

Diplomarbeit

Ermittlung von Breakpoints für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam für *Klebsiella pneumoniae* im Rahmen der beschleunigten Sensibilitätstestung von Bakterien aus positiven Blutkulturen nach EUCAST

eingereicht von

Tanja Zechner-Sammer

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

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

unter der Anleitung von

**Assoz. Prof. Priv. Doz. Dr. Ines Zollner-Schwetz
Univ. FÄ Dr. Elisabeth König**

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 26.03.2021

Tanja Zechner-Sammer eh.

Danksagung

Ein großes Dankeschön gilt vor allem meiner Betreuerin Assoz. Prof. Priv. Doz. Dr. Ines Zollner-Schwetz, die mich die gesamte Arbeit über mit ihrem unermüdlichen Engagement, ihrer fachlichen Kompetenz und sorgsamem Ratschlägen begleitet hat. Es wurde jeder Frage, Unklarheit und Unsicherheit Beachtung geschenkt, sodass ich mich rundum unterstützt fühlte.

Ein besonderer Dank gebührt auch Univ. FÄ Dr. Elisabeth König für ihre unverzüglichen Rückmeldungen bei Fragen sowie ihre kompetente und fachmännische Unterstützung bei der Erstellung der Präsentation.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei Christina Strepfl MSc. und Annika Hauer BSc. für die gute und bemühte Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung	ii
Abbildungsverzeichnis	iv
Zusammenfassung	v
Abstract.....	vii
1 Einleitung	1
1.1 Bakteriämie.....	1
1.1.1 Begriffsbestimmung	1
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Behandlung/Sepsisbündel.....	4
1.1.4 Epidemiologie von Bakteriämie	5
1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	7
1.2.1 Mikrobiologie	7
1.2.2 Vorkommen	8
1.2.3 Infektionen.....	8
1.3 Resistenz.....	9
1.3.1 Grundlagen	9
1.3.2 Resistenzmechanismen	11
1.3.3 Resistenzlage <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
1.4 Mikrobiologische Diagnostik	16
1.4.1 Blutkultur.....	16
1.4.2 Empfindlichkeitstestung	18
1.4.3 RAST	22
1.5 Ziele	25
2 Material und Methoden	25
2.1 Material.....	30
3 Ergebnisse – Resultate.....	30
3.1 Ergebnisse für Amoxicillin/Clavulansäure.....	32
3.1.1 Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit	32
3.1.2 Ergebnisse nach 6 Stunden Inkubationszeit	34
3.2 Ergebnisse für Ampicillin/Sulbactam.....	35
3.2.1 Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit	35
3.2.2 Ergebnisse nach 6 Stunden Inkubationszeit	36
4 Diskussion	38
Literaturverzeichnis	42

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aus Blutkulturen isolierte Erreger geordnet nach ihren Häufigkeiten, Mikrobiologisches Labor, Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz 2019 (27).....	6
Abbildung 2: Einteilung der Betalaktamasen nach ihrer Struktur (Ambler) und Funktion (Bush) modifiziert nach: Witte et al. (38).....	12
Abbildung 3: Cephalosporinresistenz von invasiven Klebsiella pneumoniae Isolaten in Europa 2018 (45).....	14
Abbildung 4: Fluorchinolonresistenz von invasiven Klebsiella pneumoniae Isolaten in Europa 2018 (45).....	15
Abbildung 5: Scheibendiffusionstest und Etest® vor (links) und nach Inkubation von 24 h (rechts).....	20
Abbildung 6: Antibiotikaplättchen und Etest® auf ausgestrichener MH-Agarplatte jeweils für Amoxicillin/Clavulansäure (rechts) und Ampicillin/Sulbactam (links).....	27
Abbildung 7: Hemmhofdurchmesser nach 6 h (links) und nach 4 h (rechts) Inkubationszeit.....	28
Abbildung 8: Vorgehensweise im Rahmen der Grenzwertbestimmung: Am Außenkreis wird die RAST Methode, am Innenkreis die konventionelle Empfindlichkeitstestung (AST) dargestellt.....	29
Abbildung 9: Ergebnisse für Klebsiella pneumoniae nach einer Inkubationszeit von 4 h für Amoxicillin/Clavulansäure.....	33
Abbildung 10: Ergebnisse für Klebsiella pneumoniae nach einer Inkubationszeit von 6 h für Amoxicillin/Clavulansäure.....	34
Abbildung 11: Ergebnisse für Klebsiella pneumoniae nach einer Inkubationszeit von 4 h für Ampicillin/Sulbactam.....	35
Abbildung 12: Ergebnisse für Klebsiella pneumoniae nach einer Inkubationszeit von 6 h für Ampicillin/Sulbactam.....	36
Abbildung 13: Neu ermittelte Breakpoints für Klebsiella pneumoniae jeweils für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam nach 4 h und nach 6 h Inkubationszeit zusammengefasst.....	37

Zusammenfassung

Hintergrund: Trotz der Entwicklung neuer technischer Methoden für den Nachweis und die Identifizierung von Erregern aus positiven Blutkulturflaschen ist das konventionelle Kulturverfahren für die Erstellung eines Antibiogrammes nach wie vor obligat. Dessen Ergebnis bildet einen unverzichtbaren Eckpfeiler für Therapieentscheidungen und Behandlungsmöglichkeiten. Zudem spielt der zeitliche Faktor vor allem bei Verdacht auf Sepsis und/oder septischen Schock eine große Rolle, der auch durch das vermehrte Auftreten von nosokomialen Infektionen und die Verbreitung von Resistenzen zunehmend an Bedeutung gewinnt. Dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ist es mit der Entwicklung von Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST) nun gelungen, das Zeitfenster zugunsten eines schnellstmöglichen Ergebnisses zu optimieren. Dabei erfolgt der Empfindlichkeitsnachweis direkt aus positiven Blutkulturen innerhalb einer Inkubationszeit von 4, 6 und 8 Stunden.

Ziel: Die RAST Methode ist derzeit nur für eine begrenzte Anzahl von Keimen und antiinfektiven Substanzen verfügbar. Das Ziel dieser Studie ist daher, die Festlegung neuer Breakpoints für *Klebsiella pneumoniae*, einen vielfach mit nosokomialen Infektionen assoziierten Keim, für zwei häufig eingesetzte antimikrobielle Substanzen in Österreich. Dabei handelt es sich um Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam.

Methodik: Die Studie wurde mit insgesamt 81 *Klebsiella pneumoniae* Stämmen, die das Diagnostik- und Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin sowie die Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin, Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz, zur Verfügung stellten, durchgeführt. Die Basis für die Grenzwertermittlung im Rahmen der RAST Methode bildeten Blutkulturflaschen mit 5 ml Blut, welches aus einer abgelaufenen Blutkonserve stammte. Die Blutkulturen wurden mit dem Keim gespiked und in ein automatisiertes Blutkulturgerät gegeben. Sobald die Blutkulturen ein positives Signal zeigten, wurde Blut auf die Agarplatten ausgestrichen, die entsprechenden Antibiotikaplättchen appliziert und anschließend inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 4 sowie 6 Stunden wurden die Hemmhofdurchmesser von der Vorderseite der Agarplatten abgelesen. Daneben wurden der Routinescheibendiffusionstest sowie Etest® durchgeführt und nach 24 Stunden abgelesen. Die Ergebnisse von RAST wurden zur minimalen Hemmkonzentration (MHK) in Beziehung gesetzt und Grenzwerte

für die Kategorien „empfindlich“ und „resistent“ festgelegt. Die Studie erfolgte von Ende August 2020 bis Mitte Oktober 2020 im mikrobiologischen Labor des Universitätsklinikums für Innere Medizin Graz.

Ergebnisse: Aufgrund eines Doppelansatzes der 81 *Klebsiella pneumoniae* Stämme war es möglich, 162 Testergebnisse für die Ermittlung der neuen Grenzwerte zu erzielen. RAST Grenzwerte wurden für *Klebsiella pneumoniae* und Amoxicillin/Clavulansäure festgelegt: $S \geq 16$ mm, ATU 13-15 mm, $R < 13$ mm nach 4 h und $S \geq 16$ mm, ATU 14-15 mm, $R < 14$ mm nach 6 h. Für Ampicillin/Sulbactam gelten: $S \geq 12$ mm, ATU 10-11 mm, $R < 10$ mm nach 4 h und $S \geq 13$ mm, ATU 12 mm und $R < 12$ mm nach 6 h.

Fazit: Es konnten neue Grenzwerte für *Klebsiella pneumoniae* bei Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam für RAST für das Ablesen nach 4 Stunden und 6 Stunden festgelegt werden.

Abstract

Background: Despite the development of new technical methods for the detection and identification of pathogens from positive blood culture bottles, the conventional culture procedure is still mandatory for susceptibility testing. The result is an indispensable cornerstone for therapy decisions and treatment options. In addition, the time factor plays a major role, especially in cases of suspected sepsis and/or septic shock, which is also becoming more important due to the increased incidence of nosocomial infections and the spread of bacterial resistances. With the development of Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST), the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) has now succeeded in optimizing the time to susceptibility results. In this process, susceptibility testing is performed directly from positive blood cultures after an incubation period of 4, 6 and 8 hours.

Object: The RAST method is currently only available for a limited number of germs and anti-infective substances. Therefore, the aim of this study is to establish new breakpoints for *Klebsiella pneumoniae*, a pathogen frequently associated with nosocomial infections, for two commonly used antimicrobial substances in Austria. These are amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam.

Methods: The study was performed with a total of 81 *Klebsiella pneumoniae* strains provided by the Diagnostic and Research Institute of Hygiene, Microbiology and Environmental Medicine and the Section of Infectiology and Tropical Medicine, Department of Internal Medicine, both Medical University Graz. Blood culture bottles with 5 ml of human blood, which came from an expired blood unit, formed the basis for the breakpoint determination within the RAST method. The blood cultures were spiked with the *Klebsiella pneumoniae* and placed in an automated blood culture device. As soon as the blood cultures showed a positive signal, blood was plated out on agar plates and the antibiotic discs for amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam were applied. The plates were incubated, as intended for RAST. After an incubation period of four as well as six hours, the inhibition zone diameters were read. In addition, the routine disc diffusion test and Etest® were performed to evaluate the results of RAST using minimum inhibitory concentration (MIC). Breakpoints were set for the categories “susceptible” and “resistant”. The study was performed from the end of August 2020 to mid-October 2020 in the microbiology laboratory of the University Hospital for Internal Medicine Graz.

Results: Due to a duplicate approach of the 81 *Klebsiella pneumoniae* strains, it was possible to obtain 162 test results for the determination of the new breakpoints. RAST breakpoints were set for *Klebsiella pneumoniae* and amoxicillin/clavulanic acid: S \geq 16 mm, ATU 13-15 mm, R < 13 mm after 4 h and S \geq 16 mm, ATU 14-15 mm, R < 14 mm after 6 h. For ampicillin/sulbactam the following breakpoints apply: S \geq 12 mm, ATU 10-11 mm, R < 10 mm after 4 h and S \geq 13 mm, ATU 12 mm and R < 12 mm after 6 h.

Conclusion: Novel breakpoints for amoxicillin/clavulanic acid and ampicillin/sulbactam for RAST directly from positive blood cultures for reading after 4 and 6 hours of incubation have been proposed.

1 Einleitung

1.1 Bakteriämie

1.1.1 Begriffsbestimmung

Im engeren Sinn bezeichnet eine Bakteriämie rein das zeitweise Vorhandensein von Bakterien in der Blutbahn. (1) Dieser Zustand muss nicht zwingend zu einer Infektionskrankheit führen und kann sich durchaus als selbstlimitierend und ohne klinische Konsequenz präsentieren. (2) Voraussetzung für eine Bakteriämie, die endogenen Ursprungs ist, ist die Schädigung oder Störung einer natürlichen Körperbarriere, die je nach Region physiologisch mit unterschiedlichen Bakterien kolonisiert ist. (1) Dieser Integritätsverlust wird entweder durch Mikrotraumen, beabsichtigte ärztliche Eingriffe, das Pathogen selbst oder eine beeinträchtigte immunologische Abwehrfunktion von Haut und Schleimhäuten verursacht. (3,4) Durch die genannten Unterbrechungen der Barrieren können sich die Bakterien einen Weg in den Blutstrom bahnen und wegen des Verlusts ihrer natürlichen Umgebungsbedingungen, auf die sie angepasst sind, pathogen wirken. (3,5) Im Vergleich zur endogen ausgelösten Bakteriämie, die aus der körpereigenen Flora hervorgeht, erfolgt bei einer exogen ausgelösten Bakteriämie die Erregerübertragung direkt aus der Umgebung. Dies geschieht entweder im Rahmen von Traumata oder ebenso durch therapeutische sowie chirurgische Interventionen. (1,3) Die zuletzt genannte Übertragungsform beschreibt exogen nosokomiale Infektionen, die theoretisch vollständig durch korrekte Präventions- und Hygienemaßnahmen vermeidbar sind. (1,6) Im Gegensatz dazu bildet bei einer endogenen nosokomialen Infektion eine Besiedlung mit dem entsprechenden Keim die entscheidende Grundlage, um schließlich zum Beispiel mittels Blasen- oder Venenkatheter in die Blutbahn zu gelangen. (1)

Auf Basis des Entstehungsortes wird zwischen primärer, sekundärer und Bakteriämie unbekanntes Ursprungs unterschieden. (2) Die primäre Bakteriämie meint, der klassischen Definition entsprechend, das Vorkommen von Bakterien in der Blutbahn. (7) Sie liegt korrekterweise gesprochen nur dann vor, wenn sich ein Keim mittels Blutkultur nachweisen lässt, der nicht von einem anderem Infektionsort stammt. (7) Dabei kann es sich entweder um einen pathogenen Erreger oder um einen Keim der physiologischen Hautflora handeln. (8) Bei der sekundären Bakteriämie entstammen die Bakterien aus einer extravaskulären Quelle, oder anders ausgedrückt, aus einem infizierten Fokus, der andernorts lokalisiert ist. Bei der Bakteriämie unbekanntes Ursprungs kann die Quelle hingegen nicht ausfindig

gemacht werden. (1,2) Dabei stellen oftmals Infektionen der Atem- oder Harnwege, Wundinfektionen oder Peritonitis den Ausgangspunkt der sekundären Bakteriämie dar. (6) Eine weitere Einteilung, die sich auf den Zeitpunkt bezieht, ergibt sich durch die Bezeichnungen transiente, intermittierende und kontinuierliche Bakteriämie. Eine transiente Bakteriämie dauert in der Regel Minuten bis einige Stunden. Damit sie auftreten kann, muss eine Körperregion, die mit den entsprechenden Bakterien physiologisch kolonisiert ist, manipuliert werden. Dadurch wird den Bakterien ein Anschluss an die Blutbahn ermöglicht. (7) Als Beispiele können das Zähneputzen, gastrointestinale Biopsien, perkutane Eingriffe oder chirurgische Debridements angeführt werden. (1,7) Die sich in der Blutbahn befindlichen Bakterien werden jedoch durch das Retikulohistiozytäre System (RHS) umgehend beseitigt. (9) Für eine intermittierende Bakteriämie kann ein primärer Infektionsort, welcher Bakterien periodisch in die Blutbahn abgibt, verantwortlich sein. Dabei handelt es sich beispielsweise um eine schwere Pneumonie oder nicht drainierte intraabdominelle Abszesse. (9) Von einer kontinuierlichen Bakteriämie spricht man, wenn Bakterien aus einer intravaskulären Quelle kommend, in der Blutbahn ständig vorhanden sind. Dies wäre beispielsweise bei der infektiösen Endokarditis, Infektionen von Gefäßprothesen oder Gefäßkatheter der Fall. (7,9)

Es ist von Bedeutung, zwischen einer ambulant und einer nosokomial erworbenen Bakteriämie zu differenzieren. Beide unterscheiden sich nämlich hinsichtlich Prognose, Letalitätssrate und Erregerspektrum, wobei die nosokomiale Bakteriämie mit einer höheren Letalitätssrate und folglich einer schlechteren Prognose einhergeht. (10) Zu den häufigsten ambulant erworbenen Erregern in Europa und Nordamerika zählen *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus* und Pneumokokken. (8) Bei nosokomial bedingten Bakteriämien müssen auch multiresistente Erreger wie *Methicillin-resistenter Staphylokokkus aureus* (MRSA), *Methicillin-resistenter Staphylokokkus epidermidis* (MRSE), Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) und extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) bildende Enterobakterien sowie *Pseudomonas aeruginosa* als gängige Erreger in Betracht gezogen werden. (1,10)

Von einer Sepsis spricht man, wenn eine systemische Entzündungsreaktion mit physiologischen, pathologischen und biochemischen Abweichungen besteht, deren Auslöser verschiedenste Infektionserreger und unterschiedliche Infektionsherde sein können. (1,11) Ausgehend von der Sepsis 1 Definition liegt eine Sepsis dann vor, wenn zwei oder mehr Kriterien des systemic inflammatory response syndrome (SIRS) erfüllt werden. (12) Das SIRS beinhaltet eine Tachykardie ($\geq 90/\text{min}$), Tachypnoe ($\geq 20/\text{min}$), Fieber oder

Hypothermie ($\geq 38\text{ °C}$ oder $\leq 36\text{ °C}$) und eine Leukozytose ($\geq 12.000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie (Leukozyten $\leq 4.000/\mu\text{l}$) und/oder eine Linksverschiebung mit $> 10\%$ unreifer Granulozyten, was ebenso der Sepsis 2 Definition entspricht. (13,14) Von dieser Definition wurde jedoch Abstand genommen, da eine Sepsis nicht immer mit Symptomen, die einer SIRS entsprechen, einhergehen muss. (15) Außerdem können die klinischen Kriterien des SIRS ebenso im Rahmen nichtinfektiöser Gegebenheiten wie Verbrennungen, Autoimmunerkrankungen, akuten Pankreatitiden, Lungenembolien, Infarkten oder Operationen bei Polytraumapatientinnen/Polytraumapatienten auftreten. (1,11) Die aktuelle Definition der Sepsis-3-Taskforce bezeichnet Sepsis daher als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, welche aufgrund einer fehlregulierten immunologischen Wirtsreaktion auf eine Infektion entsteht. Der septische Schock kann infolge einer Sepsis auftreten und umfasst laut Definition eine Zirkulationsstörung mit zellulärer/metabolischer Dysregulation, die von einer persistierenden Hypotonie begleitet wird. Er ist im Vergleich zur Sepsis mit einem höherem Mortalitätsrisiko verbunden. (11) Als wesentlicher Unterschied der Sepsis und des septischen Schocks zur Bakteriämie gilt eindeutig das Vorliegen eines Organversagens, welches bei einer Bakteriämie nicht zwangsläufig vorkommt. (16) Eine Organdysfunktion sowie eine fehlregulierte Immunantwort sind für die Definition der Sepsis ausreichend. (17) Daher ist auch der Erregernachweis bei einem Infektionsverdacht beziehungsweise ein positiver mikrobiologischer Befund nicht erforderlich, um klinisch von einer Sepsis ausgehen zu können. (8,17)

1.1.2 Pathogenese

Bei einer Bakteriämie löst der in der Blutbahn vorhandene Mikroorganismus eine Immunantwort aus, mit dem Ziel einer Erregereradikation. (15) Dabei setzt als erstes die unspezifische Immunantwort mit Komplementaktivierung, Mobilisierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten sowie der Zytokinfreisetzung ein. (1) Mittels einer Vielzahl von unterschiedlichen pattern-recognition receptors (PRRs) werden pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) wie die Lipid-A-Komponente des Lipopolysaccharids gram-negativer Bakterien erkannt und anschließend im Rahmen der Inflammation eliminiert. (15,18) Bei einer Sepsis kommt es jedoch zu einer übermäßigen und später zu einer unzureichenden immunologischen Reaktion. Normalerweise wird die Immunantwort durch anti-inflammatorische Mediatoren unter Kontrolle gehalten, um eine destruktive, systemische Entzündungsreaktion zu unterbinden. Im Fall einer Sepsis oder eines septischen Schocks versagt diese Regulation und die Immunantwort kann nicht mehr ins Gleichgewicht gebracht werden. (2,15) Die überschießende Reaktion, welche aber nicht zur

Erregereradikation führt, kann anhand freigesetzter proinflammatorischer Zytokine und vasoaktiver Substanzen gemessen werden. Die wichtigsten laborchemisch messbaren Parameter sind dabei Interleukin (IL) 6, IL-8, IL-1beta, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), Procalcitonin und C-reaktives Protein (CRP). (19) Außerdem beeinflusst die Immunreaktion zum einen die Hämodynamik und zum anderen die Gerinnung, die über prokoagulatorische Komponenten und Perfusionsstörungen zur Organdysfunktion führen kann. (3)

1.1.3 Behandlung/Sepsisbündel

Die Frage, ob sich eine Sepsis manifestiert, beziehungsweise deren Schweregrad wird von dem ursächlichen Erreger, der Infektionsquelle, dem Ausmaß der Organdysfunktion, Medikamenten, Komorbiditäten sowie einer verzögerten Therapieeinleitung grundlegend bestimmt. (15) Für ein einwandfreies Management bei einer Sepsis und einem septischen Schock sorgen die international geltenden Richtlinien der Surviving Sepsis Campaign sowie das auf eine Stunde komprimierte Sepsisbündel. (20,21)

Das Bündel setzt sich aus Flüssigkeitssubstitution, Laktatwertmessung, Blutkulturabnahme und der Einleitung einer kalkulierten Antibiotikatherapie zusammen. (20) Basierend auf den Leitlinien steht als erster Schritt die hämodynamische Stabilisierung mit kristalloiden Lösungen von mindestens 30 ml/kg innerhalb der ersten drei Stunden im Vordergrund, um der sepsisinduzierten Gewebhypoperfusion oder dem Schockgeschehen entgegenzuwirken. (16) Patientinnen/Patienten mit einem septischen Schock, bei welchen die Hypotonie durch Volumensubstitution nicht ausgeglichen werden kann, werden mit einem Vasopressor, in der Regel Noradrenalin, behandelt, damit ein geeigneter Perfusionsdruck in den lebenswichtigen Organen herrscht. (16,20) Der angestrebte Zielwert des mittleren arteriellen Drucks (MAP) beträgt ≥ 65 mmHg. (20) Weiters wird die hämodynamische Stabilisierung anhand der Normalisierung der Laktatwerte bemessen. Dieser spiegelt zwar nicht direkt die Gewebepfusion wider, doch eine Erhöhung kann trotzdem auf eine mögliche Gewebhypoxie hinweisen. Wiederholte Messungen sind daher indiziert, vor allem wenn der initiale Wert > 2 mg/l betrug. (16,20) Vor der Einleitung der antiinfektiven Therapie erfolgt eine Blutkulturabnahme, jeweils bestehend aus einer aeroben und anaeroben Blutkulturflasche, sowie die Probenentnahme von weiteren potenziellen Infektionsherden. Laut Empfehlung sollten zumindest zwei oder mehr Blutkulturpaare abgenommen werden. Für die empirische Therapie werden Breitbandantibiotika, häufig auch in kombinierten Konstellationen, gewählt, um die größtmögliche Treffsicherheit gewährleisten zu können. (16) Die Auswahl richtet sich nach einer Vielzahl von Faktoren.

Dazu zählen beispielsweise die Art der Symptome, Komorbiditäten, Immunstatus und Umweltexpositionen der Patientin/des Patienten sowie die Kenntnis der lokalen Resistenzlage. (2,16) Hinsichtlich der Dosierung muss die Initialdosis so gewählt werden, dass ausreichende Medikamentenkonzentrationen mit Sicherheit und so früh wie möglich erreicht werden. In schwerwiegenden Fällen wird daher eine Aufsättigungsdosis (loading dose) verabreicht. (16)

Die Therapiedauer wird mit sieben bis zehn Tagen angegeben. Ausnahmen bilden eine *Staphylokokkus aureus* Bakteriämie inklusive MRSA, ein verzögertes Therapieansprechen, persistierende Infektionsherde, gewisse mykotische- und virale Infektionen, eine invasive Candidiasis, Endokarditis, Osteomyelitis und Patientinnen/Patienten mit Immundefizienz einschließlich einer Neutropenie. (16,22) Weitere unverzichtbare Maßnahmen sind neben einer sorgsam ausgewählten Therapie, die Suche und Sanierung der Infektionsquelle sowie Komorbiditäten, wie beispielsweise Diabetes mellitus, bestmöglich zu behandeln. (2,22)

1.1.4 Epidemiologie von Bakteriämie

Die Inzidenz für eine Bakteriämie wird mit 100 bis 200 Fälle im Jahr pro 100.000 Einwohnerinnen/Einwohner angegeben und ist bei Neugeborenen und älteren Menschen am höchsten. (8) Am häufigsten werden bei der Bakteriämie weltweit *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokkus pneumoniae* isoliert. (8,23) Die jeweilige Inzidenz wird anhand populationsbasierter Studien für eine *Escherichia coli* Bakteriämie auf ca. 35/100.000 für eine *Staphylokokkus aureus* Bakteriämie auf ca. 25/100.000 und für eine *Streptokokkus pneumoniae* Bakteriämie auf ca. 10/100.000 Einwohnerinnen/Einwohner geschätzt. (23) In Österreich wurde 2018 für *Escherichia coli*, *Staphylokokkus aureus* und *Streptokokkus pneumoniae* jeweils eine Inzidenz von 64,3; 37,5 und 6,4 pro 100.000 Einwohnerinnen/Einwohner angegeben. (24) Eine genaue beziehungsweise allgemeine Inzidenzrate von Bakteriämien ist jedoch schwierig zu ermitteln, denn je nach Region variiert diese abhängig von demografischen Gegebenheiten, Risikoverteilungen und der Anzahl abgenommener Blutkulturen. (23,25) Außerdem stützen sich die Angaben oftmals nur auf Studien, die vorwiegend in Europa und Nordamerika durchgeführt wurden. Daten aus Niedriglohnländern fehlen. (15,23)

Die gängigsten Pathogene, die eine Bakteriämie verursachen, sind gram-negative und gram-positive Bakterien. (15,16) Einer Studie von Hoenigel et al. zufolge, die sich auf eine Auswertung von 672 positiven Blutkulturen bezieht, konnten *Escherichia coli* mit 39,4 % gefolgt von *Staphylokokkus aureus* sowie *Streptokokkus* spp. mit 13,7 % als häufigste ursächliche Keime einer ambulant erworbenen Bakteriämie identifiziert werden.

Für nosokomial ausgelöste Bakteriämien sind koagulase-negative Staphylokokken (CoNS) mit 18,7 %, *Escherichia coli* mit 16,5 %, und *Staphylokokkus aureus* mit 13,4 % als die gängigsten Erreger zu betrachten. (26) In Österreich wurde 2018 ebenfalls *Escherichia coli*, welcher aus 5.686 Blutkulturen und Liquorproben isoliert wurde, als häufigster Erreger gemeldet, gefolgt von *Staphylokokkus aureus* und *Klebsiella pneumoniae*. (24) Die Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz reiht koagulase-negative Staphylokokken auf den ersten, *Escherichia coli* auf den zweiten und *Staphylokokkus aureus* auf den dritten Platz als dominierende Erreger einer Bakteriämie (Abbildung 1). (27)

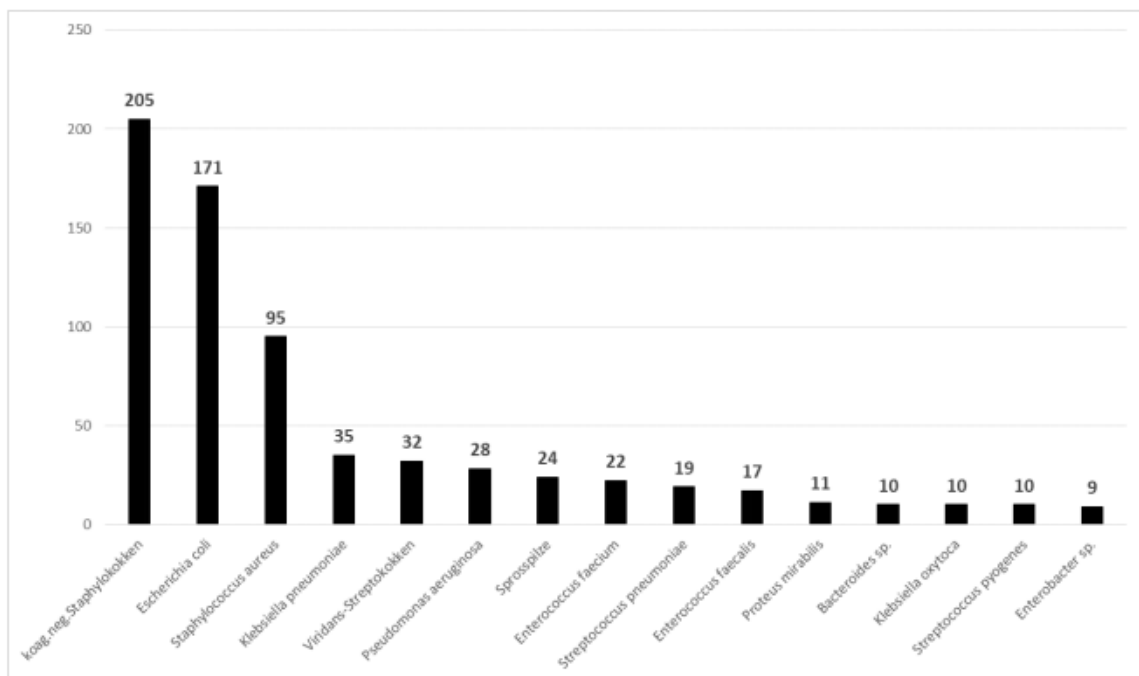


Abbildung 1: Aus Blutkulturen isolierte Erreger geordnet nach ihren Häufigkeiten, Mikrobiologisches Labor, Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz 2019 (27)

Ähnliche Daten zu den Erregerhäufigkeiten kommen aus den USA, die ebenfalls koagulase-negative Staphylokokken gefolgt von *Staphylokokkus aureus* als vorherrschende Pathogene einer Bakteriämie angeben. (2) Die führende Position von koagulase-negativen Staphylokokken kann dabei einerseits durch eine Kontamination, andererseits aber auch durch Infektionen von Zentralvenenkatheter, Gelenksprothesen, Herzklappen oder Herzschrittmacher bedingt sein. (27,28)

Klebsiella pneumoniae

1.2.1 Mikrobiologie

Klebsiella pneumoniae zählt zur Gruppe der gram-negativen Bakterien und ist nach dem deutschen Mikrobiologen Edwin Klebs benannt. (29) Es handelt sich genau gesagt um ein sporenloses, unbewegliches, bekapseltes, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. (5) Durch die dicke Kapsel, bestehend aus Polysacchariden, hat *Klebsiella* eine antiphagozytäre Wirkung. (30) Außerdem wird durch die Kapsel die charakteristische Morphologie bedingt. Als typisch morphologisch wird für den Keim ein schleimiges und mit zunehmender Inkubation zusammenfließendes, großes Koloniewachstum gesehen. (5) Hinsichtlich der Klassifikation gehört die *Klebsiella* der Ordnung der Enterobacterales an, die wiederum in Familien, bestehend aus verschiedenen Gattungen, unterteilt wird.

Es lassen sich folgende Familien mit ihren Gattungen festlegen: (31)

- Enterobacteriaceae: *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Shigella*
- Erwiniaceae: *Erwinia*, *Pantoea*
- Yersiniaceae: *Yersinia*, *Serratia*
- Hafniaceae
- Morganellaceae: *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*

Die Gattung *Klebsiella* enthält weitere Spezies, wovon *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella granulomatis* die wichtigsten auf medizinischem Gebiet darstellen. (18) *Klebsiella pneumoniae* ist, wie *Escherichia coli*, in der Lage, Laktose zu fermentieren, was als wichtige Eigenschaft für die Abgrenzung zu laktosenegativen Enterobakterien wie Salmonellen, Yersinien oder Shigellen gilt. (4) Die grobe Unterscheidung von laktosepositiven und laktosenegativen gram-negativen Enterobakterien gelingt mittels verschiedenster Kulturmedien, wie zum Beispiel MacConkey-Agar. Beim Vorliegen von Laktose fermentierenden Enterobakterien zeigen die Kolonien eine Färbung, während sie bei nicht fermentierenden farblos bleiben. (29) Eine weitere Differenzierung der Enterobakterien erlaubt die „bunte Reihe“, die sich aus Reagenzröhrchen und Kligler-Agar, bestehend aus Laktose, Glukose, Phenolrot und Säureindikatoren als Nährmedium zusammensetzt. Durch den Nachweis unterschiedlicher Stoffwechselreaktionen, die mit charakteristischen Farbänderungen einhergehen, ist eine Unterscheidung auf Speziesebene möglich. (4) Solch biochemische Nachweismethoden, die sich Stoffwechseleigenschaften, die innerhalb von Gattungen und/oder Spezies variieren, zu Nutze machen, sind in den Hintergrund geraten. (32) Heutzutage wird für die Keimidentifizierung aufgrund der

Schnelligkeit und hohen Spezifität die Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight - Mass Spectrometry (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) angewandt. (33)

1.2.2 Vorkommen

Das Vorkommen von *Klebsiella pneumoniae* ist universell. Man findet sie in der Erde, auf Pflanzen, im Wasser oder auf Schleimhautoberflächen von Säugetieren. Bei 30 % der Bevölkerung ist sie physiologisch im Darmtrakt angesiedelt, bei 1-5 % der Bevölkerung kolonisiert sie den Oropharynx. (18,30)

Die Übertragung erfolgt von Mensch zu Mensch, wobei auch erregertragendes Krankenhauspersonal als Konduktor eine große Rolle spielt. (24,30) Dies zeigt sich ebenfalls in der Häufigkeit der von *Klebsiella pneumoniae* verursachten nosokomialen Infektionen, wodurch sie auf den dritten Platz gereiht wird. (31) Auch eine Infektion über rohe pflanzliche Lebensmittel ist möglich. (30)

1.2.3 Infektionen

Enterobakterien stellen zusammen mit Staphylokokken und Streptokokken eine Hauptursache für gängige bakterielle Infektionen dar. (5) Dabei erlangen *Klebsiella* spp. durch die Auslösung von opportunistischen bei immuninkompetenten sowie nosokomialen Infektionen ihre humanpathogene Bedeutung. (5,24) Bei bakteriellen Erregern, die eine nosokomiale Infektion verursachen, ist *Klebsiella* spp. unter den zehn häufigsten anzutreffen. (5) Dabei ist *Klebsiella pneumoniae* vor allem für die Auslösung von Pneumonien, Atemwegsinfektionen, Harnwegsinfektionen, abdominellen Infektionen, postoperativen Wundinfektionen, Weichteilinfektionen und sekundären Bakteriämien verantwortlich. (18) Den höchsten Stellenwert nimmt *Klebsiella pneumoniae* als ursächlicher Keim von Pneumonien ein und ist unter anderem in der Lage, schwere hämorrhagisch nekrotisierende oder abszedierende Konsolidierungen der Lunge hervorzurufen. (5) *Klebsiella pneumoniae* verursacht nur zu einem geringen Teil ambulant erworbene Pneumonien, auch community-acquired pneumonia (CAP) genannt, und ist vielmehr als nosokomialer Infektionserreger in Pflegeheimen und Krankenhäusern als Auslöser einer hospital-acquired pneumonia (HAP) bekannt. Zudem stellt die mögliche oropharyngeale Besiedlung mit dem Keim einen bedeutenden Risikofaktor für eine beatmungsassoziierte Pneumonie, ventilator-associated pneumonia (VAP) dar. (18) Trotzdem ist es sinnvoll, auch bei einer CAP unter gewissen Umständen an seltenere Erreger wie *Klebsiella pneumoniae* zu denken. Insbesondere können Risikofaktoren wie Alkoholabusus, Demenz, Hirninfarkt und Vigilanzminderung zu einer durch *Klebsiella*

pneumoniae verursachten CAP führen. Bezüglich der Komorbiditäten prädisponieren eine chronische Herzinsuffizienz, Erkrankungen des Zentralnervensystems, Bettlägerigkeit oder eine perkutane endoskopische Gastrostomie-Sonde für eine durch Enterobakterien ausgelöste Pneumonie. (34)

Weiters ist es wichtig, *Klebsiella pneumoniae* im Zusammenhang mit einer Bakteriämie zu betrachten, wobei der Fokus vor allem auf sekundär ausgelöste Bakteriämien gerichtet werden sollte. Hierbei wird häufig eine Infektion der Harn- und Atemwege als Quelle identifiziert, die in 15-30 % eine *Klebsiella pneumoniae* Bakteriämie auslöst. (18) Eine eher untergeordnete Rolle nimmt *Klebsiella pneumoniae* in Bezug auf Endokarditis beziehungsweise endovaskuläre Infektionen sowie Sepsis und septischen Schock ein. (18,25) Bei Vorliegen einer Sepsis oder eines septischen Schocks muss seitens gram-negativer Bakterien überwiegend *Escherichia coli*, der in bis zu 19 % verglichen mit *Klebsiella pneumoniae*, die nur in ca. 5 % der Fälle nachgewiesen werden konnte, als ursächlicher Keim berücksichtigt werden. (25)

Ähnliches hinsichtlich der Erregerhäufigkeiten zeigt sich bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen, wobei sich *Klebsiella pneumoniae* mit 3,5 % wiederum hinter *Escherichia coli* mit 76,7 % einordnet. (35)

Die Therapie einer Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* wird als schwierig angesehen, da neben der natürlichen Resistenz gegen Penicillin G und Aminopenicilline das Vorliegen einer plasmidbedingten Mehrfachresistenz, welche überwiegend durch ESBL gefolgt von Carbapenemasebildung verursacht wird, bei vielen Stämmen vorkommt. (18,30,31)

1.3 Resistenz

1.3.1 Grundlagen

Bakterien können eine natürlich bedingte Eigenschaft aufweisen, die ihnen ermöglicht, gegenüber einigen antimikrobiellen Substanzen unempfindlich zu sein. Dadurch kann trotz der Anwesenheit einer ausreichenden Konzentration der Substanz die Vermehrung der Bakterien nicht gehemmt werden. Bezüglich der Resistenz gibt es zwei Wege, wie sich diese Eigenschaft bei Bakterien manifestiert. Einerseits gibt es die natürliche oder auch primäre Resistenz genannt, und andererseits die erworbene, auch sekundäre Resistenz, genannt. (31,36)

1.3.1.1 Primäre Resistenz

Die primäre Resistenz ist genetisch bedingt und stets bei allen Stämmen einer Spezies vorhanden. (36,37) Das bedeutet, dass die Unempfindlichkeit jeder folgenden Generation

weitervererbt wird und daher bereits von vornherein keine Angriffspunkte für gewisse Substanzen existieren. Bei den gram-negativen Stäbchenbakterien sind dabei die Penicillin G- sowie die Vancomycin Resistenz als primäre Resistenzen zu nennen. (31) Bezogen auf die Therapie verursacht eine natürliche Resistenz immer eine Lücke im Wirkspektrum des Antibiotikums. (37)

1.3.1.2 Sekundäre Resistenz

Von einer sekundären Resistenz spricht man bei Bakterien, die ursprünglich gegen gewisse Substanzen eine Empfindlichkeit zeigen, aber unter bestimmten Umständen eine Resistenz entwickeln. (31) Grundlage für die Entstehung neuer Resistenzen kann dabei eine Mutation sein, die entweder spontan oder unter einem Selektionsdruck auftritt. (37) Letztere kann als induzierte Resistenz durch eine inkorrekte Antibiotikatherapie auftreten. (31) Ein bekanntes Beispiel dafür ist die durch Betalaktam-Antibiotika ausgelöste Betalaktamasenproduktion. (37) Dieses Prinzip, aber auch eine Übertragung von Resistenzgenen, ermöglichen die Selektion von resistenten Stämmen, die in den Bakterienpopulationen vereinzelt vorkommen können und daher nicht durch das Antibiotikum wie alle anderen empfindlichen Erreger der Population, eliminiert werden. (36)

Es ist bekannt, dass einige Gattungen der Enterobacteriaceae ein chromosomal codiertes Betalaktamase-Gen aufweisen. (38) Grundsätzlich wird das Gen nur von wenigen Bakterien aktiv exprimiert, sodass die Empfindlichkeit gegenüber Betalaktam-Antibiotika bestehen bleiben kann. Allerdings sind bei einer unzureichenden Dosierung die Bakterien im Stande, ihr Verhalten zu verändern. (31)

Neben dem chromosomal bedingten Auftreten der Betalaktamasen kann dieses auch plasmidcodiert durch ringförmige Plasmide verursacht werden. (37) Dabei wird das Vorhandensein der Betalaktamasen nicht durch Chromosome reguliert, was eine ständige Produktion zur Folge haben kann. Liegt das Plasmid zudem als mehrfache Kopie in der Bakterienzelle vor, resultiert daraus zusätzlich eine Produktion der Betalaktamasen in großen Mengen. (31) Ebenso kann ein Austausch von Genen nicht nur innerhalb einer Spezies, sondern auch zwischen verschiedenen Spezies beobachtet werden. (39) Hierfür verantwortlich sind, wie bereits beschrieben, Plasmide oder Prophagen, die sich unabhängig von der Bakterienteilung vermehren und zwischen Stämmen unterschiedlicher Art übertragen werden. (37) Die Übertragung beziehungsweise der Austausch genetischen Materials erfolgt durch parasexuelle Mechanismen wie Transformation, Transduktion oder Konjugation. Bei der Transformation wird freiliegende DNA von einer Bakterienzelle

aufgenommen, bei der Transduktion erfolgt die Übertragung via Bakteriophagen, die Bakterienzellen infizieren und bei der Konjugation erfolgt der Austausch über Sexpili. (40)

1.3.2 Resistenzmechanismen

Bakterien bedienen sich bestimmter Resistenzmechanismen, um gegenüber dem Antibiotikum eine Unempfindlichkeit ausbilden zu können. (31,36)

1.3.2.1 Enzyme

Die Bildung von inaktivierenden Enzymen, welche Antibiotika stilllegen, bevor sie überhaupt an der Zielstruktur des Bakteriums binden können, kommt dabei am häufigsten vor. (31,36) Als bedeutendste Vertreter dieser Enzyme werden die Betalaktamasen genannt. Die Enzyme greifen die chemische Struktur, nämlich den Betalaktamring der Betalaktam-Antibiotika, an, indem sie ihn hydrolysieren und somit die Substanz bindungsunfähig machen. (31) Bisher wurden mehr als 200 verschiedene Betalaktamasen beschrieben, worunter einige über eine spezifische und andere wiederum über eine breit gefächerte Wirksamkeit gegen bestimmte Antibiotika verfügen. (40) Ihr Vorhandensein wird entweder chromosomal, durch Plasmide oder Transposone bestimmt. (37) Betalaktamasen lassen sich einerseits anhand ihrer Funktion und andererseits aufgrund der Struktur einteilen. Letztere Klassifikation ist als Ambler Klassifikation bekannt und unterteilt die Enzyme in vier Klassen. Die Klassen A, C und D besitzen in ihrem aktiven Zentrum ein Serinmolekül zur Hydrolyse der Betalaktam-Antibiotika. Bei der Klasse B handelt es sich hingegen um zinkabhängige Metalloenzyme. Die funktionelle Nomenklatur, welche von Bush initiiert wurde, scheint zwar komplizierter zu sein, ermöglicht aber anhand der bekannten Enzymeigenschaften, auf alle potenziellen Resistenzprofile rückschließen zu können. (41) *Abbildung 2* gibt einen Überblick der molekularen Einteilung nach Ambler sowie der funktionellen nach Bush. Der Vollständigkeit halber ist noch Gruppe 4 der Bush Nomenklatur zu erwähnen, deren Enzyme ebenfalls gegen Penicilline gerichtet sind, die sich jedoch keiner molekularen Klasse zuordnen lässt. (42)

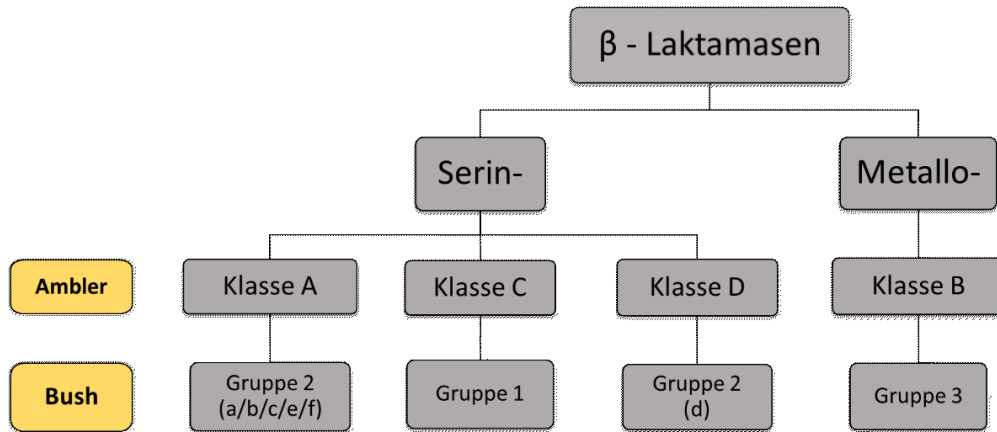


Abbildung 2: Einteilung der Betalaktamasen nach ihrer Struktur (Ambler) und Funktion (Bush) modifiziert nach: Witte et al. (38)

In Klasse A sind beispielsweise die gängigsten plasmidcodierten Betalaktamasen SHV-1 und TEM-1 zu finden, die außerdem eine geringe Aktivität gegen Cephalosporine vorweisen. (37,40) Cephalosporine mit erweitertem Wirkspektrum, wie zum Beispiel Cefotaxim, ein Cephalosporin der 3a. Generation, sind hingegen gegen diese Art von Betalaktamasen stabil beziehungsweise wirksam. (37) Allerdings können sich aufgrund von Punktmutationen in Genen, welche für diese Enzyme codieren, oder durch Austausch mobiler Gene, sogenannter Transposons, neuartige Betalaktamasen entwickeln und folglich ein erweitertes Substratspektrum zeigen. (37,38,40) An dieser Stelle sei SHV-2 zu nennen, welche die erste nachgewiesene Betalaktamase war, die auch Cephalosporine mit erweitertem Wirkspektrum inaktivieren kann und heutzutage als ESBL bekannt ist. (37) Eine weitere Variante von ESBL neben TEM- und SHV Abkömmlingen stellt die Enzymfamilie der Cefotaximasen (CTX-M) dar, die auch außerhalb des Krankenhausbereiches weltweit vorkommt. Die Enzymvarianten TEM und SHV werden hingegen meistens mit nosokomialen Infektionen assoziiert. (42,43)

Bei Klasse B handelt es sich um Metallo-Betalaktamasen wie beispielsweise Carbapenemasen. (40) Sie werden für gewöhnlich in Kombination mit einer zweiten oder dritten Betalaktamase in klinischen Isolaten nachgewiesen und haben, im Vergleich zu den Serin-Betalaktamasen eine geringe Affinität zu Monobactamen. Sie sind nicht durch Clavulansäure oder Tazobactam hemmbar. (41) Zu dieser Klasse gehören unter anderem die Enzyme Verona integron-encoded Metallo-Betalaktamase (VIM), Imipenemase (IMP) und New Delhi Metallo-Betalaktamase (NDM). (38,39,43)

Die Klasse C enthält Cephalosporinasen, die bei vielen Enterobakterien chromosomal codiert sind. Die Enzyme werden jedoch meistens nicht aktiv exprimiert. Erst unter Therapie mit Betalaktam-Antibiotika oder einer Mutation in Genen der Expressionsregulation kann

die Suppression des Enzyms aufgehoben werden. (40,41) Zudem ist es möglich, dass sie eine Resistenz gegen Carbapeneme zeigen können, vor allem wenn das Enzym in großen Mengen produziert wird. (41)

Enzyme der Klasse D können je nach funktioneller Subgruppe von Bush Cloxacillin oder Oxacillin sowie Cephalosporine der 3. Generation oder Carbapeneme hydrolysieren. Die Enzyme sind als Oxacillinasen (OXA) bekannt. (41)

Für die Therapie von Infektionen durch Betalaktamase produzierende Bakterien werden den Antibiotika Betalaktamaseinhibitoren hinzugegeben, wobei bereits fixe Kombinationen existieren. (37) Beispielsweise werden Clavulansäure, Sulbactam, Avibactam oder Tazobactam Penicilline wie Amoxicillin, Ampicillin oder Cephalosporinen beigefügt. (40)

1.3.2.2 Permeabilität

Ein weiterer Mechanismus liegt in der Veränderung der Durchlässigkeit der Zellwand. Im Fall von gram-negativen Bakterien kann auch die äußere Membran für einige Antibiotika als Hindernis fungieren. Der Transport erfolgt normalerweise über Porine, die jedoch so verändert werden können, dass sie für Antibiotika nicht mehr passierbar sind. Gleiches Prinzip gilt für Transportproteine der Zytoplasmamembran. (31,36) Bei *K. pneumoniae* stellt die Kapsel ein zusätzliches Diffusionshindernis dar. (31)

1.3.2.3 Efflux

Neben der Permeabilitätsänderung können manche Bakterien durch die Induktion von Effluxpumpen in der Zellwand ein bereits eingedrungenes Antibiotikum wieder exportieren. (31,36) Bei Bedarf wird die Expression der Effluxstrukturen hochreguliert, was auch bedeutet, dass der Grad der Resistenz variieren kann. Die Affinität von Antibiotika kann ebenfalls durch Mutationen, die die Struktur der Bakterienzelle betreffen, beeinflusst werden. (31) Wegen einer modifizierten Variante des Zielmoleküls kann das Antibiotikum nicht mehr daran binden. Weitere Möglichkeiten, die sich Bakterien zum Schutz vor Antibiotika zu Nutze machen, sind die Überexpression von Zielstrukturen und die Aktivierung von alternativen Stoffwechselwegen. In beiden Fällen kann trotz einer ausreichend vorliegenden Konzentration keine vollständige Inhibierung stattfinden. (36)

1.3.3 Resistenzlage *Klebsiella pneumoniae*

Das vermehrte Auftreten von Enterobakterien mit Mehrfachresistenzen durch ESBL und *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) ist nun auch in Europa deutlich erkennbar geworden. (44) Das Vorkommen solcher Stämme ist sowohl innerhalb Europas als auch weltweit betrachtet verschieden endemisch verbreitet. (43) Die Daten für die

Resistenzsituation in Europa für 2018 stammen aus klinischen Laboratorien der EU-Mitgliedsstaaten sowie Island und Norwegen. Dabei handelte es sich um Ergebnisse des konventionellen Empfindlichkeitstests vom European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) für invasive Isolate der gängigsten Keime und den entsprechenden Antibiotika. Im Jahr 2018 belief sich die Resistenzrate aller erfassten *K. pneumoniae* Isolate für Cephalosporine in Europa auf 31,7 %. Hinsichtlich der Verteilung der *K. pneumoniae* Isolate, die gegen Cephalosporine resistent getestet wurden, zeigte sich, wie auch aus *Abbildung 3* ersichtlich, ein Prozentsatz von $\geq 25\%$ überwiegend für südlich-, südöstlich sowie östlich gelegene Länder. Als starker Kontrast dazu wies Island nur einen Prozentsatz von $< 1\%$ auf. (44) In Österreich waren im Jahr 2014 8,2 % aller *K. pneumoniae* Isolate auf Cephalosporine der 3. Generation resistent. Im Jahr 2016 waren es 9,6 %. Im Zeitraum von 2014 bis 2018 wurden jährlich generell nur geringgradige Zu- beziehungsweise Abnahmen festgestellt. (24)

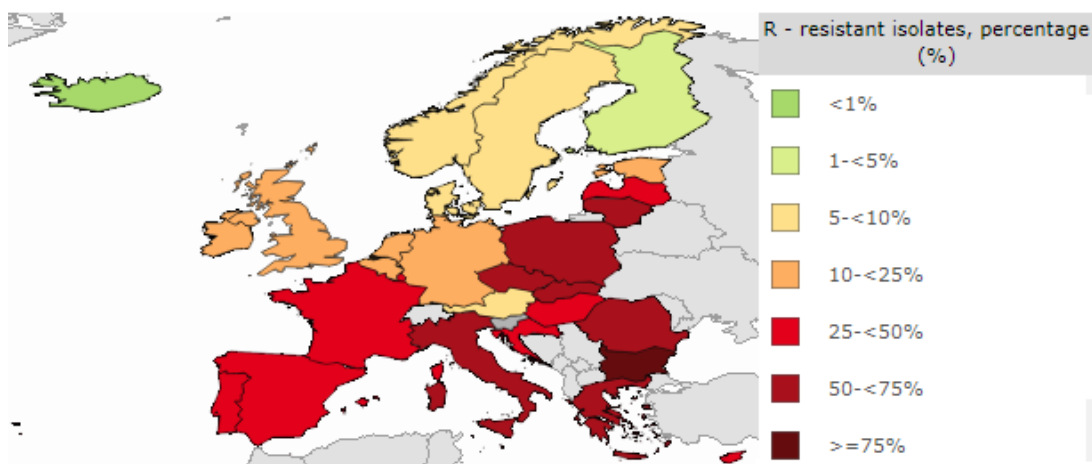


Abbildung 3: Cephalosporinresistenz von invasiven Klebsiella pneumoniae Isolaten in Europa 2018 (45)

Bezüglich der Resistenzlage für Fluorchinolone ergaben sich für den südlichen und östlichen Europäischen Raum beinahe identische prozentuelle Muster verglichen mit der Cephalosporinresistenz, was auch eindeutig aus *Abbildung 4* hervorgeht. (44) Für Österreich wird laut AURES Resistenzbericht für *K. pneumoniae* die Resistenzrate für Fluorchinolone mit 13,2 % im Jahr 2018 angegeben. (24) Der lokale Resistenzbericht der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin, Universitätsklinik für Innere Medizin Graz, gibt zwar einen stabilen Verlauf der Fluorchinolone- genauer gesagt der Ciprofloxacinresistenzrate an, jedoch beliefen sich die Prozentsätze auf 20,8 % im Jahr 2017 beziehungsweise auf 20,0 % im Jahr 2018, was deutlich über dem österreichischen Durchschnitt mit 13,2 % im Jahr 2018 lag. (27)

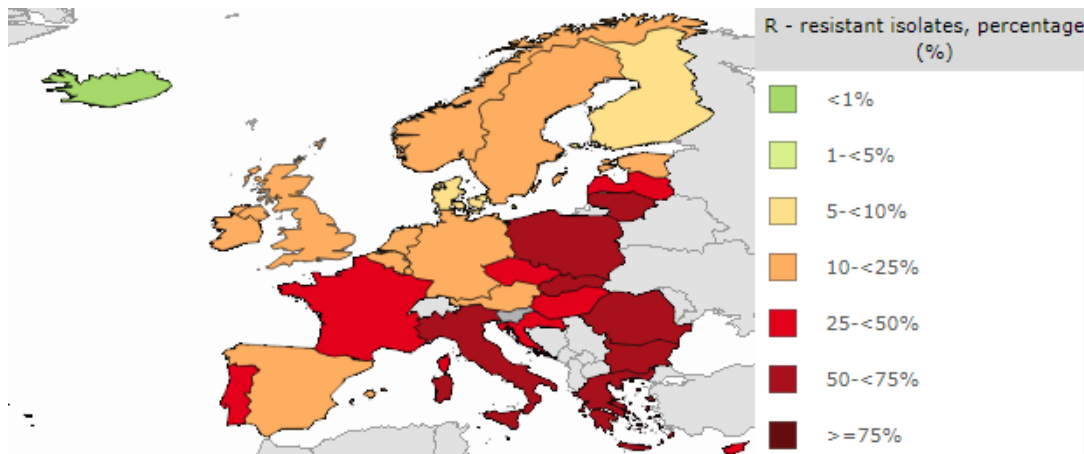


Abbildung 4: Fluorchinolonresistenz von invasiven *Klebsiella pneumoniae* Isolat in Europa 2018 (45)

In Bezug auf die Carbapenemresistenz sind vor allem Griechenland und Zypern, wo mehr als 50 % der Isolate eine Resistenz aufwiesen, gefolgt von Italien, Sizilien, Sardinien und Rumänien schwerwiegend betroffen. In Griechenland wurden von insgesamt 1.498 *K. pneumoniae* Isolat in 957 als resistent identifiziert. Das entsprach einem Prozentsatz von 63,9 %. (45) In Österreich wurden im Jahr 2018 von insgesamt 1.184 Blutkulturen zwölf als „resistent“ und zwei als „sensibel bei erhöhter Exposition“ getestet. (24) In Graz gab es im Jahr 2019 wie bereits im Jahr zuvor keinen Fall eines invasiven *K. pneumoniae* Isolates, das eine Resistenz gegen Carbapeneme aufwies. (27)

Zusammenfassend ist eine geographische Verteilung, vor allem unter Betrachtung der beiden Abbildungen 3 und 4, seitens der Resistenzlagen für alle angeführten Antibiotikaklassen eindeutig ersichtlich, wobei Nordeuropa stets einen niedrigeren Prozentsatz im Vergleich zu Süd- und Osteuropa verzeichnete. (44)

Für die lokale Resistenzsituation in Graz ist vielmehr die Zunahme der ESBL Rate von 12,5 % im Jahr 2018 auf 17,1 % im Jahr 2019 erwähnenswert. (27) Deutschland beklagt ebenfalls die Zunahme sowohl von ESBL bildenden *K. pneumoniae* als auch von ESBL bildenden *E. coli* Stämmen, die dann oft zusätzlich eine Resistenz gegenüber Fluorchinolonen und Aminoglykosiden aufweisen. (46) Das Auftreten einer einzelnen Resistenz wird durch die Häufung einer kombinierten Mehrfachresistenz gegen Fluorchinolone, Cephalosporine der 3. Generation und Aminoglykosiden immer seltener. Im europäischen Durchschnitt belief sich das Vorkommen dieser Mehrfachresistenz im Jahr 2018 auf 19,6 %. (44) Die Entstehung und Expansion von ESBL sowie der Fluorchinolonresistenz sind dem weitverbreiteten Einsatz von Breitbandantibiotika wie Cephalosporine der 3. Generation und Fluorchinolonen geschuldet. Damit verbunden ist eine weitere Problematik, da aufgrund der wachsenden Resistenzraten vermehrt auf

Carbapeneme zurückgegriffen werden muss, was erneut einen Selektionsdruck erzeugt und somit die Entstehung von carbapenemresistenten Enterobakterien ermöglicht. (43) Obwohl der Mittelwert für Europa hinsichtlich der carbapenemresistenten *K. pneumoniae* Raten für den Zeitraum 2015 bis 2018 mehr Stabilität im Vergleich zur vorigen Vierjahresperiode hervorbrachte und auch Österreich derzeit bezüglich der Carbapenemresistenz keineswegs beunruhigende Zahlen vorweist, lässt sich seitens internationaler Surveillance Studien ein signifikanter Anstieg verzeichnen. (24,39,44) Im Sinne der weltweiten Ausbreitung sind primär Griechenland, China, Südamerika, bestimmte Regionen Nordamerikas, die Türkei, arabische Länder und Israel von der carbapenemresistenten *K. pneumoniae* Problematik betroffen. (43,46)

1.4 Mikrobiologische Diagnostik

1.4.1 Blutkultur

Goldstandard für den Nachweis einer Bakteriämie ist die Blutkultur, die sowohl für die Erregeridentifizierung als auch für die nachfolgende Empfindlichkeitstestung als Grundlage fungiert. (33,47) Bedauerlicherweise geht sie mit einer geringen Sensitivität einher, die je nach untersuchtem Patientenkollektiv, Qualität der Probengewinnung und Anzahl der abgenommenen Blutkultursets sowie Blutvolumen variiert. (9,28,33) Der Keimnachweis einer Bakteriämie bei Patientinnen/Patienten mit Sepsis oder septischem Schock gelingt laut Studien bei 30-40 %. Auf die klinische Praxis bezogen kann jedoch lediglich in ca. 10 % ein Keim nachgewiesen werden. (48) Dies bestätigt sich ebenfalls an der Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz, wobei von 6.566 untersuchten Blutkulturen nur bei 815 beziehungsweise 12,4 % ein Keim isoliert werden konnte. (27) Es besteht bei zu geringem Volumen die Gefahr, dass bei Bakteriämien mit niedriger Keimdichte das Ergebnis falsch negativ ausfällt. (9)

Hinsichtlich der Spezifität und falsch positiver Ergebnisse stellen Kontaminationen eine Schwierigkeit dar, die sich jedoch durch die Abnahme mehrerer Blutkultursets bewältigen lässt. (9,49) Denn zur Beurteilung, ob es sich bei dem isolierten Keim tatsächlich um einen pathogenen oder lediglich um einen Kontaminationskeim handelt, ist es notwendig, mehrere Blutkulturpaare heranzuziehen. Falls derselbe Keim in mehreren unabhängig voneinander entnommenen Blutkulturpaaren nachweisbar ist, kann mit einer höheren Wahrscheinlichkeit von einem pathogenen Keim ausgegangen werden. (9) Dementsprechend nimmt der positive prädiktive Wert für das Vorliegen einer tatsächlichen Bakteriämie mit der Anzahl an abgenommenen Blutkulturflaschen zu, woraus eine Empfehlung für mindestens zwei bis vier Blutkultursets, jeweils bestehend aus einer aeroben und anaeroben Flasche,

resultiert. (28) Eine Kontamination durch die der physiologischen Hautflora angehörigen Bakterien wie zum Beispiel koagulase-negative Staphylokokken, *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp., *Bacillus* spp. und *Propionibacterium acnes* liegt, je nach Literatur, bei 0,6-17 % der Blutkulturen vor. (28)

Die Bebrütung der Blutkulturflaschen erfolgt in automatisierten Blutkultursystemen, die eine kontinuierliche Überwachung bewerkstelligen. (50) Für eine hohe Erfolgsrate sind präanalytische Faktoren wie eine korrekte Abnahmetechnik und die Qualität des nachfolgend gewählten Analyseverfahrens maßgebend. (33,49)

1.4.1.1 Automatisierte Blutkultursysteme

Die ersten automatisierten Detektionssysteme beruhten auf der Messung von radioaktiv markierten ^{14}C , welches beim Keimwachstum aufgenommen und als CO_2 abgegeben wurde. (32) Die weiterentwickelten Formen wie die BACTEC 9000 Serie und BD FX sind hingegen nicht mehr auf das gefährliche Radioisotop ^{14}C angewiesen und messen anstatt dessen mithilfe von Fluoreszenz die veränderte CO_2 - und O_2 - Konzentration. Aufgrund der metabolischen Aktivität des Mikroorganismus wird CO_2 gebildet und O_2 , welches für das Wachstum benötigt wird, verbraucht. Die daraus resultierenden Konzentrationsänderungen werden von einem sich unterhalb der Flaschen befindlichen Sensor, welcher einen fluoreszierenden Farbstoff enthält, registriert. Dabei steht eine Zunahme der Fluoreszenzintensität im proportionalen Verhältnis zur steigenden CO_2 Menge beziehungsweise abnehmender O_2 - Konzentration. (50,51) Das fluoreszierende Signal wird von Photodetektoren gemessen und anhand komplexer Algorithmen ausgewertet, die darauf abzielen, ein Keimwachstum möglichst früh zu erkennen und falsch positive Signale gering zu halten. (32,50) Bei einem weiteren in Europa häufig eingesetzten System, dem BacT/ALERT 3D System, befindet sich am Boden ein kolorimetrischer CO_2 - Sensor. Denn die CO_2 - Entwicklung, die beim Wachstum entsteht, ändert auch den pH-Wert, was zu einem sichtbaren Farbumschlag führt. (32,52) Im Gegensatz zu den zuvor genannten Systemen nützt VersaTREK den Verbrauch oder die Produktion verschiedenster Gase wie CO_2 , H_2 und O_2 zum Nachweis eines Keimwachstums. Der Mechanismus beruht auf der Registrierung der Druckänderung, welche die Gasentwicklung hervorruft. (2,32) Alle angeführten Geräte dienen dazu, ein Keimwachstum zu bestätigen, jedoch kann nicht analysiert werden, um welchen Mikroorganismus es sich letztendlich handelt. Für eine genaue Keimidentifizierung sind daher weitere Prozesse notwendig. (2)

1.4.1.2 Keimidentifizierung

Zur Identifizierung des Mikroorganismus aus einer positiven Blutkultur wird derzeit die Matrix Assisted Laser Desorption Ionization -Time of Flight - Mass Spectrometry (MALDI-TOF-Massenspektrometrie) eingesetzt, wobei innerhalb von weniger als zehn Minuten ein präzises Ergebnis vorliegt. (4,33) Damit können sowohl Pilze, anspruchsvolle Bakterien, Anaerobier als auch Mykobakterien detektiert werden. (53,54) Voraussetzung dafür ist die Subkultivierung des Erregers auf Festnährmedien. (33) Das aus einer Einzelkolonie entnommene Zellmaterial wird auf eine Trägerplatte mit Spots aufgetragen. (4,54) Die Spots enthalten eine starke organische Säure, angereichert mit einem Überschuss an absorbierender Matrix, die das Zellmaterial in Lösung bringt. (40) Anschließend kommt die Platte in ein Massenspektrometer. Die Matrix trennt die bakteriellen Moleküle voneinander und ermöglicht ihnen unter Einwirkung von Energie aus einem Laser, in den ionisierten Zustand zu wechseln. Die meiste Energie wird aber von der Matrix absorbiert. Die ionisierten Moleküle werden in einem positiv geladenen elektrostatischen Feld in einer Vakuumröhre in Richtung eines Ionendetektors beschleunigt. (54) Für kleinere Moleküle ergibt sich eine schnellere Beschleunigung als für größere. (40) Bedingt durch die unterschiedlichen Massen und Ladungen treffen die Moleküle zu unterschiedlichen Zeiten auf den Detektor. Daraus resultiert ein Massenspektrum, welches für jede Keimspezies spezifisch ist. Das entstandene Massenspektrum wird mit einer Datenbank abgeglichen, welche die Referenzspektren enthält. (4,54)

1.4.2 Empfindlichkeitstestung

Der phänotypische Nachweis von Sensibilität für bestimmte Antibiotika mittels minimaler Hemmkonzentration (MHK) bildet den Goldstandard unter den Empfindlichkeitstestungen. Als Grundlage dient der Vergleich von mikrobiellem Wachstum ohne Einsatz antiinfektiver Substanzen mit dem Wachstum, welches durch ansteigende Antibiotikakonzentrationen beeinträchtigt wird. Daraus lässt sich die minimale Hemmkonzentration (MHK) ermitteln. (54) Ein Sensibilitätsprofil eines Bakterienisolates kann heutzutage mithilfe verschiedenster Verfahren erstellt werden. Der makroskopische sowie mikroskopische Bouillondilutionstest, die Agardilutionsmethode und der Scheibendiffusionstest, auch bekannt als Kirby Bauer Methode, gelten dabei als klassische Empfindlichkeitstests. (53) Als Basis dient eine Kultur nach primärer Anzucht und nach Isolierung des Erregers. (55)

1.4.2.1 Bouillondilutionstest

Beim makroskopischen sowie mikroskopischen Bouillondilutionstest wird eine Verdünnungsreihe mit entsprechenden Nährlösungen und absteigenden

Antibiotikakonzentrationen in Reagenzgläsern beziehungsweise Mikrotiterplatten hergestellt. (53) Jede einzelne Konzentrationsstufe der Verdünnungsreihe wird mit derselben genau definierten Bakterienmenge beimpft und bebrütet. (31,55) Anhand der Klarheit der Flüssigkeit, lässt sich einerseits die Wachstumskontrolle ohne Antibiotikum oder eine niedrig konzentrierte Lösung, welche eine Trübung aufweist, von jener ohne Trübung, was für eine Wachstumshemmung spricht, differenzieren. Die Konzentration, bei welcher keine Trübung visualisierbar ist, entspricht der niedrigsten Konzentration, bei der das Wachstum der Bakterien gehemmt wird. Sie wird als minimale Hemmkonzentration (MHK) angegeben. (31) Mittels der MHK ist es möglich, eine Zuteilung zu den Kategorien „sensibel bei Standarddosierschema“ (S), „sensibel bei erhöhter Exposition“ (I) und „resistent“ (R) zu treffen. (56) Tabellen, die diese Klassifizierung zusammenfassen, werden von Organisationen wie zum Beispiel der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) generiert und zur Verfügung gestellt. (54) Der mikroskopische Bouillondilutionstest mit Mikrotiterplatten ist dem makroskopischen zu bevorzugen, da dieser für die Testung von mehreren Antibiotika an einem Isolat oder für eine gleichzeitige Testung von mehreren Isolaten zu umständlich wäre. (53)

1.4.2.2 Agardilutionsmethode

Bei dieser Methode wird ein definiertes Volumen von Antibiotikallösungen unterschiedlicher Konzentrationen in geschmolzenem Agar verteilt, bevor es sich in den Petrischalen fixiert. Anschließend werden die Platten mit einer bekannten Bakterienmenge beimpft und können trocknen. Nach einer Inkubation bei 35 °C für 16-20 Stunden kann die MHK ermittelt werden. Der Wert wird von jener Platte ermittelt, welche bei der geringsten Konzentration kein Wachstum zeigt. (53,57) Der Agardilutionstest ist als Routinemethode aufgrund der zeitintensiven Vorbereitung der Agarplatten jedoch ungeeignet. (53)

1.4.2.3 Scheibendiffusionstest und Etest®

In den Routinelabors hat sich der Scheibendiffusionstest als häufiges Verfahren zur Prüfung der Empfindlichkeit etabliert. Die Methode überzeugt aufgrund der schnellen und einfachen Durchführbarkeit bezüglich der labortechnischen Ausstattung und der Anwendbarkeit für ein breit gefächertes Spektrum an Bakterien und Antibiotika. (57,58) Hierbei werden Antibiotikaplättchen aus Filterpapier, welche eine bestimmte Menge des Antibiotikums enthalten, auf eine bereits mit dem Inokulum ausgestrichene Agarplatte aufgebracht und anschließend inkubiert. (31) Das Antibiotikum kann nun frei ins Medium diffundieren und ein Konzentrationsgefälle um das Plättchen aufbauen. Plättchennahe herrscht eine hohe Antibiotikakonzentration, welche in die Peripherie gehend abnimmt. (54,55) Nach der

Inkubation wird eine wachstumsfreie beziehungsweise wachstumshemmende Zone ersichtlich, sobald eine ausreichende Wirkstoffkonzentration vorliegt. Der Durchmesser dieser Zone, genannt Hemmhofdurchmesser, steht in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis zur MHK. Je größer der Hemmhofdurchmesser, desto niedriger die MHK und umgekehrt. (31,55)

Eine weitere Methode, die sich die Diffusion zu Nutze macht, nennt sich Etest®. Dabei handelt es sich um einen Streifen, welcher ansteigende Konzentrationen des Antibiotikums enthält. Wie bereits beim Scheibendiffusionstest beschrieben, wird das Inokulum auf der Agarplatte ausgestrichen und der Streifen aufgelegt. Nach der Inkubation bei 35 °C für 18-24 Stunden entstehen ebenfalls wachstumsfreie Zonen, wobei die MHK direkt abgelesen werden kann. (54,57) In *Abbildung 5* sind beide Methoden, die auf demselben Prinzip beruhen, sowie ihre charakteristischen Hemmmuster dargestellt.

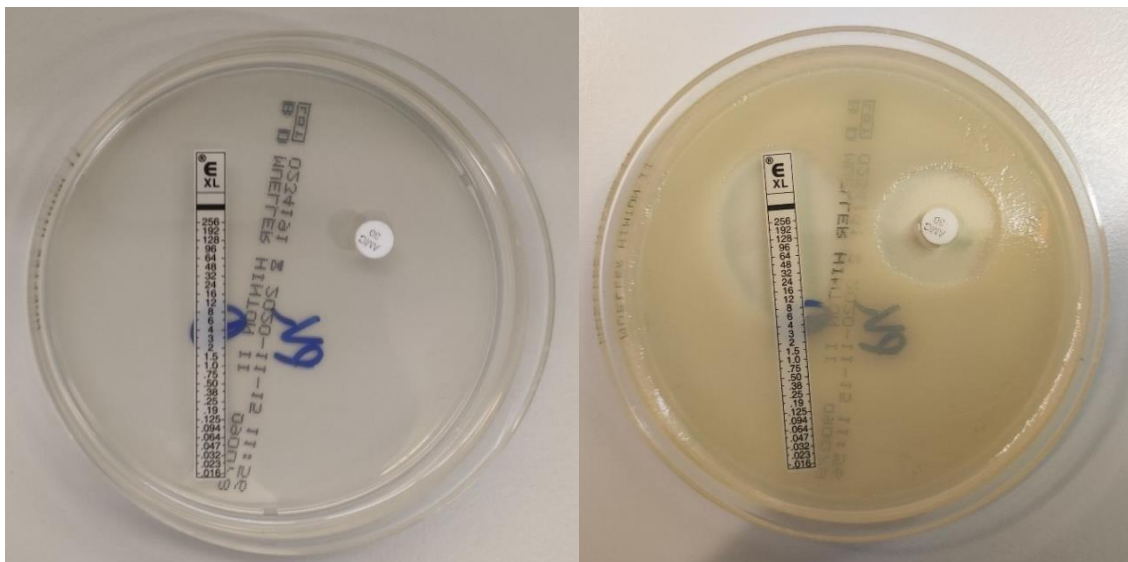


Abbildung 5: Scheibendiffusionstest und Etest® vor (links) und nach Inkubation von 24 h (rechts)

1.4.2.4 Methodik nach EUCAST

Die von EUCAST entwickelte antimikrobielle Empfindlichkeitstestung, bekannt als Antimicrobial susceptibility testing (AST), legt detaillierte Vorgaben hinsichtlich des verwendeten Materials und der Durchführung fest. (57,59) Die Grundlage dafür bildet die Kirby Bauer Methode, welche ab dem Jahr 1966 als erste standardisierte Methode in den Laboratorien bereits weitverbreitete Anwendung fand. (53) Als Medium dient bei einfach anzüchtbaren Erregern für die antimikrobielle Empfindlichkeitstestung nach EUCAST Müller Hinton Agar (MH-Agar). Für alle anspruchsvollen Erreger wird Müller Hinton fastidious Agar (MH-F Agar), welches zusätzlich mit 5 % mechanisch defibriniertem Pferdeblut und 20 mg/l beta-Nicotinamidadenindinukleotid (β -NAD) versetzt wurde,

verwendet. Das Inokulum bildet eine Bakteriensuspension, welche aus einer Kolonie, die zuvor 16-24 Stunden inkubiert war, und NaCl hergestellt wird. (59) Die Suspension wird dabei mithilfe der Photometrie entsprechend einer 0,5 McFarland Lösung standardisiert, um eine genau definierte Bakterienmenge als Inokulum gewährleisten zu können. (53,59) Die 0,5 McFarland Standardsuspension ist zu einer *E. coli* Suspension mit $1-2 \times 10^8$ CFU (colony forming unit/ml) äquivalent. (60) Es ist wichtig, dass das Inokulum einheitlich in drei Richtungen ausgestrichen wird, damit ein konfluierendes Bakterienwachstum stattfinden kann. (57) Anschließend werden die ausgestrichenen Platten binnen 15 Minuten mit den Antibiotikaplättchen ausgelegt. Innerhalb der nächsten 15 Minuten nach Aufbringen der Plättchen werden die Agarplatten für 16-20 Stunden bei 35 ± 1 °C inkubiert. MH-Agarplatten werden in Raumluft und MH-F Agarplatten mit einem 5 ± 1 %igen CO₂- Anteil inkubiert. Auch beim Messvorgang sind standardisierte Abläufe einzuhalten. Der Hemmhofdurchmesser wird aus 30 cm Entfernung zum Auge mittels Lineals, Messschiebers oder mit einem automatisierten Zonenleser erhoben. (59) MH-Agarplatten werden von der Rückseite, MH-F Platten von der Vorderseite ohne Deckel vor dunklem Hintergrund oder reflektierendem Licht abgelesen. Falls doppelte Zonen ersichtlich sind, sollte immer die innerste zum Ablesen verwendet werden. Der ermittelte Hemmhofdurchmesser erlaubt dann entsprechend der Grenzwerttabellen, die regelmäßig aktualisiert werden, eine Kategorisierung in „S“, „I“ und „R“. (57,59)

Zur Prüfung einer korrekten Testdurchführung hat EUCAST Kontrollstämme mit definierten „ranges“ und „targets“, innerhalb deren die MHK und Hemmhofdurchmesser liegen sollten, zur Verfügung gestellt. (61) Die Qualitätstests müssen täglich oder zumindest vier Mal wöchentlich durchgeführt werden, vor allem für Antibiotika, die Bestandteil eines Standardpanels sind. Weiters sind bei allen MH-Agarplatten mit neuer Charge Qualitätstests durchzuführen, um gewährleisten zu können, dass die minimalen Hemmkonzentrationen innerhalb der vorgegebenen Werte liegen. (60) Durch die Standardisierung dieser Arbeitsprozesse ist es möglich geworden, das Risiko für eine falsche Beurteilung der Ergebnisse hinsichtlich Sensibilität oder Resistenz gering zu halten. (57)

Auf die Praxis übertragen, bedeutet eine mittels Antibiogramm bestimmte Empfindlichkeit, dass mit einer verträglichen Dosierung des Antibiotikums eine ausreichende Konzentration für die Wachstumshemmung gewährleistet werden kann. Wird für die Wachstumshemmung stattdessen eine höhere Konzentration benötigt, wird der Erreger unter Therapiebedingungen als „resistent“ eingestuft, da es nicht möglich ist, die MHK unter normalen Dosierumständen erreichen zu können. (55)

1.4.3 RAST

Der Bedarf sowie die Dringlichkeit für ein schnelles Antibiogramm werden immer mehr durch die steigende Resistenzsituation bestimmt. (58) Daneben sind eine Keimidentifizierung sowie die Kenntnis über dessen Empfindlichkeitsverhalten die bedeutendsten Faktoren, um eine gezielte antimikrobielle Therapie frühestmöglich einleiten zu können, wovon Patientinnen/Patienten mit Sepsis wegen des verbesserten Outcomes stark profitieren. (58) Weiters ist zusätzlich zur richtigen Wahl des Antibiotikums bezogen auf die Wirksamkeit eine zeitnahe Verabreichung entscheidend. Schließlich resultiert jede Stunde Verzögerung in einer Steigerung der Mortalität. (16,22) Diese Herausforderungen können mit der standardisierten antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung (AST) nach EUCAST nur teilweise bewältigt werden, da diese mit einem hohen Zeitaufwand verbunden und dadurch limitiert ist. Für die Erstellung eines Antibiogrammes ist das Anlegen von Subkulturen notwendig, die jedoch auf eine bestimmte Inkubationszeit angewiesen sind. Der gesamte Prozess, ab dem Eintreffen der Blutkulturen bis zum Vorliegen der Ergebnisse, nimmt daher ein Zeitfenster von 36 bis 48 Stunden in Anspruch. (22,62)

Aus diesem Grund entwickelte EUCAST eine Methode für eine beschleunigte Empfindlichkeitstestung. Diese liefert die Testergebnisse innerhalb eines Arbeitstages, benötigt nur Materialien, die in jedem mikrobiologischen Routinelabor verfügbar sind und ist für die wichtigsten Erreger einer Bakteriämie anwendbar. Des Weiteren wurden eine einfache Durchführbarkeit und die Unabhängigkeit der Ergebnisse von den verwendeten Blutkulturgeräten bei der Entwicklung beachtet. (58)

Die Methode, welche sich als rapid Antimicrobial susceptibility testing (RAST/ rapid AST) bezeichnet, ist derzeit für folgende acht Erreger validiert: (63)

- *Escherichia coli*
- *Klebsiella pneumoniae*
- *Pseudomonas aeruginosa*
- *Staphylokokkus aureus*
- *Streptokokkus pneumoniae*
- *Enterokokkus faecalis* und *Enterokokkus faecium*
- *Acinetobacter baumannii*

RAST basiert auf der zuvor beschriebenen, standardisierten Scheibendiffusionsmethode, unterscheidet sich aber hinsichtlich des Inokulums, der Inkubationszeit, des Ablesevorgangs und der Grenzwerte. Die Grenzwerte sind auf die beschleunigte Empfindlichkeitstestung abgestimmt und daher auch nicht mit jenen Grenzwerten des standardisierten

Scheibendiffusionstests gleichzusetzen. Im Unterschied zur konventionellen Empfindlichkeitstestung werden die MH-/MH-F Agarplatten direkt mit $125 \pm 25 \mu\text{l}$ Blut aus der positiven Blutkulturflasche, anstatt der hergestellten Bakteriensuspension, ausgestrichen und anschließend mit Antibiotikaplättchen belegt. Sobald die Blutkulturflaschen, welche in einem automatisierten Blutkultursystem ausgewertet werden, ein positives Signal zeigen, kann eine beschleunigte Empfindlichkeitstestung innerhalb von 0 bis 18 Stunden durchgeführt werden. Nach bereits 4 Stunden können die Hemmhofdurchmesser abgelesen und innerhalb von zehn Minuten wieder reinkubiert werden, um nach 6 beziehungsweise insgesamt 8 Stunden den Hemmhofdurchmesser erneut zu messen. Als Hemmhofdurchmesser werden nur jene Durchmesser angenommen, die eindeutig mit abgrenzbaren Rändern erkennbar sind. Die manuelle Ablesung erfolgt im Gegensatz zum standardisierten Scheibendiffusionstest mit dem Lineal von der Vorderseite der Platte. Befindet sich ein dünnes Wachstum innerhalb eines Hemmvorhofes, der allerdings einen klar erkennbaren Rand zeigt, kann dies ignoriert werden, was gelegentlich beim Ablesen bei einer Inkubationszeit von 4 Stunden bei *E. coli* und *K. pneumoniae* und meistens bei Betalaktam-Antibiotika beobachtet werden kann. (63,64)

Mithilfe der bereits erarbeiteten Grenzwerte von EUCAST werden die Hemmhofdurchmesser der beschleunigten Empfindlichkeitstestung wie beim Routinescheibendiffusionstest für die Interpretation für „S“, „I“ und „R“ verwendet. Für alle Erreger-Antibiotikum-Kombinationen existiert bei der RAST Methode ein unsicherer Bereich, der sich wegen der kürzeren Inkubationszeiten ergibt. Dieser Bereich wird als Area of Technical Uncertainty (ATU) bezeichnet und gibt jenen Hemmhofdurchmesser beziehungsweise ein Intervall an, indem eine eindeutige Kategorisierung zu „sensibel“ oder „resistent“ nicht möglich ist. Das Intervall umfasst eine Spannweite von 1-3 mm. Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der Inkubationszeit und dem ATU Anteil. Je kürzer die Inkubationszeit ist, desto größer zeigt sich der Anteil jener Ergebnisse, der als ATU angegeben wird. Ein als ATU klassifiziertes Ergebnis trägt die Konsequenz, dass es nicht gewertet werden darf, da ansonsten eine hohe Wahrscheinlichkeit für Interpretationsfehler besteht. Falls bei 8 Stunden kein eindeutiges Ergebnis vorliegt, kann immer noch auf den Routinescheibendiffusionstest nach EUCAST zurückgegriffen werden. (65) Hinsichtlich der Ablesbarkeit der Hemmhofdurchmesser im Zuge von RAST kann trotz kurzer Inkubationszeiten ein hoher Anteil verzeichnet werden. Nach 4 Stunden konnte bei 99 % der *K. pneumoniae* Isolate ein Hemmhofdurchmesser ermittelt werden. Nach 6 und 8 Stunden stieg der Prozentsatz auf bis zu 100 %. (58) Ähnlich erfolgreiche Ergebnisse bezüglich der

Lesbarkeit zeigten sich auch bei einer prospektiven Single-Centre Studie, welche 2019 von der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin, Universitätsklinik für Innere Medizin, an der Medizinischen Universität Graz durchgeführt wurde. Neben der Gegenüberstellung von RAST und der konventionellen Empfindlichkeitstestung hinsichtlich Ablesbarkeits- und Fehlerraten erhob die Studie ferner, inwieweit Ergebnisse des RAST Entscheidungen der Infektiologin/des Infektiologen beeinflussen. Bezüglich der Ermittlung der Hemmhofdurchmesser konnten nach 4 Stunden Inkubationszeit 75,8 % abgelesen werden und nach 6 Stunden 94,7 %. Die Auswirkungen hinsichtlich des Patientenmanagements zeigten sich dadurch, dass eine noch am selben Tag durchgeführte infektiologische Konsultation in einer Änderung der antimikrobiellen Therapie und Anordnung von zusätzlichen Maßnahmen, wie etwa bildgebende Verfahren oder der Fokussanierung betreffende Eingriffe, endete. Die Erkenntnis, dass trotz verkürzter Inkubationszeit aussagekräftige Ergebnisse zu einem hohen Anteil vorliegen und dass eine beschleunigte Informationsbeschaffung Auswirkungen auf Therapiestrategien am selben Tag hat, spricht deutlich für eine Implementierung der RAST Methode in jedem Routinelabor. (62)

Obwohl RAST der Diagnostik Vorteile bietet, ist die Methode der standardisierten Scheibendiffusionstestung nicht überlegen, da das Verfahren derzeit nur für eine beschränkte Anzahl an bakteriellen Erregern sowie eine bestimmte Auswahl an Antibiotika anwendbar ist. (63) Aktuell stehen den mikrobiologischen Laboratorien Grenzwerte für Piperacillin/Tazobactam, Cephalosporine der 3. Generation, Ceftazidim/Avibactam, Ceftolozan/Tazobactam, Carbapeneme, Fluorchinolone, Aminoglykoside und Trimethoprim-Sulfamethoxazol in Bezug auf *K. pneumoniae* zur Verfügung. (65) Angesichts des österreichischen Antibiotikaverbrauches wäre es vernünftig, die Grenzwerttabelle vorrangig für Penicilline zu erweitern, da sie sowohl im niedergelassenen als auch im stationären Bereich im Jahr 2018 den größten Anteil am Antibiotikagesamtverbrauch verzeichneten. (24,62) Die Popularität und der bevorzugte Einsatz von Betalaktam-Antibiotika bestätigt sich zugleich in der Single-Centre Studie. Wie sich herausstellte, beeinflussten die RAST Ergebnisse für Betalaktam-Antibiotika die Therapieentscheidung am stärksten. Im Vergleich dazu führten Ergebnisse für Aminoglykoside und Clindamycin zu keinerlei Änderungen in der Behandlungsstrategie. (62)

1.5 Ziele

Die RAST Methode stellt, bezogen auf ihre Durchführbarkeit, eine ausgereifte Form unter den Empfindlichkeitstestverfahren dar. Dennoch kann das Potenzial dieser Methodik noch nicht vollständig ausgeschöpft werden, da sie derzeit nur für ein begrenztes Erreger- und Substanzspektrum anwendbar ist. Im Rahmen dieser Arbeit soll nun die Kapazität von RAST durch die Bestimmung neuer Grenzwerte für *K. pneumoniae* erweitert werden. Die Grenzwerte werden für Amoxicillin/Clavulansäure sowie für Ampicillin/Sulbactam erhoben, welche zu den am häufigsten verwendeten Antibiotikaklassen in Österreich zählen.

2 Material und Methoden

Die vorliegende Arbeit sieht die Ermittlung und Etablierung neuer Grenzwerte für *K. pneumoniae* für Amoxicillin/Clavulansäure sowie Ampicillin/Sulbactam vor. Die Breakpoints wurden im Zuge der von EUCAST zuletzt entwickelten RAST Methode bestimmt und sind nur für diese validiert. Für die Erhebung wurden ursprünglich 90 *K. pneumoniae* Stämme vom Diagnostik- und Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin und der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin, Universitätsklinik für Innere Medizin, Medizinische Universität Graz, zur Verfügung gestellt. Darunter befanden sich jedoch drei falsche Stämme, ein gemischtes Isolat sowie fünf Stämme, die aufgrund nicht klärbarer Diskrepanzen ausgeschlossen werden mussten. Somit belief sich die Zahl der für die Studie verwendeten Stämme auf insgesamt 81. Durch den Doppelansatz der 81 *K. pneumoniae* Isolate war es theoretisch möglich, 162 Testergebnisse zu erzielen. Die Laborarbeit wurde im mikrobiologischen Labor des Universitätsklinikums für Innere Medizin Graz im Zeitraum vom 26.08.2020 bis 16.10.2020 durchgeführt und umfasste insgesamt sieben Arbeitsdurchgänge, die jeweils an zwei Tagen stattfanden.

Zu Beginn der Studie mussten die ausgewählten *K. pneumoniae* Isolate auf eine MH-Agarplatte aufgetragen und für 24 Stunden inkubiert werden. Daraus wurde jeweils eine Subkultur entnommen und erneut inkubiert. Ausgehend von diesen Subkulturen konnten nun standardisierte 0,5 McFarland Suspensionen hergestellt werden, die den Ausgangspunkt sowohl für die konventionelle Empfindlichkeitstestung als auch RAST bildeten. Mit den insgesamt 81 *K. pneumoniae* Stämmen wurden jeweils im Doppelansatz für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam ein konventioneller Scheibendiffusionstest nach EUCAST und Etest®, welche als Kontrolle dienten, sowie RAST entsprechend der EUCAST Leitlinien erstellt. Der gesamte Arbeitsprozess nahm zwei aufeinanderfolgende Tage in Anspruch. Der erste Tag setzte sich aus dem Ansetzen des

Routinescheibendiffusionstests und Etest®-Streifens sowie dem Spiken der Blutkulturflaschen zusammen. Der zweite Tag beinhaltete das Ablesen der Ergebnisse des Routinescheibendiffusionstests und Etest®-Streifens sowie die Durchführung von RAST mithilfe der positiv gewordenen Blutkulturen und anschließender Vermessung der Hemmhofdurchmesser.

Tag 1:

Bevor RAST leitliniengerecht nach EUCAST unter Verwendung von *K. pneumoniae* positiven Blutkulturen umgesetzt werden konnte, mussten entsprechende Vorbereitungen der Blutkulturflaschen getroffen werden, um die benötigten Versuchsbedingungen zu schaffen. Aus einer Blutkonserve, die aufgrund unsachgemäßer Lagerung oder des Verfallsdatums von der Universitätsklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Graz zur Verfügung gestellt wurde, wurden 5 ml Blut in eine aerobe Blutkulturflasche injiziert, und mit *K. pneumoniae*, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, gespikt. Dazu musste im Vorhinein eine Verdünnungsreihe ausgehend von einer Bakteriensuspension, die einem 0,5 McFarland Standard entspricht, erstellt werden. Zur Herstellung der benötigten Bakteriensuspension wurde von einer *K. pneumoniae* Kolonie eine geringe Menge mittels steriler Öse entnommen und in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst. Anschließend wurde photometrisch bestimmt, ob die Suspension einem 0,5 McFarland entsprach. Dazu musste ein Wert zwischen 0,1 bis 0,08 Einheiten vorliegen. Bei nicht kongruierenden Werten wurde die Suspension erneut durchmischt, um eventuell randständige Koloniereste von der Küvettenwand in Lösung zu bringen oder es wurde physiologische Kochsalzlösung hinzugefügt, um den entsprechenden Zielbereich von 0,1 bis 0,08 Einheiten zu erreichen. Ansonsten wurde die Suspension verworfen und erneut hergestellt. Ausgehend von dieser nun standardisierten Suspension wurde 1 µl mithilfe von physiologischer Kochsalzlösung auf ein Volumen von 1 ml verdünnt. Daraus wurde erneut 1 µl entnommen, um eine zweite Verdünnung mit einem Gesamtvolumen von ebenfalls 1 ml herzustellen. Dies entspricht einer Verdünnung von 1:1 000 000. Das gesamte Volumen der zweiten Verdünnung (1000 µl beziehungsweise 1 ml) wurde dann der Blutkulturflasche hinzugefügt. Anschließend kamen die Blutkulturflaschen in das Blutkultursystem BACTEC, welches die positiv gewordenen Blutkulturen durch ein grünes Lichtsymbol kennzeichnete. Im Anschluss zu den Vorbereitungen für RAST wurden der Routinescheibendiffusionstest und Etest® angesetzt. Für das standardisierte Empfindlichkeitsverfahren wurde gleichfalls eine Suspension, welche einer 0,5 McFarland Standardlösung entsprach, benötigt. Wie bereits zuvor beschrieben, wurde sie mithilfe von 1 ml physiologischer Kochsalzlösung

hergestellt und die korrekte Dichte mithilfe des Photometers geprüft. Innerhalb von 15 Minuten nach der Herstellung wurden 100 µl der Lösung auf die Mitte einer MH-Agarplatte pipettiert, mittels Drigalskispatel ausgestrichen und nach dem Aufbringen der Antibiotikaplättchen und dem Etest®, wie in *Abbildung 6* dargestellt, für 24 Stunden bei $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. (60) Es wurde jeweils eine MH-Agarplatte für Amoxicillin/Clavulansäure und eine für Ampicillin/Sulbactam verwendet. Dies diente der Vermeidung einer möglichen Überlappung der Hemmhofdurchmesser sowie möglicher Interaktionen beider Substanzen. (60)

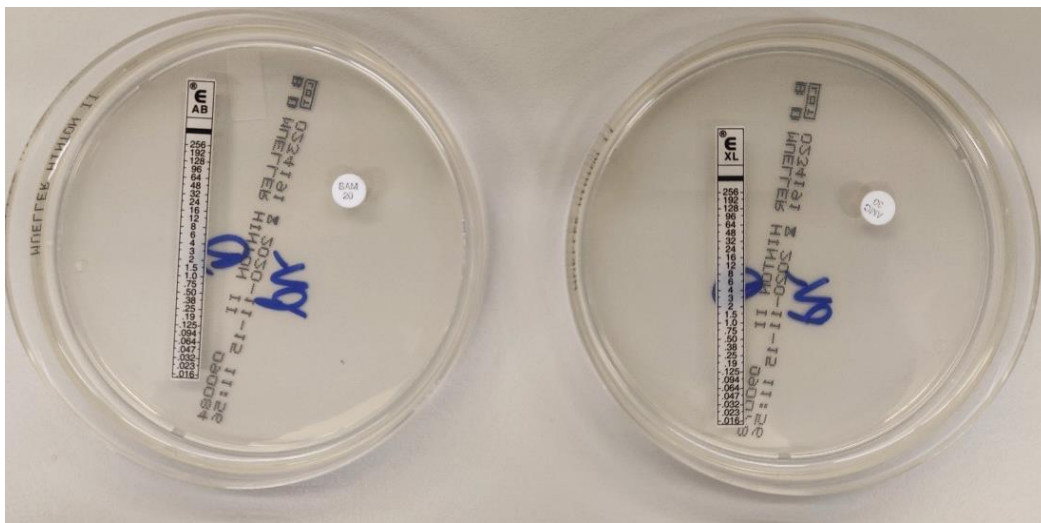


Abbildung 6: Antibiotikaplättchen und Etest® auf ausgestrichener MH-Agarplatte jeweils für Amoxicillin/Clavulansäure (rechts) und Ampicillin/Sulbactam (links)

Tag 2:

Aus den positiven gespikten Blutkulturflaschen konnte RAST entsprechend der EUCAST Empfehlungen durchgeführt werden. Die von EUCAST vorgegebene Zeitspanne von 0 bis 18 Stunden, innerhalb dieser die positiven Blutkulturen für RAST verwendet werden durften, wurde bei allen zweitägigen Arbeitszyklen eingehalten. (64) Den Leitlinien entsprechend wurden $125 \pm 25 \text{ } \mu\text{l}$ aus der positiven Blutkulturflasche entnommen, auf eine MH-Agarplatte aufgetragen und ausgestrichen. (60) Anschließend wurden die Antibiotikaplättchen für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam mittels Antibiotika Disk Dispenser aufgestempelt, wodurch ein regelmäßiger Abstand zwischen den Antibiotikaplättchen gewährleistet wurde. Jede Agarplatte enthielt insgesamt vier Antibiotikaplättchen, davon zwei für Amoxicillin/Clavulansäure und zwei für Ampicillin/Sulbactam. Die MH-Agarplatten mit den Antibiotikaplättchen kamen bei $35 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ in den Inkubator. (64) Nach bereits 4 Stunden wurden die Hemmhofdurchmesser mittels Lineals von der Vorderseite ohne Deckel von einem ausgebildetem Fachpersonal für Biomedizinische Analytik abgelesen und protokolliert. Nach weiteren zwei Stunden, also

insgesamt 6 Stunden Inkubationszeit, erfolgte die zweite Erhebung der Hemmhofdurchmesser durch die gleiche Person wie zuvor. Die sich nach 4 und 6 Stunden entwickelten Hemmhofdurchmesser sind in *Abbildung 7* ersichtlich.

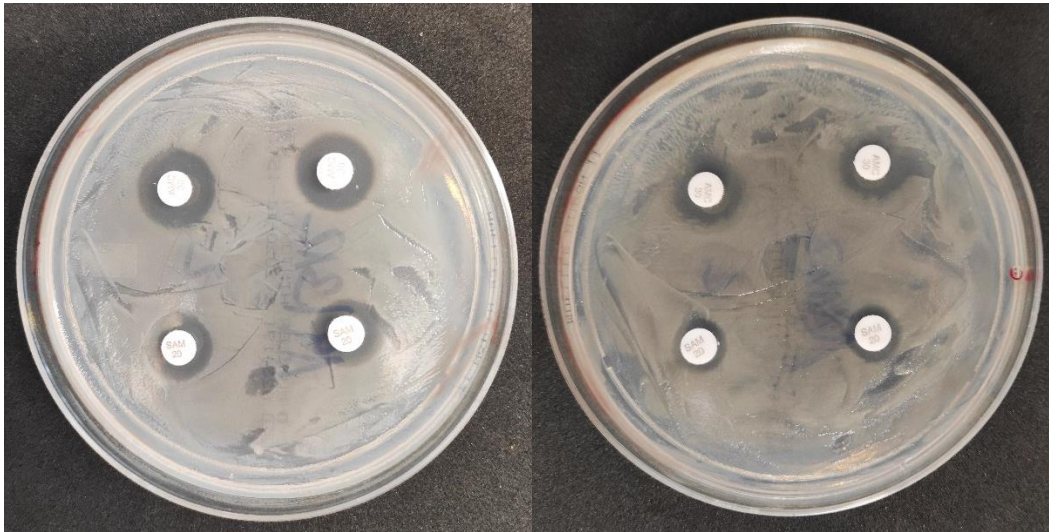


Abbildung 7: Hemmhofdurchmesser nach 6 h (links) und nach 4 h (rechts) Inkubationszeit

Da bei dem zweitägigen Arbeitszyklus immer nur eine begrenzte Zahl an *K. pneumoniae* Isolaten angesetzt wurde, konnte die von EUCAST vorgesehene Zeitspanne von 10 Minuten bis zur Reinkubation problemlos eingehalten werden. (64) Wie für RAST vorgesehen, wurden die Werte von den MH-Agarplatten von der Vorderseite ohne Deckel abgelesen. In einigen Fällen war es aufgrund zerklüfteter und somit unsicherer Begrenzungen der Hemmhofdurchmesser nicht möglich, nach bereits 4 Stunden einen Wert zu erheben. (64) Im Gegensatz zu RAST wurde beim Routinescheibendiffusionstest der Hemmhofdurchmesser von der Rückseite der Agarplatte abgelesen. Die MH-Agarplatten wurden dazu gegen Tageslicht gehalten und Werte nur dann dokumentiert, wenn ein eindeutig scharf begrenzter Rand des Hemmhofdurchmessers bestand. In *Abbildung 8* werden die Arbeitsschritte nochmals zusammengefasst.

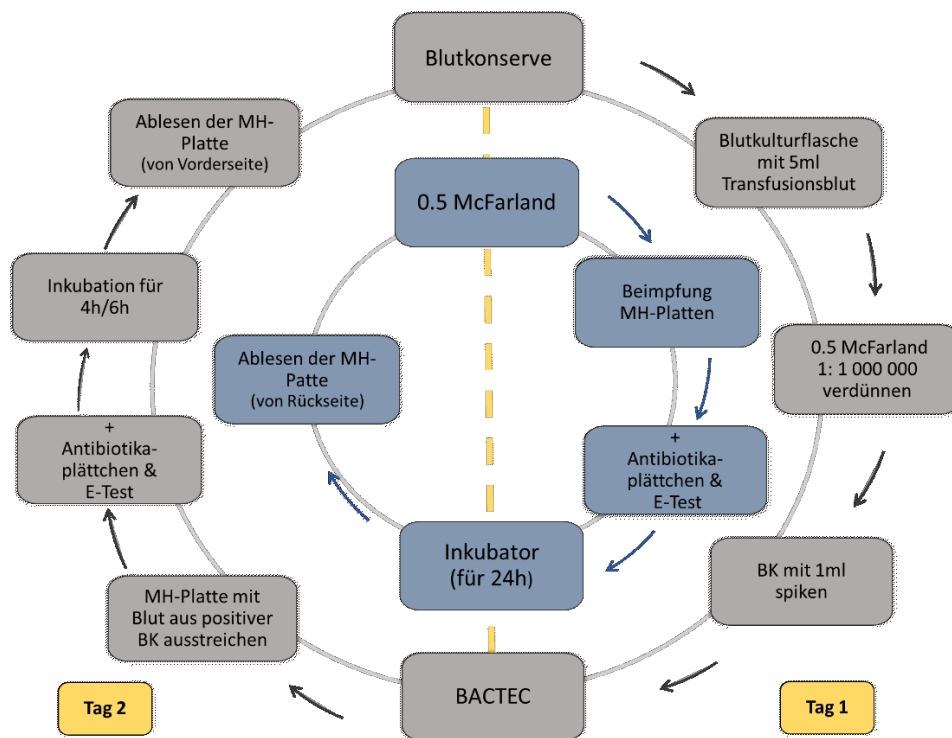


Abbildung 8: Vorgehensweise im Rahmen der Grenzwertbestimmung: Am Außenkreis wird die RAST Methode, am Innenkreis die konventionelle Empfindlichkeitstestung (AST) dargestellt

Mit einem Protokoll wurden für jede angesetzte *K. pneumoniae* Kultur die time to positivity (TTP) sowie die Hemmhofdurchmesser nach 4 beziehungsweise 6 Stunden Inkubation nach Erstellung von RAST für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam notiert. Daneben wurden ebenso die Hemmhofdurchmesser nach 24 Stunden Inkubation des konventionellen Scheibendiffusionstests sowie die MHK des Etest®-Streifens nach 24 Stunden für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam verzeichnet. Für dieses Routineverfahren existieren bereits gültige Grenzwerte für *K. pneumoniae* und Amoxicillin/Clavulansäure sowie Ampicillin/Sulbactam. Die Grenzwerte der MHK sowie der Hemmhofdurchmesser für Sensibilität und Resistenz werden in Tabellen gelistet und von EUCAST jährlich geprüft und gegebenenfalls aktualisiert. (59)

Kontrollen:

In Summe konnten durch sieben Testdurchläufe 162 Ergebnisse erhoben werden. Dabei wurde pro Testlauf *E. coli* ATCC 25922 sowohl bei der konventionellen Empfindlichkeitstestung als auch bei RAST als Positivkontrolle verwendet. Analog zur Vorgehensweise des konventionellen Empfindlichkeitstests wurde mit dem Kontrollstamm ebenfalls eine 0,5 McFarland Standardsuspension hergestellt, auf einer MH-Agarplatte ausgestrichen, die entsprechenden Antibiotikaplättchen sowie der Etest® aufgebracht und für 24 Stunden gemeinsam mit den *K. pneumoniae* Isolaten inkubiert. Bezüglich der RAST

Methode diente zur Qualitätskontrolle der Messergebnisse gleichfalls *E. coli* ATCC 25922, um bei zu großen Abweichungen der Hemmhofdurchmesser den Testlauf gegebenenfalls wiederholen zu können. Wie bei der Herstellung von *K. pneumoniae* gespickten Blutkulturen wurde die 0,5 McFarland Bakteriensuspension 1: 1 000 000 verdünnt und das gesamte Volumen von 1 ml in die Blutkulturflaschen mit 5 ml Transfusionsblut überführt. Anschließend kamen diese zeitgleich mit den *K. pneumoniae* gespickten Blutkulturflaschen in den BACTEC. Als Negativkontrolle diente ebenfalls im Doppelansatz bei jedem Testdurchlauf physiologische Kochsalzlösung.

2.1 Material

Sowohl für die Scheibendiffusionstestung als auch für die RAST Methode wurden BBL™ Müller-Hinton-II-Agar-Platten und BBL™ Sensi-Disc™ Antibiotikaplättchen von Becton Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland, verwendet. Zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration im Rahmen der konventionellen Empfindlichkeitstestung wurde der Etest® von bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Frankreich, eingesetzt. Bezogen auf die laborspezifische Ausstattung wurden zur Herstellung der Bakteriensuspension BioPhotometer® von Eppendorf, Hamburg, Deutschland, sowie das automatisierte Blutkulturgerät BACTEC™ mit den dafür geeigneten Blutkulturflaschen BACTEC™ Plus Anaerobic/F Culture Vials und BBACTEC™ Plus Aerobic/F Culture Vials von Becton Dickinson and Company, Heidelberg, Deutschland, genutzt.

3 Ergebnisse – Resultate

Es wurden 81 *K. pneumoniae* Stämme getestet. Durch einen Doppelansatz der 81 Isolate belief sich die Zahl der durchgeführten Testungen auf insgesamt 162, sowohl für die konventionelle Empfindlichkeitstestung als auch für RAST. Es wurden sieben Testläufe durchgeführt, die jeweils zwei Tage beanspruchten und sich über den Zeitraum von 26.08.2020 bis 16.10.2020 erstreckten. Zudem wurde durch den Doppelansatz garantiert, dass Stämme, die in ihren beiden Testergebnissen eine zu große Diskrepanz hinsichtlich der MHK und des Hemmhofdurchmessers aufwiesen, ein zweites Mal getestet werden konnten.

Time to positivity:

Die mit *K. pneumoniae* gespickten 162 Blutkulturflaschen zeigten durchschnittlich eine TTP von 10,43 Stunden. Das Minimum lag bei 8,28 und das Maximum bei 13,57 Stunden. Daneben wurde pro durchgeführter Testreihe, die im Mittel 12 *K. pneumoniae* Stämme jeweils im Doppelansatz umfasste, eine Positivkontrolle (*E. coli* ATCC 25922) und eine Negativkontrolle (physiologische Kochsalzlösung) ebenso im Doppelansatz mitgeführt.

Die TTP der mit *E. coli* ATCC 25922 gespikten Blutkulturflaschen lag zwischen 9,32 und 14,82 Stunden und belief sich im Durchschnitt auf 10,97 Stunden.

Festlegung der Grenzwerte:

Die nach 24 Stunden abgelesene MHK stellt einen wichtigen Parameter dar, indem sie festlegt, welche der insgesamt 162 möglichen Testergebnisse als „resistent“ oder „sensibel“ für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam zu werten sind. Konkret spricht eine MHK von ≤ 8 für das Vorliegen einer Sensibilität und eine MHK >8 für das einer Resistenz, was auf beide antiinfektiven Substanzen zutrifft. (66) Wie aus der Legende der *Abbildungen 9-12* ersichtlich, wird das mittels MHK nach 24 Stunden identifizierte Empfindlichkeitsverhalten aller 162 Kulturen farblich codiert. Das Vorliegen einer Resistenz beziehungsweise Sensibilität wird je nach ansteigender beziehungsweise abnehmender MHK mit zunehmender roter oder grüner Farbintensität wiedergegeben. Um schlussendlich die neuen Breakpoints bestimmen zu können, müssen die MHKs mit den Ergebnissen von RAST jeweils nach einer Inkubationszeit von 4 und 6 Stunden zueinander in Beziehung gesetzt werden. Dies geschieht, wie die nachfolgenden vier Diagramme der *Abbildungen 9-12* darstellen, auf grafischem Weg. Die x-Achse zeigt dabei die Testergebnisse von RAST in Form der Hemmhofdurchmesser nach einer Inkubationszeit von 4 beziehungsweise 6 Stunden, gemessen in Millimeter. Aus der y-Achse kann die absolute Anzahl der Ergebnisse mit demselben Hemmhofdurchmesser sowie die Gesamtanzahl der Messergebnisse entnommen werden. Die Legenden- und Achsenbezeichnungen sind für alle vier folgenden Diagramme der *Abbildungen 9-12* gültig. Die zentrale Rolle für die Festlegung der Grenzen für Sensibilität, Resistenz und ATU für die RAST Methode, was mit der Bestimmung der neuen Breakpoints gleichzusetzen ist, nimmt dabei, wie erläutert, die MHK ein. Der als sensibel definierte Bereich umfasst nur jene Kulturen, die nach 24 Stunden eine MHK von ≤ 8 aufwiesen, was sich in den *Abbildungen 9-12* durch einheitlich grüne Balken abzeichnet. Der resistente Bereich beinhaltet im Gegensatz dazu alle Ergebnisse mit einer MHK von > 8 und wird in den *Abbildungen 9-12* durch homogene rote Säulen erkennbar. Eine Herausforderung stellt die Festlegung des ATU Bereiches dar, da er einerseits sensibel gewertete Testergebnisse mit einer MHK mit ≤ 8 und andererseits resistent klassifizierte Ergebnisse mit einer MHK > 8 enthält. Dies zeigt sich in den *Abbildungen 9-12* anhand der rot und grün durchmischten Balken. Aufgrund der Tatsache, dass sich in diesem Bereich Testergebnisse, die nicht dasselbe Empfindlichkeitsverhalten vorweisen, gruppieren, dürfen künftige RAST Ergebnisse, welche dem ATU Bereich entsprechen, nicht kategorisiert werden.

Die einzelnen Bereiche für Sensibilität, ATU und Resistenz sind jeweils in grün, gelb und rot hinterlegt.

Bei der Abgrenzung zwischen Resistenz und ATU Bereich können major errors (ME) auftreten. Im Falle von MEs handelt es sich um Ergebnisse, die mittels MHK nach 24 Stunden als sensibel kategorisiert werden, bei RAST allerdings einen zu kleinen Hemmhofdurchmesser aufweisen. (67) Diese sind in den Grafiken als sensible und damit grün codierte Testergebnisse innerhalb einheitlich roter Balken im resistenten Bereich ersichtlich.

Die Grenze zwischen ATU und dem sensiblen Bereich wurde so gelegt, dass keine very major errors (vME) auftraten. Als vMEs werden mittels MHK nach 24 Stunden resistent gewertete Testergebnisse bezeichnet, die in der RAST Methode aber im sensiblen Bereich auftreten. (67)

Neben den MEs traten außerdem Kulturen auf, die keinen als eindeutig identifizierbaren Hemmvorhof um das Antibiotikaplättchen zeigten. Sie wurden folglich als „not readable“ deklariert und bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

3.1 Ergebnisse für Amoxicillin/Clavulansäure

3.1.1 Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit

Von den insgesamt 162 RAST Testergebnissen (aus 81 *K. pneumoniae* Isolaten) konnten 160 für die Erhebung des neuen Breakpoints für Amoxicillin/Clavulansäure nach 4 Stunden Inkubationszeit verwendet werden. Zwei Testergebnisse der 162 erwiesen sich als „not readable“. Das Empfindlichkeitsverhalten wurde zuvor, wie eingangs erwähnt, mittels Etest® durch die MHK nach 24 Stunden bestimmt. Dabei wurden von den 160 Testergebnissen 104 beziehungsweise 65 % als sensibel und 56 beziehungsweise 35 % als resistent für Amoxicillin/Clavulansäure identifiziert.

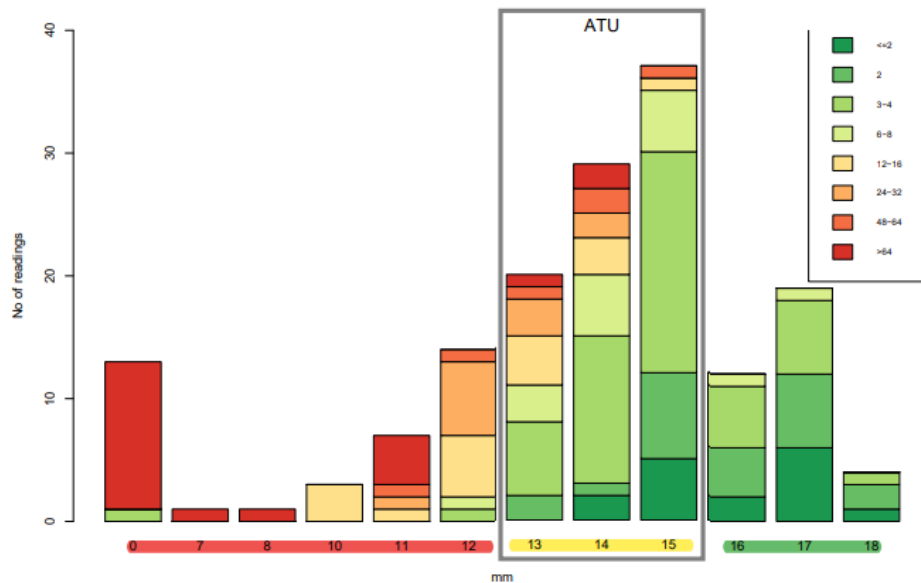


Abbildung 9: Ergebnisse für *Klebsiella pneumoniae* nach einer Inkubationszeit von 4 h für Amoxicillin/Clavulansäure

Ausgehend von den insgesamt 56 der zuvor als resistent gewerteten Ergebnisse zeigten 36 einen Hemmhofdurchmesser von 12 mm oder kleiner. Davon entfielen 12 auf 0 mm, ein Ergebnis auf 7 mm sowie 8 mm, drei auf 10 mm, sieben auf 11 mm und zwölf auf 12 mm. Daneben sind drei Kulturen, welche in der RAST Methode einen Hemmhofdurchmesser von 0 mm beziehungsweise 12 mm aufwiesen, als MEs zu werten, die aber lediglich einen Anteil von 2,9 % der insgesamt 104 sensiblen Testergebnisse darstellen. Bei einem Wert kleiner als 13 mm nach 4 Stunden kann von einer Resistenz gegen Amoxicillin/Clavulansäure ausgegangen werden. Bei einem Hemmhofdurchmesser von 13 mm war erstmals feststellbar, dass sowohl sensible als auch resistent gewertete Testergebnisse denselben Hemmhofdurchmesser in der RAST Methode zeigten. Wie aus *Abbildung 9* durch die inhomogene Farbverteilung erkenntlich, setzt sich diese bis 15 mm fort und gibt dementsprechend den ATU Bereich wieder. Insgesamt fielen 86/160 RAST Ergebnisse in den ATU Bereich, welcher 20/56 der zuvor als resistent und 66/104 der als sensibel kategorisierten Kulturen beinhaltet.

Ein Hemmhofdurchmesser von 16 mm oder größer wurde nur noch ausschließlich bei sensibel klassifizierten Ergebnissen, in Summe 35/104, erhoben. Daher ist bei 16 mm oder größer eine Empfindlichkeit für Amoxicillin/Clavulansäure nach 4 Stunden zu erwarten.

3.1.2 Ergebnisse nach 6 Stunden Inkubationszeit

Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden konnten im Gegensatz zu einer Inkubationszeit von 4 Stunden alle 162 Messergebnisse für die Grenzwertenerhebung für Amoxicillin/Clavulansäure herangezogen werden. Unter Einbeziehung des zuvor exkludierten Stammes belief sich die Auswertung nun auf 106 (65,4 %) sensibel und 56 (34,6 %) resistent gewertete Messergebnisse, bezogen auf die MHK nach 24 Stunden.

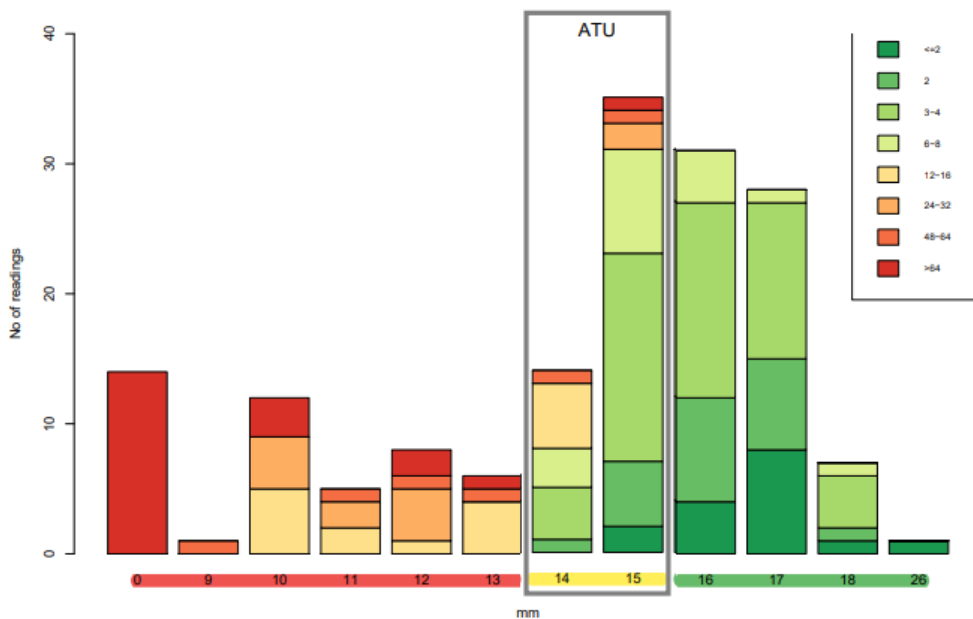


Abbildung 10: Ergebnisse für *Klebsiella pneumoniae* nach einer Inkubationszeit von 6 h für Amoxicillin/Clavulansäure

Von den 162 reinkubierten Kulturen zeigten nach 6 Stunden 46/56 der mittels MHK nach 24 Stunden als resistent klassifizierten Ergebnisse einen Hemmhofdurchmesser von 13 mm oder kleiner. Bei einem Wert kleiner als 14 mm kann daher eine Resistenz nach 6 Stunden für Amoxicillin/Clavulansäure angenommen werden. Die restlichen 10/56 der als resistent identifizierten Kulturen entwickelten einen Hemmhofdurchmesser von 14 mm oder 15 mm. Ebenso zeigten 39/106 der sensiblen Testergebnisse nach 24 Stunden in der RAST Methode nach 6 Stunden einen Hemmhofdurchmesser von 14 mm oder 15 mm. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich aufgrund des gleichzeitigen Auftretens sowohl sensibler als auch resistenter Ergebnisse bei gleichem Hemmhofdurchmesser bei 14-15 mm um den ATU Bereich handelt.

Erst bei einem Hemmhofdurchmesser von 16 mm oder größer ist es sinnvoll, von einer Sensibilität für Amoxicillin/Clavulansäure nach 6 Stunden auszugehen, was sich auch in *Abbildung 10* durch die einheitlich grüne Farbzusammensetzung der Balken verdeutlicht.

In Summe zeigten 67/106 der zuvor als sensibel identifizierten Ergebnisse einen Hemmhofdurchmesser von größer gleich 16 mm.

Die Inkubationszeiten (4 h versus 6 h) vergleichend, ist neben einem schmäleren ATU Bereich außerdem erkenntlich, dass der Anteil sensibler Messergebnisse im Bereich Sensibilität bezogen auf RAST mit zunehmender Inkubationszeit größer wurde. Der ATU Bereich verringerte sich von einer Spanne von 13-15 mm mit 86 Testergebnissen nach 4 Stunden auf ein Intervall von 14-15 mm mit 49 Testergebnissen, was die Festlegung der Grenze für den sensiblen Bereich erleichterte. Daneben konnten die Breakpoints erst nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden klar abgegrenzt werden, da keine MEs vorliegen.

3.2 Ergebnisse für Ampicillin/Sulbactam

3.2.1 Ergebnisse nach 4 Stunden Inkubationszeit

Nach 4 Stunden konnten nur 141 Testergebnisse von den maximal möglichen 162 für die Grenzwertenerhebung berücksichtigt werden. 21 Kulturen stellten sich als „not readable“ heraus. Unter den 141 Kulturen befanden sich 110 (78 %), die mittels MHK nach 24 Stunden als sensibel, und 31 (22 %), die als resistent getestet wurden.

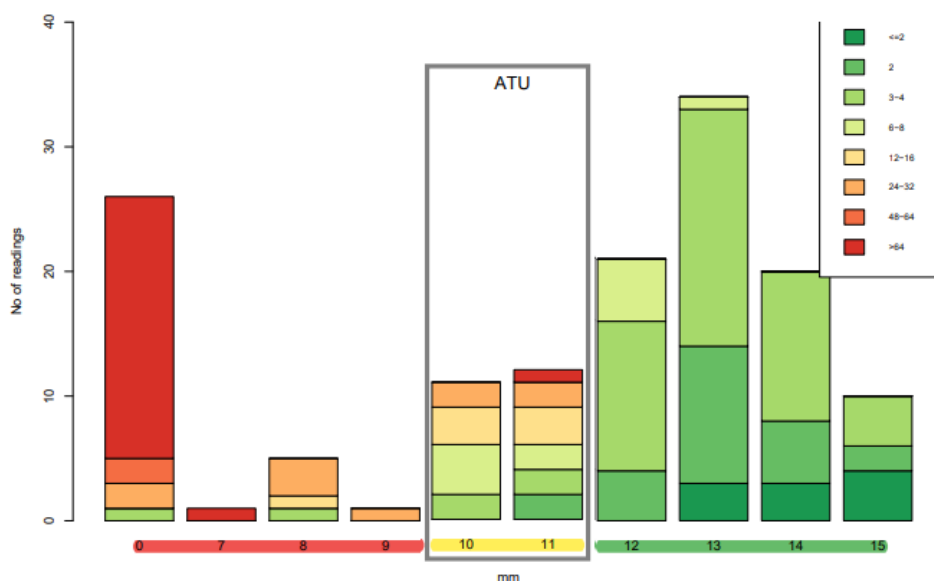


Abbildung 11: Ergebnisse für *Klebsiella pneumoniae* nach einer Inkubationszeit von 4 h für Ampicillin/Sulbactam

Der überwiegende Teil, nämlich 27/31 der mittels MHK als resistent klassifizierten Ergebnisse, zeigte einen Hemmhofdurchmesser von 0 mm. Ein resistent gewertetes Ergebnis wurde mit 7 mm und 9 mm vermessen, vier mit 8 mm, fünf mit 10 mm und sechs mit 11 mm. Die Bereiche für Resistenz sowie der ATU Bereich waren, wie aus *Abbildung 11* durch das heterogene Farbmuster hervorgeht, dennoch schwer abgrenzbar. Hierfür waren die beiden

sensibel identifizierten Kulturen, welche in der RAST Methode einen Hemmhofdurchmesser von 0 mm und 8 mm entwickelten, verantwortlich. Sie wurden dementsprechend als MEs erkannt und belaufen sich auf 1,8 % der insgesamt 110 der zuvor als sensibel gewerteten Ergebnisse. Eine Resistenz ist bei kleiner 10 mm nach 4 Stunden für Ampicillin/Sulbactam anzunehmen. Der ATU Bereich ist mit 10-11 mm abzugrenzen. Für den ATU Bereich betrachtet, wurde bei insgesamt 11 Kulturen (fünf resistente und sechs sensible) in der RAST Methode ein Hemmhofdurchmesser von 10 mm und bei 12 Kulturen (sechs resistente und sechs sensible) ein Hemmhofdurchmesser von 11 mm vermessen.

Eine Sensibilität ist bei einem Hemmhofdurchmesser von 12 mm oder größer nach 4 Stunden für Ampicillin/Sulbactam zu erwarten, was sich auch in *Abbildung 11* durch das Vorliegen einheitlich grüner Säulen präsentiert. Von den insgesamt 110 sensibel klassifizierten Testergebnissen nach 24 Stunden zeigten 96 einen Hemmhofdurchmesser von 12 mm oder größer.

3.2.2 Ergebnisse nach 6 Stunden Inkubationszeit

Gleichfalls wie bei Amoxicillin/Clavulansäure manifestierte sich auch bei Ampicillin/Sulbactam ein Unterschied hinsichtlich der Inkubationszeiten, denn nach 6 Stunden konnten wiederum alle 162 Kulturen abgelesen werden. Davon wurden nach 24 Stunden 110 (67,9 %) als sensibel und 52 (32,1 %) als resistent getestet.

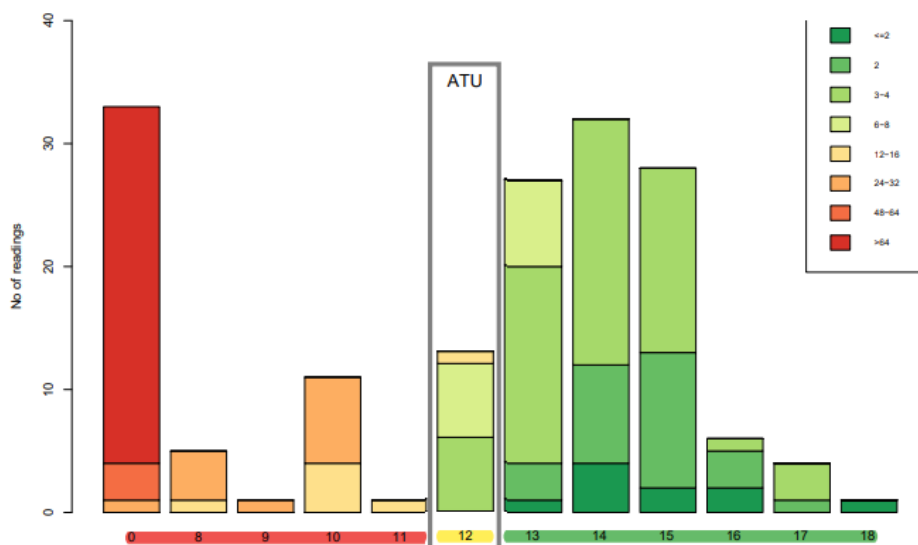


Abbildung 12: Ergebnisse für *Klebsiella pneumoniae* nach einer Inkubationszeit von 6 h für Ampicillin/Sulbactam

Auffallend an der *Abbildung 12* ist die scharfe Separation hinsichtlich des sensiblen und resistenten Bereiches bei einem Hemmhofdurchmesser von 12 mm, den sowohl zwölf

sensible Messergebnisse als auch ein resistentes Messergebnis zeigten. Daher kann angenommen werden, dass es sich bei einem Hemmhofdurchmesser von 12 mm um den ATU Bereich handelt. Von einer Resistenz ist bei einem Hemmhofdurchmesser von kleiner als 12 mm nach 6 Stunden Inkubation auszugehen, wobei insgesamt 51/52 der zuvor als resistent identifizierten Ergebnisse einen Hemmhofdurchmesser von 11 mm oder kleiner aufwiesen. Dabei zeigte der Großteil, wie es bereits nach einer Inkubationszeit nach 4 Stunden der Fall war, nämlich 33/52 der resistent gewerteten Ergebnisse, einen Hemmhofdurchmesser von 0 mm in der RAST Methode.

Eine Sensibilität ist bei einem Hemmhofdurchmesser von 13 mm oder größer nach 6 Stunden für Ampicillin/Sulbactam zu erwarten. Dabei wiesen 98/110 der zuvor mittels MHK als sensibel identifizierten Kulturen einen Hemmhofdurchmesser größer gleich 13 mm auf. Analog zu Amoxicillin/Clavulansäure ergab sich auch bei Ampicillin/Sulbactam eine Verschmälerung des ATU Bereiches von 10-11 mm mit 23 Kulturen nach 4 Stunden auf 12 mm mit 13 Testergebnissen nach 6 Stunden Inkubationszeit. Weiters waren die Grenzwerte im Gegensatz zu einer Inkubationszeit von nur 4 Stunden nach 6 Stunden eindeutig erhebbar, da keine MEs auftreten.

	4 Stunden			6 Stunden		
	S ≥	ATU	R <	S ≥	ATU	R <
Amoxicillin/ Clavulansäure	16	13-15	13	16	14-15	14
Ampicillin/ Sulbactam	12	10-11	10	13	12	12

Abbildung 13: Neu ermittelte Breakpoints für *Klebsiella pneumoniae* jeweils für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam nach 4 h und nach 6 h Inkubationszeit zusammengefasst

Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen:

Die Hemmhofdurchmesser der Positivkontrollen bei RAST waren alle wie angestrebt in derselben Größenordnung anzutreffen. Bei Amoxicillin/Clavulansäure lagen die Hemmhofdurchmesser zwischen 10 mm und 13 mm nach 4 Stunden sowie zwischen 12 mm und 14 mm nach 6 Stunden. Ampicillin/Sulbactam bildete Hemmhofdurchmesser, die sich zwischen 8 mm und 12 mm nach 4 Stunden befanden sowie einen Hemmhofdurchmesser von 13 mm oder 14 mm nach 6 Stunden. Allerdings konnten die Ergebnisse der Positivkontrollen für RAST nicht mit gültigen Werten von EUCAST verglichen werden, da noch keine „targets“ und „ranges“ für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam für Inkubationszeiten von 4 und 6 Stunden definiert wurden.

Die Ergebnisse des konventionellen Scheibendiffusionstests und Etest®-Streifens für *E. coli* ATCC 25922 nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden stimmten allesamt mit denen von EUCAST publizierten „targets“ und „ranges“ überein. (61) Bei Amoxicillin/Clavulansäure lagen nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden alle MHKs der insgesamt 14 Kontrollkulturen innerhalb der vorgegebenen „range“ von 2-8 mg/l, worunter zwei das „target“ von einer MHK von 4 mg/l erfüllten. Der Hemmhofdurchmesser befand sich mit 19, 20 oder 21 mm ebenfalls innerhalb der „range“ von 18-24 mm. Das „target“ wird mit 21 mm angegeben, was fünf Kulturen erfüllten. Auch bei Ampicillin/Sulbactam ließen sich alle MHKs innerhalb der „range“ von 1-4 mg/l oder dem „target“ von 2 mg/l wiederfinden. Weiters entsprachen die Hemmhofdurchmesser von 10 Kontrollkulturen dem „target“ von 21-22 mm. Die restlichen vier der insgesamt 14 zeigten einen Hemmhofdurchmesser von 19 mm oder 20 mm, die in die erlaubte „range“ von 19-24 mm fielen. Bei den Negativkontrollen zeigte keine der insgesamt 14 ein Wachstum.

4 Diskussion

Hauptziel dieser Studie war die Etablierung neuer Grenzwerte für *K. pneumoniae* für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam für die von EUCAST zuletzt entwickelte beschleunigte Empfindlichkeitstestung RAST. Für die Methode selbst betrachtet, hat sich ihre einfache Durchführbarkeit ohne den Gebrauch von zusätzlichen Materialien oder technischem Equipment, welches über die Grundausstattung von klinisch mikrobiologischen Laboratorien hinausgeht, während der gesamten Studie überbewährt. Darüber hinaus kann durch die Verkürzung der Inkubationszeiten auf 4, 6 und 8 Stunden die Zeitspanne bis zum Vorliegen praxisrelevanter Ergebnisse entscheidend reduziert werden. Vor allem kritisch kranke Patientinnen/Patienten könnten durch eine frühestmögliche Therapieeinleitung von der Schnelligkeit von RAST profitieren. Die praktikable Umsetzbarkeit, die Geschwindigkeit und die nutzbringende Auswirkung auf Therapieentscheidung und Outcome sprechen daher zweifelsfrei für eine universelle Implementierung in klinisch mikrobiologischen Laboratorien. Dennoch kann sie derzeit den konventionellen Empfindlichkeitstest nicht vollständig ersetzen, was zum einen an der begrenzten Verfügbarkeit für nur bestimmte Keime und zum anderen an der eingeschränkten Auswahl an antiinfektiven Substanzen liegt. Angesichts der genannten Möglichkeiten, aber auch Einschränkungen, die RAST mit sich bringt, setzte sich diese Studie zum Ziel, die Methode durch die Etablierung neuer Breakpoints zu einer umfangreicheren Anwendbarkeit zu verhelfen.

Auf die Ergebnisse und deren Differenzen Bezug nehmend sind im Folgenden die Inkubationszeiten von 4 und 6 Stunden sowie Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam gegenübergestellt. So konnte nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden nur eine begrenzte Anzahl der 162 *K. pneumoniae* Kulturen abgelesen werden, wobei Amoxicillin/Clavulansäure einen kleineren Anteil an „not readable“ Ergebnissen von nur zwei im Vergleich zu Ampicillin/Sulbactam mit 21 als „not readable“ deklarierten Kulturen verzeichnete. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden hingegen ergab sich bei beiden Substanzen eine Ablesbarkeit von 100 %. Auch EUCAST sowie Studien von Jonasson et al. und Valentin et al. publizierten eine steigende Ablesbarkeitsrate mit zunehmender Inkubationszeit. (58,62,64)

Es ließ sich auch ein Zusammenhang zwischen den Fehlerquoten und der Inkubationszeit feststellen, wobei MEs nur nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden auftraten. Bei Amoxicillin/Clavulansäure beliefen sich diese auf 2,9 %, bei Ampicillin/Sulbactam auf 1,8 % und lagen innerhalb der erlaubten Toleranzgrenze der Fehlerrate von < 3 %. (67) VMEs, das heißt Kulturen, die mittels MHK nach 24 Stunden als resistent kategorisiert werden, bei RAST allerdings im sensiblen Bereich erscheinen, kamen nicht vor, da die Breakpoints so festgelegt wurden, dass solche Ergebnisse nicht auftreten konnten.

Es zeigte sich, dass der ATU Bereich mit zunehmender Inkubationszeit schmaler wurde, was die Festlegung des sensiblen und resistenten Bereichs erleichterte. Der Grenzwert für Sensibilität blieb für Amoxicillin/Clavulansäure mit $S \geq 16$ mm nach 4 und 6 Stunden gleich, was nochmals als Indiz für die schwierige Abgrenzung von ATU zum resistenten im Vergleich zum sensiblen Bereich aufgefasst werden kann. Bei Ampicillin/Sulbactam liegt hinsichtlich des Breakpoints für Sensibilität eine Differenz von 1 mm ($S \geq 12$ mm nach 4 h und $S \geq 13$ mm nach 6 h) vor. Angesichts der Grafiken stellte sich heraus, dass sich für die Bestimmung der neuen Breakpoints vorzugsweise jene von Ampicillin/Sulbactam aufgrund ihrer erwünschten Konfiguration im Vergleich zu Amoxicillin/Clavulansäure besser eigneten. Als Musterbeispiel dient die Grafik von Ampicillin/Sulbactam nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden, in der ein schmaler ATU Bereich mit lediglich 13 von insgesamt 162 Testergebnissen vorliegt. Die restlichen 149 sensibel oder resistent klassifizierten Kulturen, einem prozentuellen Anteil von 92 % entsprechend, bildeten in der RAST Methode klar den resistenten und sensiblen Bereich. Vergleichend dazu stellt die Grafik von Amoxicillin/Clavulansäure nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden eine für eine Grenzwertbestimmung äußerst ungünstige Konstellation dar. Es zeigte sich ein sehr breiter ATU Bereich, der 86 der insgesamt 160 Testergebnisse beinhaltet. Folglich waren

nur wenige Kulturen, nämlich die verbleibenden 74, an der Bildung des resistenten und sensiblen Bereiches in der RAST Methode beteiligt. Das könnte möglicherweise die Aussagekraft der neu erhobenen Breakpoints für Sensibilität und Resistenz für Amoxicillin/Clavulansäure nach 4 Stunden in Frage stellen, da sich die Festlegung auf weniger als 50 % der vorliegenden 160 Testergebnisse bezog.

Hinsichtlich der Positivkontrollen von RAST müssten die erhobenen „targets“ und „ranges“ erst für kurze Inkubationszeiten, wie es bei RAST der Fall ist, adaptiert werden, da sie nicht mit den „ranges“ und „targets“, welche für die konventionelle Empfindlichkeitstestung gültig sind, gleichzusetzen sind. Aktuell besitzt *E. coli* ATCC 25922 zwar neben *S. aureus* ATCC 29213 und *S. pneumoniae* ATCC 49619 als Kontrollstamm für RAST von EUCAST definierte „targets“ und „ranges“, jedoch nicht für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam. (64,65) In Hinblick auf die Implementierung von RAST, die dazu gleichfalls die Durchführung von RAST mittels der Kontrollstämmen vorsieht, wäre es vernünftig, „ranges“ und „targets“ für Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam parallel zur Grenzwertermittlung zu generieren.

Limitationen:

Hinsichtlich der für die Studie verwendeten *K. pneumoniae* Stämme handelte es sich um ein äußerst homogenes Datenkollektiv, denn die Isolate stammten ausschließlich von Grazer Forschungseinheiten und Klinikinstitutionen. Durch einen Doppelansatz der insgesamt 81 Stämme erweiterte sich der Probenumfang für die Auswertung auf insgesamt 162 theoretisch mögliche Testergebnisse.

Weiters sei auf die unzureichende Verblindung im Zuge der konventionellen Empfindlichkeitstestung hingewiesen, die womöglich den Ausschluss von Isolaten und letztendlich die Gesamtzahl der maximal möglichen Testergebnisse beeinflusst haben könnte. Wie bereits erläutert, wurden die Ergebnisse des Scheibendiffusionstests und Etest®-Streifens von derselben MH-Agarplatte abgelesen, um eine zusätzliche Sicherheit des MHK Wertes durch den Hemmhofdurchmesser gewährleisten zu können. Die Gefahr bestand aber darin, dass das Ergebnis des Etest®-Streifens in Form der MHK dazu verleitete, beim Vermessen des Hemmhofdurchmessers den Wert so abzulesen, dass dieser mit dem Ergebnis der MHK hinsichtlich Sensibilität oder Resistenz übereinstimmte, um nicht aus der Studie aufgrund einer Diskrepanz ausgeschlossen zu werden. Dies könnte vor allem dann eingetroffen sein, wenn es sich um Hemmhofdurchmesser handelte, die sich an der Sensibilitäts- beziehungsweise Resistenzgrenze bewegten.

Im Hinblick auf die RAST Methode sollte hervorgehoben werden, dass sich nach einer Inkubationszeit von 4 Stunden nicht immer alle Stämme ablesbar zeigten, was bereits auch laut Angaben von EUCAST für *K. pneumoniae* zu erwarten war. (63) An dieser Stelle sei nochmals darauf aufmerksam gemacht, dass im Zuge der Studie sowohl die Ergebnisse des konventionellen Scheibendiffusionstests und Etest®-Streifens als auch von RAST nicht von zwei unabhängigen Personen, sondern von lediglich einer Person erhoben wurden. Daher wäre es mit Sicherheit sinnvoll gewesen, sowohl die MHK und Hemmhofdurchmesser des konventionellen Empfindlichkeitstests als auch die Hemmhofdurchmesser im Rahmen von RAST von zwei voneinander unabhängigen Personen ermitteln zu lassen, um Messergebnisse, die eine zu große Diskrepanz aufweisen, von der Auswertung auszuschließen.

Zudem wurden die Hemmhofdurchmesser nur nach einer Inkubationszeit von 4 und 6, nicht aber, wie im ursprünglichen EUCAST Dokument vorgesehen, auch nach 8 Stunden abgelesen. Dies liegt in den Arbeitszeiten des Laborpersonals begründet. Dennoch kann angenommen werden, dass eine Vermessung der Hemmhofdurchmesser nach 8 Stunden kaum zu einem zusätzlichen Erkenntnisgewinn geführt hätte. Schließlich beschreiben sowohl EUCAST als auch Jonasson et al., dass der Prozentsatz für die Ablesbarkeit für *K. pneumoniae* Isolate nach einer Inkubationszeit nach 6 und 8 Stunden gleich hoch lag und der ausschlaggebende Anstieg bei einer Inkubationszeit von 4 auf 6 Stunden erfolgte. (58,64)

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sowohl erwartete Ergebnisse wie die Abhängigkeit der Ablesbarkeitsraten und Fehlerquoten von zunehmender Inkubationszeit, aber auch unvorhersehbare Differenzen bedingt durch die antiinfektiven Substanzen auftraten. Letztere Gegebenheit wird vor allem durch den Vergleich der beiden Grafikkonstellationen von Amoxicillin/Clavulansäure und Ampicillin/Sulbactam ersichtlich, wobei Ampicillin/Sulbactam mit idealen Grafiken, die eine korrekte Grenzwertbestimmung erleichtern, hervorsticht. Angesichts der vielen Vorteile, die RAST bieten kann, wäre es von großer Wichtigkeit, mit weiteren Studien die neu ermittelten Breakpoints unter Berücksichtigung der angeführten Limitationen und anderen *K. pneumoniae* Stämmen zu verifizieren. Die Erstellung einer offiziellen Richtlinie für die Grenzwertbestimmung ist ein essenzielles Anliegen. Diese würde sich bei der Realisierung weiterer Studien, die das Potenzial von RAST für eine Erweiterung mittels neuer Breakpoints ebenfalls erkannt haben, sicherlich als hilfreich erweisen.

Literaturverzeichnis

1. Jassoy C, Schwarzkopf A. Hygiene, Infektiologie, Mikrobiologie. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2018.
2. Mister P, Lehman DC. Bacteremia and Sepsis. In: Mahon CR, Lehman DC, editors. Textbook of diagnostic microbiology. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2018. p. 863,864,866,867,874-877.
3. Uhle F, Lichtenstern C, Brenner T, Weigand MA. Sepsis und Multiorganversagen - Pathophysiologie der Sepsis. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2015;50(2):114–22. doi: 10.1055/s-0041-100391.
4. Groß U. Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2013.
5. Riedel S, Morse SA, Mietzner TA, Miller S, Hobden JA, Detrick B, et al. Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology. New York: McGraw-Hill Education; 2019.
6. Gastmeier P. Prävention der nosokomialen Sepsis. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM, editors. Sepsis und MODS. 5th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2015. p. 64.
7. Seifert H. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin Infect Dis* 2009;48(4):238-45. doi: 10.1086/598188.
8. Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM, Seifert H, Kern WV. Bakteriämie und Sepsis. *Der Internist* 2013;54(4):399–407. doi: 10.1007/s00108-012-3185-4.
9. Simon M. Blutkulturdiagnostik – Standards und aktuelle Entwicklungen/Blood culture diagnostics: standards and recent developments. *LaboratoriumsMedizin* 2012;36(4):199–207. doi: 10.1515/labmed-2011-0021.
10. Bodmann K-F, Huber K. Bakteriämie und Sepsis [Internet] [cited 2020 Oct 18]. Available from: https://cme.medlearning.de/pfizer/bakteriaemie_sepsis_rez/pdf/cme.pdf.
11. 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.
12. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992;101(6):1644–55. doi: 10.1378/chest.101.6.1644.
13. Brunkhorst FM, Gastmeier P, Abu Sin M. Aktuelle Aspekte zur Definition und Diagnostik der Sepsis und Antibiotikaresistenz. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2018;61(5):562–71. doi: 10.1007/s00103-018-2730-2.
14. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 2003;31(4):1250–6. doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B.

15. van der Poll T, Wiersinga WJ. Sepsis and Septic Shock. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2020. p. 991,992,994-997.
16. 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 2021 Jan 3]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/079-0011_S3_Sepsis-Praevention-Diagnose-Therapie-Nachsorge_2020-03_01.pdf.
17. Holtmann H, Nitschke J. *BASICS Medizinische Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie*. 4th ed. München: Elsevier GmbH Deutschland; 2017.
18. Möbius U, Suttorp N. Erkrankungen durch gramnegative Enterobakterien (Enterobacterales). In: Möckel M, Suttorp N, Siegmund B, Dietel M, editors. *Harrisons Innere Medizin*. 20th ed. Infektionskrankheiten, Kardiologie. Vol 2. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag GmbH; 2020. p. 1424,1425,1434-1436.
19. Kern WV. Sepsis-schwere Sepsis-septischer Schock. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2016. p. 810.
20. Levy MM, Evans LE, Rhodes A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 Update. *Crit Care Med* 2018;46(6):997–1000. doi: 10.1097/CCM.0000000000003119.
21. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017;45(3):486–552. doi: 10.1097/CCM.0000000000002255.
22. Hagel S, Forstner C, Welte T, Pletz M. Antimikrobielle Therapie. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM, editors. *Sepsis und MODS*. 5th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2015. p. 86-88,90.
23. Laupland KB. Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies. *Clin Microbiol Infect* 2013;19(6):492–500. doi: 10.1111/1469-0691.12144.
24. Bundesministerium für Arbeit, Soziales, Gesundheit und Konsumentenschutz. Resistenzbericht Österreich AURES 2018: Antibiotikaresistenz und Verbrauch antimikrobieller Substanzen in Österreich; 2018 [cited 2021 Jan 3]. Available from: https://www.ages.at/download/0/0/f1fed55f3f4bbce389ee6e9f8fd9bfe5ff1fcfb2/fileadmin/AGES2015/Themen/Arzneimittel_Medizinprodukte_Dateien/AURES/AURES_2018.pdf.
25. Brunkhorst FM. Nosokomiale Blutstrominfektionen, Antibiotikaresistenz und leitliniengerechte Blutkulturdiagnostik - eine thüringenweite prospektive populationsbasierte Erhebung; 2016 [cited 2021 Jan 18]. Available from: https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/5_Publikationen/Gesundheit/Berichte/Abschlussbericht_AlertsNet.pdf.
26. 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.
27. Krause R, Zollner-Schwetz I, Valentin T, Prattes J, Wunsch S, König E, et al. Resistenzbericht 2019: Mikrobiologisches Labor. Universitätsklinik für Innere Medizin Graz, Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin. Graz; 2020.
28. Dargère S, Cormier H, Verdon R. Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect* 2018:964–9. doi: 10.1016/j.cmi.2018.03.030.

29. Murray PR. Basic Medical Microbiology. Philadelphia: Elsevier; 2018.
30. Suerbaum S, Hornef M, Karch H. Enterobakterien. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2016. p. 238.
31. Hof H, Schlüter D. Medizinische Mikrobiologie. 7th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2019.
32. Regnath T. Manuelle und automatisierte Verfahren: Bakteriologie. In: Neumeister B, Braun R, K. Geiss H, Kimmig P, editors. Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie. 2nd ed. Stuttgart: Thieme Verlag KG; 2009. p. 166,174-175.
33. Idelevich EA, Reischl U, Becker K. Diagnostik von Blutstrominfektionen: Neue mikrobiologische Verfahren in der klinischen Praxis und Entwicklung. Dtsch Arztebl Int 2018;115(49):822–32. doi: 10.3238/arztebl.2018.0822.
34. Ewig S, Höffken G, Kern WV, Rohde G, Flick H, Krause R, et al. S3-Leitlinie: Behandlung von erwachsenen Patienten mit ambulant erworbener Pneumonie und Prävention - Update 2016 [Internet]; 2016 [cited 2021 Jan 2]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-0201_S3_ambulant_erworbene_Pneumonie_Behandlung_Praevention_2016-02-2.pdf.
35. Leitlinienprogramm DGU. Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten [Internet]; 2017 [cited 2021 Jan 16]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-0441_S3_Harnwegsinfektionen_2017-05.pdf.
36. Ziesing S, Fille M. Resistenz. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2016. p. 713–15.
37. Stahlmann R, Lode H. Antibiotika und andere Therapeutika zur antiinfektiven Therapie. In: Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Forth W, Henschler D, et al., editors. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: Für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker. 12th ed. München: Elsevier GmbH, Deutschland; 2017. p. 704,705,709,710.
38. Witte W, Mielke M. β -Laktamasen mit breitem Wirkungsspektrum. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 2003;46(10):881–90. doi: 10.1007/s00103-003-0693-3.
39. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen. Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) [Internet]; 2012 [cited 2021 Jan 2]. Available from: <https://edoc.rki.de/bitstream/handle/176904/253/21obND4dxM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
40. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. Edinburgh: Elsevier; 2021.
41. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother 2010;54(3):969–76. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
42. Ghebremedhin B. Extended-Spectrum-Betalaktamasen (ESBL): gestern ESBL - heute ESBL, Carbapenemase-Bildner und multiresistente Bakterien. Dtsch Med Wochenschr 2012;137(50):2657–62. doi: 10.1055/s-0032-1327341.

43. Girometti N, Lewis RE, Giannella M, Ambretti S, Bartoletti M, Tedeschi S, et al. Klebsiella pneumoniae Bloodstream Infection. *Medicine* 2014;93(17):298–309. doi: 10.1097/MD.000000000000111.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018. Stockholm; 2019 [cited 2020 Aug 25]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2018.pdf>.
45. European Centre for Disease Prevention and Control. Surveillance Atlas of Infectious Diseases [Internet] [cited 2021 Jan 22]. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/surveillance-atlas-infectious-diseases>.
46. Dalhoff K, Abele-Horn M, Andreas S, Deja M, Ewig S, Gastmeier P, et al. S3-Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik und Therapie erwachsener Patienten mit nosokomialer Pneumonie - Update 2017 [Internet]; 2017 [cited 2021 Jan 2]. Available from: https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/020-0131_S3_Nosokomiale_Pneumonie_Erwachsener_2017-11.pdf.
47. Brunkhorst FM, Schmitz RPH. Diagnose der Infektion und Stellenwert von Biomarkern. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM, editors. *Sepsis und MODS*. 5th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2015. p. 18–20.
48. Brunkhorst FM, Schmitz RPH. Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis. In: Werdan K, Müller-Werdan U, Schuster H-P, Brunkhorst FM, editors. *Sepsis und MODS*. 5th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2015. p. 4.
49. Hughes JA, Cabilan CJ, Williams J, Ray M, Coyer F. The effectiveness of interventions to reduce peripheral blood culture contamination in acute care: a systematic review protocol. *Syst Rev* 2018:216. doi: 10.1186/s13643-018-0877-4.
50. Kuppelwieser B. NEUES BLUTKULTUR-SYSTEM BD BACTEC™ FX [Internet]. Medizinische Universität Innsbruck, Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie; 2018 [cited 2021 Jan 3]. Available from: https://www.i-med.ac.at/hygiene/dokumente/Newsletter-15_2018.pdf.
51. AUTOMATED BLOOD CULTURE BACTEC™ 9240/9120/9050 [Internet]; 2001 [cited 2021 Jan 2]. Available from: <https://legacy.bd.com/ds/technicalCenter/clsi/clsi-9000bc2.pdf>.
52. BacT/ALERT® Kulturmedien: Colorimetrische Messung - Eine clevere Lösung [Internet]; 2018 [cited 2021 Jan 2]. Available from: <https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/bactalertr-kulturmedien>.
53. Marsik FJ, Mister P. Antimicrobial Susceptibility Testing. In: Mahon CR, Lehman DC, editors. *Textbook of diagnostic microbiology*. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders; 2018. p. 273–78.
54. Patel R. The Clinician and the Microbiology Laboratory: Test Ordering, Specimen Collection, and Result Interpretation. In: Bennett JE, Dolin R, Blaser MJ, editors. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Philadelphia: Elsevier; 2020. p. 196–97.
55. Ziesing S, Heim A, Vonberg R-P. Methoden der mikrobiologischen Diagnostik. In: Suerbaum S, Burchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 8th ed. Berlin: Springer-Verlag Berlin, Heidelberg; 2016. p. 145–46.

56. Gunnar Kahlmeter and the EUCAST Steering Committee. Redefining susceptibility testing categories S, I and R. [Internet]; 2019 [cited 2020 Oct 15]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/EUCAST_Presentations/2018/EUCAST_-_Intermediate_category_-_information_for_all.pdf.
57. Jenkins R, Maddocks S. Bacteriology methods for the study of infectious diseases. London: Elsevier; 2019.
58. 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.
59. 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.
60. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method [Internet]; 2019 [cited 2020 Sep 23]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf.
61. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. [Internet]; 2020 [cited 2021 Jan 5]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_10.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf.
62. Valentin T, Koenig E, Prattes J, Wunsch S, Loizenbaur T, Krause R, et al. Implementation of rapid antimicrobial susceptibility testing combined with routine infectious disease bedside consultation in clinical practice (RAST-ID): a prospective single-centre study. *J Antimicrob Chemother* 2021;76(1):233–8. doi: 10.1093/jac/dkaa380.
63. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Rapid AST directly from blood culture bottles [Internet] [cited 2021 Jan 3]. Available from: https://www.eucast.org/rapid_ast_in_blood_cultures/.
64. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. [Internet]; 2019 [cited 2021 Jan 3]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_methodology_v1.1_Final.pdf.
65. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles [Internet]; 2020 [cited 2021 Jan 3]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_2.1_Final.pdf.
66. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [Internet]; 2021 [cited 2021 Feb 24]. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_11.0_Breakpoint_Tables.pdf.

67. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, et al. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. *J Clin Microbiol* 2018;56(4). doi: 10.1128/JCM.01934-17.