön an meine Familie und meine Freunde, die mit mir das Leben an Sonnentagen feiern und an Regentagen stets einen Schirm für mich parat haben, unter dem ich Schutz finden kann. Ich liebe euch so sehr und bin für jeden Tag, den ich mit euch verbringen darf, so unglaublich dankbar.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|------|
| Abkürzungen | vi |
| Tabellenverzeichnis..... | x |
| Zusammenfassung..... | xi |
| Abstract | xiii |
| I. Einleitung | 1 |
| 1. Bakteriämie..... | 1 |
| 2. Epidemiologie der Blutstrominfektionen..... | 4 |
| 2.1. Risikofaktoren..... | 5 |
| 2.2. Häufige Erreger | 6 |
| 3. Escherichia coli..... | 7 |
| 3.1. Allgemeines..... | 7 |
| 3.2. E. coli- Bakteriämien und Infektionen | 7 |
| 3.3. Resistenzen..... | 8 |
| 3.3.1. Allgemeines..... | 8 |
| 3.3.2. Ausgewählte Resistenzmechanismen | 9 |
| 3.3.2.1. Inaktivierung von Enzymen, Betalaktamasen | 9 |
| 3.3.2.2. Modifikation von Zielmolekülen | 10 |
| 3.3.2.3. Veränderung von Porinen | 10 |
| 3.3.2.4. Effluxpumpen..... | 11 |
| 3.3.3. Resistenzsituation E. coli | 11 |
| 3.3.3.1. Aminopenicilline | 11 |
| 3.3.3.2. Fluorchinolone | 13 |
| 3.3.3.3. Cephalosporine der 3. Generation..... | 15 |
| 3.3.4. E. coli-Resistenzraten der Universitätsklinik Innere Medizin Graz.... | 17 |
| 4. Relevanz einer schnellen mikrobiellen Diagnostik | 18 |
| 5. Mikrobiologische Diagnostik | 19 |
| 5.1. BD-BACTEC-Blutkultursystem | 19 |
| 5.2. Erregeridentifizierung | 20 |
| 5.2.1. MALDI-TOF Massenspektrometrie..... | 20 |
| 5.2.2. Nukleinsäure-basierende-Verfahren | 22 |
| 5.3. Antimikrobielle Sensibilitätstestung (AST)..... | 22 |
| 5.3.1. Minimale Hemmkonzentration | 22 |
| 5.3.2. Agardiffusionstestung..... | 24 |

| | |
|---|----|
| 5.3.3. Rapide antimikrobielle Sensibilitätstestung | 27 |
| II. Methoden und Materialien | 30 |
| 1. Zielgrößen | 30 |
| 2. Durchführung | 30 |
| III. Ergebnisse | 36 |
| 1. Allgemeines | 36 |
| 2. Time to positivity (TTP) | 36 |
| 3. Hemmhofdurchmesser nach 4 und 6 h in Korrelation mit der MHK | 36 |
| 3.1 RAST Breakpoints für <i>E.coli</i> für Amc/Clav nach 4 h Bebrütungsdauer.... | 38 |
| 3.2 RAST Breakpoints für <i>E.coli</i> für Amc/Clav nach 6 h Bebrütungsdauer.... | 39 |
| 3.3 RAST Breakpionts für <i>E.coli</i> für Amp/Sul nach 4 h Bebrütungsdauer | 41 |
| 3.4 RAST Breakpoints für <i>E.coli</i> für Amp/Sul nach 6 h Bebrütungsdauer | 42 |
| IV. Diskussion..... | 44 |
| 1. Zusammenfassung..... | 44 |
| 2. Limitationen..... | 45 |
| 3. Fazit | 46 |
| Literaturverzeichnis..... | xv |

Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| SOFA | Sequential Organ Failure Assessment Score |
| ESBL | extended spectrum betalactamases |
| MALDI-TOF | matrix assistet laser desorption/ ionization time-of-flight |
| AST | Antimikrobielle Sensibilitätstestung |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| MH | Mueller Hinton |
| MH-F | Mueller Hinton Fastidious |
| β-NAD | Beta-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid |
| RAST | Rapid antimicrobial susceptbility testing |
| COS | Columbia Agar with 5% Sheep Blood |
| Amc/Clav | Amoxicillin/Clavulansäure |
| Amp/Sul | Ampicillin/Sulbactam |
| ATU | Area of Technical Uncertainty |
| TTP | time to positivity |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--|----|
| Abbildung 1: Isolierte Keime von Blutkulturen der Universitätsklinik für Innere Medizin Graz aus dem Jahr 2018(39)..... | 6 |
| Abbildung 2: Die Einteilung der Betalaktamasen nach Ambler nach(58)..... | 10 |
| Abbildung 3: Ländervergleich der Aminopenicillinresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2017(40)..... | 12 |
| Abbildung 4: Ländervergleich der Aminopenicillinresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2013 und 2017(40)..... | 12 |
| Abbildung 5: Ländervergleich der Fluorochinolonresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2017(40)..... | 14 |
| Abbildung 6: Ländervergleich der Fluorochinolonresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2013 und 2017(40)..... | 14 |
| Abbildung 7: Ländervergleich der 3.- Generations-Cephalosporinresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2017(40)..... | 16 |
| Abbildung 8: Ländervergleich der 3.- Generations-Cephalosporinresistenzen von <i>E. coli</i> im Jahr 2013 und 2017(40)..... | 16 |
| Abbildung 9: Zur Verfügung stehende molekulare Methoden zur Identifikation sowie teilweise auch zur Empfindlichkeitstestung und deren mögliche Anwendungszeitpunkte nach(74)..... | 21 |
| Abbildung 10: Links runder Hemmhof von SAM20-Plättchen, rechts ellipsoider Hemmhof durch ETEST®-Reagenzstreifen..... | 24 |
| Abbildung 11: Veranschaulichung der Agardiffusionsmethode(84)..... | 26 |
| Abbildung 12: <i>E. coli</i> -Kultur nach 4 h Inkubationszeit. Bei eindeutigen klar abgrenzbaren Hemmhöfen (rote Linie) kann man den Hemmhofdurchmesser ablesen, bei Hemmhöfen mit keiner eindeutigen Wachstumshemmung (rote strichlierte Linie) sollte dies nicht gemacht werden(87)..... | 29 |

Abbildung 13: Links aufgetaute „microbial pellets“, rechts die mit den „microbial pellets“ beimpfte COS-Agarplatte nach 18-24 h Bebrütungszeit.

Anschließend wurden von den ersten angefertigten Kulturen mittels sterilen Wattestäbchen erneut COS-Agarplatten inokuliert und für 18-24 h bei 35° +/- 1° Celsius inkubiert, um von den ersten Kulturen Subkulturen zu erhalten.....31

Abbildung 14: Links: vier unterschiedliche *E. coli*-Kulturen aus den aufgetauten Isolaten stammend, rechts: vier unterschiedliche Subkulturen, welche auf einer COS-Agarplatte gezüchtet wurden.....31

Abbildung 15: 1) Die hergestellte Bakteriensuspension wurde mit dem Photometer gemessen. 2) 100 µL Bakteriensuspension wurden auf die Agarplatte pipettiert. 3) Die Bakteriensuspension wurde mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. 4a) Plättchen und ETEST®-Streifen für Amc/Clav auf der Agarplatte mit Bakteriensuspension vor der Inkubation. 4b) Plättchen und ETEST®-Streifen für Amp/Sul auf der Agarplatte mit Bakteriensuspension vor der Inkubation.....33

Abbildung 16: MH II-Agarplatte mit Bakteriensuspension nach 18 - 24 h Inkubationszeit. Deutlich erkennbarer runder Hemmhof um das Plättchen sowie eine ellipsoide Aussparung im Bereich des ETEST®-Streifen.....33

Abbildung 17: Verdünnungskontrolle.....34

Abbildung 18: Herstellungsanleitung der 1:1.000.000. Verdünnung(88).....35

Abbildung 19: 1) Blutkulturflaschen wurden mit 5 mL Blut befüllt 2) 1 mL von der 1:1.000.000 verdünnten Bakteriensuspension wurde in die bereits mit 5 mL Blut befüllten Blutkulturflaschen hinzugefügt. 3) Eine für 6 h bebrütete Agarplatte, die zuvor mit 125 +/- 25 µL Blut aus einer positiven Blutkultur benetzt und mit Amc/Clav- und Amp/Sul-Plättchen belegt wurde. Deutlich erkennbare Hemmhöfe, welche mittels

| | |
|---|------------|
| Lineal | abgemessen |
| wurden..... | 35 |
| Abbildung 20: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amc/Clav nach 4 h..... | 38 |
| Abbildung 21: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation Amc/Clav nach 6 h..... | 40 |
| Abbildung 22: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation Amp/Sul nach 4 h..... | 41 |
| Abbildung 23: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amp/Sul nach 6 h..... | 43 |

Tabellenverzeichnis

| | |
|---|----|
| Tabelle 1: Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score)(7)..... | 2 |
| Tabelle 2: Inkubationsbedingungen für die RAPID-AST-Methode(87)..... | 29 |
| Tabelle 3: Ermittelte RAST-Breakpoints für <i>E. coli</i> für Amc/Clav und Amp/Sul | 44 |

Zusammenfassung

Hintergrund

Bakterielle Blutstrominfektionen sind im klinischen Alltag omnipräsent. *E. coli* gilt als der häufigste gramnegative Verursacher solcher Infektionen. Im Falle einer Blutstrominfektion hat die schnelle Auswahl einer adäquaten antimikrobiellen Therapie oberste Priorität. In den meisten europäischen mikrobiologischen Laboren wird die antimikrobielle Sensibilitätstestung unter anderem mittels Scheibendiffusionsmethode nach Richtlinien des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) als Routinediagnostik durchgeführt. 2018 publizierte die EUCAST erstmals das Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST), welches ermöglicht, direkt aus positiven Blutkulturen innerhalb von 4, 6 und 8 h Inkubationszeit das Resistenzverhalten von ausgewählten Keimen gegen antimikrobielle Substanzen festzustellen.

Zielsetzung

Das EUCAST hat für die RAST-Methode für die in Österreich vielfach eingesetzten antimikrobiellen Substanzen Amoxicillin/Clavulansäure (Amc/Clav) und Ampicillin/Sulbactam (Amp/Sul) bis dato noch keine sogenannten „Breakpoints“ für das Resistenzverhalten von *E. coli* veröffentlicht. Eben solche zu ermitteln, war das Ziel dieser Arbeit.

Methodik

Für diese Laborstudie wurden insgesamt 95 *E. coli*-Isolate aufgetaut, welche vom Diagnostik- & Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin stammten. Blutkulturflaschen wurden mit Konservenblut befüllt und mit dem jeweiligen *E. coli*-Isolat gespiked. Sobald das BACTEC-Gerät die Blutkulturen als positiv wertete, konnte das Blut auf eine Agarplatte ausgestrichen und die Amc/Clav- und Amp/Sul-Plättchen aufgebracht werden. Nach jeweils 4 und 6 h Inkubationszeit wurden die Hemmhofdurchmesser abgelesen und dokumentiert. Von allen Isolaten wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) für Amc/Clav und Amp/Sul aus einer Suspension

nach Routineverfahren bestimmt. Die Studie startete Ende Mai 2020 und wurde Anfang Juli 2020 abgeschlossen.

Ergebnisse

Von den insgesamt 95 *E. coli*-Isolaten konnten 89 in die Auswertung eingeschlossen werden. Mittels der abgelesenen und dokumentierten Hemmhofdurchmesser nach 4 und 6 h konnten folgende Breakpoints für die RAST-Methode festgelegt werden. Für Amc/Clav bestehen sowohl für 4 h als auch für 6 h dieselben Breakpoints: $S \geq 16$ mm, $R \leq 13$ mm, ATU 14-15 mm. RAST-Breakpoints für Amp/Sul nach 4 h: $S \geq 15$ mm, $R \leq 9$ mm, ATU 10-14 mm, sowie nach 6 h: $S \geq 15$ mm, $R \leq 11$ mm, ATU 12-14 mm.

Konklusion

Im Rahmen dieser Laborstudie wurden erstmals RAST-Breakpoints für *E. coli* für Amc/Clav und Amp/Sul festgelegt. Die ermittelten Breakpoints und Limitationen sollen weiteren Studien, welche gewiss notwendig sind, um verlässliche Breakpoints publizieren zu können, als Basis dienen.

Abstract

Background

Bacterial bloodstream infections are omnipresent in clinical routine. *E. coli* is considered the most common gram-negative cause of such infections. In case of bloodstream infection, fast identification of an adequate antimicrobial therapy is of highest priority. In most microbiological laboratories, antimicrobial sensitivity testing is carried out using the disc diffusion method in accordance with the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) as a routine diagnosis. In 2018, EUCAST published the Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST) for the first time, which allows to determine the resistance behaviour of selected germs and antimicrobial substances directly from positive blood cultures within 4, 6 and 8 h incubation time.

Object

EUCAST has not yet published any "breakpoints" for *E. coli* for the antimicrobial substances amoxicillin/clavulanic (amc/clav) acid and ampicillin/sulbactam (amp/sul) for the RAST method, which are both widely used in Austria. The aim of this study was to determine breakpoints for the above-mentioned antimicrobial substances.

Methods

For this laboratory study, a total number of 95 *E. coli* isolates from the Diagnostics & Research Institute for Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine were thawed for this laboratory study. Control cultures were created, and afterwards, blood culture bottles were filled with human blood and spiked with the respective *E. coli* isolate. As soon as the BACTEC device evaluated the blood cultures as positive, the blood could be spread on an agar plate and the amc/clav and amp/sul plates could be applied. After 4 and 6 h incubation time, the inhibition zone diameters were read. Minimal inhibitory concentration (MIC) was determined for each isolate according to routine procedures for comparison with RAST results. The study started in late May 2020 and was completed in early July 2020.

Results

89 of the total of 95 *E. coli* isolates were included in the evaluation. By means of the documented inhibition zone diameters after 4 and 6 h, were determined for the following breakpoints for the RAST method. Concerning amoxicillin/clavulanic acid, the same breakpoints were found for both 4 and 6 h: S \geq 16 mm, R \leq 13 mm, ATU 14-15mm. RAST breakpoints for ampicillin/sulbactam after 4 h: S \geq 15 mm, R \leq 9 mm, ATU 10-14mm and after 6 h: S \geq 15 mm, R \leq 11 mm, ATU 12-14 mm.

Conclusion

This laboratory study was the first to establish RAST breakpoints for *E. coli* for the antimicrobial substances amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam. The obtained breakpoints are intended to support further studies, which are certainly necessary to publish evidence-based breakpoints.

I. Einleitung

1. Bakteriämie

Unter dem Terminus Bakteriämie versteht man eine unterschiedlich lang andauernde Anwesenheit von lebensfähigen Mikroorganismen, konkret Bakterien, in der Blutbahn, die mittels positiver Blutkultur für bakterielles Wachstum bei Patientinnen und Patienten mit oder ohne vorhandenen klinischen Zeichen einer Infektion, nachgewiesen werden(1–4). Es gilt zwischen passageren, intermittierenden und chronischen bzw. kontinuierlichen Bakteriämien zu unterscheiden(3,4).

Die überwiegend vorkommende passagere Bakteriämie, welche in der Regel nur wenige Minuten bis Stunden – im Falle von immunkompetenten Patientinnen und Patienten – anhält, kann durch banale Verletzungen von nicht sterilen Körper- und Schleimhautoberflächen entstehen, da diese oftmals transient mit Mikroorganismen kontaminiert sowie von fakultativ pathogenen Keimen besiedelt sind (residente Flora)(3–5). Folglich handelt es sich hierbei um ein allgegenwärtiges Risiko, welches einerseits im Rahmen alltäglicher Tätigkeiten, wie der täglichen Zahnreinigung, und andererseits bei kleineren medizinisch-diagnostischen und therapeutischen (invasiven) Maßnahmen besteht(3,4). Bezugnehmend auf Letzteres kann diese z.B. im Rahmen der venösen und arteriellen Anlage von Zugängen, nach gastrointestinaler Endoskopie, nach Dentalbehandlung, chirurgischer Drainage und Katheterisierung der Harnblase respektive im Rahmen der Manipulation von infiziertem Gewebe sowie zu Beginn einer akuten bakteriellen Infektion auftreten(3,4).

Bei der intermittierenden Bakteriämie handelt es sich um eine Bakteriämie, welche immer auf denselben Mikroorganismus in der Blutbahn zurückzuführen ist und nur episodisch nachgewiesen werden kann(3,4). Diese tritt meist im Zusammenhang mit einer fokalen Infektion (Pneumonie, Osteomyelitis, Spondylodiszitis, Abszesse) auf(3,4).

Bleibt eine Bakteriämie hingegen fortlaufend bestehen, so spricht man von einer kontinuierlichen bzw. persistenten Bakteriämie, welche primär bei bakteriellen Endokarditiden und diversen intravaskulären Infektionsherden auftreten kann(3,4).

Des Weiteren wird zwischen polymikrobieller Bakteriämie, bei der mindestens zwei verschiedene Erregerspezies nachgewiesen werden können, und unimikrobieller Bakteriämie, bei welcher hingegen nur ein Erreger nachgewiesen werden kann, differenziert(2,4). Grundsätzlich kann eine Bakteriämie bei üblicher Keimbelastung transient und folgenlos verlaufen, kommt es jedoch zu einer Immunfehlregulation bzw. zum Versagen der Immunabwehr, kann daraus eine Sepsis resultieren(4,5).

Entsprechend der aktuellen S3-Leitlinie wird eine Sepsis definiert als 'eine akut lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine inadäquate Wirtsantwort auf eine Infektion'((6): p.9). Der sogenannte „Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Score“ ist hinsichtlich der im Rahmen einer Sepsis ausgelösten Organdysfunktion für die Stellung der Diagnose maßgeblich(6–8).

Somit lässt sich eine Bakteriämie deutlich von einer Sepsis abgrenzen, wobei diese Unterscheidung für die weitere Vorgehensweise unerlässlich ist(7). Der Sepsis unterzuordnen ist der septische Schock, der ohne die Applikation von Vasopressoren und trotz entsprechender Volumengabe durch eine anhaltende Hypotension (arterieller Mitteldruck ≤ 65 mmHg) sowie einen erhöhten Laktatspiegel (>2 mmol/l) charakterisiert ist(6,7,9).

| Punkte SOFA-Score | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--|----------------------|----------------------|--|---|--|
| PaO ₂ /FiO ₂ Verhältnis (mmHg) | ≥ 400 | < 400 | < 300 | < 200 bei künstlicher Beatmung | < 100 bei künstlicher Beatmung |
| Thrombozyten ($10^9/\text{mm}^3$) | ≥ 150 | < 150 | < 100 | < 50 | < 20 |
| Bilirubin (mg/dl) oder ($\mu\text{mol/l}$) | $< 1,2$ oder < 20 | 1,2-1,9 oder 20-32 | 2,0-5,9 oder 33-101 | 6,0-11,9 oder 102-204 | $> 12,0$ oder > 204 |
| Mittlerer arterieller Druck (mmHg) | ≥ 70 mmHg | < 70 mmHg | Dopamin < 5 oder Dobutamin (jede Dosierung)* | Dopamin 5,1-15 oder Adrenalin $\leq 0,1$ oder Noradrenalin $\leq 0,1$ | Dopamin >15 oder Adrenalin $> 0,1$ oder Noradrenalin $> 0,1^*$ |
| Glasgow Coma Scale (15-3 Punkte) | 15 | 13-14 | 10-12 | 6-9 | < 6 |
| Kreatinin (mg/dl) oder ($\mu\text{mol/l}$) oder Diurese (ml/d) | $< 1,2$ oder < 110 | 1,2-1,9 oder 110-170 | 2,0-3,4 oder 171-299 | 3,5-4,9 oder 300-400 oder < 500 | $> 5,0$ oder > 440 oder < 200 |
| *Dosierung in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht/min | | | | | |

Tabelle 1 : Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA-Score) nach(7)

Der Begriff „Blutstrominfektion“ umfasst grundsätzlich das gesamte Spektrum klinischer Infektionen, bei denen ein Infektionserreger mittels Blutkultur nachgewiesen werden kann(1).

Überdies können Blutstrominfektionen hinsichtlich ihres Erwerbsorts klassifiziert werden(2,10,11). Man unterscheidet hierfür nosokomiale Blutstrominfektionen (Hospital-onset-bloodstream-infections) von ambulant erworbenen Blutstrominfektionen (Community-onset-bloodstream-infections)(2,10–12). Eine nosokomiale Blutstrominfektion liegt vor, wenn eine Infektion entweder frühestens nach 48 h in Folge einer stationären Aufnahme oder innerhalb der ersten 48 h nach der Entlassung aus dem Krankenhaus auftritt(2,10,13,14). Eine ambulant erworbene Blutstrominfektion ist hingegen dann anzunehmen, wenn die Infektion ambulant auftritt oder innerhalb der ersten 48 h eines Krankenhausaufenthalts nachgewiesen wird(2,10,11,13,14). Diese Unterteilung ist aufgrund des unterschiedlichen Erregerspektrums, welches sich in Resistenzmechanismen, Eigenschaften und Outcome unterscheidet, von klinischer Relevanz(2,10–12,15).

Infolge der steigenden Zahl ambulanter Betreuungen bzw. Behandlungen außerhalb des Krankenhauses kann die „Community-onset-bloodstream-infection“ in zwei weitere Kategorien untergliedert werden(2,10,12,14). Erstens in die „Health-care-associated community-onset-bloodstream-infection“, welche Personen betrifft, die außerhalb der Klinik im engeren Sinne medizinische Dienste in Anspruch nehmen (z.B. Pflegeheime, Hämodialysezentren, häusliche Betreuung) und zweitens in die „Community-associated-community-onset-bloodstream-infection“, unter welche alle übrigen Fälle, die die Kriterien nicht erfüllen, subsumiert werden(2,14).

Ergänzend differenziert man zwischen einer primären und sekundären Bakteriämie/Sepsis(1,3,16,17). Bei ersterer handelt es sich um eine blutkulturbestätigte bakterielle Infektion mit fehlendem Anhaltspunkt für einen Fokus(1,3,16,17). Bei letzterer handelt es sich ebenfalls um eine blutkulturbestätigte

bakterielle Infektion, jedoch mit Indiz für einen Fokus wie z.B. Hautweichteilinfektion, Pneumonie, etc.(1,3,16,17).

2. Epidemiologie der Blutstrominfektionen

Obwohl sich die Medizin stetig weiterentwickelt, stellen nosokomiale Blutstrominfektionen auch heutzutage noch weltweit eine Belastung für die Gesundheit der Allgemeinheit dar und sind mit einer bedeutenden Mortalität und Morbidität vergesellschaftet(18). Nicht selten geht diese Erkrankung mit Langzeitfolgen einher und ist somit mit einem immer größer werdenden Gesundheitsproblem für die Bevölkerung assoziiert(18,19). Entsprechend der vorliegenden Daten wird geschätzt, dass sich europaweit jedes Jahr mehr als 1.2 Millionen Blutstrominfektionen ereignen(18). Die Anzahl an Episoden von nosokomialer Blutstrominfektionen in Europa beträgt jährlich ca. 243.000 – 414.000(18). Überdies sterben in Europa jährlich in etwa 158.000 – 276.000 Patientinnen und Patienten aufgrund von Blutstrominfektionen(18). Auch in Nordamerika geht man jährlich schätzungsweise von 575.000 – 677.000 Blutstrominfektionen aus, wobei ca. 79.000 – 94.000 Personen versterben(18). Hinsichtlich nosokomialer Blutstrominfektionen in Nordamerika geht man von ca. 113.000 – 134.000 Episoden pro Jahr aus(18). Zusammenfassend kann daher für Nordamerika und Europa insgesamt im Mittel von fast zwei Millionen Blutstrominfektionen und durchschnittlich von ca. 300.000 Todesfällen pro Jahr ausgegangen werden(18).

Bezugnehmend auf die Community-onset-bloodstream-infection konnte durch Heranziehen von populationsbezogenen Untersuchungen bei Industrieländern eine Inzidenz von 100 - 150 pro 100.000 ermittelt werden, wobei diese in den letzten Jahren immer weiter anstieg(20–26).

2.1. Risikofaktoren

Eine kanadische Studie konnte eine Reihe von Grunderkrankungen als erhöhtes Risiko für die Entstehung einer Community-onset-bloodstream-infection einstufen(20). Zu diesen Grunderkrankungen zählen z.B. Herzinsuffizienz, Demenz, rheumatische Erkrankungen, Insult, chronische Lungenerkrankungen im Allgemeinen, periphere vaskuläre Erkrankungen, HIV und Krebs(20).

Zuvor wurden als allgemeine Risikofaktoren für die Entwicklung von Blutstrominfektionen laut Studien aus Zentralnorwegen Tabak- und Alkoholkonsum, Eisenmangel, Übergewicht und Bewegungsmangel identifiziert(20,27,28).

Des Weiteren haben dänische Untersuchungen ergeben, dass Patientinnen und Patienten mit Diabetes mellitus oder Leberzirrhose sowie niereninsuffiziente bzw. hämolysepflichtige Menschen ein erhöhtes Risiko haben, an einer Blutstrominfektion zu erkranken(20,29–32). Insbesondere zu Diabetes mellitus liegen einige Daten hinsichtlich des erhöhten Risikos für die Entwicklung verschiedenster spezifischer Blutstrominfektionen vor, wobei diese wohl auf unterschiedlichste Gründe zurückzuführen sind(20,31,32). Dazu zählen ein erhöhtes Bakterienwachstum durch Glucosurie sowie die Dysfunktion von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aufgrund der Hyperglykämie(20,31). Im Rahmen der oben genannten kanadischen Studie haben die Wissenschaftler bereits bekannte Risikofaktoren bestätigt und neue ergänzt(20). Unter den miteinbezogenen Erkrankungen zählen vor allem HIV-Infektionen und Krebserkrankungen zu den besonders bedeutenden Risikofaktoren(20). Man nimmt an, dass diese zwei Erkrankungen aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkung das Risiko für eine Blutstrominfektion erhöhen(20). Bei Krebserkrankungen wird zusätzlich die Körperintegrität aufgrund von Mechanismen der neoplastischen Invasion negativ beeinflusst(20). Eine schwedische Studie schlussfolgerte, dass auch COPD-Patientinnen und -Patienten nach Krankenhausentlassung ein erhöhtes Risiko für nachfolgende Blutstrominfektionen sowohl aufgrund respiratorischer Infektionsquellen als auch anderen Ursprungs aufweisen(20,33). Summa summarum kann man davon ausgehen, dass allgemein Komorbiditäten indirekt ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von

Blutstrominfektionen aufgrund von etwaigen Störfaktoren darstellen(20). Folglich ist es von großer Bedeutung, diese Risikogruppen zu erkennen, um frühzeitig einer Blutstrominfektion entgegenzuwirken und entsprechende Maßnahmen hinsichtlich Prävention, Diagnostik und Therapie zu setzen(20).

2.2. Häufige Erreger

Die weltweit am häufigsten vorkommenden Erreger, die bei Blutstrominfektionen isoliert werden, sind *Staphylokokkus aureus*, *Streptokokkus pneumoniae* und *Escherichia coli*(34–36). Bei Erwachsenen gilt *E. coli* als die am häufigsten im Zuge von Bakteriämien isolierte gramnegative Bakterienspezies(37–40). Dies spiegeln auch regionale Daten vom Resistenzbericht 2018 der UKIM Graz, wie in **Abbildung 1** ersichtlich, wieder(39).

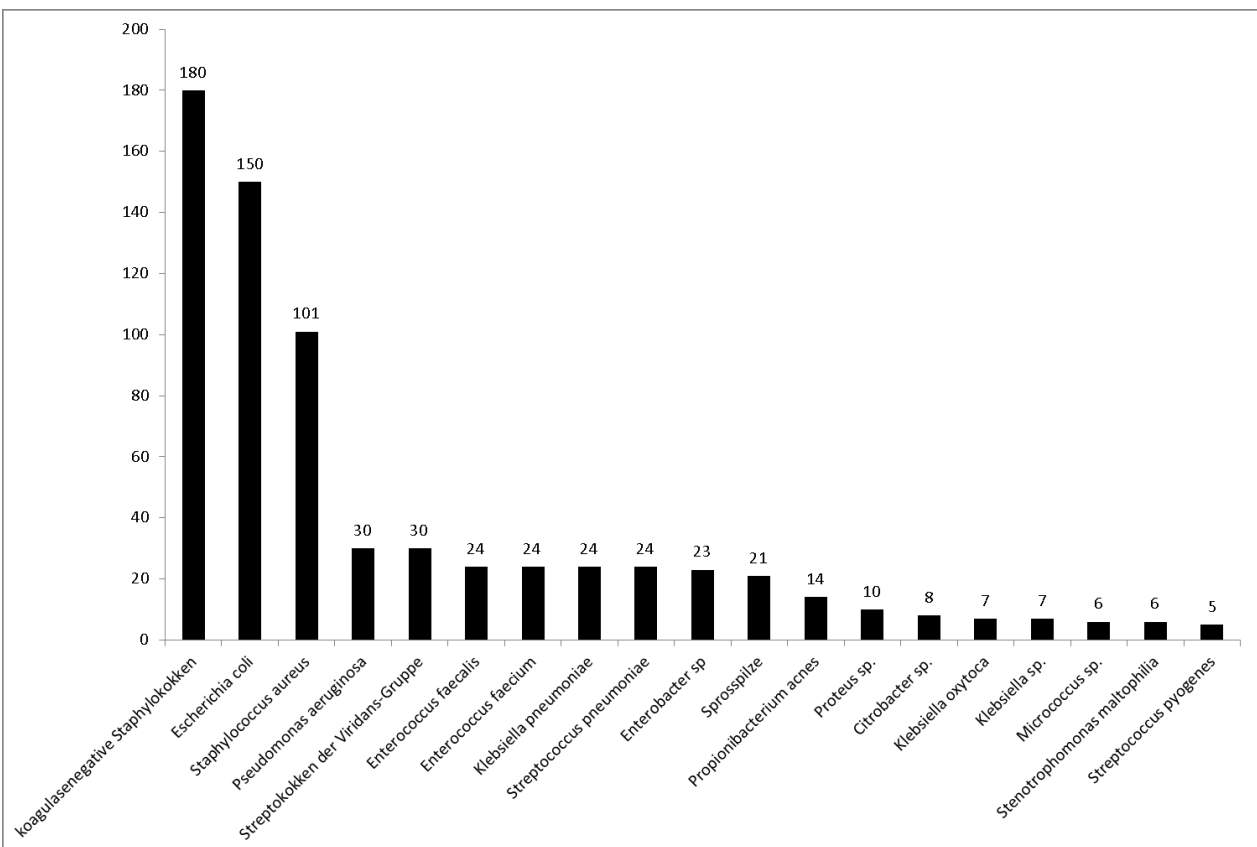


Abbildung 1: Isolierte Keime von Blutkulturen der Universitätsklinik für Innere Medizin Graz aus dem Jahr 2018(39)

3. Escherichia coli

3.1. Allgemeines

Es handelt sich bei *Escherichia coli* um ein gramnegatives, fakultativ aerobes, fakultativ pathogenes, stäbchenförmiges, nicht zur Sporenbildung befähigtes Enterobakterium, welches erstmals 1885 von dem Kinderarzt Theodor Escherich im Intestinaltrakt von Neugeborenen entdeckt und von ihm als „Bakterium coli commune“ bezeichnet wurde(41–45).

Das natürliche Habitat von *E. coli* ist unter anderem der Intestinaltrakt des Menschen, somit stellt *E. coli* einen Bestandteil des menschlichen Darmmikrobioms dar(41,42,44). Dort übernimmt es wichtige Funktionen im Bereich der Vitaminsynthese, insbesondere die Vitamin-K-Synthese(41). Der Begriff fakultativ pathogen in Bezug auf *E. coli* ist berechtigt, da diese Bakterienspezies außerhalb des Darmes in der Lage ist, schwere Infektionen zu verursachen, primär Harnwegsinfektionen, respiratorische Infektionen und Wundinfektionen, die in weiterer Folge Ursprung von Blutstrominfektionen sein können(41,42,44).

3.2. E. coli- Bakteriämien und Infektionen

Im Jahr 2017 gab es in Österreich 5.377 dokumentierte Fälle von *E. coli*-Bakteriämien(40). Das entspricht einer Inzidenz von ungefähr 61,1 Fällen pro 100.000 Einwohnerinnen und Einwohnern(40). *E. coli* zählt zu den Hauptverursachern von Blutstrominfektionen(46,47). Aufgrund der steigenden Antibiotikaresistenzen in ganz Europa, führte dies in den letzten Jahren zu einer verschärften Problematik(47–51). Überwiegend treten *E. coli*-assoziierte Blutstrominfektionen als Komplikation einer fokalen Infektion des Urogenital- oder des Magendarmtrakts auf(44,52). Kurz sei hier angemerkt, dass Harnwegsinfektionen, welche sowohl ambulant, als auch nosokomial ihren Ursprung finden, überwiegend auf *E. coli* zurückzuführen sind(40).

Blutstrominfektionen können jedoch vereinzelt auch durch eine primäre Bakteriämie ohne Indiz für einen Fokus verursacht werden(1,3,16,17,52). *E. coli* zählt unter anderem auch zu den häufigsten Keimen, die bei schweren Infektionen wie z.B. bei einer bakteriämischen Sepsis und Meningitis bei Neugeborenen isoliert werden(52–54).

3.3. Resistenzen

3.3.1. Allgemeines

‘Ein Bakterienstamm ist resistent gegen ein Antibiotikum, wenn seine minimale Hemmkonzentration so hoch ist, dass auch bei Verwendung der zugelassen Höchstdosierung ein therapeutischer Erfolg nicht zu erwarten ist‘((55): p.713). Generell muss zwischen natürlicher (primärer) und erworbener (sekundärer) Resistenz gegenüber einer antimikrobiellen Substanz unterschieden werden(55–57). Bei einer primären Resistenz ist ein Antibiotikum aufgrund der genetisch prädefinierten Eigenschaften einer Bakterienspezies nicht in der Lage, diese anzugreifen(55–57). Verliert ein Antibiotikum hingegen seine Wirkung gegen eine Bakterienart, so spricht man von einer erworbenen Resistenz(55–57). Ursächlich dafür sind Chromosomenmutationen, Gentransfer und Selektionsmechanismen von Bakterien(55–57).

Man spricht von einem Selektionsvorteil, wenn einzelne Bakterien in einer Bakterienpopulation aufgrund spontaner, äußerst seltener Mutationen im Zuge einer antimikrobiellen Therapie resistent sind, während die restliche Population zugrunde geht(55,56). Dadurch können sich diese wenigen resistenten Individuen ungehindert vermehren(55,56).

Ein Gentransfer wiederum kann auf drei verschiedene Arten erfolgen(55). Mittels Transduktion, Konjugation oder Transformation(55). Bei allen drei Formen werden DNA-Fragmente, die für Resistenzeigenschaften kodieren, auf ein anderes Bakterium übertragen und somit Resistenzen weitergegeben(55).

3.3.2. Ausgewählte Resistenzmechanismen

3.3.2.1. Inaktivierung von Enzymen, Betalaktamasen

Einige Bakterien verfügen über bestimmte Enzyme, sogenannte Betalaktamasen, die in der Lage sind, antimikrobielle Substanzen unwirksam zu machen, indem sie den Betalaktamring einiger Antibiotika hydrolysieren, also spalten(55,56,58). Sie sind unter anderem bei *E. coli* für die Penicillin- und Cephalosporinresistenz verantwortlich(56,58). Es existieren mehr als 340 verschiedene Betalaktamasen, wobei die genetische Information für die Betalaktamase entweder chromosomal oder mittels Plasmiden vererbt werden kann(56).

Sogenannte ESBL (extended spectrum betalactamases), welche über ein ausgedehntes Wirkspektrum verfügen, sind maßgeblich für Aminopenicillin- und Cephalosporinresistenzen (Generationen 1-3) bei *E. coli*(56,58). Sie zählen zu den plasmidkodierten Serinbetalaktamasen und entstehen durch unterschiedlichste Punktmutationen in den Betalaktamasegenen(56,58). ESBL haben keine Wirkung auf Carbapeneme. Carbapenemasen, wie z.B. Metallobetalaktamasen, hingegen schon(56,58). Weiterführend gibt es noch AmpC-Betalaktamasen, welche auch den Serinbetalaktamasen untergeordnet werden und dazu befähigt sein können, die meisten Betalaktamantibiotika, exklusive Carbapenem, Cefepim und Cefepim, wirkungslos zu machen(56,58).

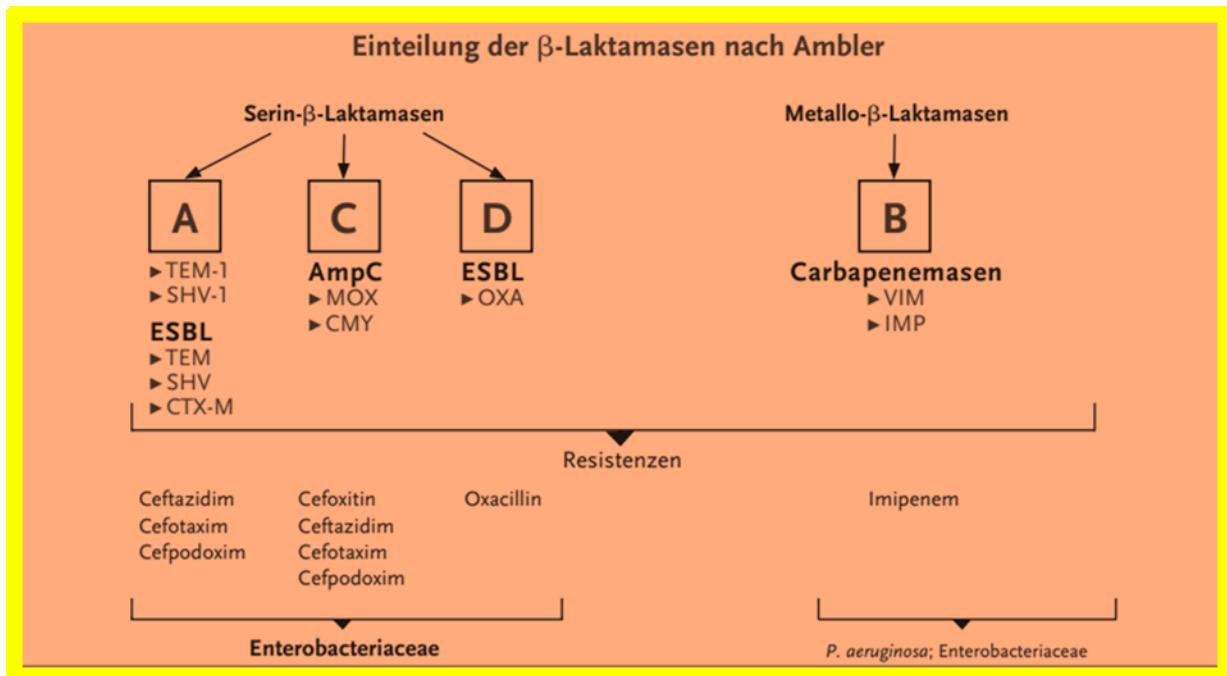


Abbildung 2: Die Einteilung der Betalaktamasen nach Ambler nach(58)

3.3.2.2. Modifikation von Zielmolekülen

Hierbei handelt es sich um Mutationen, welche ursprüngliche Angriffspunkte eines Bakteriums so modifizieren, dass Antibiotika diese nicht mehr ausnützen können und somit unwirksam werden(55,56). So können Bakterien beispielweise über Punktmutationen der DNA-Gyrasegene und DNA-Topoisomerasegene unter anderem eine Fluorchinolonresistenz erlangen(55,57). Die damit verbundene Veränderung der Zielstruktur führt dazu, dass das Antibiotikum nicht mehr angreifen kann(55,56).

3.3.2.3. Veränderung von Porinen

Mittels Porinen können hydrophile Substanzen die äußere Membran gramnegativer Bakterien passieren(55,56). Somit können Antibiotika ihre Zielstrukturen erreichen(55). Wenn sich jedoch die Struktur von Porinen verändert, wodurch das Bakterium seine Permeabilität reduziert, können bestimmte Antibiotika unter anderem auch Fluorchinolone die Membran gramnegativer Bakterien nicht mehr überwinden(55–57).

3.3.2.4. Effluxpumpen

Damit Bakterien z.B. schädliche Stoffwechselprodukte aktiv ausscheiden können, gibt es sogenannte Effluxpumpen in der Zellmembran(55–57). Dabei handelt es sich um einen Transportmechanismus, der auch bestimmte, in das Bakterium eingeschleuste Antibiotikagruppen unmittelbar hinausbefördern kann(55–57). So können hochregulierte Effluxpumpen eine Resistenzursache bei der Behandlung von *E. coli*-Infektionen mit Fluorchinolonen darstellen(57).

3.3.3. Resistenzsituation *E. coli*

3.3.3.1. Aminopenicilline

Seit 2013 liegt die Resistenzrate von *E. coli* für Aminopenicilline (Amoxicillin, Ampicillin) konstant bei in etwa 50%(40). Diese variiert jedoch je nach Altersgruppe. Allgemein kann allerdings festgestellt werden, dass Resistenzen bei jüngeren Menschen im Vergleich zu älteren häufiger vorkommen(40).

Auch geschlechterspezifische Unterschiede liegen vor. Im Schnitt lag die Resistenzrate von *E. coli*-Isolaten von Frauen, betreffend Aminopenicilline, für die Jahre 2013 bis 2017 bei ca. 49,1%, bei Männern hingegen bei 51,9%(40). Bezogen auf das Jahr 2017 waren auf pädiatrischen und urologischen Abteilungen die höchsten Resistenzraten zu verzeichnen(40). Aus geographischer Sicht lässt sich innerhalb Österreichs kein eindeutiger Trend für die jeweiligen Bundesländer angeben(40). Im europäischen Vergleich hingegen, wie in **Abbildung 3** ersichtlich, bestehen gravierende Unterschiede von bis zu 38% hinsichtlich der Resistenzraten(40). Bulgarien war im Jahr 2017 mit einer Resistenzrate von 73,2% europäischer Spitzenreiter, konträr dazu Finnland mit 35,2% als Schlusslicht(40). Österreich fand sich im Vergleich der europäischen Länder mit einer Resistenzrate von 49,5% im unteren Drittel wieder(40). Wie aus **Abbildung 4** entnommen werden kann, hat neben Österreich auch Deutschland seine Resistenzrate im Vergleich der Jahre 2013 und 2017 auf einen Wert

unter von 50% reduzieren können(40). Die übrigen Nachbarländer Österreichs wiesen im Jahr 2017 weiterhin Resistenzraten von mindestens 50% auf(40). Einzig Skandinavien konnte innerhalb Europas ebenfalls Resistenzraten von unter 50% aufweisen (ausgenommen Schweden, da keine bzw. ungenügend Daten für das Jahr 2017 vorlagen)(40).

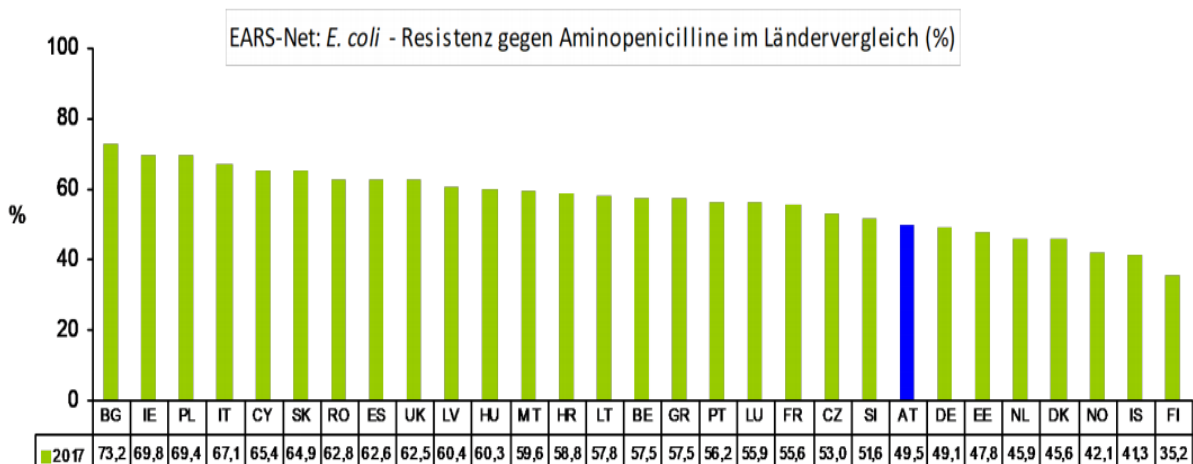


Abbildung 3: Ländervergleich der Aminopenicillinresistenzen von *E. coli* im Jahr 2017(40)

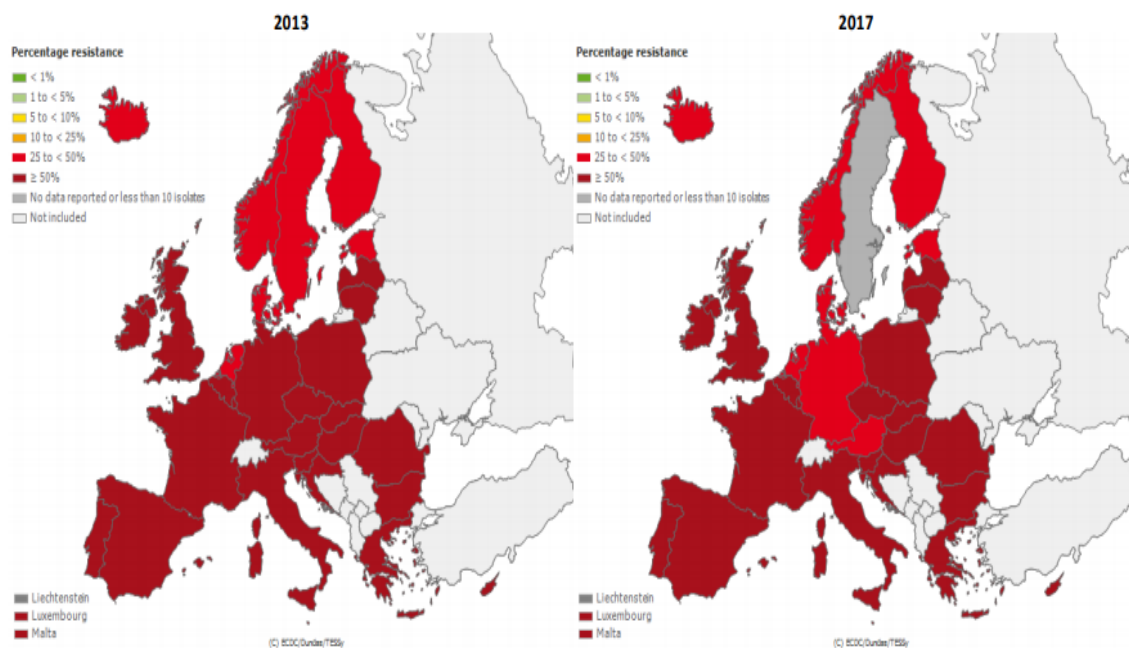


Abbildung 4: Ländervergleich der Aminopenicillinresistenzen von *E. coli* im Jahr 2013 und 2017(40)

3.3.3.2. Fluorchinolone

Fluorchinolone (Ciprofloxacin, Ofloxacin, Levofloxacin) können insbesondere bei schwerwiegenden *E. coli*-Infektionen angewandt werden(40). Die Resistenzrate liegt konstant bei etwa einem Fünftel der Isolate. Innerhalb Österreichs variieren diese je nach Altersgruppe, wobei insbesondere *E. coli*-Isolate von jüngeren Personen (unter 15 Jahren) weniger Resistenzen aufweisen(40). Bei *E. coli*-Isolaten von 45- bis 75-Jährigen hingegen konnten die höchsten Resistenzraten festgestellt werden(40). Hinsichtlich der Unterschiede zwischen Frauen und Männern konnte aufgezeigt werden, dass die von Männern isolierten *E. coli* Stämme deutlich häufiger Resistenzen aufweisen(40). Im Schnitt der Jahre 2013 bis 2017 lag die Resistenzrate der *E. coli*-Isolate der Frauen bei 16,9%, und die der Männer hingegen bei 25,1%(40). Für das Jahr 2017 lag die Differenz der Raten zwischen den Geschlechtern bei 7,8%(40).

Bezüglich der jeweiligen Krankenhausabteilungen kann festgehalten werden, dass insbesondere im Bereich der urologischen sowie hämato-onkologischen Stationen mehr *E. coli*-Isolate eine Resistenz gegen Chinolone aufweisen als z.B. pädiatrische und chirurgische Stationen(40). Der Vergleich der Jahre 2013 und 2017 ergab, dass die Resistenzen in Salzburg, Tirol und Kärnten zugenommen, in Wien, Burgenland, Niederösterreich, Oberösterreich, Vorarlberg und Steiermark hingegen abgenommen haben(40). Außerdem sind die Resistenzraten österreichweit in der Steiermark und in Wien im Schnitt am höchsten(40).

Im europäischen Vergleich bestanden im Jahr 2017 je nach Nation Unterschiede von bis zu 33,3%(40). Die höchste Resistenzrate in Europa fand sich mit 44,9% in Italien, die niedrigste hingegen mit 11,6% in Island(40). Mit einem Wert von 20,5% befand sich Österreich im europäischen Vergleich im unteren Drittel(40). Im Vergleich der Jahre 2013 und 2017 kann festgehalten werden, dass Luxemburg und Bulgarien ihre Resistenzraten auf unter 25% senken konnten, die Resistenzraten von Kroatien, Litauen und Lettland haben sich jedoch auf einen Wert von mindestens 25% verschlechtert(40).

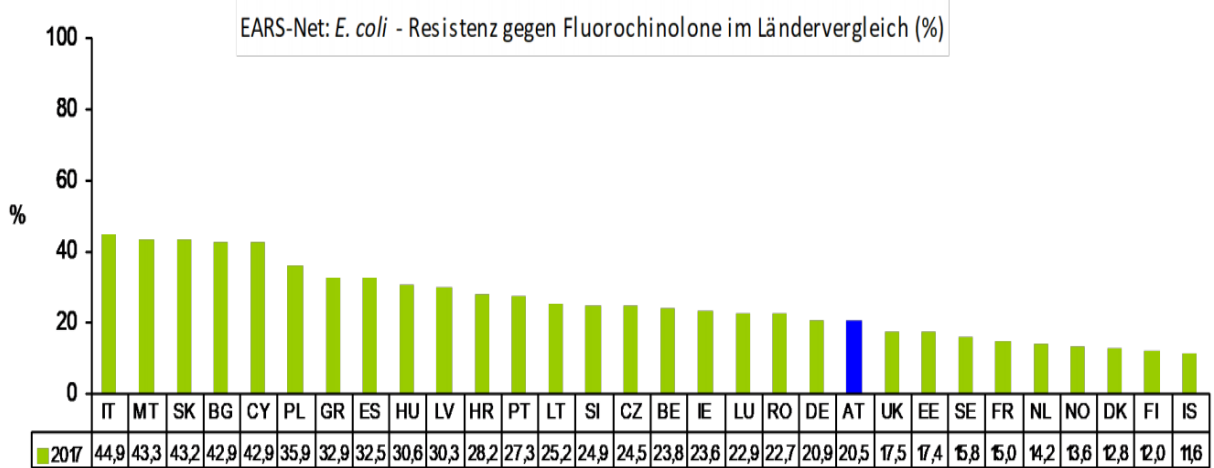


Abbildung 5: Ländervergleich der Fluorochinolonresistenzen von *E. coli* im Jahr 2017(40)

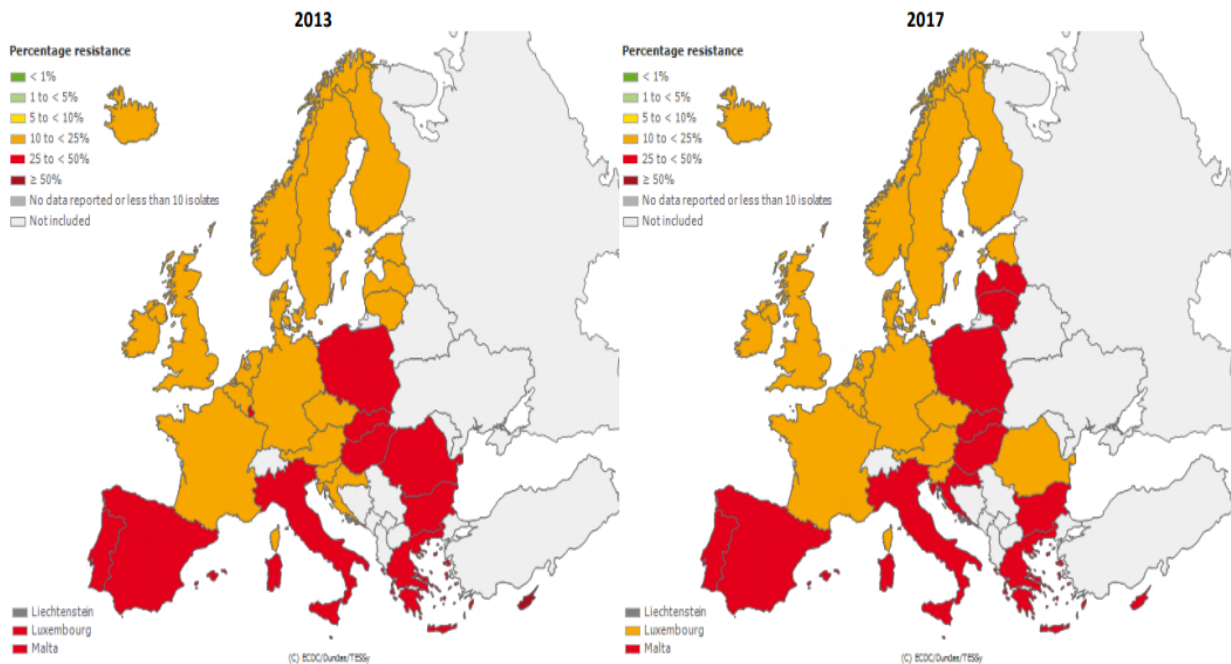


Abbildung 6: Ländervergleich der Fluorochinolonresistenzen von *E. coli* im Jahr 2013 und 2017(40)

3.3.3.3. Cephalosporine der 3. Generation

Die Resistenzrate von *E. coli*-Isolaten in Bezug auf Cephalosporine der 3. Generation (Cefotaxim, Ceftazidim, Ceftriaxon) liegt seit 2013 in Österreich konstant bei ca. 9,4%-10%(40). Angemerkt sei hier, dass anhand der Resistenz von *E. coli* gegenüber Cephalosporinen indirekt auf das Vorhandensein von Breitspektrum- β -Laktamasen (ESBL) geschlossen werden kann, wobei diese Methode nicht absolut exakt ist, da auch andere Mechanismen eine Resistenz bedingen können(40).

Hinsichtlich der *E. coli*-Isolate der jeweiligen Altersklassen ist kein eindeutiger Trend bezüglich der Resistenzraten zu erkennen(40). Bei *E. coli*-Isolaten von jungen Menschen unter 15 Jahren treten Resistenzen wohl dennoch am seltensten auf(40). In Österreich konnten bei *E. coli* Stämmen, welche von Männern isoliert wurden, häufiger Resistenzen als bei denen von Frauen nachgewiesen werden(40). Im Durchschnitt der Jahre 2013 bis 2017 lag die Resistenzrate bei Männern bei 11,6%, bei Frauen hingegen bei 8,3%(40). Für das Jahr 2017 lag die Differenz der Resistenzraten zwischen den Geschlechtern bei 2,8%(40). Klinikbezogen können Resistenzen am häufigsten in Intensivstationen bzw. im Bereich der Urologie beobachtet werden(40).

Nach Gegenüberstellung der Jahre 2013 und 2017 ist die Zahl der Cephalosporin resistenten *E. coli*-Isolate in Niederösterreich, Burgenland, Salzburg, Tirol, Vorarlberg und Steiermark gesunken, in Wien, Oberösterreich und Kärnten jedoch gestiegen(40). Wie in **Abbildung 7** ersichtlich, hatte Bulgarien im Jahr 2017 europaweit mit 40,8% den höchsten Wert und Norwegen mit 5,9% den niedrigsten Wert an Resistenzen vorzuweisen(40). Innerhalb Europas variierten die Werte je nach Land daher um bis zu 34,9%(40). Österreich liegt mit 9,6% ebenfalls im Bereich der Länder mit den niedrigsten Resistenzraten(40). Entsprechend **Abbildung 8** konnte von 2013 auf 2017 nur Luxemburg seine Resistenzrate senken, Island, Frankreich, Slowenien, Litauen, Kroatien und Malta hingegen verzeichnete einen Anstieg der Resistenzen(40).

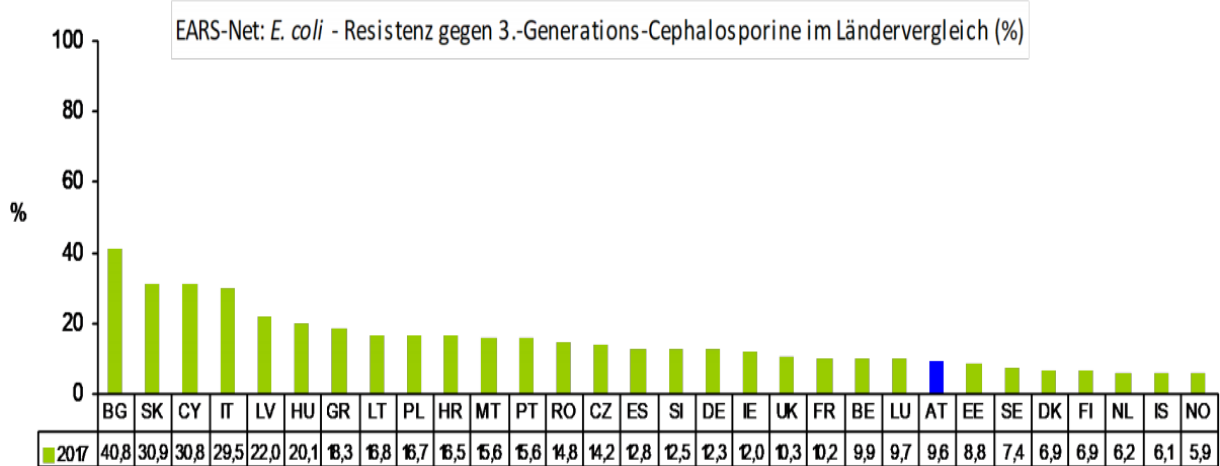


Abbildung 7: Ländervergleich der 3.- Generations-Cephalosporinresistenzen von *E. coli* im Jahr 2017(40)

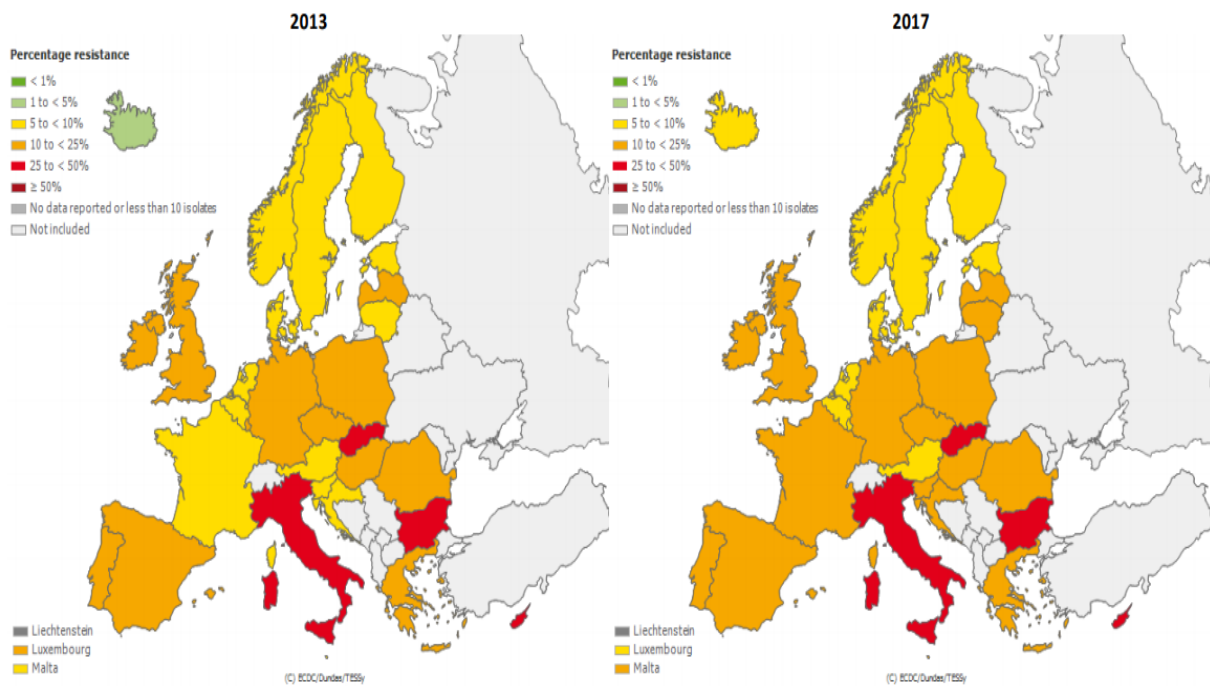


Abbildung 8: Ländervergleich der 3.- Generations-Cephalosporinresistenzen von *E. coli* im Jahr 2013 und 2017(40)

3.3.4. *E. coli*-Resistenzraten der Universitätsklinik Innere Medizin Graz

Nach der Analyse von 5.958 abgenommenen Blutkulturen im Jahr 2018 und den daraus resultierenden 755 positiven Blutkulturen konnte festgestellt werden, dass *E. coli* (n = 150) nach koagulasenegativen *Staphylokokken* (n = 180) der häufigste bakterielle Erreger war(39). Im selben Jahr wurden auf den Bettenstationen der Universitätsklinik für Innere Medizin Graz insgesamt 78 *E. coli* positive Blutkulturen von elf Bettenstationen abgenommen(39). Die Bettenstation der Gastroenterologie hatte mit 17 die größte Anzahl an positiven *E. coli*-Blutkulturen(39). Danach folgten die Onkologie und Rheumatologie mit jeweils zwölf sowie die Intensivstation mit neun positiven Blutkulturen(39). Mit einer einzigen *E. coli* positiven Blutkultur bildete die Station der Kardiologie das Schlusslicht(39). Ambulant wurden auf der Universitätsklinik für Innere Medizin Graz 2018 in Summe 59 *E. coli*-positive Blutkulturen abgenommen(39). Bis auf zwei wurden alle Blutkulturen in der Notaufnahme abgenommen(39). Nur jeweils eine positive *E. coli*-Blutkultur wurde auf der Dialyse- und Hämatologie- Ambulanz identifiziert(39). Außerhalb der Universitätsklinik für Innere Medizin konnten 13 weitere positive *E. coli*-Blutkulturen nachgewiesen werden(39). Unter diesen war die Urologie mit vier positiven *E. coli*-Blutkulturen am stärksten vertreten(39).

In weiterer Folge wurde das Resistenzverhalten dieser 150 *E. coli*-positiven Blutkulturen gegenüber den verfügbaren antimikrobiellen Substanzen getestet(39). Die höchste Resistenzrate wies *E. coli* mit 46,7% gegen Ampicillin auf. 38% der *E. coli*-Isolate waren resistent gegen Amoxicillin/Clavulansäure (Amc/Clav)(39). Gegen Fluorchinolone, konkret Ciprofloxacin und Levofloxacin, waren 18% der *E. coli*-Isolate resistent(39). Hinsichtlich der Cephalosporine der 3. Generation konnte sowohl bei Cefotaxim, als auch Ceftazidim bei 10,7% der *E. coli*-Isolate eine Resistenz festgestellt werden(39). Gegenüber Piperacillin/Tacobactam wurde hingegen nur bei 3,3% der *E. coli*-Isolate eine Resistenz nachgewiesen(39). Nur auf die Gruppe der Carbapeme (Ertapenem, Imipenem, Meropenem) war jedes der 150 *E. coli*-Isolate sensibel(39).

Im Schnitt wurden jede Woche drei *E. coli*-Isolate in Blutkulturen identifiziert. Allgemein sei hier angemerkt, dass eine weitere Zunahme der ESBL-Rate von 1,1% im Vergleich zum letzten Jahr zu berichten war (2017 8,2%, 2018 9,3%)(39). Bezogen auf alle untersuchten Materialien konnte hingegen eine Reduktion der *E. coli* ESBL-Rate beobachtet werden(39). Des Weiteren konnten 2018 zwölf Carbapenem-resistente *E. coli*-Isolate nachgewiesen werden(39).

4. Relevanz einer schnellen mikrobiellen Diagnostik

Um Blutstrominfektionen adäquat bewältigen zu können, ist eine schnelle Identifizierung des bakteriellen Erregers sowie die rasche Erkenntnis über sein jeweiliges Resistenzverhalten notwendig(59–62). Allgemein ist die Identifizierung eines bakteriellen Erregers wichtig, da dadurch die Wahl einer geeigneten antimikrobiellen Therapie ermöglicht wird(59). Zugleich ist die antimikrobielle Sensibilitätstestung maßgeblich, um mit Blutstrominfektionen, die durch die häufigsten Erreger wie beispielsweise *E. coli* verursacht werden, effizient umgehen zu können(59). Je schneller man dies bewerkstelligen kann, umso mehr profitieren davon Patientinnen und Patienten(59).

Aufgrund der steigenden Anzahl von multiresistenten Keimen sind Ärzte darauf angewiesen, als empirische Therapie antimikrobielle Substanzen mit breiterem Spektrum bei Patientinnen und Patienten mit Blutstrominfektionen einzusetzen, solange der Erreger noch nicht identifiziert wurde(59). Allein in den USA sind antibiotikaresistente Organismen jährlich für mehr als 2,8 Millionen Infektionen und über 35.000 Tote verantwortlich(59,63). Vor allem eine große Anzahl an Hospital-acquired-bloodstream-infections ist auf antibiotikaresistente Organismen zurückzuführen(59,64). Insbesondere auf Intensivstationen konnten bei ca. jedem zweiten Isolat multiresistente Keime festgestellt werden(59,64).

Durch eine rapide Identifizierung des bakteriellen Erregers sowie die beschleunigte Erkennung seines Resistenzverhaltens ist es möglich, die Zeitspanne der empirischen Therapie zu minimieren(59,65). Somit kann einerseits schneller erkannt werden, ob die eingeleitete initiale empirische Therapie überhaupt *in vitro* wirksam ist bzw. ob sie einer Änderung bedarf(59,65). Andererseits kann man dadurch der steigenden Inzidenz von multiresistenten Keimen entgegenwirken, da sich der selektive Druck der Mikroorganismen reduziert(59,65).

Je länger das Zeitfenster zwischen Diagnostik und Einleitung einer adäquaten antimikrobiellen Therapie, umso höher ist die Mortalität aufgrund einer Blutstrominfektion(59,62,66). Laut einer Studie reduziert sich die Überlebensrate innerhalb von wenigen Stunden ab Beginn der Hypotension, sofern Patientinnen und Patienten mit einem septischen Schock keine wirksame antimikrobielle Therapie erhalten(59,66). Demnach liegt die Überlebenschance bei 79,9%, wenn innerhalb der ersten Stunde eine adäquate antimikrobielle Therapie eingeleitet wird(66). Die Überlebenschance reduziert sich bereits zwischen der ersten und zweiten Stunde um weitere 9,4%(66). Vergehen weitere neun bis zwölf Stunden bis zur Einleitung einer wirksamen Therapie, so verringert sich die Überlebenschance gegenüber einer Therapie innerhalb der ersten Stunde um mehr als 50%(66).

5. Mikrobiologische Diagnostik

5.1. BD-BACTEC-Blutkultursystem

Ob sich bakterielle Erreger oder Pilze in der Blutbahn befinden, kann mittels des vollautomatisierten BACTEC-Blutkultursystems bestimmt werden. Bei Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Blutstrominfektion werden standardmäßig zwei oder drei Blutkultursets befüllt(67). Diese Sets setzen sich jeweils aus einer Blutkulturflasche für Aerobier und einer für Anaerobier (z.B. BD BACTEC FX Plus Aerobic/F und BD BACTEC FX Lytic/10 Anaerobic/F) zusammen(67). Die befüllten Blutkulturflaschen werden in dem BD-BACTEC-Blutkulturgerät für ungefähr fünf Tage bebrütet(67). Das

Prinzip, mit dem Keime in der Blutkulturflasche detektiert werden können, beruht auf einer Reaktion des von Bakterien freigesetzten CO₂ mit einem speziellen Farbstoff am Flaschensensor(67). Die fluoreszierende Eigenschaft des Farbstoffes wird durch eine Leuchtdiode hervorgerufen(67). Dabei führt die Reaktion mit dem CO₂ zu einer Veränderung der Lichtmenge(67). Die Fluoreszenz wird sodann von einem Photodetektor gemessen(67). Die daraus resultierende Fluoreszenz wird mit zuvor festgelegten Parametern abgeglichen um abzuklären, ob sich Mikroorganismen in der Blutkultur befinden(67). Ein akustisches und visuelles Signal ertönt bzw. erscheint, sobald die Blutprobe positiv ist(67). Anschließend kann der Erreger mittels verschiedener Methoden identifiziert werden(67).

5.2. Erregeridentifizierung

5.2.1. MALDI-TOF Massenspektrometrie

Durch die MALDI-TOF (matrix assistet laser desorption/ ionization time-of-flight)-Massenspektrometrie lassen sich bakterielle Erreger innerhalb weniger Minuten identifizieren(56,68). Bei diesem Verfahren nutzt man die Variabilität der ribosomalen Proteine der unterschiedlichen Bakterienarten aus(56). Auf einer Metalplatte aufgebrachte Bakterien, welche aus einem festen Nährmedium stammen, werden mit einer Substanz versetzt, sodass sie zerstört werden und sich in ihre einzelnen Bestandteile zerlegen(56). Mittels eines Laserstrahls werden die Einzelteile der Bakterienprobe beschossen und somit ionisiert(56). Durch ein elektrostatisches Feld können die erzeugten Ionen beschleunigt werden(56). Die sogenannte time-of-flight ist masseabhängig und somit kommen die Ionen je nach Masse unterschiedlich schnell am Ionendetektor an(56). Dadurch entsteht je nach Bakterienart ein spezifisches Massenspektrum und der Erreger kann durch einen Datenbankabgleich identifiziert werden(56). Heutzutage ist es aber auch möglich, aus einer positiven Blutkulturflasche eine 24-h-Subkultivierung zu umgehen, indem man eine Kurzzeit-Bebrütung in einem festen Nährmedium durchführt(68,69). Sobald nur ein Hauch eines Bakterienwachstums mit dem freiem Auge erkennbar ist, ist es ausreichend, um eine

Erregeridentifizierung mittels der MALDI-TOF-Massenspektrometrie durchzuführen(68,69).

Die Stärken der MALDI-TOF Massenspektrometrie liegen in der Preiswertigkeit pro Testung, der hohen Spezifität und insbesondere in der außerordentlich schnellen Identifikation von Mikroorganismen, die aus Festnährmedien stammen(68).

Um den Erreger jedoch direkt aus positiven Blutkulturflaschen identifizieren zu können muss die Probe vorher mit einem Lysis-Zentrifugation-Verfahren und einer Äthanol-/Ameisensäure-Extraktion aufbereitet werden(19,68–70). Aufgrund der höheren Kosten, der nicht allzu hohen Sensitivität und dem Mehraufwand ist dieses Vorgehen derzeit nicht rentabel(19,68,71). Unter anderem gibt es Ansätze, die MALDI-TOF-Massenspektrometrie für eine schnelle Empfindlichkeitstestung einzusetzen(68,72,73).

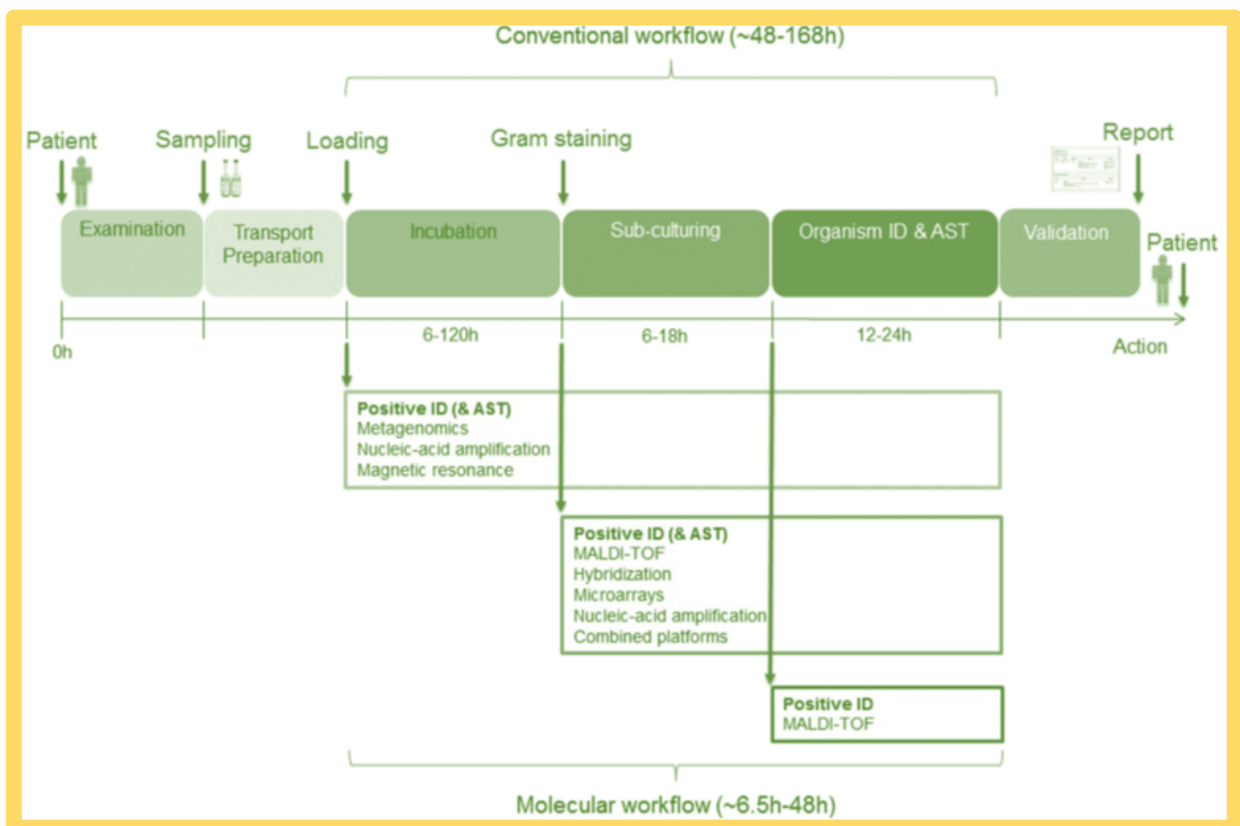


Abbildung 9: Zur Verfügung stehende molekulare Methoden zur Identifikation und teilweise auch zur Empfindlichkeitstestung und deren möglichen Anwendungszeitpunkte nach(74)

5.2.2. Nukleinsäure-basierende-Verfahren

Insbesondere mit auf Microarray-basierenden und Multiplex-PCR- Diagnostikverfahren ist es gelungen, Mikroorganismen aus positiven Blutkulturflaschen in wenigen Stunden (1-4 h) zu identifizieren(19,68,75–77). Microarray-basierende Verfahren zielen darauf ab, mithilfe eines DNA-Chips das Vorhandensein bzw. das Nichtvorhandensein von gewissen bakteriellen DNA-Sequenzen durch das Verbinden von Nanopartikelproben mit Nukleinsäuresequenzen, die aus den Blutkulturen gewonnen wurden, nachzuweisen(59). Bei der Multiplex-PCR hingegen wird eine Vielzahl von DNA-Primersequenzen zur Verstärkung einer einzelnen Zielsequenz verwendet(59). Anhand dieser Methode kann einerseits mehr als nur ein Erreger nachgewiesen werden und andererseits besteht die Möglichkeit, spezifische Resistenzmarker innerhalb dieser Erreger nachzuweisen(59). Jedoch sind diese Verfahren sehr kostspielig und nicht in der Lage alle Krankheitserreger zu erfassen. Dazu kommt noch, dass die Anzahl der Proben die man gleichzeitig verarbeiten kann nur auf wenige begrenzt ist(19,75–77). Unter anderem sind auch DNA-basierende Verfahren in der Lage direkt aus Blutproben mikrobielle DNA zu extrahieren, um so rasch Erreger (auch unter antimikrobieller Therapie) identifizieren sowie Antibiotikaresistenzen detektieren zu können(19,68). Jedoch haben sich diese Methoden aufgrund einiger Limitationen bisher noch als ungeeignete Verfahren für die Routinediagnostik erwiesen(19,68).

5.3. Antimikrobielle Sensibilitätstestung (AST)

5.3.1. Minimale Hemmkonzentration

Unter der minimalen Hemmkonzentration (MHK) versteht man die minimalste Konzentration einer antimikrobiellen Substanz, die angewendet werden muss, um bakterielles Wachstum zu verhindern(78). Um diese zu ermitteln werden Gradiententeststreifen unterschiedlicher Hersteller verwendet (z.B.: ETEST® von bioMérieux, Frankreich).

Mithilfe von ETEST®-Reagenzstreifen (biomerieux, Frankreich) ist man in der Lage die MHK von verschiedenen antimikrobiellen Substanzen unterschiedlicher bakterieller Erreger direkt festzustellen(79). Spezielle Agarplatten werden hierfür mit den Erregern, bei denen man das Resistenzverhalten bestimmen möchte, beimpft. Danach wird der ETEST®-Reagenzstreifen entweder händisch oder unter Verwendung bestimmter Tools aufgebracht(79). Diese Teststreifen bestehen aus Kunststoff und sind mit dem jeweiligen Antibiotikum mit stufenweise aufsteigender Konzentration (mehr als 15 Verdünnungsstufen) beschichtet(79). Es folgt die Inokulation der Agarplatte. Nach 24 h Bebrütungszeit kann die MHK abgelesen werden(79). Wie in **Abbildung 10** auf der rechten Seite ersichtlich, bildet sich eine ellipsoide Aussparung um den Teststreifen(79). Dort, wo diese endet, kann die jeweilige Konzentration (in µg/mL), welche der MHK entspricht, abgelesen werden(79). Somit ist man in der Lage die Empfindlichkeit eines Erregers zu bestimmen und diesen in sensibel, resistent oder intermediär zu kategorisieren(79). Die Vorteile dieses Testverfahrens liegen in der relativ simplen Anwendung, den geringen Kosten sowie den vielfältigen Verwendungsmöglichkeiten(79). Jedoch sind die ETEST®-Streifen hinsichtlich mancher Aspekte sehr empfindlich. Um ein korrektes Ergebnis zu erhalten, muss bei der Aufbewahrung auf die richtige Temperierung geachtet und bei der Anwendung ein Abknicken der Teststreifen jedenfalls vermieden werden.

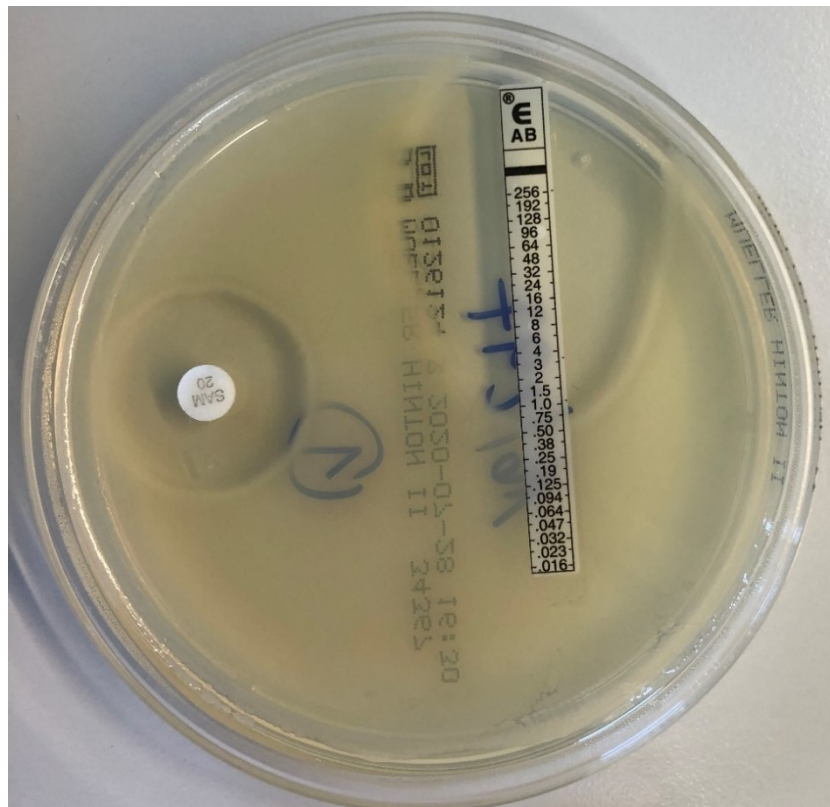


Abbildung 10: Links runder Hemmhof von SAM20-Plättchen, rechts ellipsoider Hemmhof durch ETEST®-Reagenzstreifen.

5.3.2. Agardiffusionstestung

Die am häufigsten verwendete Methode zur antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung ist die Scheibendiffusionsmethode(80,81). Im Jahr 2013 veröffentlichte das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) erstmals die Scheibendiffusionsmethode als standardisiertes Verfahren, welches sogenannte „Breakpoints“ für die jeweiligen Bakterien für antimikrobielle Substanzen in Abstimmung mit den europäischen MIC-Breakpoints festgelegt hat(80,81).

Im Falle einer positiven Blutkultur wird für die Empfindlichkeitstestung eine Kultur über Nacht auf einem festen, nicht selektiven Nährmedium gezüchtet(80). Dies wird durchgeführt, um Bakterienkolonien für eine nachfolgende Subkultivierung nach der

standardisierten EUCAST-AST-Methode zu gewinnen(80). Die Subkultivierung erfolgt nach strengen Angaben der EUCAST-Richtlinie, um ein korrektes und aussagekräftiges Ergebnis der Empfindlichkeitstestung zu erhalten(80). Von der bereits gezüchteten Kultur werden Bakterienkolonien, die morphologisch homolog erscheinen, mittels steriler Wattestäbchen oder Inokulationsschleifen entnommen(80,81). Anschließend wird mit den Bakterienkolonien und einer Kochsalzlösung eine Suspension, die der Dichte von einem McFarland 0,5 Trübungs-Standard entsprechen soll, hergestellt(80,81). Die Dichte kann mithilfe eines 0,5 McFarland-kalibrierten Photometers überprüft werden(80,81). Falls kein Photometer vorhanden ist, besteht die Möglichkeit, die Suspension mit einer 0,5 McFarland-Probe anhand eines weißen Hintergrundes mit schwarzen Linien zu vergleichen und somit zu prüfen(80,81). Sobald das richtige Verhältnis zwischen Bakterien und Kochsalzlösung erreicht wurde, kann mit der Herstellung einer Subkultur auf einer Mueller-Hinton(MH)-Agarplatte oder Mueller-Hinton-Fastidious(MH-F)-Agarplatte, welche noch zusätzlich 5% defibriniertes Pferdeblut und 20 mg/L Beta-Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (β -NAD) enthält, begonnen werden(80–82). Eine MH-F-Agarplatte muss für anspruchsvollere Bakterienspezies angewandt werden(80–82). Entsprechend der EUCAST-Richtlinie wird die Suspension auf die MH- oder MH-F-Agarplatte aufgetragen(80,81). Anschließend werden Antibiotikaplättchen mit einer Pinzette oder einem speziellen Applikator auf die inokulierte Agarplatte aufgebracht(80,81). Es muss darauf geachtet werden, dass die Plättchen fest auf der beimpften Agarplatte haften(80,81). Hinsichtlich der Zeit ist zu beachten, dass nach der Suspensionsherstellung innerhalb von 15 min die Inokulation der Agarplatte erfolgen soll(80,81). Nach dem Beimpfen der Agarplatte sollen die antimikrobiellen Plättchen innerhalb von 15 min aufgebracht werden und im Anschluss dieses Schrittes soll innerhalb von 15 min inkubiert werden („15-15-15-Minuten-Regel“)(80,81).

Außerdem sei anzumerken, dass nur eine begrenzte Anzahl von antimikrobiellen Plättchen auf die Agarplatte angebracht werden dürfen, um ablesbare Ergebnisse zu erhalten(80,81). Abhängig vom Organismus wird die inokulierte MH- oder MH-F-Agarplatte bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in der Luft für 18 ± 2 h oder bei $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in 4-6% CO_2 in der Luft für 18 ± 2 h inkubiert(80). Sobald die Inkubationszeit abgelaufen ist, werden die

Hemmhöfe nach den EUCAST-Guidelines beurteilt und dementsprechend wird entschieden, ob diese für eine Interpretation zulässig sind(80,81). Schließlich werden die Hemmhöfe abgemessen. Man fängt dort an zu messen, wo ein vollständiger Hemmhof mit freiem Auge bei 30 cm Entfernung vom Auge erkennbar ist(80,81). Indem die Platte in einem 45° Winkel zur Arbeitsfläche positioniert wird, kann das Ablesen erleichtert werden(80,81). Mit einem Lineal oder Messschieber wird millimetergenau der Durchmesser der Hemmhöfe abgemessen und nach den von der EUCAST verfügbaren „Breakpoints“ interpretiert(80,81). Für insgesamt 19 Bakterienspezies gibt es unterschiedliche „Breakpoints“ für verschiedene antimikrobielle Substanzen(83). Zum Beispiel sind nach der EUCAST-Breakpointtabelle die Hemmhofdurchmesser für Enterobakterien bei Verwendung von Amc/Clav-Plättchen (10-20 µg) folgendermaßen zu interpretieren(83). Ein Hemmhofdurchmesser von ≥ 19 mm kann als sensibel für die oben genannte antimikrobielle Substanz gedeutet werden(83). Unter 19 mm Durchmesser spricht man von resistent gegenüber Amc/Clav. Dabei ist zu beachten, dass ein Hemmhofdurchmesser von 19-20 mm bei Enterobakterien für Amc/Clav im Bereich der technischen Unsicherheit/Area of Technical Uncertainty (ATU) liegt und somit keine eindeutige Interpretation zulässt(83). Für jede Bakterienart gibt es für unterschiedliche antimikrobielle Substanzen verschieden definierte „Breakpoints“ für resistent, sensibel oder ATU(83).



Abbildung 11: Veranschaulichung der Agardiffusionsmethode(84)

Die Standard-AST-Methode hat den Vorteil, dass sie auf ein umfassendes Spektrum von Bakterienspezies und antimikrobieller Substanzen anwendbar ist(81,85). Weiter profitiert man von der Einfachheit der Methode, die eine Empfindlichkeitstestung zulässt, ohne dass dafür besondere Anschaffungen nötig sind(81,85). Dies erklärt auch die Preiswertigkeit des Verfahrens(85). Ein Nachteil liegt jedoch in dem großen Zeitaufwand, der durch das Züchten einer Kultur über Nacht und durch die weitere 16-20 h Inkubationszeit der Subkultur, welche für ein validiertes Ergebnis erforderlich ist, bedingt wird(80).

5.3.3. Rapide antimikrobielle Sensibilitätstestung

Im November 2018 publizierte die EUCAST zum ersten Mal die Methode, Breakpointtabellen und die Qualitätskontrolle für das sogenannte „rapid antimicrobial susceptibility testing“ (RAST)(86). Dieses Verfahren ermöglicht es, direkt aus positiven Blutkulturen eine Sensibilitätstestung auf einem festen Nährmedium durchzuführen und Hemmhofdurchmesser schon nach einer Inkubationszeit von 4, 6 und 8 h zu interpretieren(87). Diese schnelle Empfindlichkeitstestung basiert auf der obig angeführten EUCAST Standard-AST-Methode(87). Derzeit gibt es für neun Bakterienspezies validierte spezifische Grenzwerte bzw. Breakpoints für ausgewählte antimikrobielle Substanzen, die ausschließlich für die Rapid-AST-Methode angedacht sind(86,87). Zu diesen neun Organismen zählen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* und *Acinetobacter baumannii*(86,87). Für die Anwendung dieser Methode sollte man sich strikt an die von der EUCAST vorgegebenen Guidelines halten, um somit korrekte Interpretationsergebnisse der Hemmhofdurchmesser garantieren zu können(87).

Innerhalb von 0-18 h, nachdem eine Blutkulturflasche von einem Blutkulturgerät als positiv gemeldet wurde, sollte man mit der Inokulation des Blutes beginnen(87). Blutkulturflaschen „BACTEC (Becton Dickinson)“, „BacT/ALERT (bioMérieux)“ und „VersaTREK (Thermo Fisher)“ sind von der EUCAST zugelassen(87). Sobald die

Laborantin oder der Laborant bereit ist, eine MH-Agarplatte oder MH-F-Agarplatte mit Blut zu beimpfen, kann die Blutkultur aus dem Gerät entnommen werden(87). 125 +/- 25 µl Blut sollen direkt aus der Blutkulturfläche ohne es zu verdünnen auf die Oberfläche einer runden 90 mm MH-Agarplatte oder MH-F-Agarplatte aufgetragen werden, indem mit der Hand in drei Richtungen gestrichen oder ein Plattenrotator verwendet wird(87). Die antimikrobiellen-Plättchen werden wie bereits bei der oben beschriebenen Methode entweder mit einer Pinzette, mit der Hand oder einem Applikator aufgebracht(82,87). Anschließend soll das inokulierte Nährmedium für maximal 8 h inkubiert werden(87). Inkubationsmedium, -zeit und -bedingungen sind je nach Bakterienspezies abweichend und aus **Tabelle 2** zu entnehmen(87).

Nach 4, 6 und 8 h Inkubationszeit sollte jeweils innerhalb von 5 min der Hemmhofdurchmesser mit abgenommenen Deckel abgelesen werden(87). Hinsichtlich der Lichtverhältnisse sollte ein reflektiertes Licht herangezogen werden, die Hemmhofdurchmesser auf MH-Agarplatten auf einem dunklen und die der MH-F-Agarplatten auf einem hellem Hintergrund abgelesen werden(87). Wichtig ist, wie bereits bei der Standard-AST-Methode beschrieben, die Agarplatte beim Ablesen des Hemmhofdurchmessers 30cm vom Auge entfernt zu halten und in einem 45° Winkel zur Arbeitsfläche auszurichten(87). Die Hemmhofdurchmesser werden mittels der speziell für die EUCAST-RAST-Methode angefertigten Breakpointtabellen interpretiert (resistent, sensibel, ATU)(87). Erst wenn eine deutliche Grenze des Hemmhofes sowie ein konfluentes Wachstum zu erkennen ist, sollte man mit dem Abmessen beginnen(87). Jedoch ist anzumerken, dass bei der Rapid-AST-Methode (4, 6 und 8 h Inkubationszeit) verglichen mit der Standard-AST-Methode (16-20 h Inkubationszeit), ein geringeres Wachstum zu verzeichnen ist(87). Bei *E. coli* und *K. pneumoniae* (vor allem bei β -Lactamantibiotika) ist es möglich, dass innerhalb des Hemmhofes ein dünner Rasen sichtbar ist, welcher jedoch beim Abmessen ignoriert werden sollte(87). Falls die Interpretation nach 8 h noch nicht möglich ist, sollte auf die Standard-AST-Methode nach EUCAST zurückgegriffen werden(87).

| Organism | Incubation time | Medium | Incubation |
|--|------------------|--------|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i> | 4, 6 and 8 hours | MH | 35±1°C in air |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 6 and 8 hours | MH | 35±1°C in air |
| <i>Streptococcus pneumoniae</i> | 4, 6 and 8 hours | MH-F | 35±1°C in 4-6% CO ₂ in air |

Tabelle 2: Inkubationsbedingungen für die RAPID-AST-Methode(87)

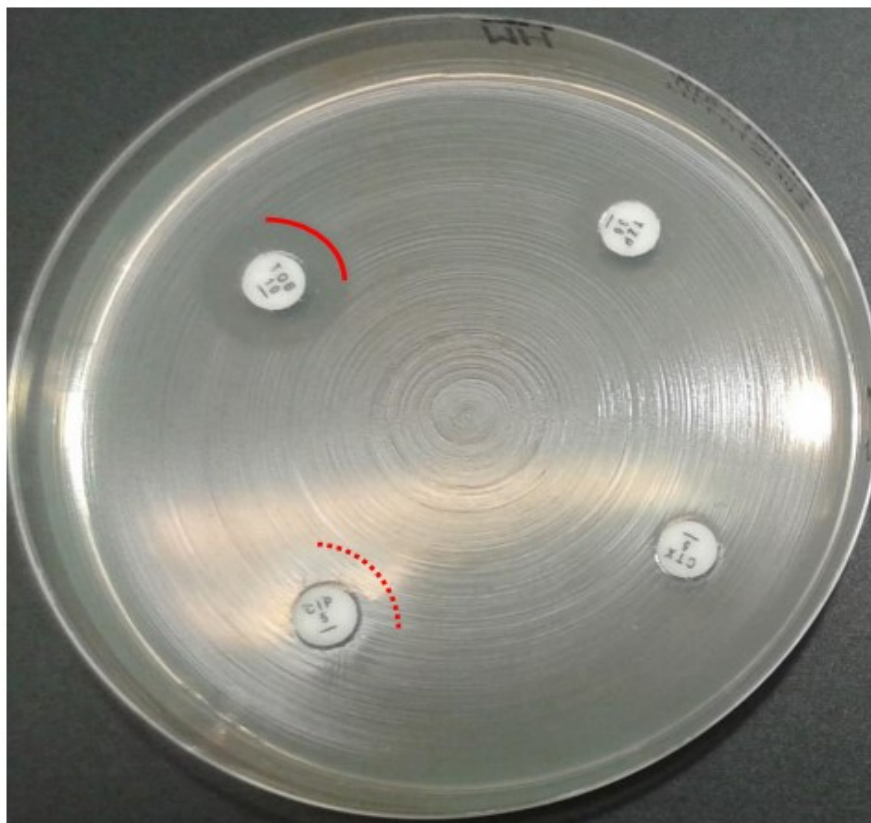


Abbildung 12: *E. coli*-Kultur nach 4 h Inkubationszeit. Bei eindeutigen klar abgrenzbaren Hemmhöfen (rote Linie) kann man den Hemmhofdurchmesser ablesen, bei Hemmhöfen mit keiner eindeutigen Wachstumshemmung (rote strichlierte Linie) sollte dies nicht gemacht werden(87).

Vorteile dieser Methode liegen in der Schnelligkeit, Einfachheit, Preiswertigkeit und darin, dass kein spezielles Equipment benötigt wird. Aktuell gibt es Limitationen

hinsichtlich der von der EUCAST validierten Breakpoints, deren Anwendbarkeit nur auf wenige Bakterienspezies und antimikrobielle Substanzen beschränkt ist.

II. Methoden und Materialien

1. Zielgrößen

Ziel dieser Arbeit war, Grenzwerte für Amc/Clav und Ampicillin/Sulbactam (Amp/Sul) für *E. coli* für die von der EUCAST entwickelten RAST-Methode zu ermitteln.

2. Durchführung

Vorbereitung der *E. coli*-Isolate:

Für diese Laborstudie wurden insgesamt 95 *E. coli*-Isolate von dem Diagnostik & Forschungs- Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin sowie dem mikrobiologischen Labor der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin, Medizinische Universität Graz herangezogen. Diese Isolate wurden als sogenannte „microbial pellets“ in eingefrorener Form aufbewahrt und für die Studie aufgetaut, um jedes einzelne von den 95 *E. coli*-Isolaten zu kultivieren. Eingangs wurde von jedem *E. coli*-Isolat jeweils ein „pellet“ mit einer sterilen Impföse entnommen und auf einen Columbia Agar + 5% Schafblut (COS) ausgestrichen. Diese beimpften COS-Agarplatten wurden für 18 - 24 h bei einer Temperatur von 35° +/- 1° Celsius inkubiert(80,81).



Abbildung 13: Links aufgetaute „microbial pellets“, rechts die mit den „microbial pellets“ beimpfte COS-Agarplatte nach 18-24 h Bebrütungszeit.

Anschließend wurden von den ersten angefertigten Kulturen mittels sterilen Wattestäbchen erneut COS-Agarplatten inokuliert und für 18-24 h bei 35° +/- 1° Celsius inkubiert, um von den ersten Kulturen Subkulturen zu erhalten.

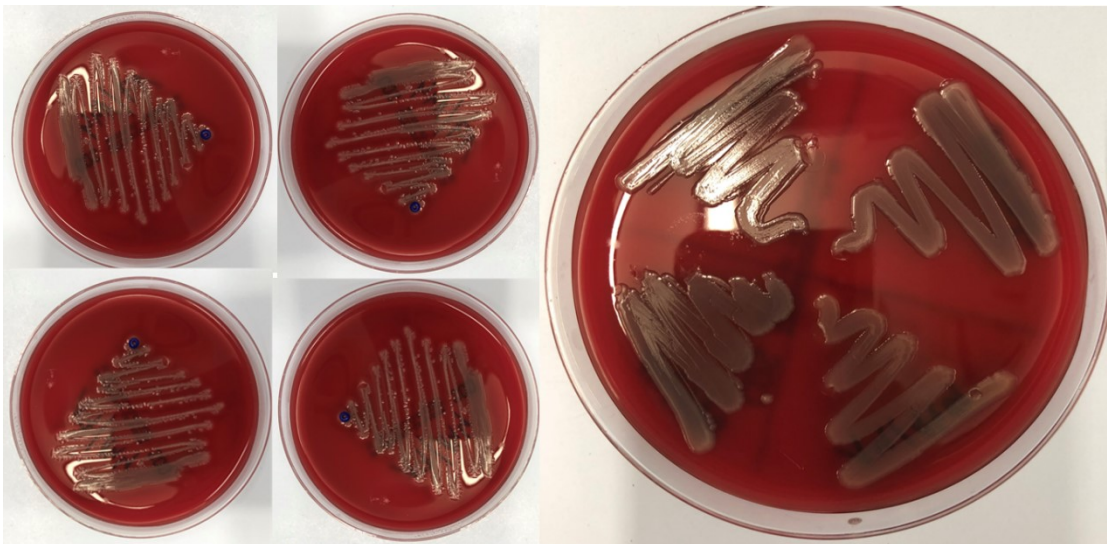


Abbildung 14: Links: vier unterschiedliche E. coli-Kulturen aus den aufgetauten Isolaten stammend, rechts: vier unterschiedliche Subkulturen, welche auf einer COS-Agarplatte gezüchtet wurden.

Tag 1: Erstellen der Verdünnungsreihe, Beimpfen der Blutkulturflaschen und Anlegen der Kontrollen

Die Subkulturen stellen die Basis für die Züchtung der Kontroll- und Verdünnungskulturen sowie für das Anlegen der RAST-Kulturen dar. Mithilfe einer sterilen Impföse wurden von den jeweiligen Subkulturen einzelne Bakterienkolonien entnommen und mit 1 mL 0,9% NaCl vermenget, sodass eine Bakterien-NaCl-Suspension entstand. Um den EUCAST-Leitlinien gerecht zu werden, muss die Suspension bei der photometrischen Messung einen Wert von 0,08 - 0,1 E annehmen (Eppendorf Biophotometer). Dies entspricht einem McFarland-Standard von 0,5(80,81). Von der hergestellten Suspension wurden für die Kontrollkulturen jeweils 100 µL auf eine Mueller-Hinton-II-Agarplatte pipettiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension auf der Agarplatte mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. Darauffolgend wurden Amc/Clav-Plättchen (AMC 20/10 µg, BD BBL™) und ein ETEST®-Streifen (XL 0,016 - 256 µg/mL, bioMérieux, Frankreich) aufgelegt und für 18 - 24 h bei 35° +/- 1° Celsius bebrütet(80,81). Zeitgleich wurden wieder 100 µL von derselben Bakteriensuspension auf eine MH II-Agarplatte pipettiert. Diese wurden nun wie zuvor ausgestrichen, jedoch wurden Amp/Sul-Plättchen (SAM 10/10 µg, BD BBL™) und ETEST®-Streifen (AB 0,016 – 256 µg/mL, bioMérieux, Frankreich) aufgelegt und für 18 - 24 h bebrütet. Insgesamt wurden pro *E. coli*-Stamm vier Kontrollkulturen angelegt, da alles im Doppelansatz durchgeführt wurde. Zudem wurden bei jedem Durchgang Negativ- und Positivkontrollen angefertigt. Die Hemmhofdurchmesser (Plättchen) und die minimale Hemmkonzentration (ETEST®) der Kontrollkulturen wurden nach 18 - 24 h Inkubationszeit abgelesen und notiert. Die so ermittelten MHK Werte dienten als Kontrolle für die zu ermittelnden RAST-Breakpoints.

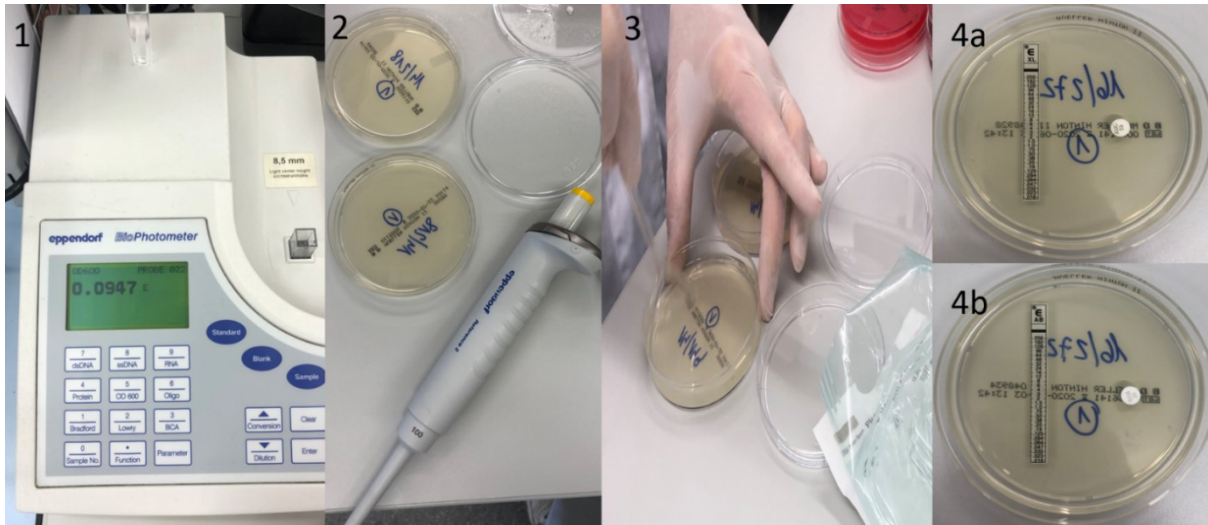


Abbildung 15: 1) Die hergestellte Bakteriensuspension wurde mit dem Photometer gemessen. 2) 100 μ L Bakteriensuspension wurden auf die Agarplatte pipettiert. 3) Die Bakteriensuspension wurde mit einem Drigalskispatel ausgestrichen. 4a) Plättchen und ETEST®-Streifen für Amc/Clav auf der Agarplatte mit Bakteriensuspension vor der Inkubation. 4b) Plättchen und ETEST®-Streifen für Amp/Sul auf der Agarplatte mit Bakteriensuspension vor der Inkubation.

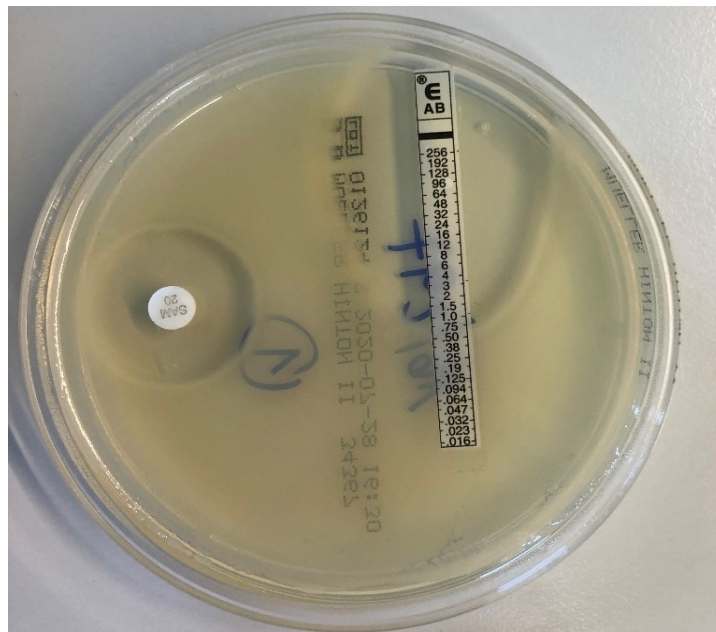


Abbildung 16: MH II-Agarplatte mit Bakteriensuspension nach 18 - 24 h Inkubationszeit. Deutlich erkennbarer runder Hemmhof um das Plättchen sowie eine ellipsoide Aussparung im Bereich des ETEST®-Streifen.

Weiter wurde eine Verdünnungskontrolle durchgeführt. Dabei wurde von der hergestellten Bakteriensuspension 1 μL entnommen. Diese wurde in ein Gefäß mit 1 mL 0,9% NaCl pipettiert und anschließend wurden von dieser verdünnten Suspension erneut 1 μL in ein Gefäß mit 1 mL 0,9% NaCl pipettiert, sodass eine Verdünnung von 1:1.000.000 entstand(88). 200 μL dieser 1:1.000.000 Verdünnung wurden auf eine COS-Agarplatte aufgebracht und für 18 - 24 h bei 35° +/- 1° Celsius inkubiert(80,81). Bei korrekter Verdünnung wurden ungefähr 10-20 Kolonien gezüchtet.

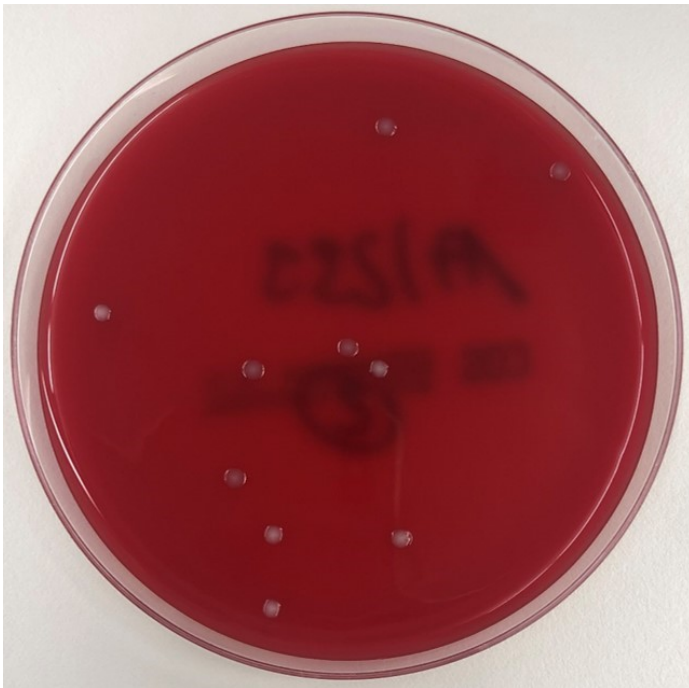


Abbildung 17: Verdünnungskontrolle

Für die Ermittlung der RAST-Breakpoints für Amc/Clav sowie für Amp/Sul bei *E. coli* wurden von der Blutbank abgelaufene Blutkonserven bereitgestellt, um eine *E. coli* Bakteriämie simulieren zu können. Im ersten Schritt wurden BACTEC-Blutkulturflaschen mit 5 mL Blut mittels steriler Injektionsnadel und Spritze befüllt. Nach den EUCAST-Leitlinien wurde eine 0,5 Mc-Farland-Bakteriensuspension mit den bereits vorhandenen Subkulturen hergestellt(80,81). Diese Bakteriensuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1.000.000, wie zuvor bei der Verdünnungskontrolle beschrieben, verdünnt(88). Die bereits mit 5 mL befüllten Blutkulturflaschen wurden mit

1000 μL von der 1:1.000.000 verdünnten Bakteriensuspension angereichert und in das BACTEC-Gerät eingelesen(88).

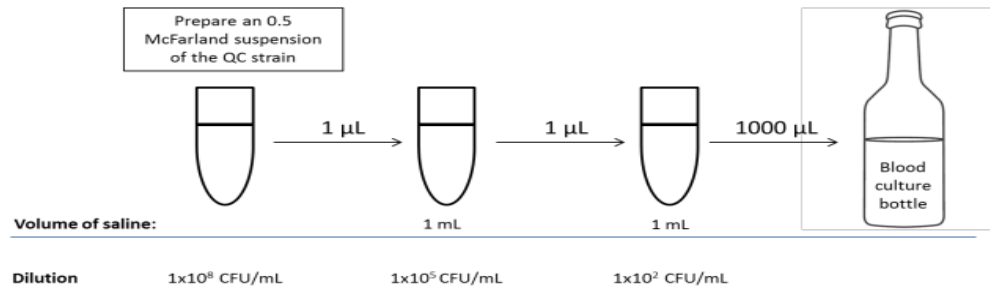


Abbildung 18: Herstellungsanleitung der 1:1.000.000. Verdünnung(88)

Tag 2: Ansetzen von RAST

Sobald die Blutkulturen positiv wurden konnten MH II-Agarplatten direkt mit dem Blut der Blutkulturflaschen beimpft werden. So wurden aus den Blutkulturflaschen 125 +/- 25 μL entnommen und auf der MH II-Agarplatte ausgestrichen(87). Danach wurden mit einer Pinzette jeweils zwei Amc/Clav- und zwei Amp/Sul-Plättchen platziert. Die inokulierten Agarplatten wurden insgesamt 6 h bei 35° +/- 1° Celsius inkubiert(87). Die Hemmhöfe wurden nach 4 und 6 h Bebrütungszeit abgelesen und dokumentiert (87). Auch hier erfolgte alles im Doppelansatz.

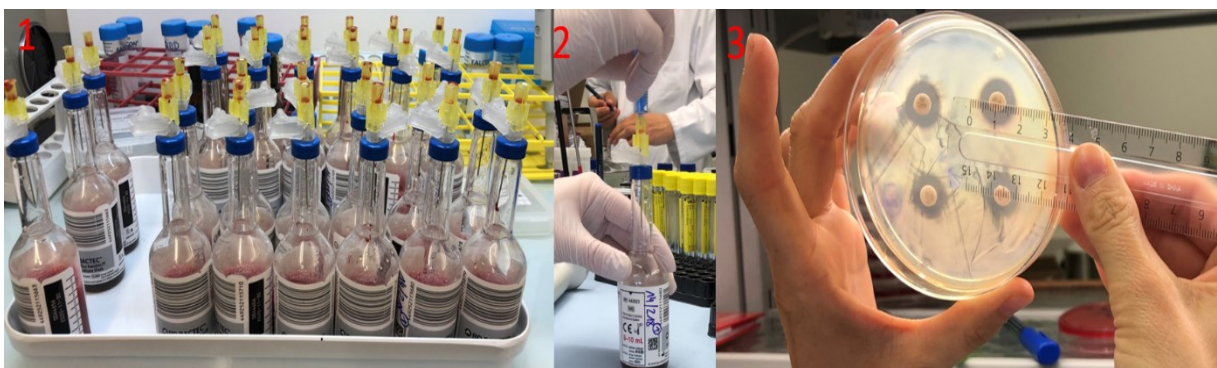


Abbildung 19: 1) Blutkulturflaschen wurden mit 5 mL Blut befüllt. 2) 1 mL von der 1:1.000.000 verdünnten Bakteriensuspension wurde in die bereits mit 5 mL Blut befüllten Blutkulturflaschen hinzugefügt. 3) Eine für 6 h bebrütete Agarplatte, die zuvor

mit 125 +/- 25 µL Blut aus einer positiven Blutkultur benetzt und mit Amc/Clav- und Amp/Sul-Plättchen belegt wurde. Deutlich erkennbare Hemmhöfe, welche mittels Lineal abgemessen wurden.

III. Ergebnisse

1. Allgemeines

Im Sammelzeitraum von 2013 – 2020 wurden insgesamt 95 *E. coli*-Isolate von dem Diagnostik & Forschungs- Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin der Medizinischen Universität Graz zur Verfügung gestellt. Im mikrobiologischen Labor der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin der Medizinischen Universität Graz fanden im Zeitraum vom 25.05.20 bis 06.07.20 die Testungen statt. Von den 95 *E. coli*-Isolaten konnten 89 Stämme in die Auswertung eingeschlossen werden, da bei 2 Stämmen eine Anzucht nicht möglich war und 4 Stämme aufgrund diskrepanter Ergebnisse ausgeschlossen werden mussten. Von den insgesamt 89 Stämmen wurden 74 Stämme im Doppelansatz und 15 Stämme im Einfachansatz getestet. Somit wurden in toto 163 Testungen durchgeführt.

2. Time to positivity (TTP)

Im Mittel meldete das BACTEC-Gerät die insgesamt 163 beimpften Blutkulturflaschen nach 10 h und 16 min als positiv. Die längste Bebrütungsdauer im BACTEC-Gerät betrug 17 h und 46 min, die kürzeste hingegen 6 h und 47 min.

3. Hemmhofdurchmesser nach 4 und 6 h in Korrelation mit der MHK

In den nachfolgenden vier Abbildungen sind die jeweils ermittelten Hemmhofdurchmesser nach 4 und 6 h in mm auf der x-Achse sowie die Anzahl der getesteten Stämme auf der y-Achse ersichtlich. Die unterschiedlichen Farben stellen die nach 24 h Bebrütungsdauer ermittelten MHK dar. Entsprechend der EUCAST-Vorgaben wurden Stämme mit einer MHK von ≤ 8 für Amc/Clav und Amp/Sul als

sensibel eingestuft, $MHK > 8$ als resistent(83). Die RAST-Breakpoints wurden, wie folgt ermittelt: In die Kategorie „sensibel“ wurden ausschließlich Hemmhofdurchmesser jener Isolate eingeschlossen, die auch nach 24 h Bebrütung eine $MHK \leq 8$ aufwiesen. Hemmhofdurchmesser von Isolat, die nach 24 h Bebrütung überwiegend $MHK > 8$ aufwiesen, wurden als „resistent“ bewertet. Hemmhofdurchmesser bei denen sowohl sensible, als auch resistente Stämme enthalten waren, wurden in den Bereich „Area of Technical Uncertainty“ eingeordnet. „ATU“ beschreibt jenen Bereich, der keine eindeutige Interpretation (sensibel oder resistent) zulässt, da sowohl sensible als auch resistente Stämme enthalten sind(85).

3.1 RAST-Breakpoints für *E.coli* für Amc/Clav nach 4 h Bebrütungsdauer

Wie bereits zuvor erläutert, wurde die Interpretation „sensibel“ für jene Hemmhofdurchmesser, welche ausschließlich sensible Stämme (bestätigt mittels MHK) enthalten, festgelegt. Gemäß **Abbildung 20** werden daher Hemmhofdurchmesser ≥ 16 mm als sensibel eingestuft. Als „ATU“ wurden Hemmhofdurchmesser von 14-15 mm zusammengefasst. *E. coli*-Stämme mit Hemmhofdurchmessern ≤ 13 mm wurden als resistent eingestuft, da die überwiegende Anzahl der MHKs > 8 betrug. So waren definitionsgemäß nach 4 h in absoluten Zahlen 15 Testungen als sensibel, 80 Testungen als resistent und 66 in den Bereich ATU einzustufen. Von insgesamt 163 Testungen waren nach 4 h Bebrütungszeit 161 Testungen ablesbar.

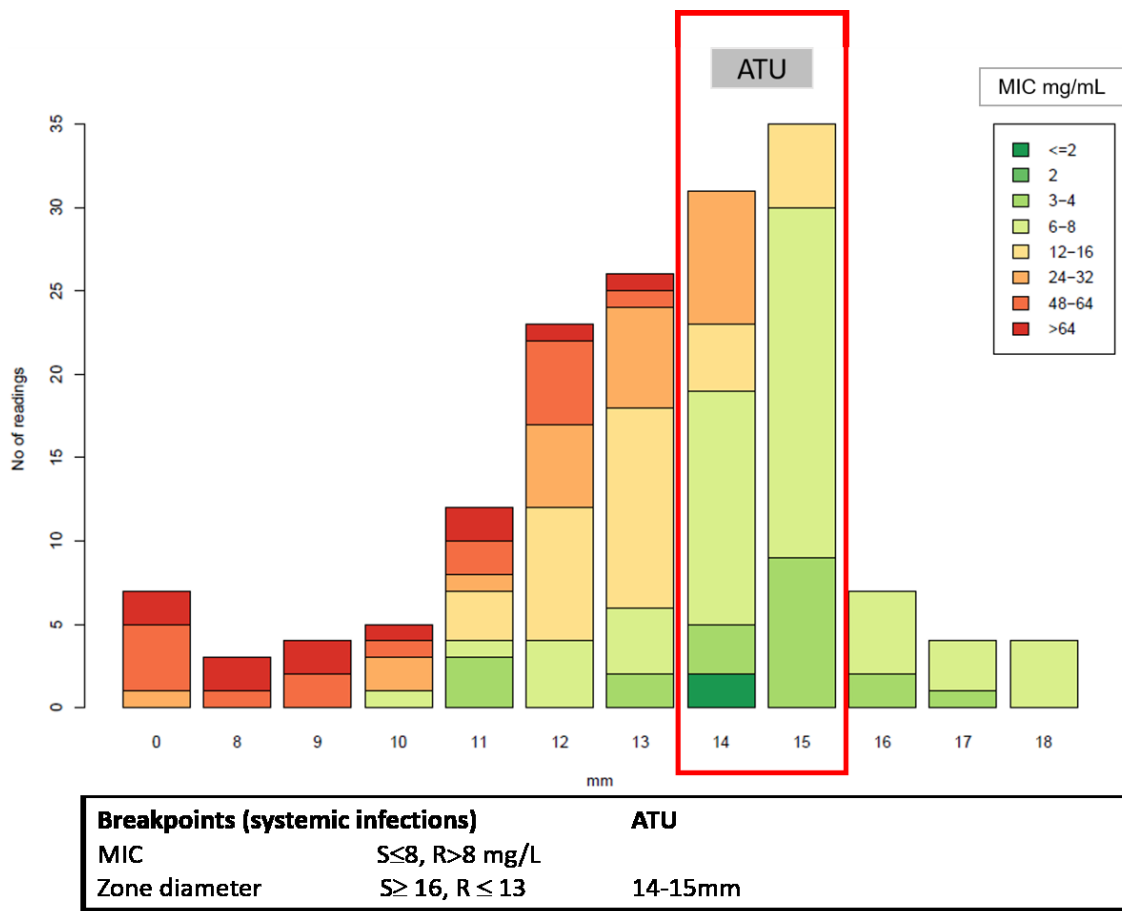
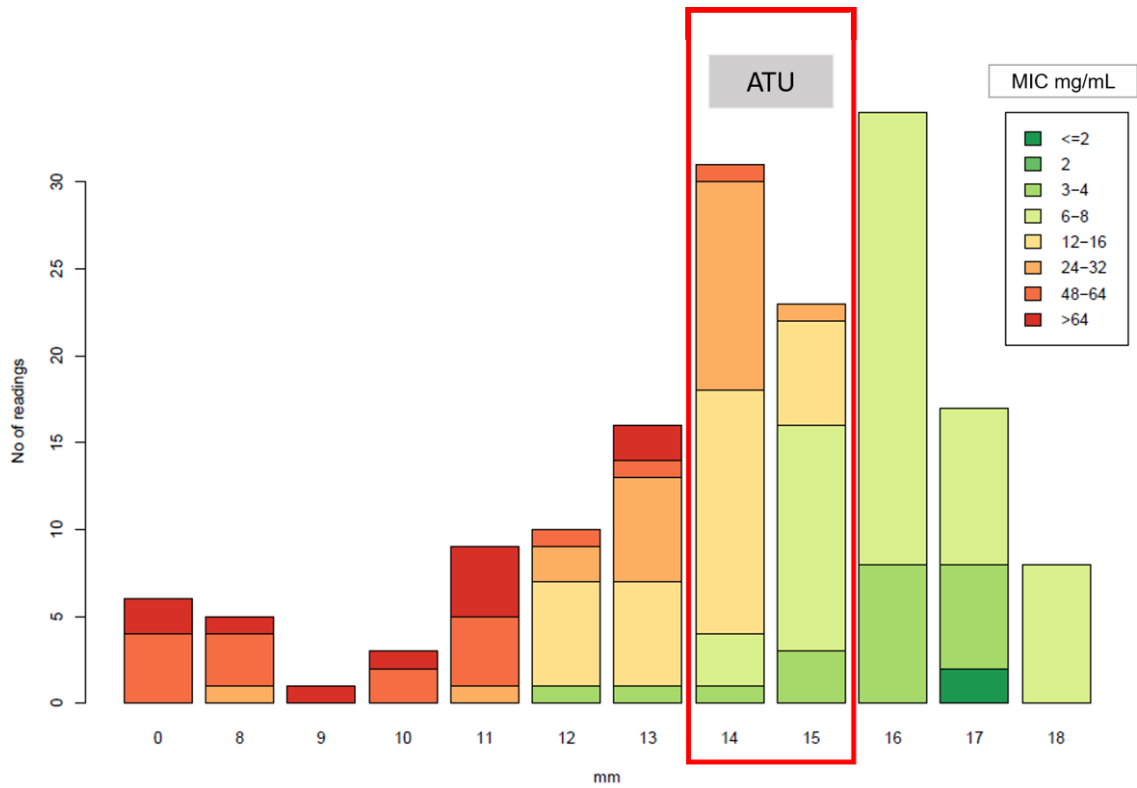


Abbildung 20: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amc/Clav nach 4 h

3.2. RAST-Breakpoints für *E.coli* für Amc/Clav nach 6 h Bebrütungsdauer

Vergleicht man **Abbildung 20** mit **Abbildung 21**, so ist erkennbar, dass sich die Ergebnisse bzw. die Breakpoints nach weiteren 2 h Bebrütungszeit nicht verändert haben. Folglich sind auch hier Hemmhofdurchmesser ≤ 13 mm als resistent einzustufen. Der „ATU“ Bereich liegt erneut bei 14-15 mm und als sensibel gelten Isolate mit Hemmhofdurchmessern ab 16 mm. Nach 2 weiteren Stunden Bebrütungsdauer konnten mehr Stämme als „sensibel“ interpretiert werden. Durch die längere Bebrütungszeit konnten daher für Amc/Clav 8 (zunächst resistent) respektive 36 (zunächst ATU) weitere Testungen, gesamt somit 44 Testungen, der Kategorie sensibel hinzugeordnet werden. Somit konnten bei Amc/Clav ca. 25% der letztlich sensibel getesteten Isolate sowohl nach 4 h Bebrütungszeit, als auch nach 2 weiteren Stunden Inkubationszeit als sensibel eingestuft werden. Von den Testungen für Amc/Clav, die erst nach einer Bebrütungsdauer von 6 h als sensibel zugeordnet werden konnten, waren 18% zunächst resistent und 86% fielen in den Bereich ATU.

Nach 6 h Inkubationszeit war es möglich 163 von 163 Testungen zu beurteilen bzw. abzulesen. Von diesen 163 Testungen fielen 59 in den Bereich sensibel, 50 in den Bereich resistent und 54 in den Bereich ATU.



| Breakpoints (systemic infections) | | ATU |
|-----------------------------------|-------------------|---------|
| MIC | S ≤ 8, R > 8 mg/L | |
| Zone diameter | S ≥ 16, R ≤ 13 | 14-15mm |

Abbildung 21: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amc/Clav nach 6 h

3.3. RAST-Breakpionts für *E.coli* für Amp/Sul nach 4 h Bebrütungsdauer

Bei Amp/Sul fällt der ATU-Bereich im Vergleich zu Amc/Clav deutlich breiter aus. Da bei Hemmhofdurchmessern von 10-14 mm sensible und resistente Stämme gleichermaßen auftreten, kann für diesen Bereich keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob sensible bzw. resistente Keime zu erwarten sind. Werden Hemmhofdurchmesser von über 14 mm abgelesen, so sind diese Stämme als „sensibel“ zu interpretieren. Hemmhofdurchmesser von unter 10 mm sind als „resistent“ einzustufen. Wie in **Abbildung 22** ersichtlich sind nach 4 h Inkubationszeit nur wenige getestete Stämme als sensibel einzustufen (S:4, R:45, ATU:101) Des Weiteren sei zu erwähnen, dass nach 4 h Bebrütungsdauer 13 von insgesamt 163 Testungen nicht abgelesen werden konnten.

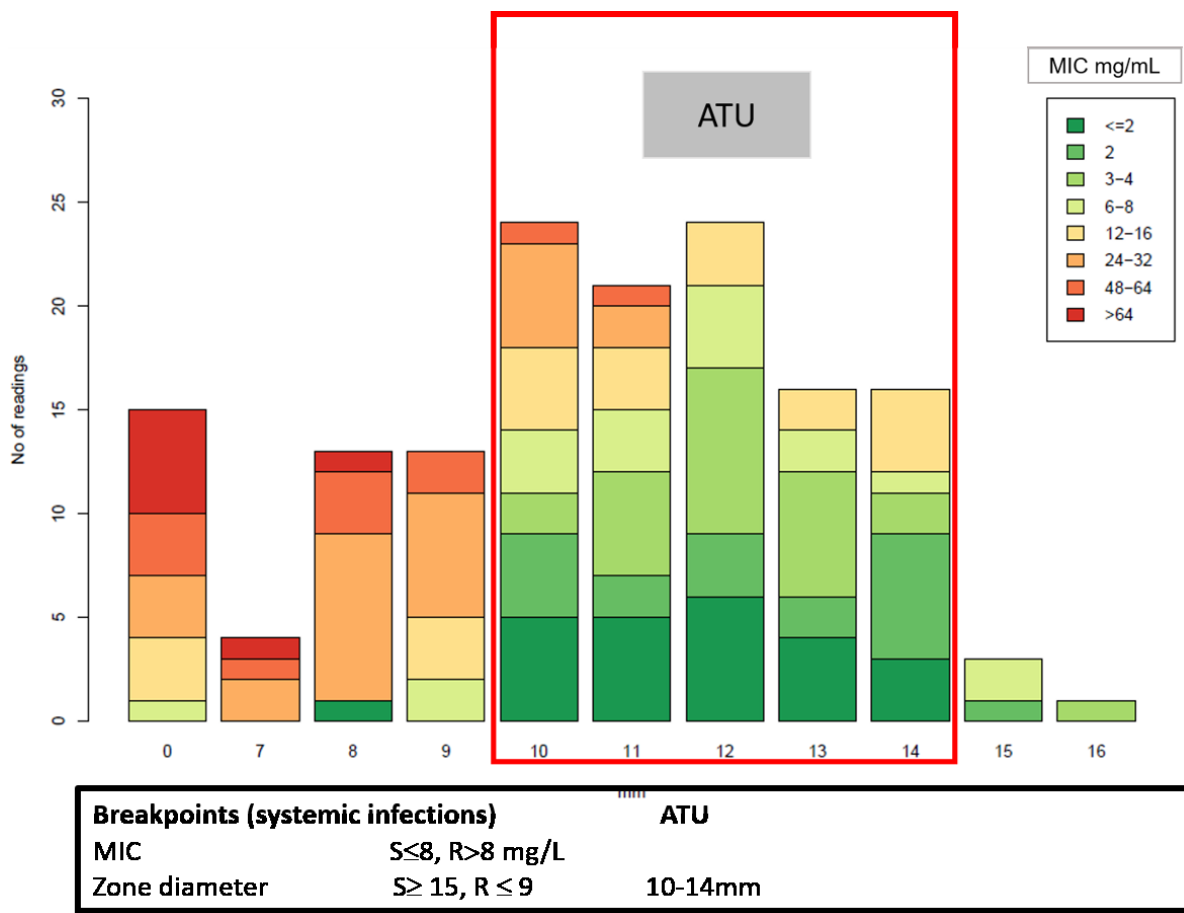


Abbildung 22: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amp/Sul nach 4 h

3.4. RAST-Breakpoints für *E.coli* für Amp/Sul nach 6 h Bebrütungsdauer

Nach einer Bebrütungsdauer von 6 h ist, wie auch bei Amc/Clav, auffallend, dass mehr Isolate einen Hemmhofdurchmesser von 15 mm erreichen und somit als „sensibel“ zu interpretieren sind. Für Amp/Sul konnten 41 weitere Testungen als sensibel eingestuft werden, wovon 38 zuvor dem ATU zuzuordnen waren und 3 zunächst nicht abgelesen werden konnten. Davon wiederum waren ca. 9% der endgültig als sensibel getesteten Isolate schon nach 4 h sensibel. 93% der nach 4 h noch nicht sensibel getesteten Isolate wurden von ATU zu sensibel und 7% der nach 6 h als sensibel zu interpretierenden Testungen konnten zuvor bzw. nach 4 h nicht abgelesen werden. Hemmhofdurchmesser von über 14 mm sind, wie bereits nach 4 h Bebrütungszeit, als „sensibel“ zu interpretieren. Als „resistent“ gelten Hemmhofdurchmesser von unter 12 mm. Folglich verschiebt sich auch der „ATU“ auf den Bereich von 12-14 mm. Nach 6 h Bebrütungsdauer konnten alle 163 Testungen abgelesen werden, von diesen waren 45 sensibel, 56 resistent und 62 in dem Bereich der technischen Unsicherheit (ATU).

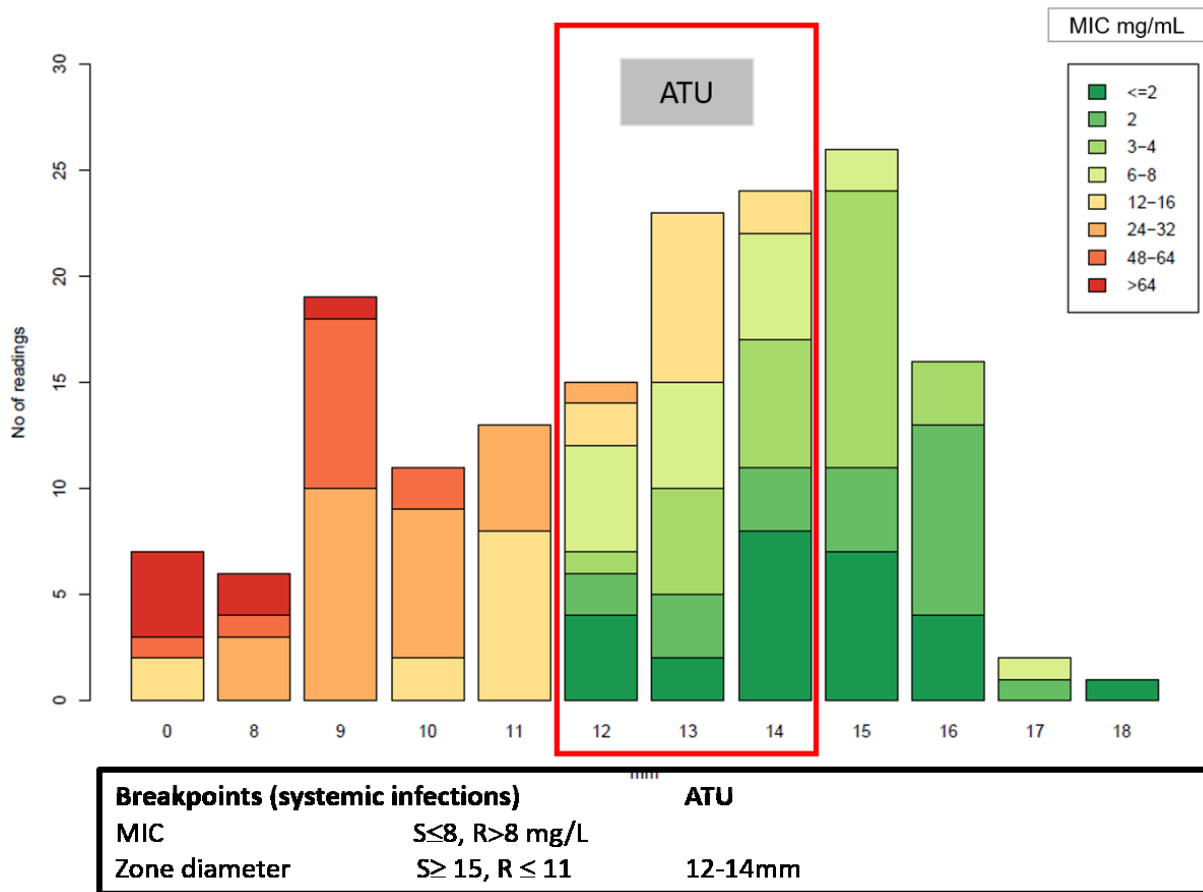


Abbildung 23: Hemmhofdurchmesser-MHK Korrelation von Amp/Sul nach 6 h

IV. Diskussion

1. Zusammenfassung

Im klinischen Alltag sind Keime allgegenwärtig. Vor allem bei Patientinnen und Patienten, deren Abwehrmechanismen durch diverse Grunderkrankungen eingeschränkt sind, stellen große bzw. auch kleine invasive Eingriffe (Blasenkatheter, ZVK oder endoskopische Verfahren etc.) Risikofaktoren für eine Bakteriämie dar, welche in weiterer Folge in eine Sepsis übergehen kann(3,4). In solchen Fällen gilt es schnell zu reagieren und für den Patienten eine geeignete antimikrobielle Therapie zu finden. Mit der von der EUCAST 2018 publizierte RAST-Methode ist es möglich das Resistenzverhalten von invasiven Stämmen aus Blutkulturen innerhalb von 4, 6 und 8 h zu ermitteln(85,87). Aufgrund der bis dato noch nicht vorhandenen RAST-Breakpoints für *E. coli* für Amc/Clav und Amp/Sul war es das Ziel dieser Arbeit, diese Grenzwerte zu bestimmen. Die folgende Tabelle zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse bzw. die RAST-Breakpoints für Amc/Clav und Amp/Sul für *E. coli*, die im Rahmen dieser Studie ermittelt wurden.

| RAST-Breakpoints <i>E.coli</i> | |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Amc/Clav nach 4 h | Amp/Sul nach 4 h |
| S ≥ 16mm | S ≥ 15mm |
| R ≤ 13mm | R ≤ 9mm |
| ATU 14-15mm | ATU 10-14mm |
| Amc/Clav nach 6 h | Amp/Sul nach 6 h |
| S ≥ 16mm | S ≥ 15mm |
| R ≤ 13mm | R ≤ 11mm |
| ATU 14-15mm | ATU 12-14mm |

Tabelle 3: Ermittelte RAST-Breakpoints für *E.coli* für Amc/Clav und Amp/Sul

2. Limitationen

Die retrospektive Beurteilung unserer Laborstudie führt zwangsläufig zur kritischen Hinterfragung einiger Punkte:

Hinsichtlich der Methodik sind folgende Punkte zu diskutieren. Erstens ist die möglicherweise nicht ausreichende Verblindung des Forschungsteams bezüglich des Resistenzverhaltens der zu testenden *E. coli*-Isolate problematisch. Die Hemmhofdurchmesser nach 4 und 6 h wurden von derselben Person abgelesen, welche auch die MHK ermittelte. Somit waren die MHK der zu testenden Stämme dem Untersucher bekannt und eine gewisse Voreingenommenheit kann nicht sicher ausgeschlossen werden. Demnach sollten bei künftigen Studien die Kontrollkulturen und RAST-Kulturen jeweils von unterschiedlichen Personen abgelesen und unabhängig voneinander dokumentiert werden, um eine vollkommene Verblindung garantieren zu können. Angemerkt sei daher, dass solch ein Vorgehen im Rahmen einer Studie optimal wäre, im klinischen Alltag jedoch ist der Abgleich von MHK und Hemmhofdurchmesser stets von Bedeutung, um für den Patienten eine sichere Entscheidung der antimikrobiellen Therapiewahl treffen zu können.

Zweitens sei angemerkt, dass die Dienstzeiten des mikrobiologischen Labors der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin der Medizinischen Universität Graz das Ablesen der Hemmhofdurchmesser nur nach 4 und 6 h zuließen, da innerhalb eines Arbeitstages trotz frühzeitigen Bebrütens der RAST-Kulturen die Dauer von 8 h die Öffnungszeiten des Labors überschritten hätte. Folglich war ein Bestimmen der Grenzwerte entsprechend der EUCAST-Richtlinien durch das Ablesen der Hemmhofdurchmesser nach 8 h nicht möglich. Dies entspricht allerdings dem klinischen Alltag der meisten mikrobiologischen Labore. Eine Verbesserung wäre daher insoweit nur durch eine Verlängerung der Öffnungszeiten des Labors denkbar. Bis dato gibt es noch keine vergleichbaren Studien, welche sich mit der Ermittlung von RAST-Breakpoints für *E. coli* für Amc/Clav und Amp/Sul beschäftigt haben. Eine weitere Limitation ist die niedrige Anzahl an getesteten Stämmen. Dennoch kann man sich an der von der EUCAST im Februar 2020 publizierte Studie orientieren(85). Vergleicht man die Anzahl der getesteten Isolate (bezogen auf *E. coli*), so wurden in

der Studie von Jonasson et al. 60 *E. coli*-Isolate für die Testung herangezogen(85), bei uns hingegen 89 *E. coli*-Isolate. Somit sind wir hinsichtlich der Anzahl der getesteten Isolate in einem Bereich, der wohl als repräsentativ einzustufen ist. Die Studie von Jonasson et al. weist darauf hin, dass je nach Bakterienspezies Hemmhofdurchmesser grundsätzlich nach 4 h interpretierbar sind(85). Das Ablesen der Hemmhofdurchmesser nach 4 h war deutlich schwieriger, als nach 6 h, da die Hemmhofdurchmesser nach kürzerer Bebrütungsdauer teilweise nicht demarkiert waren. Bei Amc/Clav konnten 2 von 163 Testungen und bei Amp/Sul 13 von 163 Testungen nach 4 h Inkubation nicht beurteilt werden. Vor allem bei Amc/Clav zeigte sich jedoch, dass die Breakpoints nach 4 und 6 h unverändert blieben. Ergänzend sei hier dennoch angemerkt, dass nach einer Bebrütungsdauer von 6 h mehr Isolate in den Bereich sensibel fielen (**siehe Kapitel III. Ergebnisse**).

Folglich ist nach 6 h Bebrütungsdauer eine zuverlässigere Aussage möglich, da das Ablesen der Hemmhofdurchmesser deutlich leichter ist und nach weiteren 2 h einige weitere Isolate als sensibel zu interpretieren sind.

Derzeit sind von der EUCAST keine RAST-Breakpoint für Amc/Clav und Amp/Sul für *E. coli* verfügbar. Ziel dieser Studie war es solche zu ermitteln.

3. Fazit

Abschließend ist daher festzuhalten, dass mit dieser Laborstudie erstmals RAST-Breakpoints (für *E. coli*) für die antimikrobiellen Substanzen Amc/Clav und Amp/Sul, welche in Österreich häufig bei diversen Infektionen eingesetzt werden, ermittelt werden konnten. Aufgrund der angeführten Limitationen und noch unzureichenden Daten sind die Ergebnisse in der Klinik durchaus als Hilfestellung nützlich, jedoch sei darauf verwiesen, dass noch weitere Studien notwendig sind, um verlässliche RAST-Breakpoints festlegen zu können.

Literaturverzeichnis

1. Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch Institut. Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen: Hinweise zur Blutkulturdiagnostik. Informativer Anhang 1 zur Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 2017;60(2):216–30. doi: 10.1007/s00103-016-2485-6. PubMed PMID: 28091690.
2. Laupland KB, Church DL. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. Clinical Microbiology Reviews 2014;27(4):647–64. doi: 10.1128/CMR.00002-14. PubMed PMID: 25278570; PubMed Central PMCID: PMC4187633.
3. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. Clin Infect Dis 2009;48 Suppl 4:S238-45. doi: 10.1086/598188. PubMed PMID: 19374579.
4. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. Clin. Microbiol. Rev. 1997;10(3):444–65. doi: 10.1128/CMR.10.3.444. PubMed PMID: 9227861; PubMed Central PMCID: PMC172929.
5. Smith DA, Nehring SM. Bacteremia. [Updated 2020 Jul 19]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatePearls Publishing; 2020 Jan-.
6. Brunkhorst FM, Weigand M, Pletz M, Gastmeier P, Lemmen SW, Meier-Hellmann A, et al. S3-Leitlinie Sepsis - Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge [Internet]; 2018 [cited 29.09.20]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-001I_S3_Sepsis-Praevention-Diagnose-Therapie-Nachsorge_2020-03_01.pdf.
7. Bracht H, Hafner S, Weiß M. Sepsis-Update: Definition und Epidemiologie. Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther 2019;54(1):10–20. doi: 10.1055/a-0625-5492. PubMed PMID: 30620952.

8. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, Mendonça A de, Bruining H, et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med* 1996;22(7):707–10. doi: 10.1007/bf01709751. PubMed PMID: 8844239.
9. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 2016;315(8):801–10. doi: 10.1001/jama.2016.0287. PubMed PMID: 26903338; PubMed Central PMCID: PMC4968574.
10. Tsertsvadze A, Royle P, McCarthy N. Community-onset sepsis and its public health burden: protocol of a systematic review. *Syst Rev* 2015;4(119):1–13. doi: 10.1186/s13643-015-0103-6. PubMed PMID: 26394931; PubMed Central PMCID: PMC4579606.
11. Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *American Journal of Infection Control* 1988;16(3):128–40. doi: 10.1016/0196-6553(88)90053-3.
12. Hoenigl M, Wagner J, Raggam RB, Pruessler F, Prattes J, Eigl S, et al. Characteristics of Hospital-Acquired and Community-Onset Blood Stream Infections, South-East Austria. *PLOS ONE* 2014;9(8):e104702. doi: 10.1371/journal.pone.0104702.
13. Morin CA, Hadler JL. Population-based incidence and characteristics of community-onset *Staphylococcus aureus* infections with bacteremia in 4 metropolitan Connecticut areas, 1998. *J Infect Dis* 2001;184(8):1029–34. doi: 10.1086/323459. PubMed PMID: 11574918.
14. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, et al. Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med* 2002;137(10):791–7. doi: 10.7326/0003-4819-137-10-200211190-00007. PubMed PMID: 12435215.
15. Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Morel KA, Munson E, Doern GV. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream

- infection. *J Clin Microbiol* 2003;41(8):3655–60. doi: 10.1128/jcm.41.8.3655-3660.2003. PubMed PMID: 12904371; PubMed Central PMCID: PMC179863.
16. Centers for Disease Control and Prevention. Bloodstream Infection Event (Central Line-Associated Bloodstream Infection and Non-central Line Associated Bloodstream Infection) [Internet]; 2020 [cited 2020 Sep 30]. Available from: https://www.cdc.gov/nhsn/PDFs/pscManual/4PSC_CLABScurrent.pdf.
 17. Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, Robert Koch-Institut. Definitionen nosokomialer Infektionen für die Surveillance im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS-Definitionen), Berlin 2017 [Internet] [cited 2020 Nov 1]. Available from: https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/module/KISS_Definitionen_E-Book_Neuaufgabe_06_2017.pdf.
 18. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(6):501–9. doi: 10.1111/1469-0691.12195. PubMed PMID: 23473333.
 19. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect* 2020;26(2):142–50. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017. PubMed PMID: 31760113; PubMed Central PMCID: PMC31760113.
 20. Laupland KB, Pasquill K, Dagasso G, Parfitt EC, Steele L, Schonheyder HC. Population-based risk factors for community-onset bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2019;39(4):753–8. doi: 10.1007/s10096-019-03777-8. PubMed PMID: 31858354.
 21. Mehl A, Åsvold BO, Lydersen S, Paulsen J, Solligård E, Damås JK, et al. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;17(1):205. doi: 10.1186/s12879-017-2291-2. PubMed PMID: 28284196; PubMed Central PMCID: PMC5346205.
 22. Uslan DZ, Crane SJ, Steckelberg JM, Cockerill FR, St Sauver JL, Wilson WR, et al. Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based

- study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Intern Med* 2007;167(8):834–9. doi: 10.1001/archinte.167.8.834. PubMed PMID: 17452548.
23. Laupland KB, Gregson DB, Flemons WW, Hawkins D, Ross T, Church DL. Burden of community-onset bloodstream infection: a population-based assessment. *Epidemiol Infect* 2007;135(6):1037–42. doi: 10.1017/S0950268806007631. PubMed PMID: 17156500; PubMed Central PMCID: PMC2870648.
 24. Laupland KB, Kibsey PC, Gregson DB, Galbraith JC. Population-based laboratory assessment of the burden of community-onset bloodstream infection in Victoria, Canada. *Epidemiol Infect* 2013;141(1):174–80. doi: 10.1017/S0950268812000428. PubMed PMID: 22417845.
 25. Søgaaard M, Nørgaard M, Dethlefsen C, Schønheyder HC. Temporal changes in the incidence and 30-day mortality associated with bacteremia in hospitalized patients from 1992 through 2006: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis* 2011;52(1):61–9. doi: 10.1093/cid/ciq069. PubMed PMID: 21148521.
 26. Laupland KB, Pasquill K, Parfitt EC, Naidu P, Steele L. Burden of community-onset bloodstream infections, Western Interior, British Columbia, Canada. *Epidemiol Infect* 2016;144(11):2440–6. doi: 10.1017/S0950268816000613. PubMed PMID: 26996433.
 27. Paulsen J, Askim Å, Mohus RM, Mehl A, Dewan A, Solligård E, et al. Associations of obesity and lifestyle with the risk and mortality of bloodstream infection in a general population: a 15-year follow-up of 64 027 individuals in the HUNT Study. *Int J Epidemiol* 2017;46(5):1573–81. doi: 10.1093/ije/dyx091. PubMed PMID: 28637260.
 28. Mohus RM, Paulsen J, Gustad L, Askim Å, Mehl A, DeWan AT, et al. Association of iron status with the risk of bloodstream infections: results from the prospective population-based HUNT Study in Norway. *Intensive Care Med* 2018;44(8):1276–83. doi: 10.1007/s00134-018-5320-8. PubMed PMID: 30039264.
 29. Thulstrup AM, Sørensen HT, Schønheyder HC, Møller JK, Tage-Jensen U. Population-based study of the risk and short-term prognosis for bacteremia in patients with liver cirrhosis. *Clin Infect Dis* 2000;31(6):1357–61. doi: 10.1086/317494. PubMed PMID: 11096002.

30. Skov Dalgaard L, Nørgaard M, Jespersen B, Jensen-Fangel S, Østergaard LJ, Schönheyder HC, et al. Risk and Prognosis of Bloodstream Infections among Patients on Chronic Hemodialysis: A Population-Based Cohort Study. *PLOS ONE* 2015;10(4):e0124547. doi: 10.1371/journal.pone.0124547. PubMed PMID: 25910221; PubMed Central PMCID: PMC4409390.
31. Thomsen RW, Hundborg HH, Lervang H-H, Johnsen SP, Schönheyder HC, Sørensen HT. Diabetes mellitus as a risk and prognostic factor for community-acquired bacteremia due to enterobacteria: a 10-year, population-based study among adults. *Clin Infect Dis* 2005;40(4):628–31. doi: 10.1086/427699. PubMed PMID: 15712091.
32. Laupland KB, Ross T, Gregson DB. Staphylococcus aureus bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J Infect Dis* 2008;198(3):336–43. doi: 10.1086/589717. PubMed PMID: 18522502.
33. Inghammar M, Engström G, Ljungberg B, Löfdahl C-G, Roth A, Egesten A. Increased incidence of invasive bacterial disease in chronic obstructive pulmonary disease compared to the general population--a population based cohort study. *BMC Infect Dis* 2014;14:163. doi: 10.1186/1471-2334-14-163. PubMed PMID: 24661335; PubMed Central PMCID: PMC3976148.
34. Ahmed D, Nahid MA, Sami AB, Halim F, Akter N, Sadique T, et al. Bacterial etiology of bloodstream infections and antimicrobial resistance in Dhaka, Bangladesh, 2005-2014. *Antimicrob Resist Infect Control* 2017;6:2. doi: 10.1186/s13756-016-0162-z. PubMed PMID: 28070309; PubMed Central PMCID: PMC5217397.
35. Kollef MH, Zilberberg MD, Shorr AF, Vo L, Schein J, Micek ST, et al. Epidemiology, microbiology and outcomes of healthcare-associated and community-acquired bacteremia: a multicenter cohort study. *J Infect* 2011;62(2):130–5. doi: 10.1016/j.jinf.2010.12.009. PubMed PMID: 21195110.
36. Vallés J, Palomar M, Álvarez-Lerma F, Rello J, Blanco A, Garnacho-Montero J, et al. Evolution over a 15-year period of clinical characteristics and outcomes of critically ill patients with community-acquired bacteremia. *Critical Care Medicine*

- 2013;41(1):76–83. doi: 10.1097/CCM.0b013e3182676698. PubMed PMID: 23222266.
37. Daga AP, Koga VL, Soncini JGM, Matos CM de, Perugini MRE, Pelisson M, et al. *Escherichia coli* Bloodstream Infections in Patients at a University Hospital: Virulence Factors and Clinical Characteristics. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:191. doi: 10.3389/fcimb.2019.00191. PubMed PMID: 31245301; PubMed Central PMCID: PMC6563721.
38. Mora-Rillo M, Fernández-Romero N, Navarro-San Francisco C, Díez-Sebastián J, Romero-Gómez MP, Fernández FA, et al. Impact of virulence genes on sepsis severity and survival in *Escherichia coli* bacteremia. *Virulence* 2015;6(1):93–100. doi: 10.4161/21505594.2014.991234. PubMed PMID: 25654604; PubMed Central PMCID: PMC4603433.
39. Krause R, Zollner-Schwetz I, Valentin T, Zurl C, Prattes J, Wunsch S, et al. Resistenzbericht 2018: Mikrobiologisches Labor. Universitätsklinik für Innere Medizin, Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin.
40. Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. Resistenzbericht Österreich AURES 2017: Antibiotikaresistenz und Verbrauch antimikrobieller Substanzen in Österreich [Internet]. Wien: ; 2017 [cited 2020 Mar 16]. Available from: https://www.ages.at/download/0/0/b732a3fdd165ad3bc848806f199a21bfb51f9237/fileadmin/AGES2015/Themen/Arzneimittel_Medizinprodukte_Dateien/AURES/AURES_2017.pdf.
41. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Brock Mikrobiologie kompakt*. 13th ed. Pearson Studium. München, Harlow, Amsterdam: Pearson Deutschland; 2015. 698 p. ger.
42. Holtmann H, Füssle R. *BASICS Medizinische Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie*. 4th ed. Philadelphia: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG; 2017. 193 p. ger.
43. Escherich T. The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. 1885. *Rev Infect Dis* 1989;11(2):352–6. doi: 10.1093/clinids/11.2.352. PubMed PMID: 2649968.

44. Hübner N-O, Wendt C. Bakterielle Infektionen. In: Kramer A, Assadian O, Exner M, Hübner N-O, Simon A, editors. Krankenhaus- und Praxishygiene: Hygienemanagement und Infektionsprävention in Medizinischen und Sozialen Einrichtungen. 3rd ed. Philadelphia: Urban & Fischer Verlag GmbH & Co. KG; 2016. p. 230–44.
45. Agnes Ullmann. Theodor Escherich and the Emergence of Molecular Biology. In: Blum-Oehler G, editor. Escherichia coli - facets of a versatile pathogen: On the occasion of the 150th birthday of Theodor Escherich (1857 - 1911) ; Leopoldina Symposium ; Bildungszentrum Kloster Banz, Bad Staffelstein, October 09 to 12, 2007 ; with 7 tables. Nova acta Leopoldina. N.F., 359 = Bd. 98. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges; 2008. p. 29–34.
46. Public Health England. Bacteremia. Polymicrobial bacteraemia and fungaemia in England, Wales and Northern Ireland, 2014 [Internet]; Public Health England, June, 2015 [cited 2020 Mar 16]. Available from: https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/436558/hpr2115_plmcrbls.pdf.
47. Vihta K-D, Stoesser N, Llewelyn MJ, Quan TP, Davies T, Fawcett NJ, et al. Trends over time in Escherichia coli bloodstream infections, urinary tract infections, and antibiotic susceptibilities in Oxfordshire, UK, 1998–2016: a study of electronic health records. *The Lancet Infectious Diseases* 2018;18(10):1138–49. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30353-0.
48. Review on Antimicrobial Resistance. Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. 2014 [Internet] [cited 2020 Mar 16]. Available from: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf.
49. Buetti N, Atkinson A, Marschall J, Kronenberg A. Incidence of bloodstream infections: a nationwide surveillance of acute care hospitals in Switzerland 2008-2014. *BMJ Open* 2017;7(3):e013665. doi: 10.1136/bmjopen-2016-013665. PubMed PMID: 28325858; PubMed Central PMCID: PMC5372113.

50. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2016.: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) [Internet]. Stockholm: ECDC; 2017. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/AMR-surveillance-Europe-2016.pdf>.
51. van der Mee-Marquet NL, Blanc DS, Gbaguidi-Haore H, Dos Santos Borges S, Viboud Q, Bertrand X, et al. Marked increase in incidence for bloodstream infections due to *Escherichia coli*, a side effect of previous antibiotic therapy in the elderly. *Front Microbiol* 2015;6:646. doi: 10.3389/fmicb.2015.00646. PubMed PMID: 26175721; PubMed Central PMCID: PMC4485226.
52. Laupland KB, Gregson DB, Church DL, Ross T, Pitout JDD. Incidence, risk factors and outcomes of *Escherichia coli* bloodstream infections in a large Canadian region. *Clin Microbiol Infect* 2008;14(11):1041–7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2008.02089.x. PubMed PMID: 19040476.
53. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, Williams T, Bauni E, Mwarumba S, et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005;352(1):39–47. doi: 10.1056/NEJMoa040275. PubMed PMID: 15635111.
54. May M, Daley AJ, Donath S, Isaacs D. Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2005;90(4):F324-7. doi: 10.1136/adc.2004.066134. PubMed PMID: 15878934; PubMed Central PMCID: PMC1721922.
55. Ziesing S, Fille M. Resistenz. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8th ed. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 713–15.
56. Hof H, Schlüter D, Dörries R. *Medizinische Mikrobiologie*. 7th ed. Duale Reihe. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; Thieme; 2019. 768 p. ger.
57. Hoffmann M, Erhard D, Geldner G. Multiresistente Bakterien – Resistenzen und Antibiotikastrategien. *Lege artis* 2014;4(02):86–93. doi: 10.1055/s-0034-1373815.
58. Robert Koch Institut. *Epidemiologisches Bulletin* [Internet]; 2007. Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Krankenhaushygiene/Erreger_ausgewaehlt/ESBL/ESBL_28_07.pdf?__blob=publicationFile.

59. Edmiston CE, Garcia R, Barnden M, DeBaun B, Johnson HB. Rapid diagnostics for bloodstream infections: A primer for infection preventionists. *American Journal of Infection Control* 2018;46(9):1060–8. doi: 10.1016/j.ajic.2018.02.022. PubMed PMID: 29661630.
60. Bauer KA, Perez KK, Forrest GN, Goff DA. Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs. *Clin Infect Dis* 2014;59 Suppl 3:S134-45. doi: 10.1093/cid/ciu547. PubMed PMID: 25261540.
61. Maurer FP, Christner M, Hentschke M, Rohde H. Advances in Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacteria in the Clinical Microbiology Laboratory: Implications for Patient Care and Antimicrobial Stewardship Programs. *Infect Dis Rep* 2017;9(1):6839. doi: 10.4081/idr.2017.6839. PubMed PMID: 28458798; PubMed Central PMCID: PMC5391540.
62. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2013;57 Suppl 3:S139-70. doi: 10.1093/cid/cit578. PubMed PMID: 24200831; PubMed Central PMCID: PMC3820169.
63. CDC. Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2019. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, CDC; 2019. [Internet] [cited 2020 Mar 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/threats-report/2019-ar-threats-report-508.pdf>.
64. Tabah A, Koulenti D, Laupland K, Misset B, Valles J, Bruzzi de Carvalho F, et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROACT International Cohort Study. *Intensive Care Med* 2012;38(12):1930–45. doi: 10.1007/s00134-012-2695-9. PubMed PMID: 23011531.
65. Karam G, Chastre J, Wilcox MH, Vincent J-L. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Crit Care* 2016;20(1):136. doi: 10.1186/s13054-016-1320-7. PubMed PMID: 27329228; PubMed Central PMCID: PMC4916531.
66. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*

- 2006;34(6):1589–96. doi: 10.1097/01.ccm.0000217961.75225.e9. PubMed PMID: 16625125.
67. Kuppelwieser B. hmm-newsletter 15 (Juli 2018): NEUES BLUTKULTUR-SYSTEM BD BACTEC FX [Internet]; 2018 [cited 2020 Jun 25]. Available from: https://www.i-med.ac.at/hygiene/dokumente/Newsletter-15_2018.pdf.
68. Idelevich EA, Reischl U, Becker K. New Microbiological Techniques in the Diagnosis of Bloodstream Infections. *Dtsch Arztebl Int* 2018;115(49):822–32. doi: 10.3238/arztebl.2018.0822. PubMed PMID: 30678752; PubMed Central PMCID: PMC6369238.
69. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(10):1001–6. doi: 10.1111/1469-0691.12640. PubMed PMID: 24698361.
70. Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PLOS ONE* 2011;6(8):e23285. doi: 10.1371/journal.pone.0023285. PubMed PMID: 21858058; PubMed Central PMCID: PMC3156714.
71. Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, et al. Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 2012;50(10):3324–8. doi: 10.1128/JCM.01479-12. PubMed PMID: 22875888; PubMed Central PMCID: PMC3457416.
72. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Acceleration of antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures by inoculation of Vitek 2 cards with briefly incubated solid medium cultures. *J Clin Microbiol* 2014;52(11):4058–62. doi: 10.1128/JCM.02400-14. PubMed PMID: 25165084; PubMed Central PMCID: PMC4313230.

73. Idelevich EA, Sparbier K, Kostrzewa M, Becker K. Rapid detection of antibiotic resistance by MALDI-TOF mass spectrometry using a novel direct-on-target microdroplet growth assay. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(7):738–43. doi: 10.1016/j.cmi.2017.10.016. PubMed PMID: 29079147.
74. Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018;24(9):944–55. doi: 10.1016/j.cmi.2018.05.007. PubMed PMID: 29787889.
75. Banerjee R, Teng CB, Cunningham SA, Ihde SM, Steckelberg JM, Moriarty JP, et al. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clin Infect Dis* 2015;61(7):1071–80. doi: 10.1093/cid/civ447. PubMed PMID: 26197846; PubMed Central PMCID: PMC4560903.
76. Ledebner NA, Lopansri BK, Dhiman N, Cavagnolo R, Carroll KC, Granato P, et al. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol* 2015;53(8):2460–72. doi: 10.1128/JCM.00581-15. PubMed PMID: 25994165; PubMed Central PMCID: PMC4508435.
77. Altun O, Almuhayawi M, Ullberg M, Ozenci V. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 2013;51(12):4130–6. doi: 10.1128/JCM.01835-13. PubMed PMID: 24088863; PubMed Central PMCID: PMC3838040.
78. Fille M, Ziesing S. Antibakterielle Wirkung. In: Suerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8th ed. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2016. p. 709–11.
79. bioMérieux Austria. ETEST® [Internet] [cited 2020 Jun 8]. Available from: <https://www.biomerieux.at/klinische-diagnostik/etestr>.

80. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method [Internet]; Version 8.0, 2020 [cited 2020 Apr 19]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Manual_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf.
81. Matuschek E, Brown DFJ, Kahlmeter G. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect* 2014;20(4):O255-66. doi: 10.1111/1469-0691.12373. PubMed PMID: 24131428.
82. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Media preparation for EUCAST disk diffusion testing and for determination of MIC values by the broth microdilution method [Internet]; Version 6.0, 2020 [cited 2020 Apr 19]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Media_preparation_v_6.0_EUCAST_AST.pdf.
83. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]; Version 10.0, 2020 [cited 2020 Apr 19]. Available from: <http://www.eucast.org>.
84. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST disk diffusion method for antimicrobial susceptibility testing [Internet]; Version 8.0, 2020 [cited 2020 Apr 20]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2020_manuals/Slide_show_v_8.0_EUCAST_Disk_Test_2020.pdf.
85. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother* 2020;75(4):968–78. doi: 10.1093/jac/dkz548. PubMed PMID: 32016342; PubMed Central PMCID: PMC7069491.
86. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Rapid AST directly from blood culture bottles [Internet] [cited 2019 Apr 20]. Available from: <https://www.eucast.org>.

87. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. [Internet]; Version 1.1, 2019 [cited 2019 Apr 20]. Available from:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf.
88. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST RAST Frequently Asked Questions [Internet]; 2019 [cited 2020 Aug 26]. Available from:
https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/RAST_FAQ_20191015.pdf.