

Diplomarbeit

**Ermitteln eines Schwellenwertes für die
Bakteriämiediagnostik mittels Whole Genome
Sequencing mit MinION Nanopore**

eingereicht von

Barbara Hofer

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Drⁱⁿ. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Innere Medizin

Klinische Abteilung für Infektiologie

unter der Anleitung von

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

Univ.-Prof. Dr. med. univ. Robert Krause

Graz, 29.07.2025

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.

Des Weiteren erkläre ich hiermit, dass, sofern bei der Erstellung dieser Arbeit Künstliche Intelligenz (KI) Werkzeuge zur Generierung und/oder Korrektur bestimmter Textpassagen verwendet wurden, dieser Einsatz unter Einhaltung ethischer Grundsätze, akademischer Integrität und den Vorgaben meiner Universität erfolgte, sowie in Folge dies transparent gemacht und in angemessener Weise gekennzeichnet wurde.

Graz, am 29.07.2025

Barbara Hofer eh.

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die mich in meinem Studium und bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an Frau Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. univ. Ines Zollner-Schwetz für die herausragende Betreuung dieser Arbeit. Auch bei meinem Zweitbetreuer Herrn Univ.-Prof. Dr. med. univ. Robert Krause möchte ich mich bedanken.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Dr. Alexander Mahnert für seine Expertise und Hilfe bedanken.

Weiterer Dank geht an das Team des Mikrobiologie Labors der Abteilung für Infektiologie, an Herrn Dr. Johannes Boyer, Frau Doritt Franz, Frau Theresa Schnur und Frau Martina Streppl für die Unterstützung bei der Laborarbeit.

Ich danke auch meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich in allem unterstützen.

Zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Familie und allen Freundinnen und Freunden bedanken, die mich in dieser Zeit begleitet und unterstützt haben.

Zusammenfassung

Hintergrund:

Blutkulturen stellen noch immer den Goldstandard in der Diagnostik von Blutstrominfektionen dar, obwohl der Diagnoseprozess lange dauert. Aufgrund der hohen Inzidenz von Blutstrominfektionen und der mit ihnen einhergehenden hohen Mortalität und Morbidität wäre eine Verkürzung dieses Diagnoseprozesses von großem Vorteil. Eine frühere Detektion eines Erregers würde frühere gezielte Therapie ermöglichen und das Outcome für Patient*innen vermutlich verbessern. In den letzten Jahren lieferten mehrere Studien vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich schnellerer Erregerdiagnostik mittels Whole Genome Sequencing mit dem MinION Nanopore (Oxford Technologies). Allerdings liegen keine konkreten Daten vor, wie hoch die Konzentration der Erreger im Blut sein muss, um noch detektiert werden zu können. Ziel dieser Arbeit war es einen Schwellenwert zu finden, ab welchem der Nachweis von *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Candida albicans* im Blut mittels Sequenzierung mit dem MinION Nanopore möglich ist.

Material/Methoden:

Erstellung von gespikten Blutproben mit *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* oder *Candida albicans*. Dafür wurden drei Verdünnungsreihen mit den jeweiligen Keimen erstellt, um Proben verschiedener Konzentration zum Sequenzieren zur Verfügung zu haben. Die Verdünnungsreihen wurden im Doppelansatz erstellt, ein Ansatz (A) jeweils mit 0.9% NaCl Lösung als Trägerlösung, der zweite Ansatz (B) mit Lithium-Heparin-Blut als Trägerlösung.

Die im Anschluss sequenzierten Verdünnungsstufen enthielten jeweils $1,5 \times 10^5$ CFU/ml, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, $1,5 \times 10^3$ CFU/ml, $1,5 \times 10^2$ CFU/ml, $1,5 \times 10$ CFU/ml und 1,5 CFU/ml. Eine Kontrolle der Konzentrationen der Proben erfolgte durch einen Ausstrich jeder einzelnen Probe des A-Ansatzes auf Schafblut-Agar. Anschließend wurde die DNA aus den Proben des B-Ansatzes extrahiert. Die extrahierte DNA wurde nach Erstellung der Library mit dem MinION Nanopore mittels Whole Genome Sequencing sequenziert. Basecalling der Daten erfolgte mit Hilfe von Dorado-0.8.2 Software, für eine weitere Analyse der Sequenzierergebnisse wurde

die qiime2-Metagenome Distribution 2024.10 Plattform und der Dem Epi2me Labs wf-metagenomics Nexflow-Workflow herangezogen.

Ergebnisse:

Die von den Kontrollplatten abgelesene Keimzahl der ausgestrichenen Proben stimmte bei allen weiterverwendeten Proben mit der erwarteten Keimzahl überein. Im durchgeführten Sequenzierlauf ließ sich *E. coli* in allen 22 sequenzierten Proben inklusive der Negativproben und der NTC („no template control“) Probe nachweisen. Ein Nachweis von *S. aureus* und *C. albicans* war in keiner der Proben möglich.

Conclusio:

Die Ermittlung des Schwellenwertes war aufgrund einer wahrscheinlichen Kontamination der Proben im Workflow und der fehlenden Detektion der eingebrachten Pathogene nicht möglich. Erneute Versuche mit besonderem Augenmerk auf Kontaminationsfreiheit und Verminderung der Dominanz der menschlichen DNA in den Proben durch „host depletion“ oder „adaptive sampling“ sind notwendig um die eingebrachten Organismen in einer ausreichenden Häufigkeit zu Samplen um einen Schwellenwert ermitteln zu können.

Abstract

Background:

Blood cultures still represent the gold standard for diagnosing blood stream infections even though the diagnostic process takes a long time. Because of the high incidence of blood stream infections and the concomitant mortality and morbidity a shortened diagnostic process would be of great advantage. Earlier detection of pathogens could lead to earlier targeted therapy and thus lead to a better patient outcome.

Over the last years several studies have shown promising results regarding faster pathogen identification using Whole Genome Sequencing with the MinION Nanopore (Oxford Technologies). However, there is no data concerning the pathogen concentration in blood needed to be able to identify these pathogens. The goal of this thesis was to determine the threshold concentration needed to be able to detect *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* in blood when sequencing with the MinION Nanopore.

Methods and Material:

Creation of spiked blood samples containing *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* or *Candida albicans*. Three dilution series were created using the respective organisms. The series were prepared in two batches, with one batch (A) using 0,9% NaCl solution as a carrier solution and the other batch (B) using lithium-heparin-blood as a carrier solution. The samples that would later be sequenced contained concentrations of $1,5 \times 10^5$ CFU/ml, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, $1,5 \times 10^3$ CFU/ml, $1,5 \times 10^2$ CFU/ml, $1,5 \times 10$ CFU/ml and 1,5 CFU/ml. A verification of the concentration of each sample was carried out by streaking every sample of the A-batch onto control plates. This was followed by DNA extraction from the samples of the B-batch, Library preparation and sequencing of the DNA with the MinION Nanopore using Whole Genome Sequencing. Basecalling was carried out using the Dorado-0.8.2 Software. Further analysis of the generated data was conducted through the qiime2-Metagenome Distribution 2024.10 Plattform and the Dem Epi2me Labs wf-metagenomics Nexflow-Workflow.

Results:

The microbial count read off the control plates corresponded to the expected microbial count in all samples that were used further.

During the sequencing run *E. coli* was detected in all 22 samples, including the negative controls and no template controls. A detection of *S. aureus* and *C. albicans* was not possible in any of the samples.

Conclusion:

A determination of a detection threshold was not possible, due to a likely contamination of the samples during the workflow and the failure to detect the introduced pathogens. Further tests, focusing on a contamination free process and reduction of the dominant human DNA, either by using host depletion or adaptive sampling, are needed to be able to detect the pathogens in a frequency that would allow determining a threshold.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	III
Zusammenfassung	IV
Abstract	VI
Abkürzungsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	2
Tabellenverzeichnis	3
1 Einleitung	4
1.1 Blutstrominfektionen	4
1.1.1 Krankheitslast und Epidemiologie von Blutstrominfektionen	5
1.1.2 Risikofaktoren von Blutstrominfektionen	7
1.1.3 Bedeutung einer raschen Therapieeinleitung	8
1.1.4 Häufigste Erreger	9
1.1.5 Staphylococcus aureus	9
1.1.6 Escherichia coli	10
1.1.7 Candida albicans	12
1.2 Diagnostik mittels Blutkulturen	13
1.2.1 Erregeridentifikation	14
1.2.2 Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit	15
1.2.3 Limitationen der Blutkulturdiagnostik	16
1.3 Whole Genome Sequencing	18
1.3.1 First Generation Sequencing	18
1.3.2 Second Generation Sequencing	19
1.3.3 Third Generation Sequencing	20
1.4 MinION Nanopore	21
1.4.1 Diagnostik von Blutstrominfektionen mit Nanopore Sequenzierung	23
1.5 Ziele der Arbeit	24
2 Material und Methoden	25
2.1 Anlage von Übernachtkulturen	25
2.2 Erstellen der Verdünnungsreihen mit S. aureus und E. coli	26
2.3 Erstellen der Verdünnungsreihen mit C. albicans	28
2.4 Codierung der Proben	29
2.5 DNA-Extraktion	30

2.6	Library Preparation.....	30
2.7	Sequenzierung.....	31
2.8	Analyse	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Keimwachstum auf den Kontrollplatten	32
3.2	Ergebnisse der Kontrollblutkulturen	34
3.3	Ergebnisse der DNA-Extraktion	34
3.4	Ergebnisse der DNA-Sequenzierung	36
3.4.1	Ergebnisse des wf-metagenomics nextflow workflow	37
3.4.2	Ergebnisse der qiime2-Metagenome Distribution 2024	38
4	Diskussion.....	41
4.1	Fehlende Detektion von <i>S. aureus</i> und <i>C. albicans</i>	41
4.2	Detektion von <i>E. coli</i> in allen Proben.....	43
	Literaturverzeichnis	45

Abkürzungsverzeichnis

AURES	Österreichischer Antibiotika Resistenz-Bericht
CFU	Colony Forming Unit
CMV	Cytomegalievirus
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphat
EARS-Net.....	European Antimicrobial Resistance Surveillance Network
EBV	Epstein Barr Virus
ESBL	Extended Spectrum Beta Lactamase
EUCAST.....	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
gDNA.....	genomische Desoxyribonukleinsäure
GPU	Graphics Processing Unit
HBV	Hepatitis B Virus
HCV.....	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
MALDI	Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
MSSA.....	Methicillin sensibler Staphylococcus aureus
NTC.....	No Template Control
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
RAST.....	Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing
TOF	time-of-flight

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: MRSA Rate in verschiedenen europäischen Ländern (2022) (40) ..	10
Abbildung 2: Resistenz gegen 3. Generations Cephalosporine / Anteil an ESBL-Bildern bei E. coli in verschiedenen europäischen Ländern (2022) (44)	12
Abbildung 3: Der MinION Nanopore (104)	22
Abbildung 4: Schema zur Erstellung des A-Ansatzes der mit S. aureus und E. coli gespikten Verdünnungsreihen.....	27
Abbildung 5: Schema zur Erstellung des B-Ansatzes der mit S. aureus und E. coli gespikten Verdünnungsreihen.....	27
Abbildung 6: Der fertige B-Ansatz mit S. aureus	28
Abbildung 7: Schema zur Erstellung des A-Ansatzes mit C. albicans	28
Abbildung 8: Schema zur Erstellung des B-Ansatzes mit C. albicans	29
Abbildung 9: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit S. aureus	32
Abbildung 10: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit E. coli.....	33
Abbildung 11: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit C. albicans.....	34
Abbildung 12: Verlauf der Porenaktivität im Laufe des Sequenzierens	36
Abbildung 13: Q-Score Diagramm des Sequenzierlaufs	37
Abbildung 14: Taxonomische Klassifikation des gesamten Sequenzierlaufs	37
Abbildung 15: Metagenom Aufschlüsselung der einzelnen Proben.....	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Inzidenz von Blutstrominfektionen in verschiedenen Regionen.....	6
Tabelle 2: Verdünnungsstufen mit entsprechender Keim-Konzentration.....	29
Tabelle 3: Keimzahl der Kontrollplatten mit <i>S. aureus</i>	32
Tabelle 4: Keimzahl der Kontrollplatten mit <i>E. coli</i>	33
Tabelle 5: Keimzahl der Kontrollplatten mit <i>C. albicans</i>	34
Tabelle 6: Ergebnisse der Qualitäts- und Konzentrationsmessungen der einzelnen Proben.....	35
Tabelle 7: Gesamtübersicht der nachgewiesenen Organismen	38
Tabelle 8: Genaue Aufschlüsselung der Read Anzahl der nachgewiesenen Organismen in den einzelnen Proben	40

1 Einleitung

1.1 Blutstrominfektionen

Von einer Blutstrominfektion spricht man, wenn ein krankheitsverursachender Organismus im Blut einer infizierten Person nachgewiesen werden kann. Sind die verursachenden Organismen Bakterien, handelt es sich um eine Bakteriämie, bei Pilzen um eine Fungämie (1). Dabei ist zu beachten, dass nicht jede Bakteriämie oder Fungämie mit einer Infektion einhergehen muss, sondern die Mikroorganismen auch transient, ohne assoziierter Infektion, im Blut nachgewiesen werden können (2). Das kann zum Beispiel nach Verletzung von Schleimhäuten im Rahmen von zahnärztlichen Behandlungen vorkommen (2). Eine Einteilung erfolgt zwischen primären Blutstrominfektionen ohne identifizierbaren Ursprung und sekundären Infektionen, die eine bekannte Quelle haben und oft im Rahmen von respiratorischen, gastrointestinalen oder urogenitalen Infektionen entstehen (1,3). Hinsichtlich des Entstehungsorts der Blutstrominfektion kann man zwischen „nosokomial“, „Gesundheitssystem-assoziiert“ und „ambulant erworben“ unterscheiden (4). Als „nosokomial“ werden Blutstrominfektionen bezeichnet, die später als 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus auftreten (4,5). „Gesundheitssystem-assoziiert“ bedeutet, dass eine positive Blutkultur innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus bei einer Person abgenommen wurde, die zuvor schon ambulant in medizinischer Behandlung war. Um die Infektion als „Gesundheitssystem-assoziiert“ werten zu können muss nach Friedman et. al einer der folgenden Punkte zutreffen: intravenöse Therapie zuhause, Wundversorgung oder Pflege durch Personal eines Pflegeheims, Hauskrankenpflege, Familie oder Freunde; selbst verabreichte intravenöse Infusion in den letzten 30 Tagen, Aufsuchen eines Krankenhauses oder einer Dialyseklinik zur Hämodialyse oder Chemotherapie in den letzten 30 Tagen, Hospitalisierungen für über zwei Tage in den letzten 90 Tagen, Bewohner eines Pflege- oder Altenwohnheims (4). Alle anderen Blutstrominfektionen, die innerhalb von 48 Stunden nach Aufnahme in ein Krankenhaus oder bei ambulanten Patient*innen auftreten, bezeichnet man als „ambulant erworben“ (4,5). Diese Differenzierung ist wichtig, da es je nach Entstehungsort Unterschiede im Patientenkontext, Erregerspektrum und vor allem Resistenzverhalten der Erreger gibt, die die Therapie und auch die Mortalität signifikant beeinflussen (4,6,7).

Weiters kann man zwischen polymikrobiellen und monomikrobiellen Blutstrominfektionen unterscheiden. Polymikrobiell bedeutet, dass zwei oder mehr Organismen innerhalb von 48 Stunden isoliert werden konnten. Wird nur ein Organismus isoliert, ist die Infektion monomikrobiell (1). Polymikrobielle Infektionen kommen bedeutend häufiger bei Gesundheitssystem-assoziierten oder nosokomialen Blutstrominfektionen vor (7,8).

Blutstrominfektionen werden oft mit Sepsis in Verbindung gebracht, weil sie, wie jede andere Infektion auch, zu Sepsis führen können. In vielen Fällen kommt es aber nicht so weit und die Infektion kann, bevor es zur Dysregulation und Organdysfunktion kommt, kontrolliert werden (9).

1.1.1 Krankheitslast und Epidemiologie von Blutstrominfektionen

Blutstrominfektionen kommen häufig vor und gehen mit einer hohen Mortalität und Morbidität einher (10). Verschiedenen Studien zufolge liegt die Gesamtinzidenz von Blutstrominfektionen in Nordamerika und Europa zwischen 189 und 307 pro 100.000 Einwohnern (11–16). Oft wird auch eine zunehmende Häufigkeit der Inzidenz im Verlauf des Beobachtungszeitraumes beschrieben, was an der immer älter werdenden Bevölkerung, einer höheren Rate an Vorerkrankungen und einer Zunahme an invasiven Eingriffen liegen könnte (11–14). Nach Schätzungen aus dem Jahr 2013, die auf den damals bekannten Inzidenzraten beruhen, treten in Europa 1.213.000 – 1.382.000 Fälle von Blutstrominfektionen pro Jahr auf (10).

Tabelle 1: Inzidenz von Blutstrominfektionen in verschiedenen Regionen

Region	Zeitraum	Inzidenz	Inzidenz Trend	Referenz
Finnland	2004-2018	216/100.000	steigend	(11)
Schweiz	2008-2014	220/100.000	steigend	(12)
Schweden	2006-2019	307/100.000 (95% CI, 304-309/100.000)	steigend	(13)
Norwegen	2002-2013	232/100.000 (95% CI, 222-242/100.000)	steigend	(14)
Dänemark	2000-2008	215/100.000 (95% CI, 210-220/100.000)	sinkend	(15)
USA	2003-2005	189/100.000 (95% CI, 174-204/100.000)	-	(16)

Die 1-Monat-Sterblichkeitsrate von Blutstrominfektionen liegt laut unterschiedlichen Quellen zwischen 12% und 20 % (7,8,11,17). Gesundheitssystem-assoziierte und nosokomiale Infektionen sind dabei mit höheren Sterblichkeitsraten assoziiert als ambulant erworbene Blutstrominfektionen (7,8,14).

Schätzungen zufolge sind Blutstrominfektionen in Europa insgesamt für 158.000-276.000 Todesfälle pro Jahr verantwortlich (10). Zusätzlich zur 1-monatigen-Sterblichkeit ist auch die Langzeitsterblichkeit bei Patient*innen mit Blutstrominfektionen stark erhöht (18).

Die Inzidenz von Blutstrominfektionen ist bei Männern höher als bei Frauen und steigt mit dem Alter an (19). Ältere Patient*innen weisen auch höhere Sterblichkeitsraten und überproportional steigende Inzidenzen auf (11,13). In einer finnischen Studie wurde beobachtet, dass der Anteil an Infektionen die ambulant erworben waren sank, während jener der Gesundheitssystem-assoziiert war anstieg (11). Auch in Norwegen stieg die Rate an Gesundheitssystem-assoziierten und nosokomialen Blutstrominfektionen im Beobachtungszeitraum (14).

Der häufigste Entstehungsgrund für Blutstrominfektionen sind Infektionen des Urogenitaltrakts. Weitere häufige Foci sind intraabdominale Infekte, respiratorische Infekte oder intravaskuläre Devices (1,8,14). Die genaue Häufigkeitsverteilung der

Foci ist auch vom Ort der Entstehung des Infekts abhängig. Eine nosokomiale Blutstrominfektion entsteht häufiger durch intravasculäre Devices und bleibt öfter ohne identifizierbaren Ursprung als ambulant erworbene oder Gesundheitssystem-assoziierte Infektionen (8).

1.1.2 Risikofaktoren von Blutstrominfektionen

Wie bei allen Infektionskrankheiten spielen Pathogenexposition und Immunstatus eine Rolle in der Entwicklung der Infektion. So erhöhen alle Faktoren, die das Immunsystem supprimieren auch das Risiko an einer Blutstrominfektion zu erkranken. Dazu zählen unter anderem: Immunsupprimierende Therapie, Autoimmunerkrankungen, Neutropenie, Lymphopenie, Komorbiditäten wie Urämie, Unterernährung, Diabetes, Herzinsuffizienz, Leber- und Nierenerkrankungen, oder immunsupprimierende Virusinfektionen wie CMV, EBV, HBV, HCV, HIV und chirurgische oder invasive Eingriffe. Auch rezente Krankenhausaufenthalte oder Inanspruchnahme von anderen medizinischen Leistungen erhöhen das Risiko, an einer Blutstrominfektion zu erkranken (2).

Stratifiziert man nach den epidemiologischen Kategorien, kann man solide Tumore, chronische Niereninsuffizienz, zentralvenöse Katheter oder vorangegangene Krankenhausaufenthalte und antibiotische Therapie als Risikofaktoren für eine nosokomiale *S. aureus* Blutstrominfektion festmachen. Bei Gesundheitssystem-assoziierten Blutstrominfektionen finden sich hingegen vermehrt Patient*innen, die zuvor in einer Langzeitpflegeeinrichtung oder einem Krankenhaus untergebracht waren, die eine höhere Anzahl an Komorbiditäten aufwiesen und eine Kortikosteroid Therapie erhielten. In der Gruppe der ambulant erworbenen Blutstrominfektionen gelten Diabetes mellitus, HIV und chronische Lebererkrankungen als Risikofaktoren (20). Patient*innen mit aktiven Krebserkrankungen, peripheren Kathetern, Träger*innen von ESBL-Bildnern (extended-Spectrum-Betalactamase) oder MRSA (Methicillin resistenter *Staphylococcus aureus*), und Patient*innen die an Katheter-assoziierten-Blutstrominfektion leiden, haben zusätzlich ein erhöhtes Risiko, dass ihre Blutstrominfektion durch multiresistente Keime ausgelöst wird (21).

Auch höheres Alter ist ein Risikofaktor für die Entwicklung von Blutstrominfektionen (19). Ältere Personen sind empfänglicher für Infektionen, da es im Alter zu vermehrten Dysfunktionen des Immunsystems, degenerativen physiologischen und

anatomischen Veränderungen, vermehrten schweren chronischen Erkrankungen und Mangelernährung kommt. Besonders gefährdet für nosokomiale Blutstrominfektionen sind ältere Patient*innen mit venösem Zugang, Harnkatheter, Dekubitus und Bettlägerigkeit (22). Infektionen in dieser Altersgruppe gehen auch mit einem erhöhtem Mortalitätsrisiko einher (11,23).

1.1.3 Bedeutung einer raschen Therapieeinleitung

Bei Sepsis-Patient*innen in Schock wurde in den ersten 6 Stunden nach Feststellung einer Hypotonie eine Steigerung der Mortalität um 7,6% pro Stunde verzögerter Therapieeinleitung beschrieben (24). Das rasche Einleiten einer passenden antimikrobiellen Therapie trägt also bei septischen und auch bakteriämischen Patient*innen wesentlich zur weiteren Entwicklung des Krankheitsverlauf bei (25,26).

Erschwert wird die zeitgerechte Einleitung einer wirksamen Therapie durch die Zunahme von resistenten Mikroorganismen (17). Im Rahmen einer retrospektiven Studie aus den USA wurde festgestellt, dass 19% aller Patient*innen mit Blutstrominfektionen eine empirische antimikrobielle Therapie erhielten, auf die der Erreger nicht empfindlich reagierte. Das Erhalten einer unpassenden empirischen Therapie kam vermehrt bei Personen vor, die mit resistenten Erregern infiziert waren und führte zu erhöhter Mortalität (27).

Auch eine Studie aus Spanien beschreibt dieselben Tendenzen. Dort wurden 24,8% aller Patient*innen initial mit einer inadäquaten empirischen Therapie behandelt. Die 14-Tage-Mortalitätsrate dieser Patient*innen lag bei 29,9%, die der Patient*innen ohne Verzögerung der adäquaten Therapie bei 13,5%. Die Verzögerung der adäquaten Therapie erhöhte also das Mortalitätsrisiko auf mehr als das Doppelte (28).

Eine weitere Studie aus England beschreibt die Verzögerung der antimikrobiellen Therapie als einzigen modifizierbaren Prädiktor für die Mortalität bei Blutstrominfektionen (29).

Diese Studien verdeutlichen die Wichtigkeit der raschen Erlangung eines Resistenzprofils des Pathogens, um die empirische antimikrobielle Therapie gegebenenfalls dementsprechend anzupassen und das Mortalitätsrisiko möglichst gering zu halten (17,27).

1.1.4 Häufigste Erreger

Die häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen in Industrieländern sind *Staphylococcus aureus*, Koagulase-negative Staphylokokken, *Enterococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella* spp. (2,30).

Obwohl die genauen Häufigkeiten stark variieren, beschreiben viele Studien *E. coli* als den insgesamt häufigsten Erreger (8,11,13,14). *Ps. aeruginosa* und Staphylokokken werden oft mit Infektionen, die nosokomial oder Gesundheitssystem-assoziiert auftreten in Verbindung gebracht, während *E. coli*, *S. pneumoniae* und andere Streptokokken vermehrt in ambulanten Infektionen isoliert werden (8,14,30).

1.1.5 Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus gehört zur Gruppe der grampositiven Kokken (31). Rund 20% der Bevölkerung sind permanent mit *S. aureus* besiedelt (32). Der häufigste Kolonisationsort ist die Nase. Diese Kolonisation erfolgt meist asymptomatisch, kolonisierte Personen haben aber ein höheres Risiko an invasiven *S. aureus* Infektionen zu erkranken als nicht kolonisierte (31).

Infektionen mit *S. aureus* betreffen oft Haut und Weichteile und sind in vielen Fällen selbstlimitierend (33,34). Diese Haut- und Weichteilinfektionen können aber auch eine Eintrittspforte für tiefer sitzende Infekte wie Blutstrominfektionen darstellen (35).

1.1.5.1 Blutstrominfektionen durch *S. aureus*

S. aureus ist einer der häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen weltweit (30). In Österreich wurden im Jahr 2022 4.440 *S. aureus* Bakteriämien gemeldet. Damit liegt die Inzidenzrate bei 48,8/100.000 und *S. aureus* ist nach *E. Coli* der zweithäufigste Erreger von Bakteriämien hierzulande (36). Laut einer Studie, die auf Daten von EARS-Net beruht, wurde von 2005 – 2018 europaweit ein Anstieg in der Inzidenz von *S. aureus* Blutstrominfektionen beobachtet. Vor allem die Rate jener Infektionen, die durch Methicillin empfindlichen *S. aureus* (MSSA) ausgelöst wurde, war im Anstieg, während die Inzidenz der *Methicillin resistenten S. aureus* (MRSA) Blutstrominfektion fiel (37). MRSA-Blutstrominfektionen machten demnach europaweit 2018 16,4% aller *S. aureus* Blutstrominfektionen aus. Die MRSA-Rate lag in Österreich 2018 bei 6,9%, 2022 lag sie bei 3,9%. Wie auch in Abbildung 1

ersichtlich, ist sie damit unter dem Europa-Schnitt und auch als fallend zu betrachten (36).

Die meisten dieser *S. aureus* Blutstrominfektionen werden durch vorangegangene Haut- und Weichteilinfektionen oder liegende Katheter ausgelöst (35). Sie sind mit einer hohen Mortalität und häufig mit Langzeitfolgen verbunden (30,38). In 5 – 10% der Fälle treten auch Rezidive auf (39).

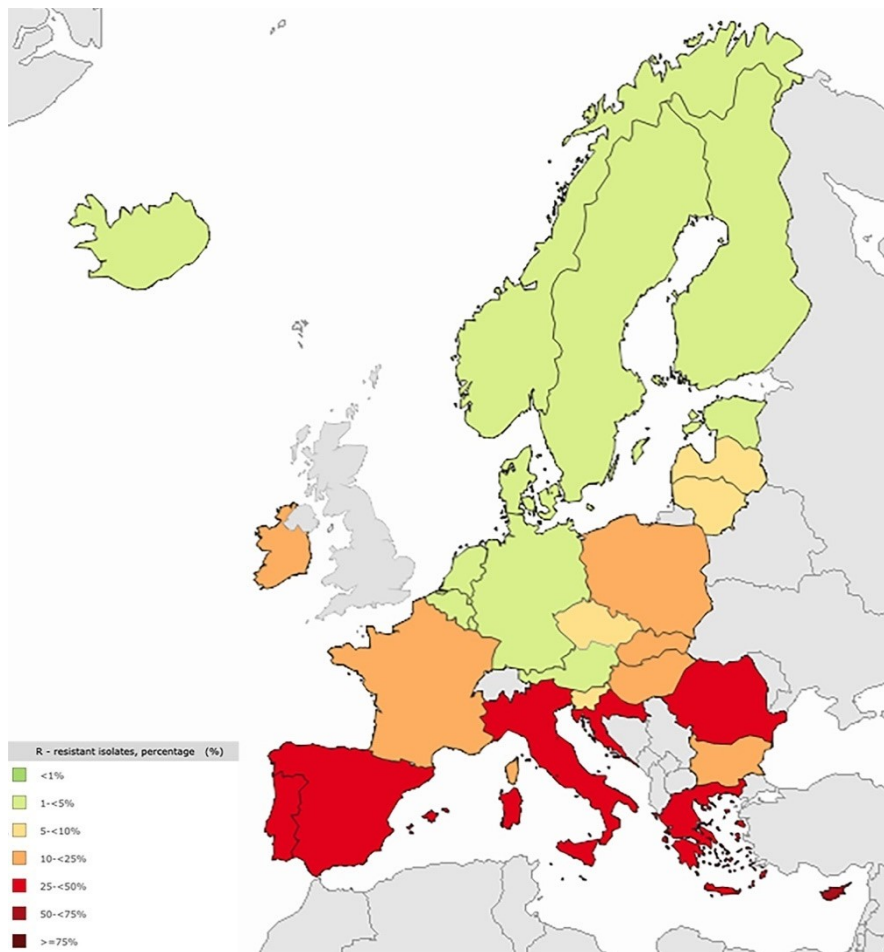


Abbildung 1: MRSA Rate in verschiedenen europäischen Ländern (2022) (40)

1.1.6 Escherichia coli

E. coli ist ein fakultativ anaerobes gramnegatives Stäbchen (41). Bei über 90% der Bevölkerung ist er als nichtpathogener Kommensale in der Darmflora nachweisbar und stellt dort den prädominanten aeroben Organismus dar (42). Gleichzeitig gibt es auch pathogene Stämme, die Infektionen des Gastrointestinaltrakts auslösen können (43). Aufgrund seiner großen Anpassungsfähigkeit haben sich extraintestinal vorkommende pathogene Stämme entwickelt, die eine häufige

Ursache für Urogenitalinfektionen, Blutstrominfektionen, Sepsis oder neonatale Meningitis darstellen (41).

1.1.6.1 Blutstrominfektionen durch *E. coli*

E. coli ist sowohl in internationalen Studien als auch in Österreich der häufigste Erreger von Blutstrominfektionen (30,36). Im Jahr 2022 wurden laut AURES-Bericht 6.886 Fälle von *E. coli* Bakteriämien erfasst, das entspricht einer Inzidenz von 75,6/100.000 (36). In den letzten Jahrzehnten gab es bei *E. coli* Probleme mit Resistenzentwicklungen (30,43). In Österreich waren 2022 46,7% der getesteten Stämme gegen Aminopenicilline, 15,3% gegen Fluorchinolone und 8,6% gegen 3. Generations Cephalosporine resistent. Die Resistenz gegenüber 3. Generations Cephalosporinen wird im AURES-Bericht auch als Richtwert für den Anteil an ESBL (Extended-Spektrum Betalactamase) bildenden *E. coli* herangezogen. Man kann also davon ausgehen, dass 8,6% der 2022 isolierten *E. coli* Proben ESBL-Bildner waren. Wie man in Abbildung 2 erkennen kann, ist diese Resistenzrate verglichen mit anderen europäischen Ländern niedrig (44). Im 5-Jahres Vergleich sind die Resistenzraten bei Aminopenicillinen und 3. Generations Cephalosporinen gleichbleibend und bei Fluorchinolonen fallend (36). Die stabil hohen Resistenzraten stellen eine therapeutische Herausforderung dar. Infektionen mit ESBL bildenden *E. coli* Stämmen sind mit 2,5 fach höherer Mortalität und längeren Krankenhausaufenthalten assoziiert (45).

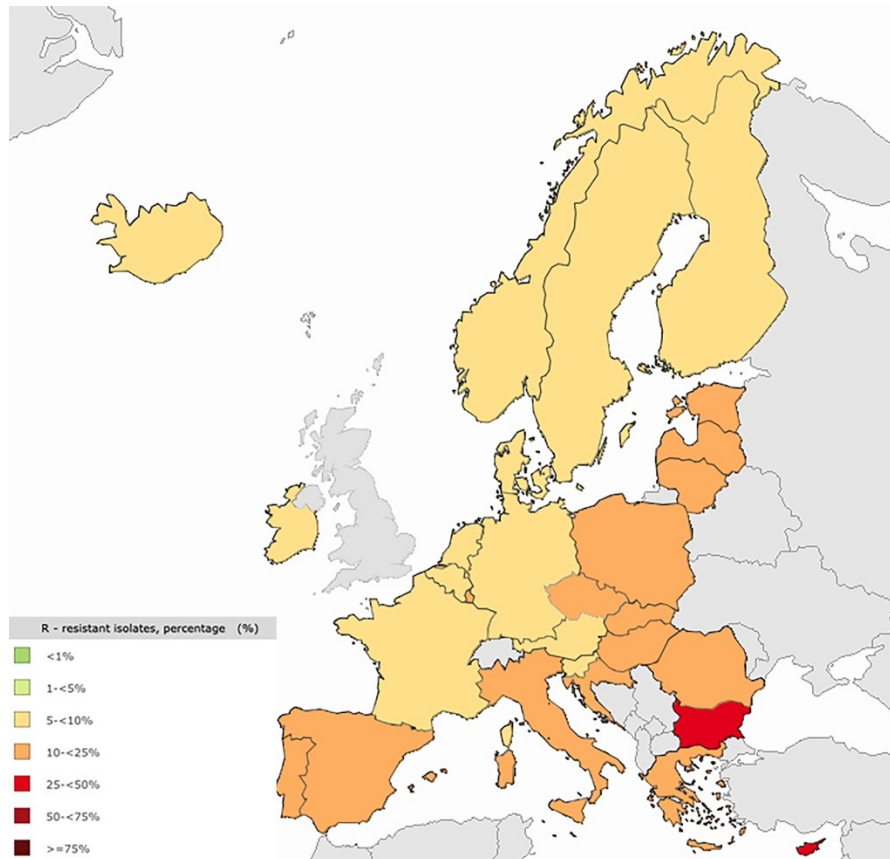


Abbildung 2: Resistenz gegen 3. Generations Cephalosporine / Anteil an ESBL-Bildern bei *E. coli* in verschiedenen europäischen Ländern (2022) (44)

1.1.7 *Candida albicans*

Candida albicans ist ein ubiquitär vorkommender Hefepilz. Wie auch *E. coli* ist er als Kommensale im Darm-Mikrobiom, in der Hautflora, im Mund oder im weiblichen Urogenitaltrakt vorhanden. Da rund 70% aller Erwachsenen von *C. albicans* kolonisiert sind, ist er der häufigste Pilz-Kommensale und gleichzeitig auch das am häufigsten isolierte Pilz-Pathogen (46). In einem immunkompetenten Wirten oder einer immunkompetenten Wirtin wird *C. albicans* durch intakte Epithelien und Schleimhäute davon abgehalten, invasiv zu werden. Kommt es aus irgendeinem Grund zur Immunsuppression des Wirtes oder Verletzungen der Schleimhaut- oder Epithel-Barriere, zum Beispiel durch periphere Venenverweilkatheter, ist *C. albicans* in der Lage, in nahezu jeden Teil des Körpers einzudringen und dort Infektionen auszulösen (47,48).

1.1.7.1 Blutstrominfektionen durch *C. albicans*

Blutstrominfektionen durch *C. albicans* sind weitaus seltener als durch *S. aureus* oder *E. coli* verursachte Blutstrominfektionen (49). Sie kommen vor allem in nosokomialen Settings vor, besonders betroffen sind Patient*innen auf Intensivstationen (50). Eine Review aus dem Jahr 2019 schätzt die Inzidenzrate für die gesamten Blutstrominfektionen durch Vertreter der Gruppe *Candida* spp. auf 3,3/100.000 (49). *C. albicans* ist der am häufigsten isolierte Vertreter dieser Gruppe, wobei eine sinkende Häufigkeit in mehreren Studien beschrieben wird, während andere Vertreter häufiger werden (36,49,51). Insgesamt wird eine steigende Inzidenz bei Candidämien beobachtet. In Österreich wurden 2022 191 Isolate von *C. albicans* aus Blutkulturen gemeldet. Österreichweit gibt es bei *C. albicans* keine großen Probleme mit Resistenzen (36).

Die Mortalitätsrate durch *Candida* Infektionen ist sehr hoch und liegt bei bis zu 40% (47,52). Das liegt einerseits daran, dass die herkömmliche Diagnostik durch Blutkulturen bei *C. albicans* sehr lange dauert und nicht sehr sensibel ist, andererseits betreffen *C. albicans* Infektionen sehr oft Patient*innen, die ohnehin immunsupprimiert oder multimorbide sind (47,51,53).

1.2 Diagnostik mittels Blutkulturen

Die gängigste Methode zur Diagnostik von Blutstrominfektionen ist die Abnahme von Blutkulturen (54). Die „Surviving Sepsis Campaign“ empfiehlt die routinemäßige Abnahme von Blutkulturen bei allen Patient*innen mit Verdacht auf Sepsis oder septischem Schock, sofern das Einleiten einer empirischen antiinfektiven Therapie damit nicht verzögert wird (55).

Die Sensitivität der Blutkulturen ist abhängig von der Anzahl an Sets, die abgenommen werden und beträgt bei zwei Sets innerhalb von 24 Stunden rund 90%, bei der Abnahme von drei Sets kann sie auf bis zu 98% erhöht werden (56–58). Dabei gibt es Unterschiede zwischen den verschiedenen detektierten Mikroorganismen. So wurden *S. aureus* Bakteriämien schon zu 90% im ersten Set detektiert, während bei *Ps. aeruginosa* und *C. albicans* nur rund 60% der insgesamt detektierten Bakteriämien/Fungämien schon im ersten Set positiv waren (56).

Für optimale Ergebnisse wird empfohlen, zwei bis vier Sets von Blutkulturflaschen (jeweils aerob und anaerob) mit 20-30ml Blut pro Set zu füllen. Die Entnahme sollte

nach Hautdesinfektion und Punktion aus einer peripheren Vene erfolgen. Es sollte keine Abnahme an liegenden Kathetern erfolgen, da hier das Risiko einer Kontamination erhöht ist (59). Eine Ausnahme besteht bei Verdacht auf Katheter assoziierte Blutstrominfektionen, hier soll ein Set vom liegenden Katheter abgenommen werden, um die Zeit zur Positivität mit einer peripher abgenommenen Kultur vergleichen zu können. Die Entnahme sollte auch vor Einleiten einer antiinfektiven Therapie erfolgen, da es bereits kurz nach Gabe von antiinfektiven Substanzen zu falsch-negativen Proben kommen kann (60). Die Standard-Inkubationszeit für Blutkulturen beträgt fünf Tage, längeres Inkubieren führt bei den gängigsten bakteriellen Erregern nicht zu einer höheren Detektionsrate und sollte deshalb nicht standardisiert stattfinden. Bei Verdacht auf Pilzinfektionen oder Infektionen mit anderen langsam wachsenden Organismen wie Mykobakterien sollte die Inkubationszeit verlängert werden (59,61).

Die Flaschen werden bei modernen automatisierten Blutkultursystemen kontinuierlich überwacht und vom System, je nach Hersteller, anhand unterschiedlicher Parameter als positiv erkannt. Bei BacT/ALERT monitorisiert man das Keimwachstum anhand farblicher Änderungen der Probe. Diese finden infolge eines Abfalls des pH-Wertes nach CO₂-Erhöhung statt. BACTEC überwacht Fluoreszenz-Änderungen der Probe, die ebenfalls nach CO₂-Erhöhung und pH-Wert-Abfall stattfinden. VersaTREK misst Druckveränderungen innerhalb der Kulturflaschen, die durch Gasverbrauch oder Gasproduktion der Mikroorganismen entstehen (62).

1.2.1 Erregeridentifikation

Da es keine europäischen Guidelines zur mikrobiologischen Diagnostik von Blutstrominfektionen gibt, werden je nach Labor und dessen Ausstattung unterschiedliche Methoden zur Erregeridentifikation und Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit verwendet. Laut einer Umfrage von Idelevich et. al aus den Jahren 2016 und 2017, die an über 200 Laboren in 25 verschiedenen europäischen Ländern durchgeführt wurde, war die gängigste Methode zur Auswertung von positiven Blutkulturen die Identifikation der Erreger mittels matrix-assistierter Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) in Kombination mit einer Flugzeitanalyse der freigesetzten Ionen (TOF) (63). Dabei werden die Proben zuerst ionisiert und dann mit Hilfe von Massenspektrometrie anhand der Flugzeit analysiert

und die Spezies identifiziert (64). Das Verfahren erfolgt entweder direkt mit Blut aus den Blutkulturen oder nach kurzer Inkubation auf festem Medium (65).

Bei der direkten Methode muss zunächst eine Lyse erfolgen, um störende Bestandteile wie das Kulturmedium, Blutzellen und menschliche Proteine zu entfernen. Danach wird die Probe zentrifugiert, ausgewaschen und erneut zentrifugiert, bevor das entstandene Pellet auf eine Target-Platte aufgetragen werden kann und vom Gerät analysiert wird. Diese Schritte können zwischen 15 Minuten und zwei Stunden in Anspruch nehmen (65).

Für die kurzzeitige Inkubation, die trotz ihrer längeren Dauer häufiger verwendet wird, werden einige Tropfen der positiven Blutkultur auf einer Agarplatte verteilt und dann für zwei bis sechs Stunden inkubiert, erst danach erfolgt die Identifikation der Kulturen mittels MALDI-TOF (63,66). Der Vorteil dieser Methode besteht in ihrer Kostengünstigkeit und, im Gegensatz zur direkten Methode, besseren Detektionsrate (abhängig von der Inkubationszeit), vor allem bei grampositiven Erregern. Ein Nachteil von MALDI-TOF ist, dass bei polymikrobiellen Infektionen nicht alle Erreger identifiziert werden können (65).

Weitere Identifikationsmethoden, die weniger häufig verwendet werden sind: Latex-Agglutination, Beimpfung von semiautomatisierten biochemischen Systemen nach kurzer Kultivierung auf Agarplatten, direkter Koagulase-Test zur Identifikation von *S. aureus* oder auf Nukleinsäure basierende Methoden wie FISH oder Multiplex-PCR (63).

1.2.2 Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit

Im Anschluss an die Erregeridentifizierung muss noch die antimikrobielle Empfindlichkeit getestet werden (54,67). Die in europäischen Laboren am häufigsten verwendete Methode zur Testung der antimikrobiellen Empfindlichkeit ist der Agardiffusionstest (67). Dafür muss eine Übernachtskultur des zu testenden Pathogens angelegt werden. Von den über Nacht gewachsenen Kolonien werden einige in eine Salzlösung überführt und vermischt. Die Dichte der Suspension kann mit einem Photometer gemessen werden und wird durch weiteres Zugeben von Kolonien oder Salzlösung so lange angepasst, bis sie bei 0,5 McFarland liegt. Anschließend wird die Suspension mit einem sterilen Tupfer gleichmäßig auf Agarplatten aufgetragen. Danach werden Antibiotika enthaltende Plättchen auf die Agarplatten aufgebracht und die Platten inkubiert. Die Inkubationszeit hängt vom

Organismus ab, meist sind 18 Stunden empfohlen. Nach der Inkubation kann die Größe der Hemmhöfe rund um die jeweiligen Antibiotikaplättchen abgemessen werden und damit anhand von Breakpoint Tabellen die antibiotische Empfindlichkeit beurteilt werden (68).

Es gibt seit 2019 eine weitere von der EUCAST entwickelte und empfohlene Methode zur schnelleren Resistenzprüfung. Bei „rapid antimicrobial susceptibility testing“ (RAST) wird Blut direkt aus der positiven Blutkulturflasche auf Agarplatten pipettiert. Nach Aufbringen der Antibiotikaplättchen wird nur vier, sechs oder acht Stunden inkubiert (je nach Erreger). Danach kann wieder, anhand einer speziellen RAST Breakpoint Tabelle, ausgewertet werden. Die Limitation dieser Methode besteht darin, dass sie nur für die gängigsten Erreger validiert ist (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*, *S. aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* und *faecium* und *Acinetobacter baumannii*) (69).

1.2.3 Limitationen der Blutkulturdiagnostik

1.2.3.1 Dauer

In den letzten Jahren gab es viele Bemühungen zur Verkürzung des Diagnoseprozesses mittels Blutkultur (66,67). Dennoch stellt die noch immer relativ lange Dauer ein Problem dar, da eine längere Zeitspanne bis zur adäquaten Therapieeinleitung mit höherer Morbidität und Mortalität assoziiert ist (25,70). Die Dauer des Gesamtprozesses ist weiterhin stark von der Dauer zur positiven Blutkultur und auch der Besetzung und Ausstattung des Labors abhängig (54). Verschiedene Studien zeigen auf, dass die Dauer des Diagnoseprozesses maßgeblich vom Zeitpunkt der Probenentnahme abhängt. Werden Blutkulturen nach Arbeitsschluss oder an Wochenenden abgenommen oder positiv, kommt es häufig zu Verzögerungen des weiteren Diagnoseprozesses und damit auch zu Verzögerungen in der Einleitung einer adäquaten Therapie (70,71). Schnellere Identifikationsmethoden wie RAST sind zwar theoretisch verfügbar, aber werden nicht so breit verwendet und sind nicht bei allen Erregern einsetzbar (63,69).

1.2.3.2 Schwer zu kultivierende Organismen

Nicht alle Organismen lassen sich gleich schnell und gut mit Hilfe einer Standard-Blutkultur kultivieren (61). Einige seltenere Erreger wie *Coxiella burnetii*, *Bartonella*

spp., *Brucella* spp. *Tropheryma whipplei*, Vertreter der Mykobakterien und Pilze wachsen nicht oder nur schlecht in herkömmlichen Blutkulturflaschen (72). Viele Mykobakterien etwa wachsen sehr langsam. Verschiedene Studien geben durchschnittlich zwei bis drei Wochen als Zeit zur Positivität an (73,74). Die Identifikation dieser Erreger muss mit Serologie, PCR oder verlängerter Inkubationszeit erfolgen und nimmt damit zusätzliche Zeit und Ressourcen in Anspruch (61,72).

1.2.3.3 Hohe Rate an Kontaminationen

Ein weiteres Problem, dass im Zusammenhang mit der Abnahme von Blutkulturen auftritt, ist die hohe Rate an falsch-positiven Proben in Relation zu richtig-positiven Proben (75). Einerseits ist das auf mangelnde Hygiene im Rahmen der Abnahme zurückzuführen, denn am häufigsten sind für die Kontamination von Blutkulturen Koagulase-negative Staphylokokken verantwortlich, die aus der Hautflora der Patient*innen stammen (76). Weitere Erreger die häufig für eine Kontamination verantwortlich sind, sind *Micrococcus* spp., *Propionibacterium acnes*, *Corynebacterium* spp. und *Bacillus* spp. (77,78).

Kontaminierte von richtig positiven Blutkulturen zu unterscheiden ist nicht einfach, da viele der Pathogene, die typischerweise für Kontaminationen sorgen, auch immer häufiger für tatsächliche Blutstrominfektionen verantwortlich sind (79). Einen Anhaltspunkt zur Differenzierung von falsch-positiven und richtig-positiven Proben kann, außer der Art des Erregers, auch die Anzahl an positiven Flaschen geben. Je höher die Anzahl der positiven Blutkulturen innerhalb eines abgenommenen Sets ist, desto wahrscheinlicher handelt es sich um eine richtig-positive Probe (80).

Andererseits stellen neben den Kontaminationen fehlende Guidelines zu korrekten Abnahme-Indikationen von Blutkulturen ein Problem dar (81). Oft werden Blutkulturen aufgrund von neu aufgetretenem oder persistierendem Fieber oder Leukozytose abgenommen, obwohl diese Marker schlechte Prädiktoren für eine Bakteriämie oder Fungämie sind (75,82,83). Weil Bakteriämien und Fungämien aber mit einer hohen Mortalität assoziiert sind, werden Blutkulturen oft aus Sorge vor Unterversorgung von Infektionen oder Angst vor dem fehlenden Ansprechen der antiinfektiven Therapie trotzdem durchgeführt (83). All diese Faktoren führen dazu, dass der Anteil an positiven Blutkulturen in vielen Studien sehr niedrig ist (3-8%)

und die falsch-positiven Proben oft bis zu 50% der Gesamtpositiven ausmachen (75,84,85).

Aufgrund des hohen Anteils an falsch-positiven Proben und weil es schwierig ist, eine Kontamination als solche zu identifizieren, werden 40-50% der Patient*innen mit falsch-positiven Proben unnötig mit Antiinfektiva behandelt. Diese Patient*innen bleiben auch längere Zeit im Krankenhaus stationär, was zu erhöhten Behandlungskosten führt (86). Zudem führt die unnötige oder unwirksame Verschreibung von Antiinfektiva zu erhöhten Resistenzraten, was wiederum das Einleiten einer wirksamen empirischen Therapie für die tatsächlich erkrankten Patient*innen erschwert (87).

1.3 Whole Genome Sequencing

Zwischen der Entdeckung der DNA-Struktur im Jahr 1953 und der erfolgreichen Etablierung von Sequenzierungstechniken der ersten Generation vergingen über zwei Jahrzehnte. Das lag unter anderem an der großen Länge der DNA-Stränge, diese ließ eine komplette Sequenzierung unmöglich wirken. Auch die Ähnlichkeit der verschiedenen DNA-Moleküle zueinander und der Fakt, dass zu dieser Zeit keine spezifischen DNasen bekannt waren, stellte Forscher*innen vor Probleme (88).

Die erste Methode zur DNA-Sequenzierung, die weite Anerkennung fand, wurde im Februar 1977 publiziert und stammt von Maxam und Gilbert. Sie basierte darauf, dass radiomarkierte DNA mit Chemikalien behandelt wurde, was dazu führte, dass der Strang an bestimmten Basen brach. Durch Gelelektrophorese konnte die Länge der gebrochenen Stränge und damit die Position der Basen bestimmt werden. Ein noch größerer Erfolg, der die folgenden 30 Jahre der DNA-Sequenzierung bestimmte, folgte im Dezember 1977, als Fred Sanger seine „Kettenabbruch-Methode“ oder „Didesoxy-Technik“ entwickelte (89).

1.3.1 First Generation Sequencing

Die Kettenabbruch-Methode basiert darauf, die normalerweise in der DNA vorkommenden Desoxyribonukleotide (dNTPs) durch chemische Analoga zu ersetzen, die keine 3'Hydroxygruppe besitzen (Didesoxynukleotide; ddNTPs).

Durch das Fehlen der 3'Hydroxygruppe kann die Extension des DNA-Strangs nach Einfügen des Analogons nicht weitergeführt werden und die Synthese der Nukleinsäure stoppt an dieser Stelle.

Um diesen Mechanismus zur Sequenzierung zu nutzen, werden vier Reaktionen parallel durchgeführt. Jede enthält einen denaturierten DNA-Stang mit Primer und jeweils dNTPs (entweder Adenin, Guanin, Cytosin oder Thymin) und entsprechende radiomarkierte ddNTPs. Die ddNTPs werden zufällig an einer Stelle eingebaut, an der eigentlich die dNTPs liegen sollten und stoppen danach die Synthese. Man erhält also sehr viele verschieden lange Ketten. Lässt man die Lösungen der vier Reaktionen anschließend über ein Polyacrylamid-Gel laufen, bilden sich durch die Radiomarkierung Banden am Gel, die die Position der jeweiligen Nukleotide anzeigen. Daran kann die Sequenz abgelesen werden (89,90).

Diese Methode war bis Mitte der 2000er der Goldstandard der Sequenzierung. Ihr Vorteil lag in ihrer großen Genauigkeit und relativ langen Länge der Reads (bis zu 1 Kilobase). Nachteile waren extrem hohe Kosten und vor allem niedriger Durchsatz, weshalb sie auch größtenteils durch „Next Generation Sequencing“ abgelöst wurde (91).

1.3.2 Second Generation Sequencing

Die zweite Generation der Sequenzierung umfasst mehrere Methoden (92). Die erste Methode, die der zweiten Generation zugeordnet wurde, war die „Pyrosequenzierung“. Hierbei werden Lichtreaktionen gemessen, die durch eine chemische Reaktion des Spaltproduktes Pyrophosphat entstehen, wenn ein Nukleotid in einen DNA-Strang eingebaut wird (93). Die Vorteile dieser Methode gegenüber der Kettenabbruch-Methode sind, dass man sie in Echtzeit messen kann und nicht mit veränderten Nukleotiden arbeiten muss (90). Erfolgreich kommerzialisiert wurde die Pyrosequenzierung Mitte der 2000er, als es 454 Life Sciences gelang, Sequenziergeräte herzustellen, die in der Lage waren, verschiedene DNA-Bruchstücke parallel zu sequenzieren. Somit konnte die Menge an DNA, die während eines Durchgangs sequenziert wurde, um ein Vielfaches erhöht werden (94).

Als Antwort auf den Erfolg dieser Technik wurden von mehreren Herstellern verschiedene Techniken entwickelt, die es ebenfalls ermöglichten, parallel zu sequenzieren (90).

Die am weitesten verbreitete Technik dieser Generation stammt von Illumina. Sie basiert auf „sequencing by synthesis“ und misst fluoreszierende Signale, die beim Einbau von dNTPs abgegeben werden. Diese Signale entstehen, weil die dNTPs zuvor mit Molekülen modifiziert wurden, die fluoreszierende Signale abgeben. Diese Moleküle nennt man „Labels“ (95).

Die Erneuerungen, die diese Generation mit sich brachte, führten zu einer drastischen Reduktion des Aufwandes und der Kosten, die ursprünglich mit dem Sequenzieren verbunden waren (90). Eine Gemeinsamkeit, die alle Methoden dieser Generation haben, ist die „short read length“. Das heißt, die Anzahl der Basenpaare, die in einem Read gelesen werden kann, liegt bei nur 50-500 (90). Das birgt den Nachteil, dass Rekonstruktion und de-novo-Assembly der sequenzierten Strukturen schwierig ist (96).

Weiters muss bei Methoden dieser Generation die DNA zuerst durch PCR amplifiziert werden, um die Signale zu verstärken und messbar zu machen (97). Durch die Amplifizierung kann ein weiteres Problem auftreten, nämlich ein Amplifizierungs-Bias, der dafür sorgt, dass bestimmte Fragmente der amplifizierten DNA über- oder unterrepräsentiert werden (98).

1.3.3 Third Generation Sequencing

Als „Third Generation Sequencing“ werden Techniken bezeichnet, bei denen die Amplifikation der DNA nicht notwendig ist und die das Sequenzieren von einzelnen Molekülen in Echtzeit möglich machen (90,99). Da die beiden am weitesten verbreiteten Technologien dieser Generation Read-Längen von bis zu 10 Kilobasen erreichen, spricht man auch von „long-read sequencing“ (96). Die längeren Reads erlauben besseres de-novo-Assembly und besseres Sequenzieren von repetitiven Regionen. Beide Technologien basieren auf unterschiedlichen Prinzipien. Pacific Biosciences misst Lichtimpulse fluoreszierender Nukleotide, während diese eingebaut werden. Jeder Lichtimpuls kann einer bestimmten Base zugeordnet werden, dadurch ergibt sich die Sequenz (99).

Oxford Nanopore Technologies hat „Nanopore-Sequencing“ entwickelt. Dabei wird ein einzelner DNA-Strang mit Hilfe eines elektrischen Potentials durch eine Pore in

einer Isoliermembran gezogen. Beim Durchtreten der Pore kommt es durch die verschiedenen Basenkombinationen zu charakteristischen Veränderungen im elektrischen Fluss, die von einem Sensor detektiert werden. Diesen Veränderungen können die Basen dann zugeordnet werden (97).

Zum Einführungszeitpunkt dieser Methode war deren größte Schwachstelle eine hohe Fehlerrate von bis zu 15% (100). In den letzten Jahren wurden diese durch bessere Algorithmen und verbesserte Poren laufend geringer, liegen aber noch immer höher als Fehlerraten der zweiten Generation. Weiter minimiert werden können Fehler durch höhere Sequenziertiefe, also vermehrtes Sequenzieren desselben Abschnittes (101).

Vorteile der Nanopore-Technologie sind kurze Sequenzierdauer, niedrige Kosten und Ortsunabhängigkeit aufgrund der geringen Größe der Geräte.

Eingesetzt werden können diese neuen Methoden bei der HLA-Typisierung, Krebsdiagnostik und Diagnostik von Infektionskrankheiten. In der Forschung werden sie aufgrund der Länge der Reads verwendet, um Genomlücken bei Referenzgenomen zu schließen oder neue Referenzgenome zusammensetzen (102).

1.4 MinION Nanopore

Der MinION wurde 2014 als erstes kommerzielles Sequenziergerät von Oxford Nanopore Technologies auf den Markt gebracht. Der MinION wiegt nur 90g und kann mittels USB3 Port mit jedem Computer verbunden werden. Eine spezielle Software (MinKNOW) muss am Computer installiert werden, um das Gerät zu bedienen und die Daten, die der MinION misst, in Echtzeit auszuwerten.

Um DNA zu sequenzieren, verwendet der MinION auswechselbare Flowcells, die auf Basis der Nanopore Technologie funktionieren. Die Flowcells besitzen jeweils 512 Kanäle, das erlaubt die gleichzeitige Analyse von bis zu 512 DNA-Molekülen (103).



Abbildung 3: Der MinION Nanopore (104)

Bevor Proben analysiert werden können, müssen sie in das richtige Format gebracht werden, um vom MinION ausgelesen werden zu können. Diesen Prozess nennt man „library preparation“. Dabei wird die DNA in kleine Stücke zerteilt und Adapter an beiden Enden der DNA-Stücke angebracht. Einer dieser Adapter verbindet sich später mit der Nanopore, hilft dabei die Flussgeschwindigkeit soweit zu verlangsamen, dass die Signale gemessen werden können und trennt die doppelsträngige DNA in zwei Einzelstränge auf (105). Danach kann der Strang anhand eines Ionen-Gradienten durch die Pore gezogen werden. Währenddessen werden die Veränderungen des elektrischen Potentials, die die Nukleotide beim Durchlaufen der Pore erzeugen, gemessen (103). Anschließend werden die Messungen den verschiedenen Basen der DNA zugeordnet, das bezeichnet man als „base calling“ (106). Zur darauffolgenden Analyse der erhobenen Werte wurden verschiedene Tools entwickelt, um die rohen Daten aufzubereiten oder zu visualisieren. Es existieren Tools zur Fehlerkorrektur, zum Zuordnen der sequenzierten Abschnitte zu bekannten Referenzgenomen („Read-Mapping“), zur Variantenerkennung, zur Echtzeitvisualisierung der gemessenen Daten und auch Tools, die ein de-novo-Assembly ermöglichen (97,103).

1.4.1 Diagnostik von Blutstrominfektionen mit Nanopore Sequenzierung

Erfolgreiche Anwendungen des MinION zur Erregeridentifizierung bei Infektionen wurden seit seiner Einführung in verschiedenen Studien beschrieben. Die Anwendungsbreite geht dabei von der Monitorisierung des Ebola Ausbruchs in Westafrika 2016, über Erregernachweise aus Urin, Blut, oder Sputum bis hin zum Erstellen von antimikrobiellen Resistenzprofilen (107–110).

Zur Diagnostik von Blutstrominfektionen gibt es nur eine Handvoll Studien. In zwei Studien aus den Jahren 2018 und 2019 wurden bakterielle Erreger erfolgreich aus positiven Blutkulturflaschen identifiziert. Die Ergebnisse bei gramnegativen Erregern waren sehr zufriedenstellend, im grampositiven Bereich gab es allerdings Probleme mit Fehlidentifizierungen. Außerdem verliert man, weil das Blut zuerst inkubiert werden muss, durch diese Vorgehensweise den Zeitvorteil, den die Sequenzierung eigentlich gegenüber der herkömmlichen Diagnostik bietet (111,112).

Die direkte, erfolgreiche Erregeridentifizierung aus Blutproben von Sepsis-Patient*innen beschrieben unter anderem Grumaz et. al 2020. Sie war innerhalb von fünf bis sechs Stunden nach der Blutabnahme möglich und war damit um ein Vielfaches schneller als die herkömmliche Diagnostik mittels Kultur. Es konnten in dieser Studie 75% der Erreger, die durch Illumina Sequenzierung detektiert wurden, auch vom MinION gefunden werden (110).

Weitere, neuere Studien beschreiben erfolgreiche Identifizierung direkt aus Blutproben in ähnlich kurzen Zeitspannen (113–115). In den Studien von Hong et. al und Han et. al aus den Jahren 2023 und 2024 wird mit Hilfe von Nanopore Sequenzierung eine höhere Detektionsrate von Blutstrominfektionen erreicht als mit herkömmlichen Blutkulturen (113,114). Verglichen mit Blutkulturen und anschließender PCR-Kontrolle der Proben, lag die Sensitivität der Nanopore Sequenzierung laut Hong et al. bei 92% und die Spezifität bei 78% (114).

Ein große Herausforderung in der erfolgreichen Erregeridentifizierung sind falsch-positive Ergebnisse (110,113,114). Da durch die Sequenzierung auch Kontaminationen, transiente Bakteriämien oder nicht lebensfähige Bakterien im Blut erkannt werden, muss noch weiter an Algorithmen zur Qualitätskontrolle gearbeitet werden, um besser zwischen falsch-positiven und richtig-positiven Ergebnissen

differenzieren können. Das Miteinbeziehen anderer Laborergebnisse und der Klinik der Patient*innen ist hierbei wesentlich (113).

Die Bestimmung der antimikrobiellen Resistenzen betreffend, gibt es auch vielversprechende Ergebnisse.

Sakai et al. gelang es, mit dem MinION ESBL-produzierende gramnegative Bakterien aus Blutkulturflaschen nachzuweisen und somit nicht nur die Erreger zu identifizieren, sondern auch eine Aussage über die antimikrobielle Empfindlichkeit zu treffen (112). Auch Chan et al. beschrieben, dass eine erfolgreiche Erstellung eines antimikrobiellen Profils von *Mycobacterium tuberculosis* Proben mit Hilfe von MinION möglich war (116).

Han et al. suchten mit Hilfe der Nanopore Sequenzierung nach bekannten Resistenzgenen und verglichen die Ergebnisse mit denen herkömmlicher Agardiffusionstests. Dabei stellten sie fest, dass sich die Ergebnisse in 80% der untersuchten Proben deckten. Es war möglich, alle ESBL-bildenden Erreger mittels Nanopore Sequenzierung zu identifizieren, allerdings konnten nur 54% der Carbapenem-Resistenzen erkannt werden.

Der Nachweis von Resistenzen ist noch weitaus schwieriger als die richtige Identifikation des Erregers und stark davon abhängig, dass neue Mutationen von Resistenzgenen zeitnahe in Resistenzdatenbanken eingepflegt werden. Außerdem ist zu beachten, dass mit dieser Methode lediglich das Vorhandensein oder Fehlen von Resistenzgenen, also ein resistenter oder empfindlicher Genotyp nachgewiesen wird (113). Der Nachweis eines resistenten oder empfindlichen Genotyps muss nicht bedeuten, dass auch ein entsprechender Phänotyp vorliegt (117).

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, wie hoch die Konzentration bestimmter Erreger im Blut sein muss, um sie mittels Whole Genome Sequencing mit dem MinION Nanopore detektieren zu können. Es sollten Schwellenwerte für *S. aureus*, *E. coli* und *C. albicans* ermittelt werden.

2 Material und Methoden

Laut verschiedener Quellen liegt die Bakterienkonzentration bei Blutstrominfektionen in der Regel zwischen 1 und 10 CFU/ml (118–120).

Um möglichst realistische Bedingungen nachzustellen und Blutproben mit bekannter Keimkonzentration zum Sequenzieren zur Verfügung zu haben, wurden Verdünnungsreihen erstellt. Dafür wurde Blut von gesunden freiwilligen Spender*innen mit den oben genannten Keimen versetzt, ein entsprechendes Votum der Ethikkommission liegt vor.

Das gespendete Blut wurde an den Tagen der Erstellung der Verdünnungsreihen in 5ml Lithium-Heparin-Vacuetten abgenommen, zusätzlich wurde von jeder Spenderin und jedem Spender ein Paar Blutkulturen (aerob und anaerob; BD BACTEC™) abgenommen und inkubiert, um auszuschließen, dass bereits eine Blutstrominfektion vorlag.

Die Erstellung der gespikten Blutproben fand im Juni 2024 im Mikrobiologie Labor des Instituts für Infektiologie am LKH Graz statt.

2.1 Anlage von Übernachtskulturen

Zur Erstellung der Suspensionen, die den Ausgangspunkt der Verdünnungsreihen bildeten, wurden zunächst auf Columbia-Blut-Agarplatten Übernachtskulturen von Referenzstämmen von *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922) und *C. albicans* (ATCC 10231) angelegt.

Für die Herstellung der Ausgangssuspensionen, die jeweils einer Trübung von 0,5 McFarland entsprachen, wurden von den Platten mit den Referenzstämmen einzelne Kulturen mit einer Öse übernommen und mit 0,9% NaCl Lösung versetzt. Die Trübung der Suspension wurde mit einem Photometer (DensiCheck, BioMerieux) kontrolliert und auf 0,5 McFarland eingestellt. Eine Trübung von 0,5 McFarland entspricht bei *E. coli* und *S. aureus* einer Bakterienkonzentration von $1,5 \times 10^8$ CFU/ml (68). Bei *C. albicans* entspricht 0,5 McFarland einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ CFU/ml (121).

2.2 Erstellen der Verdünnungsreihen mit *S. aureus* und *E. coli*

Die Erstellung der Verdünnungsreihen mit *S. aureus* und *E. coli* erfolgten nach demselben Prinzip. Ausgangspunkt bildeten jeweils die beiden 0,5 McFarland Suspensionen mit *S. aureus* und *E. coli*, diese entsprachen jeweils einer Konzentration von $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

Ein Pilotversuch ergab, dass auf Kontrollplatten jener Verdünnungsstufen, die mit Blut aus Lithium-Heparin-Röhrchen angefertigt wurden, weniger CFU als erwartet wuchsen. Dies könnte auf eine antimikrobielle Aktivität von Heparin zurückzuführen sein (122). Um trotzdem eine Möglichkeit zu haben, die Keimkonzentration in den Proben zu kontrollieren, wurde entschieden, die Verdünnungsreihen im Doppelansatz zu erstellen. Der A-Ansatz wurde zur Gänze mit 0,9% NaCl Lösung als Trägermedium durchgeführt. Die Proben des A-Ansatzes wurden später auf Kontrollplatten ausgestrichen, um die Konzentration der einzelnen Verdünnungsstufen ohne den Einfluss von Heparin überprüfen zu können.

Der zeitgleich erstellte B-Ansatz wurde ab der dritten Verdünnungsstufe, die einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ CFU/ml entspricht, mit Lithium-Heparin-Blut von gesunden Spender*innen als Trägermedium erstellt. Damit sollen realitätsnahe Bedingungen für die spätere Extraktion und Sequenzierung der Proben des B-Ansatzes nachgestellt werden.

Die Verdünnung der einzelnen Stufen betrug jeweils 1:10. Für den ersten Schritt wurden 300 µl der 0,5 McFarland Suspension in 2700 µl 0,9% NaCl pipettiert und anschließend gevortext. Diese erste Verdünnungsstufe entsprach einer Konzentration von $1,5 \times 10^7$ CFU/ml. Aus der so entstandenen Suspension wurden wieder 300 µl in 2700 µl 0,9% NaCl Lösung pipettiert und gevortext. Diese Schritte wurden noch insgesamt sechsmal wiederholt. Die so entstandenen Verdünnungsstufen entsprachen den Konzentrationen $1,5 \times 10^7$ CFU/ml, $1,5 \times 10^6$ CFU/ml, $1,5 \times 10^5$ CFU/ml, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, $1,5 \times 10^3$ CFU/ml, $1,5 \times 10^2$ CFU/ml, $1,5 \times 10$ CFU/ml und 1,5 CFU/ml.

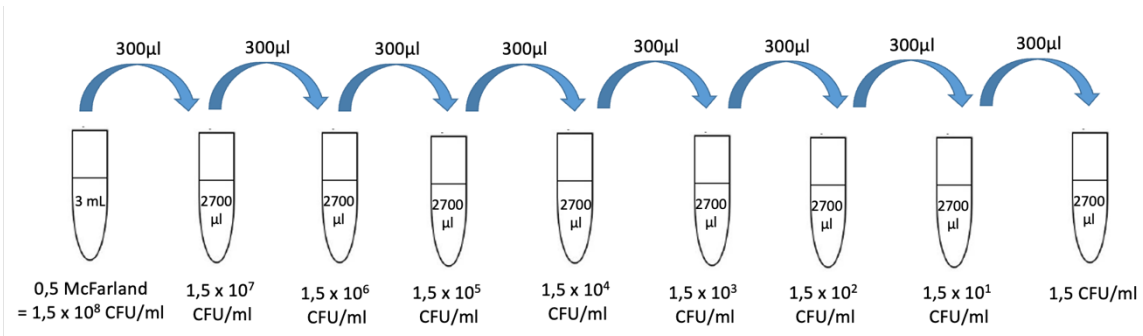


Abbildung 4: Schema zur Erstellung des A-Ansatzes der mit *S. aureus* und *E. coli* gespikten Verdünnungsreihen

Für die B-Ansätze wurde nur bei den ersten beiden Verdünnungsstufen 0,9% NaCl Lösung als Trägermedium verwendet, ab der dritten Stufe wurden 300 µl in 2700 µl Lithium-Heparin-Blut pipettiert. Bei diesem Ansatz wurde in DNA-freie 5ml Eppendorf Tubes pipettiert.

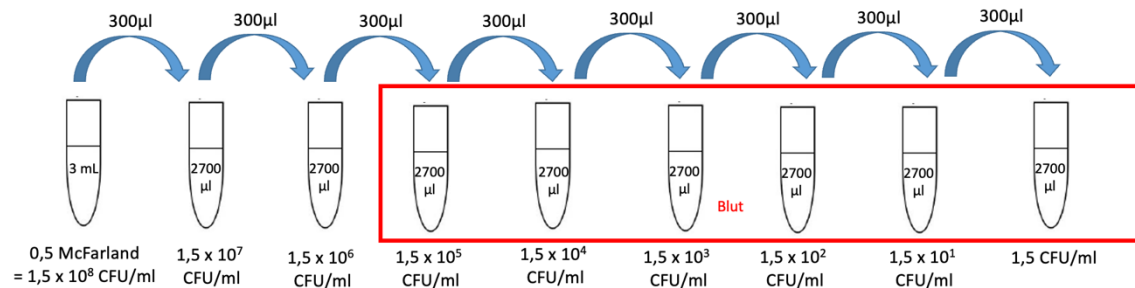


Abbildung 5: Schema zur Erstellung des B-Ansatzes der mit *S. aureus* und *E. coli* gespikten Verdünnungsreihen

Zusätzlich zu den Verdünnungsstufen wurde bei jedem B-Ansatz eine Negativprobe hergestellt, die nur aus 2700 µl Spender*innenblut bestand. Von sämtlichen erstellten Verdünnungsstufen der beiden Ansätze und den Negativproben wurden zur Kontrolle der Keimzahl jeweils 100 µl auf Schafblut-Agar-Platten pipettiert und verstrichen. Im Anschluss wurden die im B-Ansatz erstellten Blutproben eingefroren, um später die DNA zu extrahieren und die Proben zu sequenzieren. Sämtliche Kontroll-Platten wurden bei 35°C für 24h inkubiert, anschließend wurde die Keimzahl abgelesen und kontrolliert.

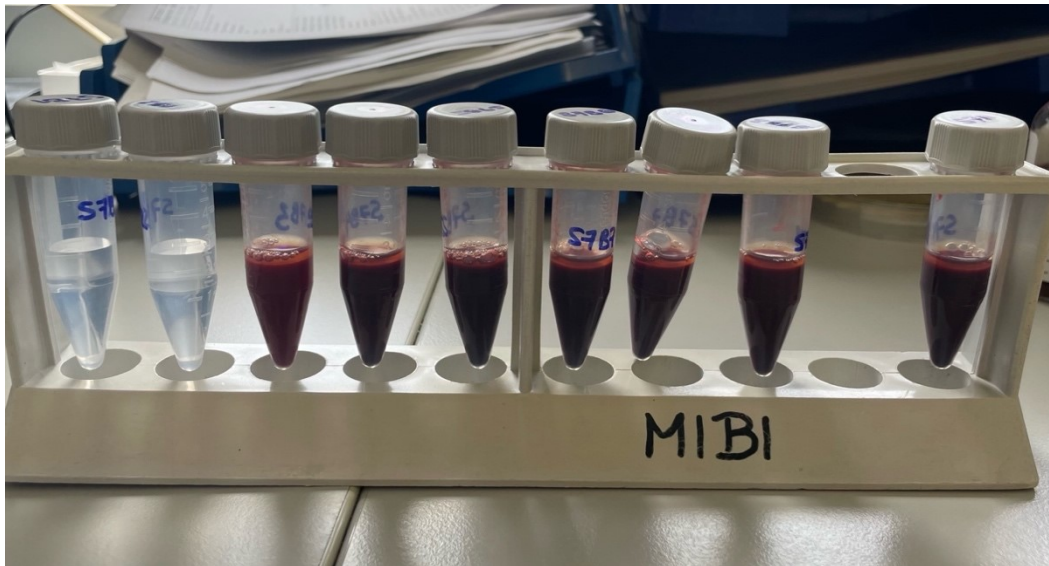


Abbildung 6: Der fertige B-Ansatz mit *S. aureus*

2.3 Erstellen der Verdünnungsreihen mit *C. albicans*

Da eine Trübung von 0,5 McFarland bei *C. albicans* einer Konzentration von $1,5 \times 10^6$ CFU/ml entspricht, waren zwei Verdünnungsstufen weniger notwendig um eine Verdünnungsstufe mit einer Konzentration von 1,5 CFU/ml zu erreichen (121). Der erste Ansatz wurde wieder zur Gänze mit 0,9% NaCl Lösung erstellt.

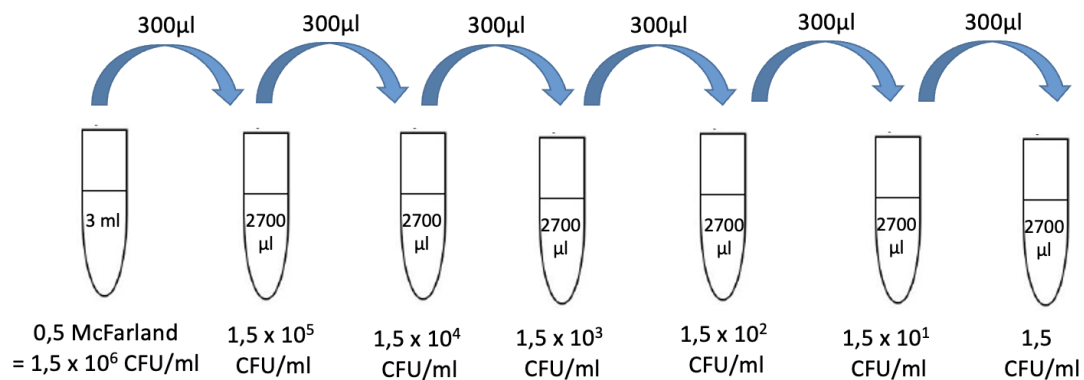


Abbildung 7: Schema zur Erstellung des A-Ansatzes mit *C. albicans*

Der B-Ansatz wurde zur Gänze mit Spender*innenblut durchgeführt, da hier bereits die erste Verdünnungsstufe einer Konzentration von $1,5 \times 10^5$ CFU/ml entspricht. Auch von diesen beiden Ansätzen wurde von sämtlichen Verdünnungsstufen jeweils 100µl auf Schafblut-Agar-Platten pipettiert. Die erstellten Proben des B-

Ansatzes wurden eingefroren, die Platten bei 35°C 24h inkubiert und anschließend die Keimzahl darauf kontrolliert.

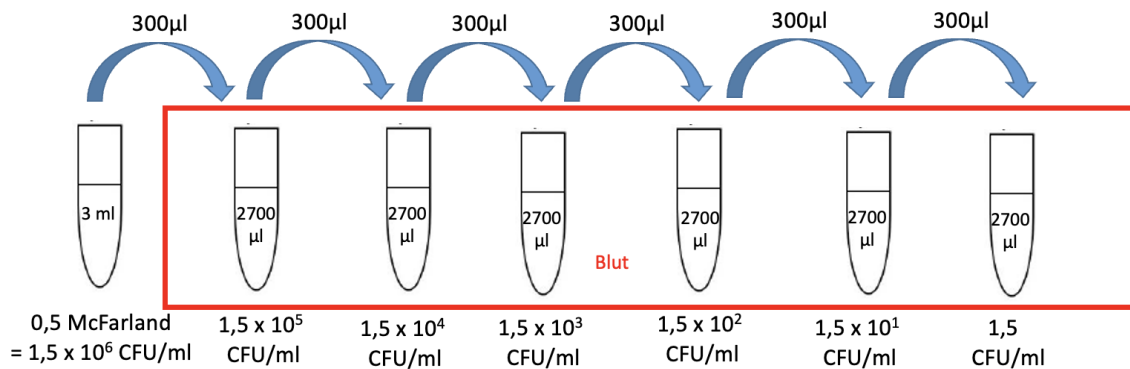


Abbildung 8: Schema zur Erstellung des B-Ansatzes mit *C. albicans*

2.4 Codierung der Proben

Zur Codierung der erstellten Proben wurde ein System entwickelt. Der erste Buchstabe steht für den hinzugefügten Keim (C = *C. albicans*, E= *E. Coli*, S= *S. aureus*). Die darauffolgende Zahl ist die Nummer des Probanden. Danach folgt entweder A für den A-Ansatz mit 0,9% NaCl als Trägermedium oder B für den B-Ansatz mit Blut als Trägermedium. Die letzte Zahl steht für die Verdünnungsstufe, die entsprechende Konzentration ist der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen, ein N anstelle der letzten Zahl steht für die Negativkontrolle.

Tabelle 2: Verdünnungsstufen mit entsprechender Keim-Konzentration

Verdünnungsstufe	CFU/ml
1	$1,5 \times 10^7$
2	$1,5 \times 10^6$
3	$1,5 \times 10^5$
4	$1,5 \times 10^4$
5	$1,5 \times 10^3$
6	$1,5 \times 10^2$
7	$1,5 \times 10^1$
8	1,5

2.5 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion erfolgte im November 2024 durch Frau Doritt Franz vom Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz. Es wurden nur jene Proben weiterverarbeitet, die Blut als Trägerlösung enthielten. Also jeweils die Verdünnungsstufen mit $1,5 \times 10^5$ CFU/ml, $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, $1,5 \times 10^3$ CFU/ml, $1,5 \times 10^2$ CFU/ml, $1,5 \times 10$ CFU/ml und $1,5$ CFU/ml des B-Ansatzes aller 3 Verdünnungsreihen plus jeweils eine Negativkontrolle. Die DNA der insgesamt 21 Proben wurde mit dem QiaSymphony DSP DNA Midi Kit (Qiagen) laut Angaben des Herstellers extrahiert (123). Als Elutionspuffer wurde 200µl ATE Buffer (Qiagen) verwendet.

2.6 Library Preparation

Die Library Preparation wurde unter der Anleitung von Dr. Alexander Mahnert (Diagnostik & Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin) am Zentrum für Medizinische Forschung im März 2025 von Theresa Schnur und Martina Strepfl der Core Facility Molecular Biology durchgeführt. Die Proben wurde mit dem Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24) der Firma Oxford Nanopore gemäß dem Ligation sequencing gDNA Protokoll (NBE_9169_v114_revU_30Jan2025) des Herstellers präpariert. Bei diesem Kit wird jede Probe mit einem individuellen Barcode versehen, danach können die Proben gepoolt ligiert und anschließend sequenziert werden (124).

Als Negativkontrolle für die Library wurde in diesem Arbeitsschritt auch eine „no template control“ (NTC) Probe erstellt. Diese Probe durchläuft denselben Arbeitsprozess wie alle anderen Proben enthält als Ausgangsmaterial jedoch anstelle des gespikten Vollbluts nur die Reagenzien der Library. Die Probe dient als Monitor für Kontamination, da sie kein genetisches Material enthält sollte sie später beim Sequenzieren keine bzw. nur einige wenige Reads generieren.

2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte durch Dr. Alexander Mahnert am Diagnostik & Forschungsinstitut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin im April 2025. Zur Sequenzierung wurde der MinION Nanopore mit einer R10.4.1 Flowcell (FLO-MIN114) (beides von Oxford Nanopore) verwendet. Ein Scan der Flowcell zur Qualitätskontrolle zeigte vor Start des Sequenzierens 1037 aktive Poren. Der Run lief für 72h mit 400 Basen pro Sekunde.

2.8 Analyse

Die Analyse der Daten erfolgte ebenfalls durch Dr. Alexander Mahnert im April 2025. Das sequenzierte Rohsignal wurde durch Simplex und Duplex GPU Basecalling in DNA-Basen übersetzt. Dafür wurde die Dorado-0.8.2 Software und das für die R10.4.1 Flowcell optimierte `dna_r10.4.1_e8.2_400bps_sup_v5.0.0` superior Basecalling-Modell (Oxford Nanopore) verwendet.

Die Annotation der Sequenzen erfolgte mit dem EPI2ME Labs wf-metagenomics Nexflow-Workflow v2.12.1 (125). Diese Pipeline umfasst die folgenden Schritte: Konkatenieren der Input Dateien und Erstellung von Sequenzierstatistiken, taxonomische Klassifizierung der Sequenzen mit Kraken2 anhand der PlusPFP-8-Referenzdatenbank, Identifikation von antimikrobiellen Resistenzgenen mittels ABRicate, und abschließend eine Berechnung der Diversitätsindices sowie die Erstellung von Tabellen, Balken -und Kronadiagrammen. Im Rahmen dieses Workflows wurden folgende Softwareversionen verwendet: pysam 0.22.1, pandas 2.0.3, fastcat 0.20.0, minimap2 2.28-r1209, samtools 1.21, taxonkit v0.18.0, kraken 2.1.3, abricate 1.0.1.

Eine zusätzliche Analyse der Daten wurde mittels der QIIME2Metagenome Distribution 2024.10 Plattform durchgeführt (126,127). Nach dem Import der durch EPI2ME wf-metagenomics annotierten Sequenzierdaten wurde eine Diversitätsanalyse durchgeführt. Diese Analyse umfasste Berechnungen zur alpha Diversität, Statistik, sowie eine Darstellung als Boxplot.

3 Ergebnisse

3.1 Keimwachstum auf den Kontrollplatten

Sämtliche Kontrollplatten wurden 24h nach dem Ausstreichen auf Wachstum kontrolliert. Es waren bei allen Keimen mehrere Durchgänge notwendig, bis Verdünnungsreihen erstellt werden konnten, die ein zufriedenstellendes Wachstum auf den Kontrollplatten zeigten. Für jeden der drei Keime wurde jene Verdünnungsreihe ausgewählt, die ein optimales Wachstum auf den Kontrollplatten zeigte. Mit den B-Proben dieser ausgewählten Reihen wurde anschließend weitergearbeitet.

In Abbildung 9 sind die Kontrollplatten des ausgewählten *S. aureus* A-Ansatzes ersichtlich.

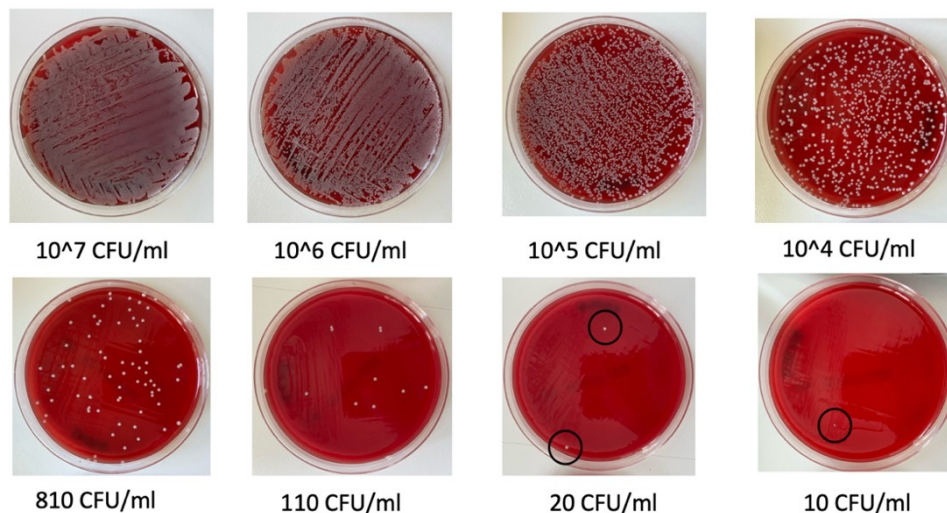


Abbildung 9: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit *S. aureus*

Die Keimzahlen der Kontrollplatten des A-Ansatzes mit *S. aureus* waren wie folgt:

Tabelle 3: Keimzahl der Kontrollplatten mit *S. aureus*

Proben-ID	Soll-Keimzahl	Abgelesene Keimzahl
S10A1	$1,5 \times 10^7$ CFU/ml	10^7 CFU/ml
S10A2	$1,5 \times 10^6$ CFU/ml	10^6 CFU/ml
S10A3	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	10^5 CFU/ml
S10A4	$1,5 \times 10^4$ CFU/ml	10^4 CFU/ml
S10A5	$1,5 \times 10^3$ CFU/ml	810 CFU/ml
S10A6	$1,5 \times 10^2$ CFU/ml	110 CFU/ml
S10A7	$1,5 \times 10$ CFU/ml	20 CFU/ml
S10A8	1,5 CFU/ml	10 CFU/ml

In Abbildung 10 sind die Kontrollplatten des ausgewählten *E.coli* A-Ansatzes ersichtlich.

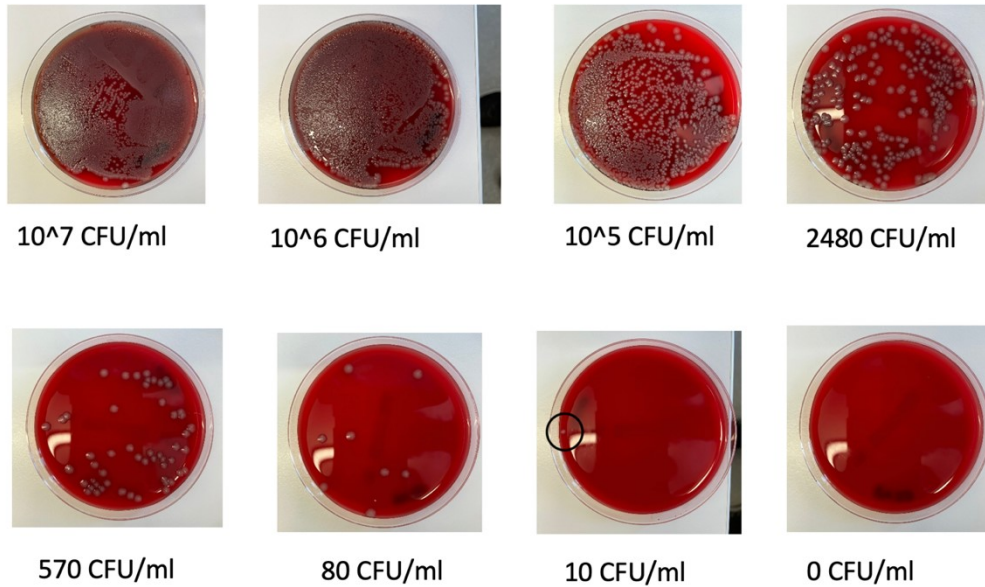


Abbildung 10: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit *E. coli*

Die Keimzahlen der Kontrollplatten des A-Ansatzes mit *E. coli* waren wie folgt:

Tabelle 4: Keimzahl der Kontrollplatten mit *E. coli*

Proben-ID	Soll-Keimzahl	Abgelesene Keimzahl
E6A1	$1,5 \times 10^7$ CFU/ml	10^7 CFU/ml
E6A2	$1,5 \times 10^6$ CFU/ml	10^6 CFU/ml
E6A3	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	10^5 CFU/ml
E6A4	$1,5 \times 10^4$ CFU/ml	2480 CFU/ml
E6A5	$1,5 \times 10^3$ CFU/ml	570 CFU/ml
E6A6	$1,5 \times 10^2$ CFU/ml	80 CFU/ml
E6A7	$1,5 \times 10$ CFU/ml	10 CFU/ml
E6A8	1,5 CFU/ml	0 CFU/ml

In Abbildung 11 sind die Kontrollplatten des ausgewählten *C. albicans* A-Ansatzes ersichtlich.

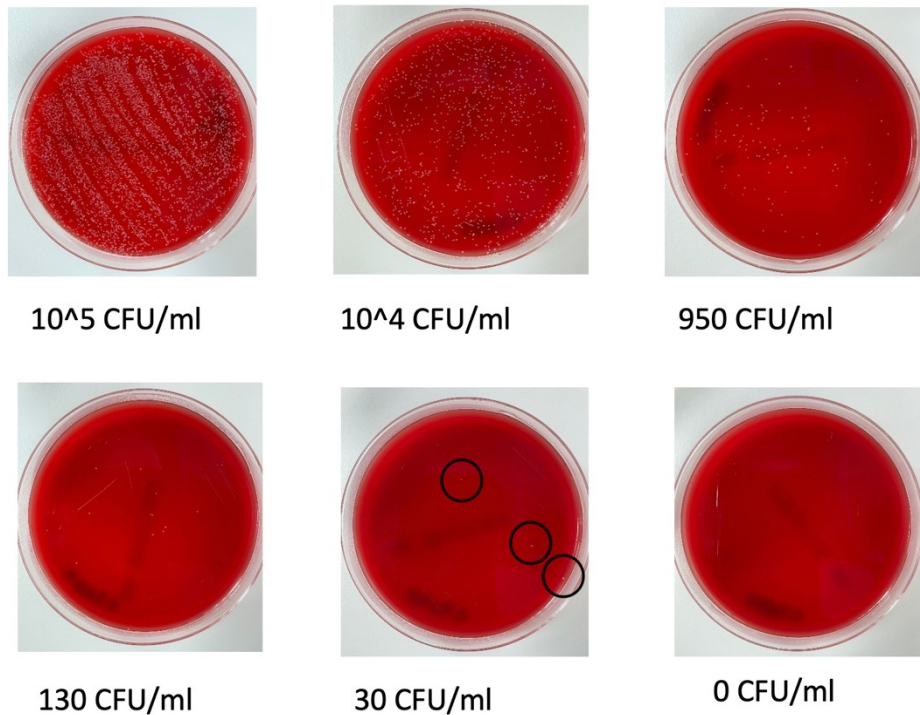


Abbildung 11: Keimzahl auf den Kontrollplatten der verschiedenen Verdünnungsstufen des A-Ansatzes mit *C. albicans*

Die Keimzahlen der Kontrollplatten des A-Ansatzes mit *C. albicans* waren wie folgt:

Tabelle 5: Keimzahl der Kontrollplatten mit *C. albicans*

Proben-ID	Soll-Keimzahl	Abgelesene Keimzahl
C7A3	$1,5 \times 10^5$ CFU/ml	10^5 CFU/ml
C7A4	$1,5 \times 10^4$ CFU/ml	10^4 CFU/ml
C7A5	$1,5 \times 10^3$ CFU/ml	950 CFU/ml
C7A6	$1,5 \times 10^2$ CFU/ml	130 CFU/ml
C7A7	$1,5 \times 10$ CFU/ml	30 CFU/ml
C7A8	1,5 CFU/ml	0 CFU/ml

3.2 Ergebnisse der Kontrollblutkulturen

Alle abgenommenen Kontrollblutkulturen wurden für 5 Tage im BD BACTEC FX Blutkultursystem bebrütet und blieben negativ.

3.3 Ergebnisse der DNA-Extraktion

Nach Extraktion der DNA wurde die Konzentration der isolierten DNA zur Qualitätssicherung bei allen Proben (Qubit Fluorometer, Thermo Fisher Scientific; Quantus Fluorometer, Promega) fluorometrisch überprüft. Die Ergebnisse der Quantitätskontrollen sind Tabelle 6 zu entnehmen.

Ein Zielwert für die Qualität ist laut Herstellerangaben bei 260/280 1,8 und bei 260/230 2,0 (129).

Tabelle 6: Ergebnisse der Qualitäts- und Konzentrationsmessungen der einzelnen Proben

Proben-ID	Qubit Concentration	Quantus Concentration	260/280 ratio	260/230 ratio
S10B3	60,20 µg/mL	77,00 µg/mL	1,7	1,8
S10B4	51,40 µg/mL	87,00 µg/mL	1,8	1,9
S10B5	70,80 µg/mL	75,00 µg/mL	1,8	2,0
S10B6	45,00 µg/mL	67,00 µg/mL	1,7	1,8
S10B7	81,80 µg/mL	76,00 µg/mL	1,8	1,8
S10B8	52,00 µg/mL	64,00 µg/mL	1,7	1,8
S10N	36,40 µg/mL	47,00 µg/mL	1,7	1,7
E6B3	71,40 µg/mL	80,00 µg/mL	1,8	1,9
E6B4	23,20 µg/mL	30,00 µg/mL	1,7	1,6
E6B5	64,60 µg/mL	93,00 µg/mL	1,8	1,9
E6B6	77,40 µg/mL	100,00 µg/mL	1,8	2,0
E6B7	61,20 µg/mL	84,00 µg/mL	1,7	1,8
E6B8	64,20 µg/mL	84,00 µg/mL	1,8	1,9
E6N	70,20 µg/mL	94,00 µg/mL	1,8	1,9
C7B3	67,60 µg/mL	88,00 µg/mL	1,8	2,0
C7B4	76,60 µg/mL	116,00 µg/mL	1,8	2,0
C7B5	78,60 µg/mL	98,00 µg/mL	1,8	2,0
C7B6	73,80 µg/mL	108,00 µg/mL	1,8	2,0
C7B7	76,40 µg/mL	100,00 µg/mL	1,8	1,9
C7B8	78,60 µg/mL	109,00 µg/mL	1,8	1,9
C7N	82,40 µg/mL	108,00 µg/mL	1,8	2,0

3.4 Ergebnisse der DNA-Sequenzierung

Es wurden in den 72h Laufzeit insgesamt 1.24 Millionen Reads generiert und geschätzt 7.8 Gb Basen sequenziert. Der geschätzte N50 Wert lag bei 10.69 kb, was bedeutet, dass 50% aller Reads länger als 10.69kb waren. Der Verlauf der Porenaktivität der Flowcell ist in der untenstehenden Grafik (Abbildung 12) ersichtlich:

Die Ordinate zeigt den Prozentsatz der Poren der Flowcell die einem bestimmten Aktivitätszustand entsprechen, während auf der Abszisse der zeitliche Verlauf dargestellt wird. Die hellgrüne Färbung stellt der Prozentsatz an Poren dar, die gerade sequenzieren. Dunkelgrün bedeutet, dass die Pore gerade nicht sequenziert, aber grundsätzlich zum Sequenzieren bereit ist. Der hellblaue Ton zeigt inaktive Poren an, die für weitere Sequenzierungen ungeeignet sind. Der mittelblaue Ton bezeichnet Poren, die nur im Moment nicht zur Sequenzierung zur Verfügung stehen. Der Prozentsatz der Poren, der dunkelblau gefärbt ist, ist nicht klassifizierbar.

Wie zu erkennen ist, startete der Sequenzierlauf mit etwa 70 Prozent aktiver oder verfügbarer Poren. Im Verlauf der ersten 37 Stunden fiel dieser Prozentsatz relativ stark, bis er sich schließlich auf einem Niveau einpendelte, an dem nur noch etwa 10 Prozent der Poren sequenzierten oder sequenzierbereit waren. Dieses Niveau blieb leicht abfallend bis zum Ende des 72 Stunden langen Sequenzierlaufs bestehen.

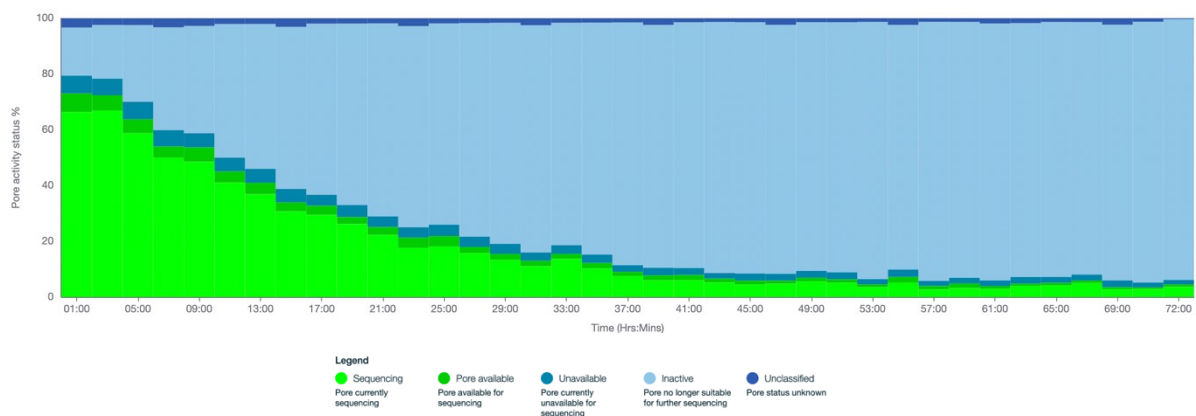


Abbildung 12: Verlauf der Porenaktivität im Laufe des Sequenzierens

3.4.1 Ergebnisse des wf-metagenomics nextflow workflow

Die Qualität der Reads wurde mit dem Phred Quality Score (Q-Score) beurteilt. Das zweigipfelige Muster ist durch die gleichzeitige Durchführung von Einzel- und Doppelstrang Reads erklärbar. Da Doppelstrang-Reads eine geringere Fehlerrate aufweisen haben sie typischerweise auch einen höheren Q-Score (130). Der Q-Score lag für Simplex (Einzelstrang) Reads bei 10, was einer Fehlerrate von 10% entspricht, für Duplex (Doppelstrang) Reads bei etwa 24, was einer Fehlerrate von ca. 0.4% entspricht (131).

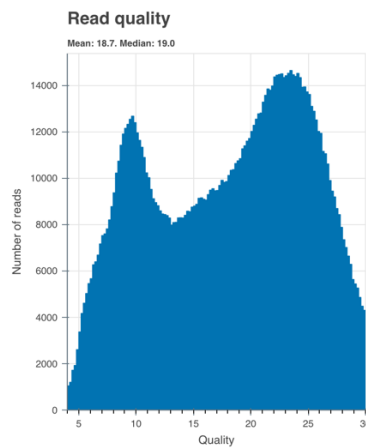


Abbildung 13: Q-Score Diagramm des Sequenzierlaufs

Die taxonomische Komposition des gesamten Sequenzierlaufs ließ sich wie folgt darstellen.

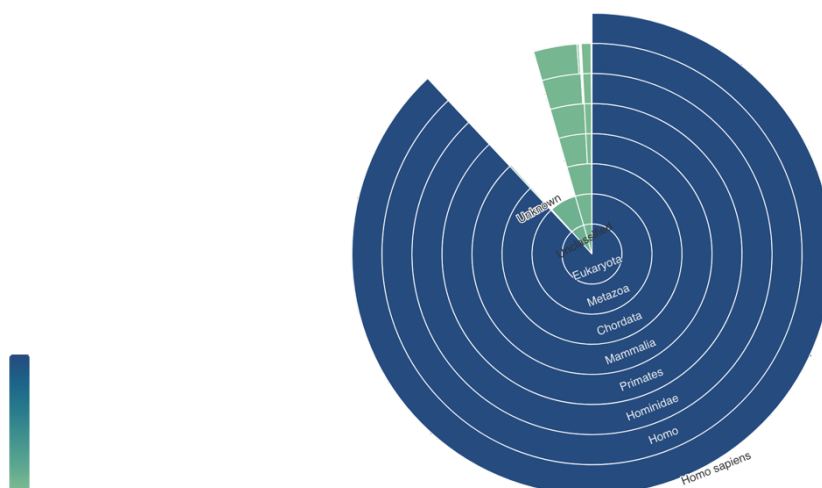


Abbildung 14: Taxonomische Klassifikation des gesamten Sequenzierlaufs

88,01% der sequenzierten Reads ließen sich *Homo sapiens* (in Abbildung 14 dunkelblau dargestellt) zuordnen, 3,34% *Escherichia coli*, 0,76% *Acinetobacter baumannii*, 0,15% *Escherichia albertii*, 7,25% konnten nicht zugeordnet werden.

3.4.2 Ergebnisse der qiime2-Metagenome Distribution 2024

In den 22 Proben wurden insgesamt 10 verschiedene Spezies identifiziert. 4 davon, *Homo sapiens*, *Escherichia coli*, *Escherichia albertii* und *Phoenix dactylifera*, wurden in allen Proben nachgewiesen. Die ursprünglich hinzugefügten *S.aureus* und *C. albicans* konnten in keiner Probe nachgewiesen werden.

Tabelle 7: Gesamtübersicht der nachgewiesenen Organismen

Spezies	Häufigkeit	Anzahl der Proben in denen die Spezies nachgewiesen wurde
<i>Homo sapiens</i>	556.220	22
<i>Escherichia coli</i>	26.533	22
<i>Unknown</i>	19.215	22
<i>Escherichia albertii</i>	1.523	22
<i>Phoenix dactylifera</i>	467	22
<i>Salmonella enterica</i>	369	7
<i>Shigella flexneri</i>	174	8
<i>Kosakonia oryzae</i>	89	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	17	1
<i>Escherichia fergusonii</i>	10	1
<i>Ipomoea triloba</i>	10	1

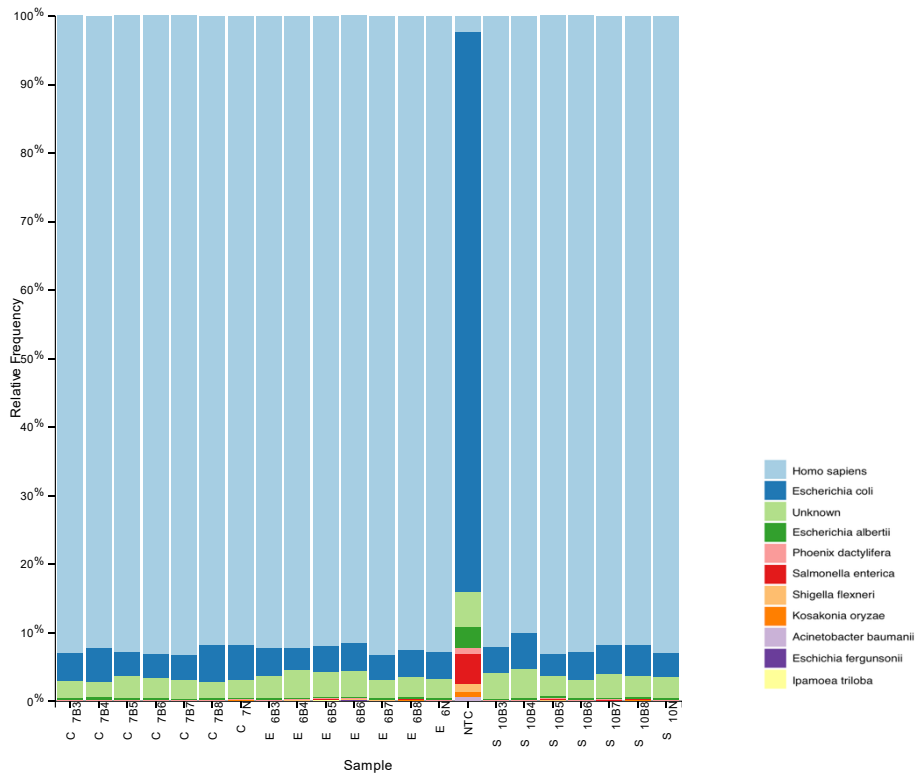


Abbildung 15: Metagenom Aufschlüsselung der einzelnen Proben

Abbildung 15 und Tabelle 8 zeigen die Metagenom Aufschlüsselung der einzelnen Proben (alpha Diversität).

Die verschiedenen nachgewiesenen Spezies sind in Abbildung 15 durch verschiedene Farben markiert. Die y-Achse zeigt die relative Frequenz der nachgewiesenen Spezies innerhalb einer Probe, während auf der x-Achse die verschiedenen Proben dargestellt sind.

Tabelle 8 zeigt die absolute Read Anzahl der einzelnen Proben.

Wie in Abbildung 15 und Tabelle 8 ersichtlich, enthielten alle Proben, mit Ausnahme der NTC-Probe, die als Negativkontrolle ohne Proben DNA diente, einen sehr hohen Anteil an humaner DNA. *E. coli* konnte in allen Proben außer der NTC, in etwa gleich hoher relativer Frequenz nachgewiesen werden. Der relative Anteil anderer Mikroorganismen am Metagenom der Proben war sehr gering.

Tabelle 8: Genaue Aufschlüsselung der Read Anzahl der nachgewiesenen Organismen in den einzelnen Proben

Proben ID	Homo sapiens	Unknown	Escherichia coli	Escherichia albertii	Phoenix dactylifera	Salmonella enterica	Shigella flexneri	Kosakonia oryzae	Ipomoea triloba	Escherichia fergusonii	Acinetobacter baumannii
S10B3	23015.0	953.0	911.0	53.0	11.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S10B4	16163.0	777.0	929.0	43.0	14.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S10B5	22104.0	725.0	745.0	78.0	11.0	36.0	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S10B6	25419.0	746.0	1109.0	70.0	17.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S10B7	30587.0	1166.0	1391.0	72.0	26.0	37.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
S10B8	34166.0	1136.0	1677.0	102.0	31.0	28.0	18.0	15.0	0.0	0.0	0.0
S10N_	24793.0	822.0	927.0	66.0	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E6B3	20369.0	737.0	878.0	51.0	20.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E6B4	28634.0	1302.0	983.0	74.0	19.0	0.0	23.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E6B5	34224.0	1356.0	1378.0	82.0	27.0	44.0	23.0	12.0	10.0	0.0	0.0
E6B6	34068.0	1432.0	1471.0	97.0	30.0	47.0	19.0	17.0	0.0	10.0	0.0
E6B7	33514.0	1006.0	1305.0	67.0	22.0	0.0	18.0	0.0	0.0	0.0	0.0
E6B8	35341.0	1114.0	1495.0	91.0	24.0	45.0	17.0	11.0	0.0	0.0	0.0
E6N	31120.0	976.0	1319.0	74.0	24.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B3	25082.0	712.0	1088.0	48.0	26.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B4	21302.0	529.0	1127.0	69.0	22.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B5	22407.0	824.0	822.0	46.0	23.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B6	20459.0	664.0	765.0	51.0	12.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B7	22731.0	690.0	879.0	48.0	15.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7B8	25436.0	656.0	1472.0	82.0	21.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C7N	25211.0	737.0	1367.0	65.0	21.0	0.0	0.0	16.0	0.0	0.0	0.0
NTC	75.0	155.0	2495.0	94.0	29.0	132.0	38.0	18.0	0.0	0.0	17.0

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es zu bestimmen, wie hoch die Konzentration von *S. aureus*, *C. albicans* und *E. coli* im Blut sein muss, um sie mittels Nanopore Sequencing mit dem MinION Nanopore noch nachweisen zu können.

Die Ergebnisse der Versuche entsprachen nicht den Erwartungen. Einerseits wurden zwei der drei verwendeten Keime gar nicht vom MinION Nanopore detektiert, andererseits kam es auch in sämtlichen Proben, die nicht mit *E. coli* gespickt wurden, zu einem Nachweis von *E. coli*.

Nachfolgend wird versucht potenzielle Fehlerquellen zu eruieren und zu diskutieren.

4.1 Fehlende Detektion von *S. aureus* und *C. albicans*

Grundsätzlich wäre die Abwesenheit von *S. aureus* und *C. albicans* am einfachsten dadurch zu erklären, dass die Konzentration in sämtlichen sequenzierten Proben nicht hoch genug war, um detektiert werden zu können. Da beim Erstellen der Verdünnungsreihen Kontrollausstriche angefertigt wurden, kann man davon ausgehen, dass in den ursprünglichen Proben eine entsprechende Menge an Bakterien und damit auch bakterieller DNA vorhanden war. Dass eine Menge von $1,5 \times 10^5$ oder $1,5 \times 10^4$ CFU/ml, wie sie den Verdünnungsstufen 3 und 4 entspricht, vom MinION Nanopore detektiert werden kann, wurde bereits in mehreren Studien belegt (132–134).

Eine quantitative Analyse der DNA mittels Fluorometrie zeigte im Anschluss an die DNA-Extraktion ausreichende Mengen an DNA in sämtlichen Proben in annehmbarer Qualität. Eine Aussage darüber, wie viel dieser DNA mikrobieller DNA entspricht und wie viel humaner DNA, kann allerdings durch die durchgeführten Tests nicht getroffen werden. Es ist also möglich, dass beim Prozess der DNA-Extraktion nicht genug mikrobielle DNA isoliert werden konnte um die Organismen anschließend detektieren zu können.

Ebenso muss erwähnt werden, dass Vollblut eine weitaus höhere Konzentration an menschlicher DNA enthält als Urin oder Plasma (135,136). Da in dieser Studie die DNA aus Vollblut extrahiert wurde, kann man davon ausgehen, dass die relative Menge an menschlicher DNA im Vergleich zu bakterieller DNA in den Proben höher

ist, als in vergleichbaren Studien (113,132–134), in denen bakterielle DNA mit dem MinION Nanopore in Plasma oder Urin nachgewiesen werden konnte.

In Kombination mit niedriger Sequenziertiefe des MinION Nanopore, die es schwerer macht weniger dominante Organismen in der Probe zu identifizieren, könnte, selbst bei initial erfolgreicher Extraktion der mikrobiellen DNA aus den Proben, das mit ein Grund sein, warum die einbrachten Organismen nicht detektiert werden konnten.

Es gibt verschiedene Methoden, die Read Häufigkeit der menschlichen DNA in Proben, in denen der Nachweis von anderen Organismen im Vordergrund steht, zu verringern. Einerseits kann man mittels „host depletion“ versuchen, die menschliche Hintergrund-DNA bereits in der präanalytischen Phase durch selektive Lyse von Leukozyten und anschließender Behandlung mit Desoxyribonuklease verringern. Die bakterielle DNA liegt innerhalb mikrobieller Zellwände vor und ist von diesem Lyse-Vorgang nicht betroffen (137). Dieser Prozess wurde auch in einigen vergleichbaren Studien durchgeführt (109,115,138). Ein Nachteil hiervon ist, dass auch potenzielle Verunreinigungen mit einer höheren Frequenz sequenziert werden.

Ein weiterer möglicher Ansatz ist, genetisches Material mit hohem molekularem Gewicht, welches eher menschlichem als bakteriellem Genmaterial entspricht, durch physikalische Methoden wie Zentrifugation von Material mit niedrigem molekularem Gewicht zu trennen und anschließend nur dieses zu sequenzieren. Obwohl hier das Risiko besteht, intakte intrazelluläre Mikroorganismen mit zu entfernen, wurde nach diesem Vorgang in mehreren Studien eine höhere relative Menge an Mikroorganismen im Vergleich zu menschlichen Reads beschrieben (137).

Eine weitere Methode wäre „adaptive sampling“, dabei handelt es sich um ein Konzept von Oxford Nanopore Technologies. Die Methode basiert darauf, dass eine Software anhand der ersten sequenzierten Basen eines Moleküls erkennt, ob dieses Molekül einer zuvor festgelegten Zielspezies entspricht oder nicht. Wenn nicht, wird das Molekül aus der Pore geworfen und keine weitere Zeit damit verschwendet die nicht benötigten Moleküle, also in diesem Fall menschliche DNA, zu sequenzieren (139).

In einigen der oben genannten Studien wurde auch mit PCR-Amplifizierung bestimmter „marker genes“ der Pathogene gearbeitet, um sie einfacher detektieren zu können (111,113,114). Hierbei verliert man allerdings den großen Vorteil des Nanopore Sequenzierens, der darin besteht, dass „real-time“ sequenziert werden kann und eine Amplifizierung nicht nötig ist.

Ein neuerlicher Versuch, bei dem entweder mittels „adaptive sampling“ oder „host depletion“ versucht wird, die Dominanz der eigentlich nicht im Fokus stehenden menschlichen DNA zu verringern oder bestimmte Genabschnitte der eingebrachten Mikroorganismen durch gezielte PCR-Amplifizierung zu verstärken, könnte in dieser Hinsicht bessere Ergebnisse liefern.

4.2 Detektion von *E. coli* in allen Proben

Ein weiteres unerwartetes Ergebnis der Sequenzierung war der Nachweis von *E. coli* in sämtlichen sequenzierten Proben. Zunächst stellt sich die Frage, ob der detektierte *E. coli* dem zu Beginn eingebrachten *E. coli* entspricht und es sich um ein Problem bei der Proben-Codierung gehandelt haben könnte, sprich die Proben falsch gelabelt wurden, oder ob die Reads einem *E. coli* entsprechen, der im Laufe des Workflows ungewollt eingebracht wurde.

Ein Grund, der für eine Kontamination spricht, ist, dass auch in der NTC-Probe eine sehr hohe Anzahl an Reads *E. coli* zugeordnet werden. Diese Probe sollte eigentlich kein bis wenig DNA-Material enthalten und damit auch kaum Reads generieren. Der ursprüngliche *E. coli*, der bei der Erstellung der Verdünnungsreihen eingebracht wurde, kann in dieser Probe nicht enthalten sein. Betrachtet man die Read Häufigkeit der unterschiedlichen Proben, kann man aber feststellen, dass die NTC-Probe jene Probe mit den meisten *E. coli* Reads ist. Dies spricht stark für eine Kontamination im Arbeitsprozess.

Ebenso für eine Verunreinigung spricht, dass sich bei der Sequenzierung *E. coli* in allen diesen Proben in gleicher relativer Häufigkeit detektieren ließ. Die niedrigste Verdünnungsstufe der *E. coli* Reihe, die sequenziert wurde, enthält $10^5 \times 1,5$ CFU/ml und die höchste 1,5 CFU/ml. In einer ähnlich aufgebauten Studie mit gespikten Proben wurde zwischen Proben mit $10^3 \times 1,5$ CFU/ml und $10^5 \times 1,5$ CFU/ml ein großer Unterschied in der Read-Häufigkeit mit der *E. coli* detektiert wurde festgestellt (133).

Geht man von einer Kontamination aus, wäre wichtig festzustellen in welchem Arbeitsschritt diese passiert ist, um sie bei zukünftigen Versuchen zu unterbinden. Die Kontrollplatten, die zum Zeitpunkt der Probenerstellung angefertigt wurden, zeigten sich bei den Negativkontrollen klar negativ. Auch auf den Kontrollausstrichen der Proben *S. aureus* und *C. albicans* Verdünnungsreihe gab es keine Hinweise auf eine Kontamination durch *E. coli*. Die Tatsache, dass in der NTC-Probe auch *E. coli* enthalten ist, spricht dafür, dass die fragliche Kontamination in einem Arbeitsschritt nach oder während der Erstellung der NTC-Probe passiert ist. Es ist also wahrscheinlich, dass es im Rahmen der Library Erstellung oder Sequenzierung zu einer Verunreinigung gekommen ist. Bei welchem Schritt genau, ist im Nachgang schwer zu eruieren, da zwischen den verschiedenen Schritten keine weiteren Kontrollen auf Kontamination durchgeführt wurden.

Abschließend ist zu sagen, dass die Ziele dieser Arbeit nicht erreicht wurden und es neuerliche Versuche brauchen wird, um ein Detektionslimit von *S. aureus*, *C. albicans* und *E. coli* mittels Nanopore Sequencing zu ermitteln. In weiterer Folge sollte besonderes Augenmerk auf Kontaminationsfreiheit gelegt werden. Zusätzliche Schritte zu Sicherstellung dieser vor der Sequenzierung wären empfehlenswert. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, die eingebrachten Erreger bei niedriger Sequenziertiefe in ausreichender Frequenz sequenzieren zu können, wäre eine host depletion oder adaptive sampling überlegenswert.

Literaturverzeichnis

1. Laupland KB, Church DL. Population-Based Epidemiology and Microbiology of Community-Onset Bloodstream Infections. *Clin Microbiol Rev.* 1. Oktober 2014;27(4):647.
2. Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream Infections. Hayden RT, Wolk DM, Carroll KC, Tang YW, Herausgeber. *Microbiol Spectr.* 12. August 2016;4(4):10.1128/microbiolspec.dmh2-0031–2016.
3. Timsit JF, Ruppé E, Barbier F, Tabah A, Bassetti M. Bloodstream infections in critically ill patients: an expert statement. *Intensive Care Med.* 1. Februar 2020;46(2):266.
4. Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP, u. a. Health Care–Associated Bloodstream Infections in Adults: A Reason To Change the Accepted Definition of Community-Acquired Infections. *Ann Intern Med.* 19. November 2002;137(10):791–7.
5. Morin CA, Hadler JL. Population-Based Incidence and Characteristics of Community-Onset Staphylococcus aureus Infections with Bacteremia in 4 Metropolitan Connecticut Areas, 1998. *J Infect Dis.* 15. Oktober 2001;184(8):1029–34.
6. Son JS, Song JH, Ko KS, Yeom JS, Ki HK, Kim SW, u. a. Bloodstream Infections and Clinical Significance of Healthcare-associated Bacteremia: A Multicenter Surveillance Study in Korean Hospitals. *J Korean Med Sci.* 1. Juli 2010;25(7):992–8.
7. Lenz R, Leal JR, Church DL, Gregson DB, Ross T, Laupland KB. The distinct category of healthcare associated bloodstream infections. *BMC Infect Dis.* 9. April 2012;12(1):85.
8. Vallés J, Calbo E, Anoro E, Fontanals D, Xercavins M, Espejo E, u. a. Bloodstream infections in adults: Importance of healthcare-associated infections. *J Infect.* Jänner 2008;56(1):27–34.
9. Huerta LE, Rice TW. Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections MINI-REVIEWS. 2018; Verfügbar unter: <https://academic.oup.com/jalm/article/3/4/654/5603104>
10. Goto M, Al-Hasan MN. Overall burden of bloodstream infection and nosocomial bloodstream infection in North America and Europe. *Clin Microbiol Infect.* 1. Juni 2013;19(6):501–9.
11. Kontula KSK, Skogberg K, Ollgren J, Järvinen A, Lyytikäinen O. Population-Based Study of Bloodstream Infection Incidence and Mortality Rates, Finland, 2004–2018. *Emerg Infect Dis.* Oktober 2021;27(10):2560–9.
12. Buetti N, Atkinson A, Marschall J, Kronenberg A. Incidence of bloodstream infections: a nationwide surveillance of acute care hospitals in Switzerland 2008-2014. *BMJ Open.* 2017;7:13665.

13. Ljungquist O, Blomstergren A, Merkel A, Sunnerhagen T, Holm K, Torisson G. Incidence, aetiology and temporal trend of bloodstream infections in southern Sweden from 2006 to 2019: a population-based study. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 3. März 2023;28(10):1–10.
14. Mehl A, Åsvold BO, Lydersen S, Paulsen J, Solligård E, Damås JK, u. a. Burden of bloodstream infection in an area of Mid-Norway 2002-2013: a prospective population-based observational study. *BMC Infect Dis.* 11. März 2017;17(1):205.
15. Nielsen SL, Pedersen C, Jensen TG, Gradel KO, Kolmos HJ, Lassen AT. Decreasing incidence rates of bacteremia: A 9-year population-based study. *J Infect.* 1. Juli 2014;69(1):51–9.
16. Uslan DZ, Crane SJ, Steckelberg JM, Cockerill FR III, St. Sauver JL, Wilson WR, u. a. Age- and Sex-Associated Trends in Bloodstream Infection: A Population-Based Study in Olmsted County, Minnesota. *Arch Intern Med.* 23. April 2007;167(8):834–9.
17. Cassini A, Högberg LD, Plachouras D, Quattrocchi A, Hoxha A, Simonsen GS, u. a. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis.* 1. Jänner 2019;19(1):56.
18. McNamara JF, Righi E, Wright H, Hartel GF, Harris PNA, Paterson DL. Long-term morbidity and mortality following bloodstream infection: A systematic literature review. *J Infect.* 1. Juli 2018;77(1):1–8.
19. Waterlow NR, Cooper BS, Robotham JV, Knight GM. Antimicrobial resistance prevalence in bloodstream infection in 29 European countries by age and sex: An observational study. *PLOS Med.* 1. März 2024;21(3):e1004301.
20. Bassetti M, Treçarichi EM, Mesini A, Spanu T, Giacobbe DR, Rossi M, u. a. Risk factors and mortality of healthcare-associated and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *Clin Microbiol Infect.* 1. September 2012;18(9):862–9.
21. de Laroche M, Fellous L, Salomon E, Saadeh D, Duran C, Bouchand F, u. a. Bloodstream infections in older population: epidemiology, outcome, and impact of multidrug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. August 2021;40(8):1665–72.
22. Reunes S, Rombaut V, Vogelaers D, Brusselaers N, Lizy C, Cankurtaran M, u. a. Risk factors and mortality for nosocomial bloodstream infections in elderly patients. *Eur J Intern Med.* Oktober 2011;22(5):e39–44.
23. Chien-Chang L, Shey-Ying C, I-Jing C, Shyr-Chyr C, Shwu-Chong W. Comparison of clinical manifestations and outcome of community-acquired bloodstream infections among the oldest old, elderly, and adult patients. *Medicine (Baltimore).* Mai 2007;86(3):138–44.

24. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, u. a. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* Juni 2006;34(6):1589–96.
25. Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, u. a. Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis. *N Engl J Med.* 8. Juni 2017;376(23):2235–44.
26. Lee CC, Lee CH, Yang CY, Hsieh CC, Tang HJ, Ko WC. Beneficial effects of early empirical administration of appropriate antimicrobials on survival and defervescence in adults with community-onset bacteremia. *Crit Care.* 20. November 2019;23(1):1–12.
27. Kadri SS, Lai YL, Warner S, Strich JR, Babiker A, Ricotta EE, u. a. Inappropriate empirical antibiotic therapy for bloodstream infections based on discordant in-vitro susceptibilities: a retrospective cohort analysis of prevalence, predictors, and mortality risk in US hospitals. *Lancet Infect Dis.* 1. Februar 2021;21(2):241–51.
28. Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD, Rodríguez-López F, de Cueto M, García MV, u. a. Impact of Inadequate Empirical Therapy on the Mortality of Patients with Bloodstream Infections: a Propensity Score-Based Analysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 26. Dezember 2012;56(1):472–8.
29. Hounsom L, Grayson K, Melzer M. Mortality and associated risk factors in consecutive patients admitted to a UK NHS trust with community acquired bacteraemia. *Postgrad Med J.* 1. November 2011;87(1033):757–62.
30. Kern WV, Rieg S. Burden of bacterial bloodstream infection—a brief update on epidemiology and significance of multidrug-resistant pathogens. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis.* 1. Februar 2020;26(2):151–7.
31. Lowy FD. *Staphylococcus aureus* Infections. *N Engl J Med.* 20. August 1998;339(8):520–32.
32. Wertheim HF, Melles DC, Vos MC, Leeuwen W van, Belkum A van, Verbrugh HA, u. a. The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect Dis.* 1. Dezember 2005;5(12):751–62.
33. Dryden MS. Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *Int J Antimicrob Agents.* 1. Juli 2009;34:S2–7.
34. Kwiecinski JM, Horswill AR. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. *Curr Opin Microbiol.* 1. Februar 2020;53:51–60.
35. Yarovoy JY, Monte AA, Knepper BC, Young HL. Epidemiology of Community-Onset *Staphylococcus aureus* Bacteremia. *West J Emerg Med.* Mai 2019;20(3):438.

36. Bundesministerium für Soziales, Gesundheit, Pflege und Konsumentenschutz. Resistenzbericht Österreich - AURES 2022 [Internet]. 2024 Feb. Verfügbar unter:
https://www.sozialministerium.at/dam/sozialministeriumat/Anlagen/Themen/Gesundheit/Antimikrobielle-Resistenzen-und-Gesundheitssystem-assoziierte-Infektionen/Antimikrobielle-Resistenzen/AURES/AURES_2022.pdf
37. Gagliotti C, Högberg LD, Billström H, Eckmanns T, Giske CG, Heuer OE, u. a. Staphylococcus aureus bloodstream infections: diverging trends of meticillin-resistant and meticillin-susceptible isolates, EU/EEA, 2005 to 2018. Eurosurveillance. 18. November 2021;26(46):2002094.
38. Asgeirsson H, Thalme A, Weiland O. Staphylococcus aureus bacteraemia and endocarditis - epidemiology and outcome: a review. Infect Dis. 4. März 2018;50(3):175–92.
39. Jacobsson G, Gustafsson E, Andersson R. Outcome for invasive Staphylococcus aureus infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1. September 2008;27(9):839–48.
40. European Centre for Disease Prevention and Control. Rate an MRSA Infektionen in Europa im Jahr 2022 [Internet]. [zitiert 21. Juni 2024]. Verfügbar unter: <https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
41. Riley LW. Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: Escherichia coli. Microbiol Spectr. 31. Dezember 2020;8(4):10.1128/microbiolspec.ame-0014–2020.
42. Tenailon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal Escherichia coli. Nat Rev Microbiol. März 2010;8(3):207–17.
43. Pitout JDD. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. Expert Rev Anti Infect Ther. Oktober 2012;10(10):1165–76.
44. European Centre for Disease Prevention and Control. Rate an 3. Generations Cephalosporin Resistenzen / ESBL E. Coli in Europa im Jahr 2022 [Internet]. [zitiert 21. Juni 2024]. Verfügbar unter:
<https://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
45. de Kraker MEA, Wolkewitz M, Davey PG, Koller W, Berger J, Nagler J, u. a. Burden of antimicrobial resistance in European hospitals: excess mortality and length of hospital stay associated with bloodstream infections due to Escherichia coli resistant to third-generation cephalosporins. J Antimicrob Chemother. 1. Februar 2011;66(2):398–407.
46. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. Nat Rev Microbiol. Februar 2017;15(2):96–108.

47. Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol.* 1. Juni 2007;45(4):321–46.
48. Freitas CG, Felipe MS. Candida albicans and Antifungal Peptides. *Infect Dis Ther.* Dezember 2023;12(12):2631–48.
49. Koehler P, Stecher M, Cornely OA, Koehler D, Vehreschild MJGT, Bohlius J, u. a. Morbidity and mortality of candidaemia in Europe: an epidemiologic meta-analysis. *Clin Microbiol Infect.* 1. Oktober 2019;25(10):1200–12.
50. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin Infect Dis.* 8. Jänner 2004;39(3):309–17.
51. Mun SJ, Kim SH, Kim HT, Moon C, Wi YM. The epidemiology of bloodstream infection contributing to mortality: the difference between community-acquired, healthcare-associated, and hospital-acquired infections. *BMC Infect Dis.* 5. April 2022;22(1):336.
52. Cheng MF, Yang YL, Yao TJ, Lin CY, Liu JS, Tang RB, u. a. Risk factors for fatal candidemia caused by Candida albicans and non-albicans Candida species. *BMC Infect Dis.* Dezember 2005;5(1):22.
53. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 1. Juli 2019;25(7):792–8.
54. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA. Bloodstream infections – Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect.* 1. Februar 2020;26(2):142–50.
55. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, u. a. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock 2021. *Crit Care Med.* 1. November 2021;49(11):E1063–143.
56. Lee A, Mirrett S, Reller LB, Weinstein MP. Detection of Bloodstream Infections in Adults: How Many Blood Cultures Are Needed? *J Clin Microbiol.* November 2007;45(11):3546–8.
57. Cockerill FR III, Wilson JW, Vetter EA, Goodman KM, Torgerson CA, Harmsen WS, u. a. Optimal Testing Parameters for Blood Cultures. *Clin Infect Dis.* 15. Juni 2004;38(12):1724–30.
58. Washington JA. Blood cultures: principles and techniques. *Mayo Clin Proc.* Februar 1975;50(2):91–8.
59. Miller JM, Binnicker MJ, Campbell S, Carroll KC, Chapin KC, Gilligan PH, u. a. A Guide to Utilization of the Microbiology Laboratory for Diagnosis of Infectious Diseases: 2018 Update by the Infectious Diseases Society of

- America and the American Society for Microbiology. *Clin Infect Dis*. 31. August 2018;67(6):e1–94.
60. Zadroga R, Williams DN, Gottschall R, Hanson K, Nordberg V, Deike M, u. a. Comparison of 2 Blood Culture Media Shows Significant Differences in Bacterial Recovery for Patients on Antimicrobial Therapy. *Clin Infect Dis*. 15. März 2013;56(6):790–7.
 61. Baron EJ, Scott JD, Tompkins LS. Prolonged Incubation and Extensive Subculturing Do Not Increase Recovery of Clinically Significant Microorganisms from Standard Automated Blood Cultures. *Clin Infect Dis*. 1. Dezember 2005;41(11):1677–80.
 62. Gonzalez MD, Chao T, Pettengill MA. Modern Blood Culture Management Decisions and Method Options. *Clin Lab Med*. 1. Dezember 2020;40(4):379–92.
 63. Idelevich EA, Seifert H, Sundqvist M, Scudeller L, Amit S, Balode A, u. a. Microbiological diagnostics of bloodstream infections in European ESGBIES survey *. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:1399.
 64. Angeletti S. Matrix assisted laser desorption time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiology. *J Microbiol Methods*. 1. Juli 2017;138:20–9.
 65. Dubourg G, Lamy B, Ruimy R. Rapid phenotypic methods to improve the diagnosis of bacterial bloodstream infections: meeting the challenge to reduce the time to result. *Clin Microbiol Infect*. 1. September 2018;24(9):935–43.
 66. Idelevich EA, Schüle I, Grünastel B, Wüllenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect*. 1. Oktober 2014;20(10):1001–6.
 67. Idelevich EA, Becker K. How to accelerate antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*. 2019;25:1347.
 68. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing - EUCAST disk diffusion method [Internet]. Verfügbar unter: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2024_manuals/Manual_v_12.0_EUCAST_Disk_Test_2024.pdf
 69. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles [Internet]. [zitiert 12. Juni 2024]. Verfügbar unter: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/2024/EUCAST_RAST_methodology_v5.0_final.pdf

70. Sikkens JJ, Möhlmann MC, Peerbooms PG, Lettinga KD, Peters EJG, Kramer MHH, u. a. The impact of laboratory closing times on delay of adequate therapy in blood stream infections. *Neth J Med*. 2018;76(8).
71. Kerremans Jj, van der Bij Ak, Goessens W, Verbrugh Ha, Vos Mc. Needle-to-incubator transport time: logistic factors influencing transport time for blood culture specimens. *J Clin Microbiol* [Internet]. März 2009 [zitiert 16. Juni 2024];47(3). Verfügbar unter: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/jcm.01829-08>
72. Godfrey R, Curtis S, Schilling WH, James PR. Blood culture negative endocarditis in the modern era of 16S rRNA sequencing. *Clin Med*. 1. Juli 2020;20(4):412–6.
73. Crump JA, Morrissey AB, Ramadhani HO, Njau BN, Maro VP, Reller LB. Controlled Comparison of BacT/Alert MB System, Manual Myco/F Lytic Procedure, and Isolator 10 System for Diagnosis of Mycobacterium tuberculosis Bacteremia ▽ . *J Clin Microbiol*. August 2011;49(8):3054–7.
74. Crump JA, Tanner DC, Mirrett S, McKnight CM, Reller LB. Controlled Comparison of BACTEC 13A, MYCO/F LYTIC, BacT/ALERT MB, and ISOLATOR 10 Systems for Detection of Mycobacteremia. *J Clin Microbiol*. Mai 2003;41(5):1987–90.
75. Linsenmeyer K, Gupta K, Strymish JM, Dhanani M, Brecher SM, Breu AC. Culture if spikes? Indications and yield of blood cultures in hospitalized medical patients. *J Hosp Med*. 1. Mai 2016;11(5):336–40.
76. Viagappan M, Kelsey MC. The origin of coagulase-negative staphylococci isolated from blood cultures. *J Hosp Infect*. 1995;30:217–23.
77. Schiffman RB, Strand CL, Meier FA, Howanitz PJ. Blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Probes study involving 640 institutions and 497134 specimens from adult patients. *Arch Pathol Lab Med*. März 1998;122(3):216–21.
78. Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, Mirrett S, Reimer LG, Parmigiani G, u. a. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s: A Prospective Comprehensive Evaluation of the Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults. *Clin Infect Dis*. 1. April 1997;24(4):584–602.
79. Dargère S, Cormier H, Verdon R. Contaminants in blood cultures: importance, implications, interpretation and prevention. *Clin Microbiol Infect*. 1. September 2018;24(9):964–9.
80. Mirrett S, Weinstein MP, Reimer LG, Wilson ML, Reller LB. Relevance of the Number of Positive Bottles in Determining Clinical Significance of Coagulase-Negative Staphylococci in Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. September 2001;39(9):3279–81.

81. Fabre V, Sharara SL, Salinas AB, Carroll KC, Desai S, Cosgrove SE. Does This Patient Need Blood Cultures? A Scoping Review of Indications for Blood Cultures in Adult Nonneutropenic Inpatients. *Clin Infect Dis*. 22. August 2020;71(5):1339–47.
82. Seigel TA, Cocchi MN, Saliccioli J, Shapiro NI, Howell M, Tang A, u. a. Inadequacy of Temperature and White Blood Cell Count in predicting Bacteremia in Patients with suspected Infection.
83. Coburn B, Morris AM, Tomlinson G, Detsky AS. Does This Adult Patient With Suspected Bacteremia Require Blood Cultures? Verfügbar unter: www.jamaarchivescme.com
84. Roth A, Wiklund AE, Pålsson AS, Melander EZ, Wullt M, Cronqvist J, u. a. Reducing blood culture contamination by a simple informational intervention. *J Clin Microbiol*. Dezember 2010;48(12):4552–8.
85. Bates DW. Predicting Bacteremia in Hospitalized Patients. *Ann Intern Med*. 1. Oktober 1990;113(7):495.
86. Souvenir D, Anderson DE, Palpant S, Mroch H, Askin S, Anderson J, u. a. Blood Cultures Positive for Coagulase-Negative Staphylococci: Antisepsis, Pseudobacteremia, and Therapy of Patients. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):1923.
87. Bell BG, Schellevis F, Stobberingh E, Goossens H, Pringle M. A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect Dis*. 9. Jänner 2014;14(1):13.
88. Hutchison CA III. DNA sequencing: bench to bedside and beyond †. *Nucleic Acids Res*. 15. September 2007;35(18):6227–37.
89. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dezember 1977;74(12):5463–7.
90. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 1. Jänner 2016;107(1):1–8.
91. Besser J, Carleton HA, Gerner-Smidt P, Lindsey RL, Trees E. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin Microbiol Infect*. 1. April 2018;24(4):335–41.
92. Mustafa AS. Whole Genome Sequencing: Applications in Clinical Bacteriology. *Med Princ Pract*. 23. Februar 2024;33(3):185–97.
93. Nyrén P, Lundin A. Enzymatic method for continuous monitoring of inorganic pyrophosphate synthesis. *Anal Biochem*. 1. Dezember 1985;151(2):504–9.
94. Margulies M, Egholm M, Altman WE, Attiya S, Bader JS, Bemben LA, u. a. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 15. September 2005;437(7057):376–80.

95. Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. April 2018;122(1):e59.
96. Amarasinghe SL, Su S, Dong X, Zappia L, Ritchie ME, Gouil Q. Opportunities and challenges in long-read sequencing data analysis. *Genome Biol*. 7. Februar 2020;21(1):30.
97. Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 1. November 2021;82(11):801–11.
98. Aird D, Ross MG, Chen WS, Danielsson M, Fennell T, Russ C, u. a. Analyzing and minimizing PCR amplification bias in Illumina sequencing libraries. *Genome Biol*. 21. Februar 2011;12(2):R18.
99. Rhoads A, Au KF. PacBio Sequencing and Its Applications. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 1. Oktober 2015;13(5):278–89.
100. Chen J, Xu F. Application of Nanopore Sequencing in the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Infections. *Mol Diagn Ther*. 1. November 2023;27(6):685–701.
101. Zheng P, Zhou C, Ding Y, Liu B, Lu L, Zhu F, u. a. Nanopore sequencing technology and its applications. *MedComm*. 10. Juli 2023;4(4):e316.
102. Wang Y, Zhao Y, Bollas A, Wang Y, Au KF. Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol*. November 2021;39(11):1348.
103. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 1. Oktober 2016;14(5):265–79.
104. Oxford Nanopore Technologies. MinION Nanopore [Internet]. [zitiert 1. Juli 2024]. Verfügbar unter: <https://nanoporetech.com/about/for-the-media>
105. MacKenzie M, Argyropoulos C. An Introduction to Nanopore Sequencing: Past, Present, and Future Considerations. *Micromachines*. 16. Februar 2023;14(2):459.
106. Ledergerber C, Dessimoz C. Base-calling for next-generation sequencing platforms. *Brief Bioinform*. September 2011;12(5):489–97.
107. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, u. a. Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature*. 11. Februar 2016;530(7589):228–32.
108. Schmidt K, Mwaigwisya S, Crossman LC, Doumith M, Munroe D, Pires C, u. a. Identification of bacterial pathogens and antimicrobial resistance directly from clinical urines by nanopore-based metagenomic sequencing. *J Antimicrob Chemother*. 1. Jänner 2017;72(1):104–14.

109. Charalampous T, Kay GL, Richardson H, Aydin A, Baldan R, Jeanes C, u. a. Nanopore metagenomics enables rapid clinical diagnosis of bacterial lower respiratory infection. *Nat Biotechnol.* Juli 2019;37(7):783–92.
110. Grumaz C, Hoffmann A, Vainshtein Y, Kopp M, Grumaz S, Stevens P, u. a. Rapid Next-Generation Sequencing–Based Diagnostics of Bacteremia in Septic Patients. *J Mol Diagn.* 1. März 2020;22(3):405–18.
111. Ashikawa S, Tarumoto N, Imai K, Sakai J, Kodana M, Kawamura T, u. a. Rapid identification of pathogens from positive blood culture bottles with the MinION nanopore sequencer. *J Med Microbiol.* 2018;67(11):1589–95.
112. Sakai J, Tarumoto N, Kodana M, Ashikawa S, Imai K, Kawamura T, u. a. An identification protocol for ESBL-producing Gram-negative bacteria bloodstream infections using a MinION nanopore sequencer. *J Med Microbiol.* 2019;68(8):1219–26.
113. Han D, Yu F, Zhang D, Hu J, Zhang X, Xiang D, u. a. Molecular rapid diagnostic testing for bloodstream infections: Nanopore targeted sequencing with pathogen-specific primers. *J Infect [Internet].* 1. Juni 2024 [zitiert 22. Juni 2024];88(6). Verfügbar unter: [https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453\(24\)00100-2/fulltext](https://www.journalofinfection.com/article/S0163-4453(24)00100-2/fulltext)
114. Hong M, Peng D, Fu A, Wang X, Zheng Y, Xia L, u. a. The application of nanopore targeted sequencing in the diagnosis and antimicrobial treatment guidance of bloodstream infection of febrile neutropenia patients with hematologic disease. *J Cell Mol Med.* 2023;27(4):506–14.
115. Liu Y, Xu Y, Xu X, Chen X, Chen H, Zhang J, u. a. Metagenomic identification of pathogens and antimicrobial-resistant genes in bacterial positive blood cultures by nanopore sequencing. *Front Cell Infect Microbiol.* 12. Dezember 2023;13(1283094):doi: 10.3389/fcimb.2023.1283094.
116. Chan WS, Au CH, Chung Y, Leung HCM, Ho DN, Wong EYL, u. a. Rapid and economical drug resistance profiling with Nanopore MinION for clinical specimens with low bacillary burden of *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Res Notes.* 18. September 2020;13(1):444.
117. Yee R, Dien Bard J, Simner PJ. The Genotype-to-Phenotype Dilemma: How Should Laboratories Approach Discordant Susceptibility Results? *J Clin Microbiol.* 19. Mai 2021;59(6):10.1128/jcm.00138-20.
118. Wain J, Diep TS, Ho VA, Walsh AM, Hoa NTT, Parry CM, u. a. Quantitation of Bacteria in Blood of Typhoid Fever Patients and Relationship between Counts and Clinical Features, Transmissibility, and Antibiotic Resistance. *J Clin Microbiol.* Juni 1998;36(6):1683–7.
119. Henry NK, McLimans CA, Wright AJ, Thompson RL, Wilson WR, Washington JA. Microbiological and clinical evaluation of the isolator lysis-centrifugation blood culture tube. *J Clin Microbiol.* Mai 1983;17(5):864–9.

120. Kreger BE, Craven DE, Carling PC, McCabe WR. Gram-negative bacteremia: III. Reassessment of etiology, epidemiology and ecology in 612 patients. *Am J Med.* 1. März 1980;68(3):332–43.
121. Guinea J, Recio S, Escribano P, Torres-Narbona M, Pelaez T, Sánchez-Carrillo C, u. a. Rapid Antifungal Susceptibility Determination for Yeast Isolates by Use of Etest Performed Directly on Blood Samples from Patients with Fungemia. *J Clin Microbiol.* 1. Jänner 2010;48:2205–12.
122. Rosett W, Hodges GR. Antimicrobial Activity of Heparin. *J Clin Microbiol.* Jänner 1980;11(1):30–4.
123. QIAGEN. QIAasymphony® DSP DNA Midi Kit Instructions for Use (Protocol Sheet) DNA_Buffy_Coat_400_V6 DSP protocol [Internet]. 2022. Verfügbar unter: <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=cdaf9d9d-3e65-4a3b-801f-0fe474e7535b&lang=en>
124. Oxford Nanopore Technologies [Internet]. 2022 [zitiert 27. Mai 2025]. Ligation sequencing amplicons - Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24). Verfügbar unter: <https://nanoporetech.com/document/ligation-sequencing-amplicons-native-barcoding-v14-sqk-nbd114-24>
125. epi2me-labs/wf-metagenomics [Internet]. GITHUB; 2025 [zitiert 19. Juli 2025]. Verfügbar unter: <https://github.com/epi2me-labs/wf-metagenomics>
126. The Bokulich Lab. MOSHPIT tutorials [Internet]. The Bokulich Lab; 2023 [zitiert 19. Juli 2025]. Verfügbar unter: <https://bokulich-lab.github.io/moshpit-docs/intro.html>
127. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, u. a. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol.* August 2019;37(8):852–7.
128. Davis NM, Proctor DM, Holmes SP, Relman DA, Callahan BJ. Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome.* 17. Dezember 2018;6(1):226.
129. Matlock B. Assessment of Nucleic Acid Purity [Internet]. Wilmington, MA, USA: Thermo Fisher Scientific; S. 3. Report No.: 52646. Verfügbar unter: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>
130. Sanderson ND, Kapel N, Rodger G, Webster H, Lipworth S, Street TL, u. a. Comparison of R9.4.1/Kit10 and R10/Kit12 Oxford Nanopore flowcells and chemistries in bacterial genome reconstruction. *Microb Genomics.* 2023;9(1):000910.
131. Ewing B, Green P. Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred. II. Error Probabilities. *Genome Res.* 1. März 1998;8(3):186–94.

132. Ali J, Johansen W, Ahmad R. Short turnaround time of seven to nine hours from sample collection until informed decision for sepsis treatment using nanopore sequencing. *Sci Rep.* 19. März 2024;14(1):6534.
133. Bellankimath AB, Chapagain C, Branders S, Ali J, Wilson RC, Johansen TEB, u. a. Culture and amplification-free nanopore sequencing for rapid detection of pathogens and antimicrobial resistance genes from urine. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1. November 2024;43(11):2177–90.
134. Zhang L, Huang W, Zhang S, Li Q, Wang Y, Chen T, u. a. Rapid Detection of Bacterial Pathogens and Antimicrobial Resistance Genes in Clinical Urine Samples With Urinary Tract Infection by Metagenomic Nanopore Sequencing. *Front Microbiol.* 17. Mai 2022;13:Article 858777.
135. Bukyya JL, Tejasvi MLA, Avinash A, P. CH, Talwade P, Afroz MM, u. a. DNA Profiling in Forensic Science: A Review. *Glob Med Genet.* 31. Mai 2021;8(4):135–43.
136. Suzuki N, Kamataki A, Yamaki J, Homma Y. Characterization of circulating DNA in healthy human plasma. *Clin Chim Acta.* 1. Jänner 2008;387(1):55–8.
137. Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 24. Jänner 2019;14(1):319–38.
138. Harris PNA, Bauer MJ, Lüftinger L, Beisken S, Forde BM, Balch R, u. a. Rapid nanopore sequencing and predictive susceptibility testing of positive blood cultures from intensive care patients with sepsis. *Microbiol Spectr.* 9. Jänner 2024;12(2):e03065-23.
139. Martin S, Heavens D, Lan Y, Horsfield S, Clark MD, Leggett RM. Nanopore adaptive sampling: a tool for enrichment of low abundance species in metagenomic samples. *Genome Biol.* 24. Jänner 2022;23(1):11.