

Diplomarbeit

Einfluss der beschleunigten Sensibilitätstestung von bakteriellen Erregern aus positiven Blutkulturen nach EUCAST 2018 auf die antimikrobielle Therapie

eingereicht von

Tobias Loizenbaur

zur Erlangung des akademischen Grades

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

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt am

**Universitätsklinikum für Innere Medizin/
Sektion Infektiologie & Tropenmedizin**

unter der Anleitung von

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

und

OA. Dr.med. Thomas Valentin

Graz, 21.11.2019

Eidesstattliche Erklärung

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

Graz, am 21.11.2019

Tobias Loizenbaur eh

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei allen bedanken, die mich in diesem Prozess unterstützt haben.

Dieser Dank gilt meiner Familie, meinen Freunden, meiner Partnerin und dem Team der Infektiologie.

Durch die umfassende Hilfe meiner Freundin Sandra Moser konnten wir das Beste aus der Arbeit hervorholen. Sie half mir die Arbeit grammatikalisch zu korrigieren, obwohl sie keinerlei Vorwissen auf diesem Gebiet besaß.

Auch Frau Professor Ines Zollner-Schwetz muss hier erwähnt werden. Sie stand mir immer mit Rat und Tat zur Seite und ermöglichte mir durch ihr Engagement das Voranschreiten und Gelingen dieser Arbeit. Sie eröffnete mir, gemeinsam mit ihren Kolleginnen und Kollegen, Einblicke in die mikrobiologische Diagnostik, wodurch sich sowohl mein Interesse als auch mein Wissen in diesem Bereich erheblich steigerten.

Zusammenfassung

Hintergrund: Aufgrund steigender Inzidenz und Mortalität wurde Sepsis von der WHO 2017 zu einer globalen Gesundheitsbedrohung erklärt. Eine adäquate antiinfektive Therapie ist eines der Schlüsselemente, um die Mortalität von Betroffenen zu senken. Die Plättchendiffusionsmethode ist aufgrund ihrer einfachen Durchführung weit verbreitet. Die neue Methode der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) ermöglicht Aussagen über Resistenzen bereits nach vierstündiger Inkubation. Ziel dieser Studie ist die Evaluierung der neuen EUCAST Methodik sowie deren Einfluss auf die antimikrobielle Therapie zu bewerten.

Methoden: Von 16.01.2019 bis 23.05.2019 wurden Blutkulturen von 50 Patientinnen und Patienten des Universitätsklinikums für Innere Medizin Graz untersucht. Blutkulturen wurden gemäß der neuen EUCAST Methodik bearbeitet. Die Erregeridentifikation erfolgte nach vierstündiger Inkubation auf der Agarplatte mittels MALDI-TOF MS. Hemmhofdurchmesser nach vier-, sechs- und 24-stündiger Inkubation wurden vermessen und entsprechend der geltenden EUCAST-Richtlinien interpretiert. Zusätzlich wurde eine Testung mittels Vitek 2 durchgeführt. Anschließend wurden die Ergebnisse verglichen. Ein infektiologisches Begutachtung erfolgte am selben Tag. Therapieänderungen im Zuge des Konsils wurden erfasst und mit der ursprünglichen antimikrobiellen Therapie verglichen.

Ergebnisse: *Escherichia coli* (n=20; 40,0 %) und *Staphylococcus aureus* (n=17; 34,0 %) wurden am häufigsten nachgewiesen. 207 von 582 Messwerten (35,6 %) konnten aufgrund eines nicht eindeutigen oder nicht interpretierbaren Hemmhofdurchmessers nicht verwertet werden. Nach vier Stunden waren 146 (50,0 %) Ergebnisse nicht verwertbar und nach sechs Stunden 61 (21,0 %). Bei Vergleich der RAST-Methode mit der Standardplättchendiffusionsmethode konnten 12 Diskrepanzen (4,0 %) festgestellt werden. Ein Großteil dieser Werte basierte auf falschen Messergebnissen nach vierstündiger Inkubation. Im Zuge von 37 Konsilen und zwei telefonischen Konsilen wurde die antimikrobielle Therapie in 17 Fällen geändert und 14 klinisch-diagnostisch relevante Maßnahmen eingeleitet.

Diskussion: Die RAST-Methodik zeigte nach vierstündiger Inkubation eine relativ geringe Aussagekraft, weil eine hohe Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen und eine hohe Zahl an Diskrepanzen auftraten. Nach sechsstündiger Bebrütungsdauer hingegen konnten sehr gute Ergebnisse, vor allem bei *E. coli*, erzielt werden. Ob durch die RAST-Methode die Mortalität gesenkt werden kann, muss durch weitere Studien evaluiert werden.

Abstract

Background: Sepsis has been declared a world health priority from the WHO due to rising incidence and mortality. Administration of effective antibiotic therapy is a key element in order to reduce mortality of affected people. Disk diffusion methods are still a diagnostic gold standard, because they are easy to perform and have a high sensitivity. With the new method of EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) results of antimicrobial susceptibility testing are available as early as four hours after blood culture positivity. The aim of this study is to evaluate the new method of EUCAST and to assess its influence on antimicrobial therapy.

Methods: From 16.01.2019 until 23.05.2019 blood cultures from 50 patients of the university hospital of Internal Medicine in Graz have been collected. After positivity, blood cultures have been processed according to the new EUCAST method. Identification of bacteria was performed four hours after incubation on an agar plate via MALDI-TOF MS. Zone diameters were read and interpreted according to EUCAST guidelines after incubation of four, six and 24 hours. Additionally, susceptibility testing with Vitek 2 was performed. The results were compared. Subsequently, an infectious disease consultation was performed on the same day. Changes in antimicrobial therapy were noted and compared with the original therapy afterwards.

Results: *Escherichia coli* (n=20; 40,0 %) and *Staphylococcus aureus* (n=17; 34,0 %) have been the most frequently detected bacteria. 207 of 508 measured values (35,6 %) obtained no information, because of an uncertain zone diameter or a not interpretable diameter. After four hours of incubation 146 results obtained no information (50,0 %), but only 61 (21,0 %) did so after six hours of incubation. 12 discrepancies in comparison of RAST and traditional disk diffusion were detected. Most of the discrepancies are based on wrong results after four hours of incubation. In the course of 37 infectious disease on-bed consultations and two telephonic consultations, antimicrobial therapy was changed in 17 patients and 14 clinic-diagnostic steps were initiated.

Discussion: The RAST-method has poor validity after four hours of incubation, because of a high number of measurements with lack of information and a high number of discrepancies. However, results after six hours of incubation show a good performance, especially with *E. coli*. The effect of this method on mortality has to be evaluated in further studies.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	iii
Zusammenfassung	iv
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Glossar und Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Bakteriämie und Sepsis.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	3
1.1.2 Ätiologie Sepsis	4
1.1.3 Pathophysiologie von Sepsis	5
1.1.4 Antiinfektive Therapie bei Sepsis	12
1.2 Diagnostik von Bakteriämie	16
1.2.1 Abnehmen von Blutkulturen	16
1.2.2 Funktionsweise von Blutkulturlesegeräten.....	19
1.2.3 Identifikationsmethoden für Bakterien	20
1.2.4 Empfindlichkeitstestung von Bakterien	27
1.3 Molekulare Methoden zur beschleunigten Sensibilitätstestung.....	33
1.3.1 Anwendung molekularer Methoden aus positiven Blutkulturen.....	34
1.3.2 Anwendung molekularer Methoden direkt aus Vollblutproben (ohne vorangehende Inkubation)	40
1.3.3 Vor- und Nachteile der molekularen Diagnostik.....	41
1.4 Beschleunigte Sensibilitätstestung von Blutkulturen gemäß EUCAST 2018	43
1.5 Ziele der Arbeit	44
2 Material und Methoden	45

2.1	Ausschlusskriterien	47
2.2	Studiendauer und Stichprobengröße	47
2.3	Datenbeschaffung und Verarbeitung	48
3	Ergebnisse – Resultate	49
3.1	Patientenkollektiv	49
3.2	Nachgewiesene Erreger	50
3.3	Häufigkeit von nicht verwertbaren Ergebnissen	51
3.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	53
3.3.2	<i>Escherichia coli</i>	54
3.4	Diskrepanzen	56
3.4.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	58
3.4.2	<i>Escherichia coli</i>	59
3.4.3	<i>Enterococcus faecium</i> und <i>Enterococcus faecalis</i>	60
3.4.4	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	61
3.4.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	62
3.4.6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
3.5	Änderung der Therapie und Einleitung weiterer Maßnahmen	64
4	Diskussion	66
4.1	Aussage und Bedeutung	66
4.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	67
4.1.2	<i>Escherichia coli</i>	69
4.1.3	Einfluss des RAST auf die antimikrobielle Therapie	70
4.2	Limitationen	71
5	Literaturverzeichnis	73

Glossar und Abkürzungen

A

ARDS.....	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
AST	Antimicrobial Susceptibility Testing
ATU	<i>Area of Technical Uncertainty</i>

B

BCID.....	<i>Blood Culture Identification Panel</i>
-----------	---

C

CFU.....	<i>colony forming unit</i>
CLSI.....	<i>Clinical & Laboratory Standards Institute</i>
CNS.....	<i>coagulase negative staphylococci</i>

D

DIC.....	<i>disseminierten intravaskulären Koagulopathie</i>
----------	---

E

EUCAST.....	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
-------------	---

F

FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung</i>

G

GSA.....	<i>Global Sepsis Alliance</i>
----------	-------------------------------

L

LAMP.....	<i>Loop-mediated Isothermal Amplification</i>
LPS.....	<i>Lipopolysaccharid</i>

M

MALDI-TOF MS.....	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry</i>
MAP.....	<i>Mean Arterial Pressure</i>
MHK	<i>minimale Hemmkonzentration</i>

MRSA..... *Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus*
MSSA..... *Methicillin-sensiblen Staphylococcus aureus*

P

PCR..... *Polymerase Chain Reaction*
PNA..... *Peptide Nucleic Acid*

R

rDNA..... *ribosomale DNA*

S

SIRS..... *Systemic Inflammatory Response Syndrom*
SOFA..... *Sequential Organ Failure Assessment*

T

TTP..... *Time to Positivity*

W

WHA..... *World Health Assembly*
WHO..... *World Health Organization*

Z

ZVK..... *zentraler Venenkatheter*

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: DARSTELLUNG DER AM HÄUFIGSTEN NACHGEWIESENEN ERREGER AUS POSITIVEN BLUTKULTUREN DES UNIVERSITÄTSKLINIKUMS FÜR INNERE MEDIZIN GRAZ, 2018.	4
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHER ABLAUF DER ENTZÜNDUNGSREAKTION BEI SEPSIS.	6
ABBILDUNG 3: KUMULATIVER EFFEKT ADÄQUATER ANTIMIKROBIELLER THERAPIE NACH AUFTRETEN VON HYPOTONIE BEI SEPTISCHEM SCHOCK.	13
ABBILDUNG 4: ABNAHME EINER BLUTKULTUR AUS EINER PERIPHEREN VENE.	18
ABBILDUNG 5: BLUTKULTURFLASCHEN VON BD DIAGNOSTICS®.	19
ABBILDUNG 6: MATRIX-ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION–TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY (MALDI-TOF MS)..	24
ABBILDUNG 7: ANTIBIOGRAMM MITTELS PLÄTTCHENDIFFUSIONSTEST.	28
ABBILDUNG 8: MÖGLICHE ZEITPUNKTE, AN DENEN MOLEKULARE METHODEN ZUR IDENTIFIKATION UND TEILWEISE ZUR EMPFINDLICHKEITSTESTUNG EINGESETZT WERDEN KÖNNEN.	34
ABBILDUNG 9: VEREINFACHTE DARSTELLUNG DES PRINZIPS EINES MIKROARRAY.	36
ABBILDUNG 10: SCHEMATISCHER DARSTELLUNG DER RIBOSOMALEN DNA.	40
ABBILDUNG 11: STUDIENDESIGN.	46
ABBILDUNG 12: DARSTELLUNG DES ALTERS DER PROBANDINNEN UND PROBANDEN IM BEZUG AUF DAS GESCHLECHT.	49
ABBILDUNG 13: ANZAHL DER NACHGEWIESENEN NACH KEIMNAME.	50

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ANZAHL DER NICHT VERWERTBAREN ERGEBNISSE IN BEZUG AUF DIE EINZELNEN ERREGER IN ABSOLUTEN ZAHLEN UND PROZENT.....	51
TABELLE 2: ANZAHL UND PROZENT ATU UND NICHT INTERPRETIERBAR BEZOGEN AUF DIE EINZELNEN ERREGER SOWIE AUF DIE ENTSPRECHENDEN MESSZEITPUNKTE.	52
TABELLE 3: ANZAHL UND PROZENT DER NICHT VERWERTBAREN ERGEBNISSE BEI STAPHYLOCOCCUS AUREUS AUFGESPALTEN IN ATU UND NICHT INTERPRETIERBAR IN BEZUG AUF DIE EINZELNEN ANTIINFECTIVEN SUBSTANZEN UND ENTSPRECHENDEN MESSZEITPUNKTE.....	54
TABELLE 4: ANZAHL UND PROZENT DER NICHT VERWERTBAREN ERGEBNISSE BEI ESCHERICHIA COLI AUFGESPALTEN IN ATU UND NICHT INTERPRETIERBAR IN BEZUG AUF DIE EINZELNEN ANTIINFECTIVEN SUBSTANZEN UND ENTSPRECHENDEN MESSZEITPUNKTE.....	55
TABELLE 5: DARSTELLUNG DER AUFGETRETENEN DISKREPANZEN ALLER ERREGER IN ABSOLUTEN WERTEN UND PROZENT BEI VERGLEICH DER RAST-METHODIK MIT DER PLÄTTCHENDIFFUSIONSMETHODE NACH 24 STUNDEN.....	56
TABELLE 6: DETAILIERTE ANALYSE DER AUFGETRETENEN DISKREPANZEN ZWISCHEN DEN MESSMETHODEN RAST, STANDARDPLÄTTCHENDIFFUSION UND VITEK 2.	57
TABELLE 7: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI STAPHYLOCOCCUS AUREUS AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.....	58
TABELLE 8: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI ESCHERICHIA COLI AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.....	60
TABELLE 9: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI ENTEROCOCCUS FAECIUM AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA..	61
TABELLE 10: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI ENTEROCOCCUS FAECALIS AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.....	61
TABELLE 11: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.	62
TABELLE 12: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESTS NACH 24 STUNDEN BEI KLEBSIELLA PNEUMONIAE AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.....	63
TABELLE 13: VERGLEICH DER ERGEBNISSE DER RAST-METHODIK MIT DENEN DES PLÄTTCHENDIFFUSIONSTESS NACH 24 STUNDEN BEI PSEUDOMONAS AERUGINOSA AUFGESPALTEN IN DIE EINZELNEN ANTIBIOTIKA.	63
TABELLE 14: HÄUFIGKEITSDARSTELLUNG DER THERAPIEÄNDERUNG UNTER BERÜCKSICHTIGUNG DER TELEFONISCHEN KONSILE. .	65

1 Einleitung

Aufgrund steigender Inzidenz und Mortalität wurde Sepsis von der WHO 2017 zu einer globalen Gesundheitsbedrohung erklärt. (8,9) Eine adäquate, empirische antiinfektive Therapie ist eines der Schlüsselemente, um die Mortalität von Betroffenen zu senken. (7,54,56) Ist der Nachweis eines pathogenen Erregers z.B. aus der Blutkultur gelungen, soll die antimikrobielle Therapie entsprechend der Sensibilitätstestung angepasst oder auch deeskaliert werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist die Sensibilitätstestung jedoch mit einer relativ langen Wartezeit, von ungefähr 48 Stunden, behaftet und diese kann je nach Erreger variieren.

Seit 2018 kann bei manchen Erregern durch die beschleunigte Sensibilitätstestung von Blutkulturen nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) eine wesentliche Verkürzung der Wartezeit erreicht werden. Dadurch können Resistenzbildungen vermindert, Nebenwirkungen sowie Toxizitäten reduziert (16) und womöglich auch das Outcome der Patientinnen und Patienten optimiert werden.

1.1 Bakteriämie und Sepsis

Unter einer Bakteriämie versteht man das vorübergehende Auftreten von lebensfähigen Bakterien in der Blutbahn, „wobei es definitionsgemäß weder zur Vermehrung der Bakterien im Blut noch zur Absiedelung der Infektion in andere Organe kommt.“(1) Ein Übergang in eine Sepsis ist allerdings möglich. (1,2)

Hippokrates hat den medizinischen Begriff der Sepsis eingeführt, der sich vom griechischen Wort „sipsi“ ableitet und Fäulnis bedeutet. (3) Im Laufe der Jahrhunderte hat sich die Definition der Sepsis, vor allem bedingt durch die Keimtheorie von Erkrankungen und Durchbrüche in der Bakteriologie, mehrmals verändert. Diese Entwicklungen führten zur Ansicht, dass eine Sepsis durch pathogene Mikroorganismen, die sich über den Blutstrom verteilen und zu einer systemischen Entzündung führen, verursacht wird. Die Entdeckung von Endotoxinen und die Applikation von Antibiotika zeigten allerdings, dass die Pathophysiologie der Sepsis komplizierter ist, als diese Theorie annimmt. (4,5)

2016 wurde der Begriff Sepsis neu definiert, nämlich als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, die durch eine Dysregulation der Wirtsantwort auf die Infektion verursacht wird. Organdysfunktionen werden mittels Sequential-Organ-Failure-Assessment-Score (SOFA-Score) evaluiert. Die Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom-Kriterien (SIRS-Kriterien), die man vor 2016 zur Diagnostik herangezogen hat, werden heute aufgrund mangelnder Sensitivität und Spezifität nicht mehr verwendet. (6,7) Diese weisen lediglich auf eine Inflammation im Allgemeinen hin und sind somit Zeichen einer adäquaten Wirtsantwort. Die Pathophysiologie der Sepsis ist jedoch weitaus komplexer, wie die oben genannte Definition bereits zeigt. Im Zuge dieser neuen Definition wurde der Terminus „Schwere Sepsis“ – früher definiert durch Vorhandensein einer Sepsis und Auftreten von Organdysfunktion(en) – für obsolet erklärt. (7)

Der Begriff des septischen Schocks wurde ebenfalls neu definiert als Teil der Sepsis, bei dem es aufgrund von Störungen von Kreislauf und zellulären Metabolismus zu einer Erhöhung der Mortalität im Vergleich zur Sepsis kommt. Diese Patientinnen und Patienten können durch eine persistierende, vasokonstriktorpflichtige Hypotonie mit einem MAP (Mean Arterial Pressure) von höchstens 65 mmHg und einer Erhöhung des Serumlaktats über 2 mmol/L – trotz ausreichender Volumensubstitution – identifiziert werden. (7)

1.1.1 Epidemiologie

2017 erklärte das World Health Assembly (WHA), das entscheidungsfällende Organ der World Health Organization (WHO), Sepsis zu einer globalen Gesundheitsbedrohung. Ungefähr 31 Millionen Menschen erkrankten weltweit jährlich an einer Sepsis, 6 Millionen davon versterben daran. Viele dieser Tode sind vermeidbar. Aufgrund dieser hohen Zahlen und einer deutlich steigenden Inzidenz der Erkrankung in den Industriestaaten wurde diese Resolution der WHA, initiiert durch die Global Sepsis Alliance (GSA), veröffentlicht. Ziele dieser Resolution sind unter anderem Prävention von Infektionen durch die Förderung von Handhygiene, die Verbesserung von Hygienestandards und den verbesserten Zugang zu Impfungen, sowie besseres Training für behandelnde Ärztinnen, Ärzte und Laien sowie Sensibilisierung der Bevölkerung für Infektionskrankheiten und deren mögliche Progression zur Sepsis. Ebenfalls wird auf die korrekte Verwendung von antibiotischen Substanzen sowie auf die Entwicklung und Förderung von Antimicrobial Stewardship Programms zur Reduktion von bakteriellen Resistenzen hingewiesen. (8,9)

1992 zeigten Bone et al., dass Sepsis die häufigste Todesursache auf nicht-kardiologischen Intensivstationen ist. (10) Dies kann natürlich nicht analog auf das Jahr 2019 übertragen werden, da sich die Definition der Sepsis seit damals schon mehrmals geändert hat und vor dem 3. Internationalen Sepsis Konsensus (Sepsis 3) mehrere Definitionen und Terminologien gebräuchlich waren. (7) Epidemiologische Daten zur Sepsis, vor allem Daten zur Inzidenz, weisen große Diskrepanzen auf. Eine Steigerung der Inzidenz kann jedoch festgestellt werden. (7,11,12) Dies führt man unter anderem auf eine älter werdende Gesellschaft mit mehr Komorbiditäten sowie auf ein besseres Erkennen der Erkrankung zurück. (7)

Analog zur Inzidenz kann die Mortalität von Sepsis nicht genau angegeben werden. (7) Herold et al. (13) und Singer et al. (7) geben an, dass diese bei mehr als 10 % liegt. Bei einem septischen Schock liegt die Mortalität bei über 40 %. (7,13)

1.1.2 Ätiologie Sepsis

Die Identifikation der Quelle einer Sepsis-verursachenden Infektion spielt eine sehr wichtige Rolle in der Therapie der Sepsis. Sehr häufig sind Infektionen der Atemwege, des Urogenitaltrakts und von Venenverweilkanülen, insbesondere zentraler Venenverweilkanülen, für Bakteriämien verantwortlich. Intraabdominelle sowie Haut- und Weichteilinfektionen spielen vor allem bei postoperativem Auftreten von Sepsis eine Rolle. (2,14,15)

Zu den häufigsten grampositiven Erregern von Sepsis zählen *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*, zu den häufigsten gramnegativen *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* und *Pseudomonas aeruginosa*. (13) Opota et al. zeigten hingegen, dass Koagulase-negative Staphylokokken weitaus häufiger als Pneumokokken aus Blutkulturen isoliert werden konnten. Sie konnten *E. coli* und *Staphylococcus aureus* am häufigsten in positiven Blutkulturen nachweisen. (16) Der Resistenzbericht des Universitätsklinikums für Inner Medizin Graz 2018 zeigte ähnliche Zahlen. (17)

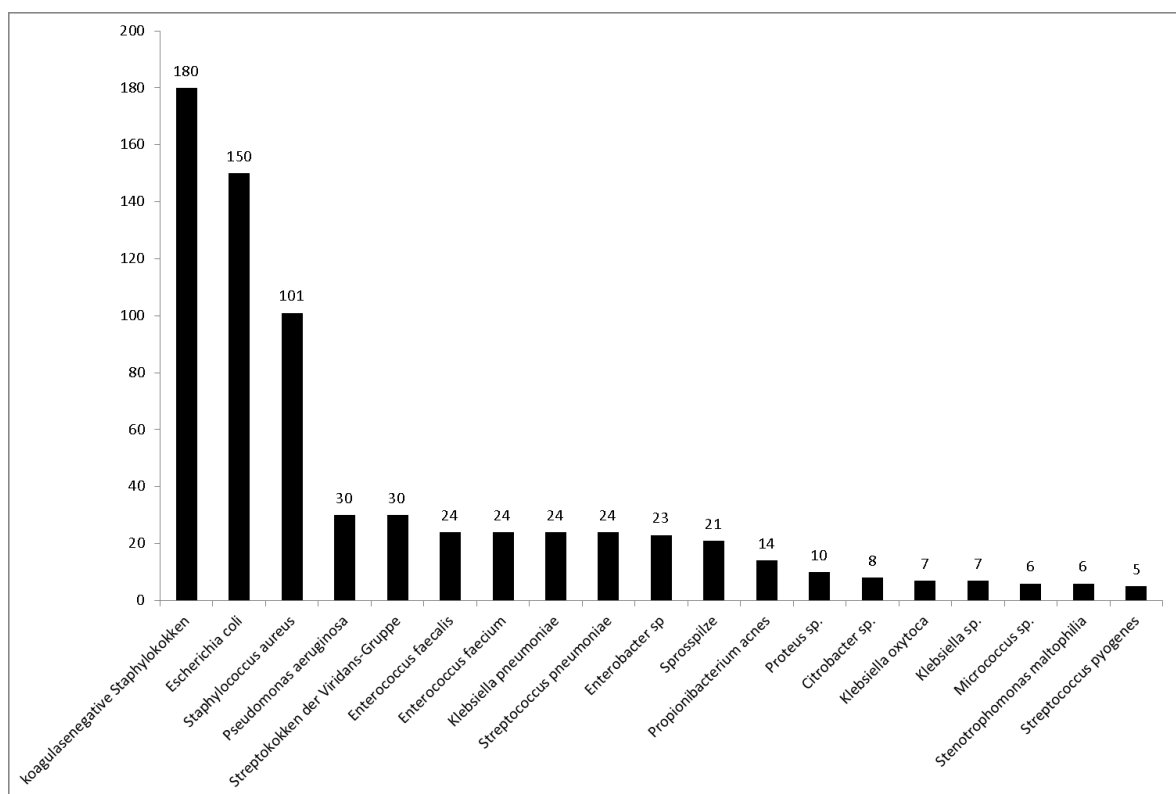


Abbildung 1: Darstellung der am häufigsten nachgewiesenen Erreger aus positiven Blutkulturen des Universitätsklinikums für Innere Medizin Graz, 2018.

Abbildung Krause R, Zollner-Scwetz I, Valentin T, Prattes J, Wunsch S, Strempl C, et al. Resistenz-bericht 2018 . 2019.

1.1.2.1 Transiente Bakteriämie

Es ist wichtig, transiente Bakteriämien von Sepsis abzugrenzen, da diese bei gesunden Menschen meist ohne weitere Konsequenzen ablaufen und nach kurzer Zeit wieder verschwinden. Transiente Bakteriämien treten oft nach Aktivitäten des täglichen Lebens, wie zum Beispiel dem Zähneputzen oder kleinen medizinischen Eingriffen auf. (2) Forner et al. konnten einen Zusammenhang zwischen Paradontitis und dem Ausmaß sowie der Dauer der Bakteriämie herstellen. Bakteriämien traten bei Patientinnen und Patienten mit Paradontitis sowohl nach dem Kauen, Zähneputzen und nach der Entfernung von Zahnstein auf. (18). Eine Studie aus Afrika zeigte, dass Bakteriämien bei zahngesunden Menschen nach dem Zähneputzen auftreten können. (19) Forner et al. konnten dies allerdings nicht nachweisen. (18)

Diese beiden Studien zeigen außerdem, dass zahnärztliche Eingriffe ein Risiko für infektiöse Endokarditiden sind, denn es konnten verschieden Arten von Streptokokken (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguis*, etc.) entdeckt werden. Diese als Teil der Mundflora vorkommenden Bakterien sind eine der Hauptursachen für infektiöse Endokarditis bei Patientinnen und Patienten mit prädisponierenden Risikofaktoren, wie zum Beispiel Zustand nach rheumatischem Fieber. Transiente Bakteriämien können somit nicht nur durch den zeitlichen Verlauf, sondern auch durch das auftretende Erregerspektrum von Sepsis abgegrenzt werden. (16,18,19) (Vergleiche Abbildung 1)

1.1.3 Pathophysiologie von Sepsis

1.1.3.1 Allgemeiner Ablauf einer Entzündungsreaktion

Die Reaktion des Wirts auf die Invasion durch Mikroorganismen besteht aus einer proinflammatorischen und einer antiinflammatorischen Antwort. Das Ausmaß beider hängt sowohl von pathogenen als auch von Faktoren des Wirts (Umweltbedingungen, Erbanlagen, Alter und Komorbiditäten) ab. Im Zuge der Sepsis kommt es zu einer Dysregulation dieser Reaktionen.

Die Entzündungsreaktion wird durch das Erkennen eines Pathogens initiiert. Am Beginn steht die Aktivierung der Leukozyten (größtenteils neutrophile Granulozyten), gefolgt von der Komplementaktivierung und schlussendlich der Aktivierung der Gerinnung mit dem Ergebnis des bakteriellen Zelltodes. Zellnekrosen führen zu einer Verstärkung der Entzündungsreaktion, wodurch mehr Gewebe geschädigt wird. Dieser Prozess benötigt aufgrund der Möglichkeit der Eigenerhaltung und der Gefahr des Überschießens antiinflammatorische Gegenreaktionen. Mechanismen, die die Entzündung vorantreiben, werden durch endogene Kontrollmechanismen überwacht und reguliert. Zu letzteren zählen humorale, zelluläre und neurale Mechanismen. (4,5)

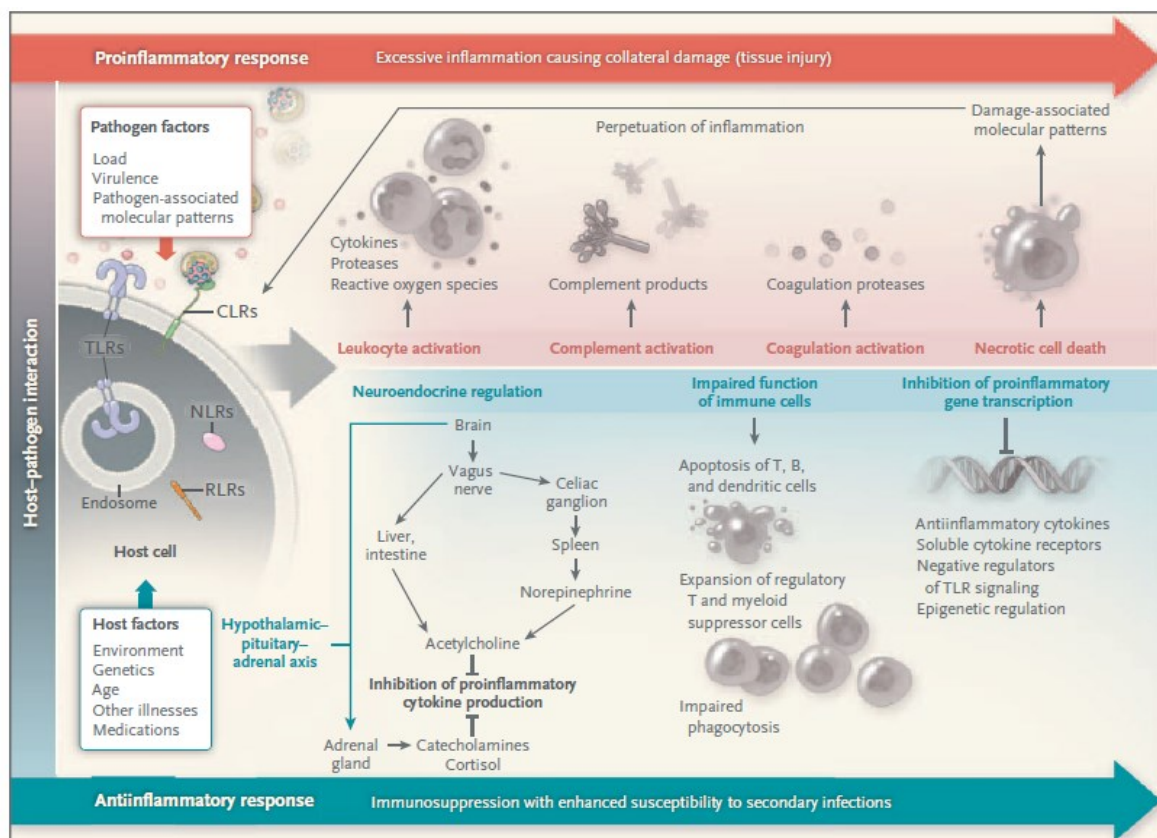


Abbildung 2: Schematischer Ablauf der Entzündungsreaktion bei Sepsis.

Der rote Bereich stellt die inflammatorische dar, der blaue die antiinflammatorische Antwort.

Abbildung aus Angus D.C und van der Poll T., Severe sepsis and septic shock. N.Engl.J.Med 2013. Verwendung der Abbildung genehmigt von Copyright Massachusetts Medical Society.

Unter der humoralen Gegenregulation versteht man das vermehrte Auftreten von regulatorischen T-Zellen und myeloiden Suppressorzellen, die beide das Fortschreiten der Entzündungsreaktion hemmen. Auf zellulärer Ebene kommt es zu einer verminderten Expression von proinflammatorischen Genen und auf neuronaler Ebene kommt es durch Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und der Milz durch den *Nervus vagus* zur Sekretion von Acetylcholin und Noradrenalin, was in CD4-T-Zellen zur verminderten Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren führt. (4,5)

1.1.3.2 Bedeutung der angeborenen Immunabwehr in Bezug auf Sepsis

Das angeborene Immunsystem spielt eine sehr wichtige Rolle in der Pathogenese von Sepsis. Es ist nicht nur für die Initiierung der antigenspezifischen Immunantwort verantwortlich, sondern auch an den klinischen Manifestationen und dem Systemic-Inflammatory-Response-Syndrom beteiligt. (20,21) Normalerweise invadieren Bakterien zuerst das Gewebe. Tritt eine Gewebsschädigung auf, kommt es zum Kontakt von Blut und Bakterien. Als erste Stufe der angeborenen Immunabwehr, müssen Bakterien die Komplementkaskade und lokale Blutgerinnung überwinden. (21,22) Durch Bestandteile der Mikroorganismen kommt es in nächster Instanz zur Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen und Monozyten. Diese aktivierten Zellen der angeborenen Immunabwehr sind zur Phagozytose befähigt, wodurch sie die Infektion stoppen können. (21,23) Allerdings haben einige Bakterien Mechanismen entwickelt, um die Aktivität der Makrophagen und die Immunantwort zu hemmen. (21,24)

Wenn sich Bakterien in der Blutbahn fortbewegen, werden diese aufgrund des triboelektrischen Effekts elektrisch aufgeladen – man spricht auch von Reibungselektrizität. Die Zellwand von Bakterien ist negativ geladen, wobei die Stärke der Negativladung von der physiologischen Beschaffenheit abhängt. Die Reibungselektrizität hingegen hängt von der Reibung der Bakterien mit Blutplasma, Gefäßwänden und anderen Zellen in Blutstrom ab. Da die triboelektrische Aufladung stärker als die negative Ladung der Bakterienzellwand ist, kommt es zur Interaktion der Bakterien mit anderen ebenfalls stark aufgeladenen Blutbestandteilen. Besonders starke Wechselwirkungen gibt es zwischen Bakterien und Erythrozyten, weil diese aufgrund ihrer besonderen Membraneigenschaften und bikonkaven Form stark triboelektrisch geladen sind. (21)

Bakterien werden aufgrund des triboelektrischen Effekts sofort an die Membran von Erythrozyten gehaftet, was zur umgehenden Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies, wie zum Beispiel Peroxide, Superoxide oder Hydroxyl-Radikale aus Erythrozyten führt. Die meisten Bakterien sind gegenüber diesen reaktiven Sauerstoffspezies empfindlich und werden dadurch getötet. (21,24,25) Daraus resultiert ein Verlust der elektrischen Aufladung, wodurch diese von den Erythrozyten gelöst werden. Mit dem Blutplasma gelangen die abgetöteten Bakterien in die Leber oder Milz, wo sie von Kuppfer'schen Sternzellen der Leber oder Makrophagen der Milz abgebaut werden. (21,25,26)

Einige Bakterien haben allerdings Mechanismen entwickelt, die sie die Oxidation an der Oberfläche der Erythrozyten überleben lassen. Dadurch kann es im Zuge der angeborenen Immunabwehr zur intravaskulären Gerinnung kommen, die möglicherweise zur disseminierten intravaskulären Koagulopathie (DIC) führt. (21,26,27)

1.1.3.3 Überlebensmechanismen von Bakterien in der Blutbahn

Um die bereits oben erwähnte Oxidation an der Oberfläche der Erythrozyten zu überleben, haben Bakterien einige Mechanismen entwickelt. Zu diesen zählen: Produktion von antioxidativen Enzymen (zum Beispiel Katalase, Superoxid-Dismutase, etc.) und Anpassung der Zellatmung an hohe die Konzentration an reaktive Sauerstoffspezies, Polysaccharidkapsel, Biofilmbildung sowie Wechsel in die L-Form. (21)

1.1.3.3.1 Produktion von antioxidativen Enzymen und Modulation der Zellatmung

Einer der Mechanismen sich vor der Oxidation an der Oberfläche der Erythrozyten zu schützen, ist die Produktion von antioxidativen Enzymen und die Anpassung der Zellatmung an die hohe Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies. Bei planktonischen Bakterien, die keine Kapsel haben und sich nicht in einem Biofilm befinden, stellt dieser Mechanismus den bedeutendsten dar. (21)

Planktonische Bakterien starten ihren Weg in die Blutbahn normalerweise im Gewebe, wo sie eine akute Entzündung verursachen und eine Undichtigkeit der Gefäße sowie die Produktion eines Exsudats stimulieren, um sich rasch zu vermehren und zu verteilen. (21,28) Aufgrund der hohen Proliferationsrate sind planktonische Bakterien gegenüber antiinfektiven Substanzen sehr empfindlich. (21,29) Nachdem freie Bakterien das Gewebe in die Blutbahn verlassen haben, können diese sich entweder freischwebend bewegen oder in Erythrozyten einwandern. Durch bereits genannte Mechanismen der Anpassung (antioxidative Enzyme, Anpassung der Zellatmung) können manche Bakterien an der Oberfläche der Erythrozyten überleben. (21)

Außerdem verfügen alle sepsisverursachenden Bakterien über Hämolsine, mit denen sie Poren in die Phospholipidschicht der Erythrozyten bohren können. (21,30,31) So können sie in Erythrozyten einwandern und ihr Hämoglobin als Nahrungsquelle verwenden, um sich zu vermehren. In weiterer Folge kommt es so zur kontinuierlichen Verbreitung dieser Erregerreservoirs durch den Blutstrom. (21)

1.1.3.3.2 Kapselproduktion

Die Polysaccharidkapsel befindet sich bei grampositiven Erregern direkt über der Mureinschicht und bei gramnegativen über der äußeren Membran. (21) Sie spielt eine wichtige Rolle im Schutz vor umweltbedingtem Stress (21,32), Phagozytose und Antibiotika (21,33). Außerdem kann sie für die Bildung eines Biofilms (21,34) bedeutend sein. Des Weiteren stellt die Kapsel einen bedeutenden Virulenzfaktor dar (21,35) und verhindert die triboelektrische Aufladung der Bakterien, weswegen bekapselte Bakterien nicht an Erythrozyten festgehalten werden. So können diese die Oxidation an der Oberfläche der Erythrozyten vermeiden. (21,27)

Die Kapsel stellt ein großes Hindernis für die antiinfektive Therapie dar, denn sie setzt die Menge an Antibiotika herab, die in das Bakterium eindringen können. (21,36) Dadurch kann es zu subinhibitorischen Konzentrationen von Antibiotika kommen, was zu einer intensivierten Produktion von Kapselpolysaccharid führt. Somit wird die Aufnahme von Antibiotika noch weiter einschränkt, woraus auch eine herabgesetzte Wirkung gegenüber anderen strukturell und funktionell nicht verwandten Antibiotika resultiert. (21,37,38)

1.1.3.3.3 Biofilmbildung

Unter einem Biofilm versteht man das koordinierte Zusammenleben von Bakterien, die in einer selbst produzierten Matrix leben. (39) Der Biofilm schützt die darin lebenden Bakterien vor Phagozytose (21,40) und führt zu einer hohen Resistenz der Bakterien gegenüber antiinfektiven Substanzen. (21,41) Sehr häufig kommt es zu chronischen Infektionen, die durch alleinige Therapie mit Antibiotika nicht ausreichend behandelt werden können. (21,42) Biofilmbildung tritt häufig auf Fremdkörpern, die zum Blutstrom Kontakt haben, wie zum Beispiel zentrale Venenkatheter (ZVK) und Herzschrittmacher-Elektroden, auf. (43) Aus dem Biofilm können sich Fragmente, aber auch freie Bakterien lösen und verteilen. (21,44)

1.1.3.3.4 L-Form von Bakterien

Durch den Einfluss von zellwandsynthesehemmenden Antibiotika, insbesondere Betalaktamantibiotika (39), können die meisten Bakterien in die L-Form wechseln. (21,45) Als L-Form-Bakterien werden jene bezeichnet, die eine Veränderung der Zellwand aufweisen. Der Name L-Form geht auf das Lister Institut zurück, wo Bakterien mit defizienter Zellwand das erste Mal 1935 beschrieben wurden. (46) Durch einen Mureindefekt (39) werden Bakterien in der L-Form gegenüber zellwandsynthesehemmenden Antibiotika völlig resistent. (47) Alle Bakterien in der L-Form haben sehr ähnliche Eigenschaften bezüglich Wachstum und Morphologie. (21,47) Diese Tatsache bekräftigt die Theorie, dass die L-Form auf primitive Bakterien zurückgeht, die noch keine Zellwand besaßen. (47)

Nach Behandlung lokaler Infektionen mit besagten antiinfektiven Substanzen können Bakterien, die in die L-Form gewechselt haben, lange Zeit im Gewebe persistieren, denn durch den Mangel an Peptidoglycan wird das angeborene Immunsystem nicht aktiviert. (21,46)

Makrophagen können diese zwar phagozytieren aber nicht abbauen. (21,48) Bakterien in L-Form können durch Leukozyten, Sphäroplasten und Protoplasten in die Blutbahn gelangen, sich hämatogen verbreiten und auf ungewöhnliche Weise reproduzieren. (21,49) Sphäroplasten und Protoplasten sind sehr fragil. Bakterien in der L-Form können allerdings in Leukozyten, Erythrozyten und Thrombozyten überleben. Durch den Abbau der infizierten Blutkörperchen, werden die Bakterien in der Leber oder der Milz erneut phagozytiert. Bei Bakteriämien mit Bakterien in der L-Form treten normalerweise keine typischen Zeichen einer Sepsis auf, allerdings spielen diese bei atypischen, chronischen und latenten Infektionen eine wichtige Rolle. (21)

1.1.3.4 Pathophysiologie des Organversagens und des septischen Schocks

Das Fortschreiten der Sepsis zum septischen Schock und Multiorganversagen kann auf eine Kreislaufinsuffizienz zurückgeführt werden. Diese wird durch Hypovolämie, verringerte Pumpleistung des Herzens, erhöhten metabolischen Bedarf und Störungen der Gefäße verursacht.

Durch eine systemische Vasodilatation der Arterien und Venen kommt es zur Verminderung von Vor- und Nachlast des Herzens. Das Herz kompensiert dies durch eine Erhöhung der Pumpfrequenz, um den kardialen Auswurf konstant zu halten. Die Vasodilatation kann größtenteils auf Dysfunktionen von Endothel und Mitochondrien zurückgeführt werden. Das Endothel wird durch inflammatorische Prozesse zur vermehrten NO-Bildung stimuliert, was zur Vasodilatation führt. Zur verminderten Gewebedurchblutung trägt auch die Bildung von Mikrothromben bei, die im Zuge einer gesteigerten Gerinnbarkeit des Blutes entstehen. Das Überschießen der Gerinnung wird auf eine verminderte Gerinnungshemmung sowie die herabgesetzte Funktion der Fibrinolyse zurückgeführt. Die Minderperfusion des Gewebes und die Bildung von Mikrothromben führen zu einer Störung der Zellkontakte des Endothels, insbesondere der Tight-junctions. Dies führt zur Ausbildung des Capillary-Leak-Syndroms und in weiterer Folge zur Entstehung eines interstitiellen Ödems. (4,5)

Ein Anstieg des Serum-Laktats bei schwerkranken Menschen ist ein Hinweis auf eine Entgleisung des Metabolismus und korreliert mit der Schwere der Erkrankung. Hyperlaktatämie wird durch systemische Minderperfusion, die zum anaeroben Metabolismus führt, lokale Minderperfusion und Störungen der Mikrozirkulation begünstigt. Aus der mitochondrialen Dysfunktion resultiert die Anhäufung von Pyruvat, das aufgrund von Sauerstoffmangel nur zu einem kleinen Teil in den Citratzyklus eingespeist werden kann. Folglich wird Pyruvat in Laktat umgewandelt. Durch die anaerobe Glykolyse kommt es zur weiteren Anhäufung von Pyruvat. (4,50,51)

Ein weiterer Anstieg proinflammatorischer Zytokine führt zu einer herabgesetzten Kontraktilität des Herzmuskels und zur Minderperfusion des Splanchnikusgebiets zugunsten anderer Organe, insbesondere während der Hypotonie. (52) Obwohl der genaue Mechanismus der Entstehung des Organversagens im Zuge einer Sepsis noch nicht zur Gänze verstanden wird, wissen wir heute, dass herabgesetzte Gewebsperfusion einen zentralen Punkt in der Entstehung von Sepsis-assoziiertem Organversagen darstellt. Viele andere Einflüsse wie Hypotonie, Mikrothrombosierung und verminderte Verformbarkeit der Erythrozyten, woraus eine schlechtere Oxygenierung des Gewebes resultiert, müssen ebenfalls berücksichtigt werden. An die Schädigung der Mitochondrien durch den oxidativen Stress muss ebenfalls gedacht werden, da beschädigte Mitochondrien neutrophile Granulozyten aktivieren und so weiteren Gewebsschaden verursachen können. (4,5,52)

1.1.4 Antiinfektive Therapie bei Sepsis

Laut der Surviving Sepsis Campaign ist die Verabreichung einer adäquaten antibiotischen Therapie eine der wichtigsten Maßnahmen in der Behandlung der Sepsis und des septischen Schocks. Maßnahmen zur Kreislaufstabilisierung und Sanierung der Infektionsquelle sind ebenfalls von zentraler Bedeutung. Die Verabreichung der antiinfektiven Therapie sollte so schnell wie möglich, jedoch maximal eine Stunde nach Entdeckung des septischen Zustandsbilds des Patienten intravenös verabreicht werden. (53) Dies ist unbedingt notwendig, um ein optimales Outcome zu erzielen. (54,55) Bevor man die antiinfektive Therapie verabreicht, sollten Blutkulturen und gegebenenfalls weitere Proben, wie Urin, Liquor, Wundabstriche und andere Körperflüssigkeiten abgenommen werden, um das ursächliche Pathogen zu identifizieren und eine Resistenztestung durchzuführen. Die Diagnostik der Sepsis sollte den Start der antibiotischen Therapie nicht wesentlich verzögern. (53)

Kumar et al. zeigten, dass eine effektive antibiotische Therapie, die innerhalb der ersten Stunde nach Auftreten von Hypotonie im Zuge eines septischen Schocks intravenös verabreicht wird, mit einer Senkung der Mortalität assoziiert ist. Des Weiteren konnten Kumar et al. eine durchschnittliche Abnahme von 7,6 % der Überlebensrate pro Stunde bei Patientinnen und Patienten mit Hypotonie in Folge eines septischen Schocks zeigen. Wurde eine effektive antimikrobielle Therapie innerhalb von 30 Minuten nach Auftreten der Hypotonie verabreicht, wurde eine Gesamtüberlebensrate von 82,7 % erreicht, wohingegen eine deutliche Reduktion auf 42 % bei Verabreichung der adäquaten Antibiose in der sechsten Stunde nach Auftreten der Hypotonie beobachtet werden konnte. (54) (Vergleiche Abbildung 3)

Ferrer et al. konnten ähnliche Ergebnisse erzielen. Sie zeigten, dass verzögertes Verabreichen der adäquaten antiinfektiven Therapie mit einer Steigerung der Mortalität assoziiert ist. Außerdem wurde gezeigt, dass eine Verzögerung der Therapie mit Antibiotika einen signifikant negativen Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patientinnen und Patienten hat, unabhängig von der Schwere der Sepsis. Die Schwere der Sepsis bestimmten Ferrer et al. anhand der Zahl an versagenden Organen. (56)

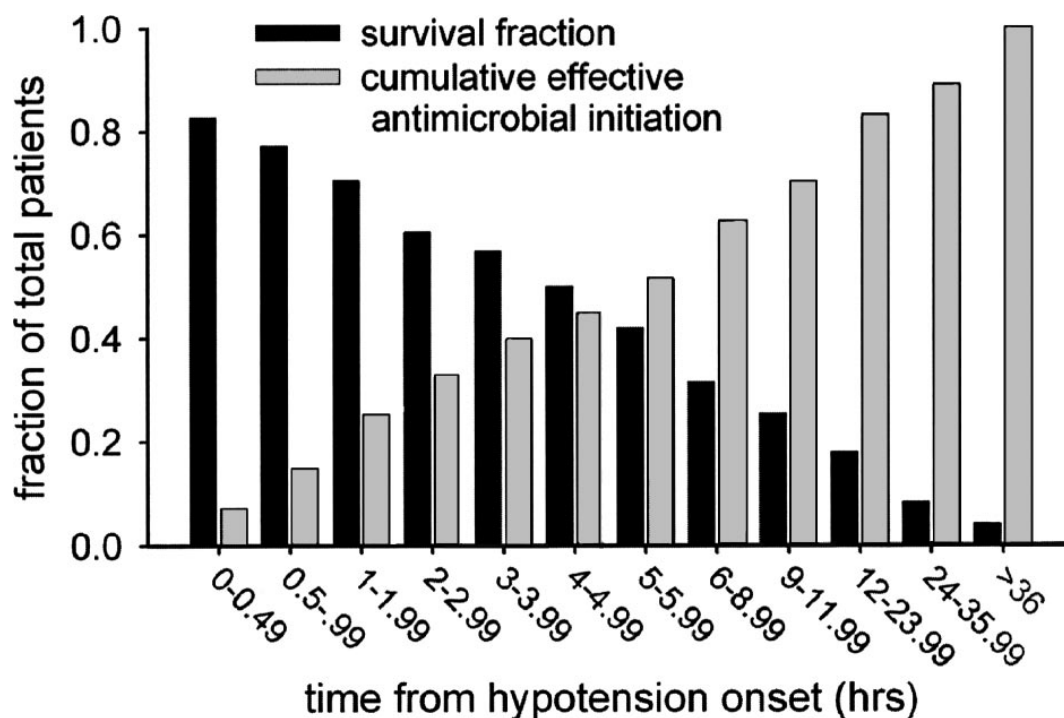


Abbildung 3: Kumulativer Effekt adäquater antimikrobieller Therapie nach Auftreten von Hypotonie bei septischem Schock.

Die x-Achse zeigt die Zeit in Stunden. Die schwarzen Balken zeigen das Gesamtüberleben nach adäquater antibiotischer Therapie im entsprechenden Zeitintervall. Die grauen Balken zeigen den kumulativen Anteil der Patienten, die im entsprechenden Zeitintervall eine adäquate antibiotische Therapie erhalten haben.

Abbildung aus Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006 Jun;34(6):1589-1596. Verwendung der Abbildung genehmigt durch Wolters Kluwer ©.

1.1.4.1 Spektrum der antiinfektiven Therapie

Die Surviving Sepsis Campaign empfiehlt die Einleitung einer empirischen antibiotischen Breitspektrum-Therapie, die alle potentiell vorkommenden Erreger abdeckt. Dazu kann eine Substanz oder können mehrere Substanzen verwendet werden. (53) Die Verwendung einer ineffektiven antibiotischen Therapie bei Sepsis und septischem Schock ist assoziiert mit einer Erhöhung der Mortalität und Morbidität. (53,57) Die Auswahl der empirischen Therapie ist allerdings komplex und kann nicht einfach pauschalisiert werden. Diese muss patientenabhängig gestaltet, sowie vom klinischen Status und lokalen epidemiologischen Daten abhängig gemacht werden. Zu den patientenabhängigen Faktoren zählen unter anderem die Art der Infektion und Infektionsquelle, die zugrundeliegenden Erkrankungen und chronischen Organinsuffizienzen, die Einnahme von Medikamenten und Antibiotika in den letzten drei Monaten sowie die Immunsuppression und andere Formen der Immunschwäche. Außerdem sollte berücksichtigt werden, ob die Patientin oder der Patient die Infektion im Krankenhaus oder zu Hause erworben hat, um das Risiko für multiresistente Keime abschätzen zu können. Treten bei der Auswahl der empirischen Therapie Unsicherheiten auf, ist die Konsultation eines infektiologischen Teams ratsam. (53)

Nachdem der pathogene Mikroorganismus identifiziert und eine Resistenztestung durchgeführt wurde, sollte die empirische Breitspektrum-Therapie entsprechend der Resistenzen und Sensibilitäten eingeschränkt werden. Man spricht hier auch von Deeskalation. (53)

1.1.4.2 Probleme der antiinfektiven Therapie bei septischen Patienten

Sepsis verursachende Bakterien haben verschiedene Mechanismen entwickelt, um in der Blutbahn des Menschen zu überleben. Daraus resultiert teilweise auch eine veränderte Empfindlichkeit dieser gegenüber Antibiotika. (21) Bei der Abtötung von Bakterien werden unter anderem Toxine frei, was bei manchen Bakterienspezies zu erheblichen Problemen führen kann. (58)

Freie Bakterien werden aufgrund der triboelektrischen Aufladung an Erythrozyten geheftet, wodurch ihr Stoffwechsel gehemmt wird. Dadurch können sich die Bakterien schlechter vermehren, weswegen antibiotische Substanzen eine herabgesetzte Effektivität aufweisen. Wandern planktonische Bakterien durch Hämolysine in Erythrozyten ein und vermehren sich dort, sind diese um ein Vielfaches schlechter zu behandeln (21), da Antibiotika schlecht in Blutzellen eindringen können. (59)

Bakterien in Biofilmen und bekapselte Bakterien weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber antiinfektiven Substanzen auf. Bakterien in Biofilmen haben einen herabgesetzten Metabolismus und sind durch Polysaccharidschichten gegenüber der Penetration von Antibiotika geschützt. Bakterien in der L-Form sind gegenüber zellwandsynthesehemmenden Antibiotika resistent, weil sie eben keine Zellwand besitzen. Auch sie weisen einen herabgesetzten Stoffwechsel auf und können in Leukozyten einwandern. Da Antibiotika, wie bereits erwähnt, nur schlecht Blutzellen penetrieren können, sind vor allem L-Form-Bakterien in Blutzellen schwer zu behandeln. (59)

1.1.4.2.1 Bakterielle Toxine

Bakterielle Toxine können in Endo- und Exotoxine unterteilt werden. Exotoxine werden von lebenden Bakterien produziert, wohingegen Endotoxine aus absterbenden Bakterien frei werden können. Wird eine Vielzahl von Bakterien zu rasch abgetötet, besteht die Möglichkeit negativer Konsequenzen durch die hohe Menge an freiwerdenden Endotoxinen. (21,60)

Bakterielle Endotoxine sind Lipopolysaccharide (LPS), die sich in der äußeren Zellwand von gramnegativen Bakterien befinden. LPS bestehen jeweils aus mehreren Abschnitten, wobei das Lipid A den toxischen Anteil darstellt. (10) In Makrophagen und dendritischen Zellen führt das Lipid A zur Sekretion von Zytokinen (39), wodurch beispielsweise die Gerinnung, die Körpertemperatur und der Blutdruck beeinflusst werden. (10) Auf diese Art können Endotoxine unter anderem Schock, Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) und disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) verursachen. (21,61)

Exotoxine können sehr potent sein und im schlimmsten Falle eine tödliche Wirkung auf das betroffene Individuum haben. Um diese Wirkung zu entfalten, müssen sich die Erreger nicht einmal in der Blutbahn befinden. Dies tritt beispielsweise bei Tetanus oder Diphtherie auf, wo die Infektion lokal begrenzt stattfindet, die Toxine allerdings absorbiert werden und einen systemischen Effekt entfalten. (21,62) Das Toxic-Shock-Syndrom ist vermutlich die schlimmste durch Exotoxine verursachte Erkrankung. *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pyogenes* können Toxine produzieren, die als Superantigene wirken und zur ungezügelten Ausschüttung von Zytokinen sowie zur massiven Aktivierung von Immunzellen führen. Die enorme Menge an Zytokinen führt zur Gewebsschädigung sowie zum distributiven Schock und Organversagen. (63-65)

1.1.4.2.2 Jarisch-Herxheimer-Reaktion

Bei manchen Infektionen kann es im Zuge der Therapie mit Antibiotika zur Auslösung einer Jarisch-Herxheimer-Reaktion kommen. (21) Diese Reaktion wird allerdings nicht von Endotoxinen getriggert. Sie zeichnet sich durch Schüttelfrost, Fieber und verstärktem Auftreten von Hautausschlägen bis zu 24 Stunden nach Verabreichung einer adäquaten antibiotischen Therapie bei Infektionen durch Spirochäten wie Syphilis, Lyme-Borreliose, Leptospirose und Rückfallfieber aus. Es bestehen Ähnlichkeiten in der Pathogenese von Sepsis und der Jarisch-Herxheimer-Reaktion. Letztere ist jedoch von viel kürzerer Dauer. Patientinnen und Patienten versterben sehr selten daran und bereits nach kürzester Zeit kommt es wieder zur Normalisierung des Cytokin-Niveaus. Außerdem treten bei der Jarisch-Herxheimer-Reaktion keine Störungen der Mikrozirkulation auf. (66-68)

1.2 Diagnostik von Bakteriämie

Mikrobiologische Diagnostik ist von zentraler Bedeutung für Patientinnen und Patienten mit Sepsis. Die Verwendung von Blutkulturen ist dabei nach wie vor der bestmögliche Zugang, da diese sehr sensitiv sind und die anschließende mikrobiologische Diagnostik leicht durchführbar ist. (16) In den letzten Jahren konnten viele Errungenschaften in den Bereichen Identifikation und Sensibilitätstestung von Bakterien gefeiert werden. Dennoch können diese neuen Methoden die Diagnostik mittels Blutkulturen noch nicht ersetzen. (16,69-72) Im folgenden Kapitel wird die Methodik der Standarddiagnostik von Bakteriämien und Sepsis näher erläutert.

1.2.1 Abnehmen von Blutkulturen

Die korrekte Durchführung der Abnahme von Blutkulturen ist sehr wichtig, um Kontaminationen zu verhindern. Kontaminationen können zu falschen therapeutischen Entscheidungen – wie nicht notwendigen antibiotischen Therapien – führen. (16,73) Um das Risiko von Kontaminationen zu verringern, sollte die Punktionsstelle ausreichend desinfiziert und eine gewisse Mindestmenge an Blut abgenommen werden. (74) Kontaminationen können allerdings trotz korrekter Desinfektion auftreten. Gonsalves et al. konnten bei Patientinnen und Patienten unter 18 Jahren zeigen, dass ein indirekter Zusammenhang zwischen dem abgenommenen Blutvolumen und dem Kontaminationsrisiko besteht. (73)

Binkhamis und Forward konnten zeigen, dass durch Verwerfen beziehungsweise durch anderweitige Verwendung des ersten Milliliters der Blutabnahme Kontaminationen seltener auftreten. Zurückführbar ist dies auf die potentiell höchste Keimbelastung des ersten Milliliters des Blutes. In dieser Studie verglichen die Autoren Ergebnisse von Blutkulturen, die in zwei definierten Zeiträumen abgenommen worden waren. Im ersten Zeitraum wurde der erste Milliliter nicht verworfen, im zweiten hingegen schon. Typische Bakterien der Haut, wie Koagulase-negative Staphylokokken, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* und *Corynebacterium* spp. wurden als Marker für Kontamination verwendet, denn Hautbakterien treten im Zuge von Kontaminationen sehr häufig auf. Bei gleichbleibender Detektionsrate von Blutstrominfektionen konnte eine 30-prozentige Reduktion der Keimbelastung mit Koagulase-negativen Staphylokokken festgestellt werden. (75)

Patton und Schmitt konnten ähnliche Ergebnisse bereits vier Jahre zuvor erarbeiten. (76) Sie verweisen außerdem darauf, dass beim Blutspenden die ersten 10-50 Milliliter aufgrund der Kontaminationsgefahr ebenfalls verworfen werden. Dadurch konnten Kontaminationen von Blutkonserven um 40-90 % gesenkt werden. (76,77)

Die Relevanz positiver Blutkulturen kann durch verschiedene Parameter abgeschätzt werden. Zu diesen zählen die klinische Anzeichen und Symptome des Patienten, die Zahl der positiven Blutkulturen, die Entnahmestelle der Blutabnahme und die Zeit, die benötigt wird, bis sich die Blutkultur als positiv herausstellt (time to positivity TTP). (16) Die in den positiven Blutkulturen nachgewiesene Spezies gibt ebenfalls einen Hinweis darauf, ob es sich um eine Kontamination oder Infektion handelt. Wie oben bereits erwähnt, sind typischerweise Bakterien der Hautflora wie Koagulase-negative Staphylokokken, *Propionibacterium acnes*, *Bacillus* und *Corynebactrium* spp. für Kontaminationen verantwortlich. Es wird vermutet, dass Hautbakterien größtenteils im Zuge der Punktion der Vene mitaspiert werden. (75) Die Zahl der positiven Blutkulturen korreliert mit der Wahrscheinlichkeit, dass es sich um eine Infektion handelt. (78) Die TTP spiegelt die Bakteriendichte im Blut wider, weswegen eine kurze TTP meist als Hinweis auf eine Infektion interpretiert werden kann. (79) Bei der Interpretation der TTP sollte allerdings die mögliche Präsenz von langsamwachsenden Erregern bedacht werden. (16)

1.2.1.1 Empfehlungen zur Abnahme von Blutkulturen

Blutkulturen sollten direkt nach der Stellung der Indikation abgenommen werden. Die Abnahme kann zu jeder Tageszeit erfolgen, eine Steigerung der Sensitivität kann durch Abnahme im Fieberschub nicht erreicht werden. (74) Die Abnahme sollte unbedingt vor der Verabreichung von antiinfektiven Substanzen geschehen. (53) Es sollten sechs Blutkulturflaschen, drei aerobe und drei anaerobe Flaschen, mit jeweils 5-10 Milliliter im Zuge einer einzelnen Punktion mit Blut befüllt werden. (74,80)

Beim Abnehmen von peripheren Blutkulturen erfolgt die Punktion der Vene nach suffizienter Hautdesinfektion an der Einstichstelle. Nachdem alle Fläschchen mit ausreichend Blut befüllt wurden, wird die Einstichstelle versorgt. Die Blutkulturen werden danach beschriftet und ins Labor gebracht. Verwendet man zur Blutabnahme eine Venenverweilkanüle, muss beachtet werden, dass nur frisch gelegte Venenverweilkanülen dafür verwendet werden dürfen, da ansonst die Kontaminationsgefahr zu hoch ist. Dies kann analog auf arterielle Leitungen übertragen werden. (74,81,82)



Abbildung 4: Abnahme einer Blutkultur aus einer peripheren Vene.

Abbildung aus Valentin T., Zollner-Schwetz I., Hönlgl M., Krause R., Strempl C., Neuhold B., Valentin A. Empfehlung für die Abnahme von Blutkulturen. 2015.

Bei der Abnahme von Blutkulturen aus einem zentralvenösen Zugang muss zusätzlich folgendes beachtet werden: Inspektion der Einstichstelle, um eine mögliche Infektion des Katheters zu erkennen, Entfernung zusätzlicher Strukturen wie zum Beispiel Dreiwegehähne und Desinfektion des Ansatzstücks, Abnahme eines Blutkulturpärchens aus jedem Schenkel des Katheters, wenn dies aus medizinischen Gründen möglich ist, Spülung oder Blocken des Katheters, erneute Desinfektion des Ansatzstücks und Verwendung einer frischen Verschlusskappe. (74)

1.2.2 Funktionsweise von Blutkulturlesegeräten

Zur Diagnostik werden standardisierte Blutkulturflaschen, die spezifisch für aerobe und anaerobe Keime designed wurden, verwendet. Eine Füllung mit bis zu 10 Millilitern Blut ist möglich. Für Kinder wurden hingegen spezielle Fläschchen mit geringeren Füllmengen entworfen.

Spezielle Zusätze wurden außerdem entwickelt, um Antibiotika, die vor der Blutabnahme verabreicht wurden, zu neutralisieren. Durch Zusatz von lytischen Substanzen gelingt es, phagozytierte Mikroorganismen zu schützen und deren Vermehrung zu gewährleisten.



Abbildung 5: Blutkulturflaschen von BD Diagnostics©.

3 dieser sind für die Bebrütung aerober Bakterien und 3 für die anaerobe konzipiert. Sie sind kompatibel mit dem BD BACTEC®. Abbildung aus Valentin T., Zollner-Schwetz I., Hönlgl M., Krause R., Strempl C., Neuhold B., Valentin A. Empfehlung für die Abnahme von Blutkulturen. 2015.

Durch eine Bebrütungszeit von fünf Tagen kann der Großteil der Mikroorganismen, inklusive schwer kultivierbaren Erregern, nachgewiesen werden. Jedoch sollte die Bebrütungszeit für langsam wachsende Erreger wie Mycobakterien verlängert werden. (16)

Moderne Laboratorien verwenden automatisierte Bebrütungssysteme, die kontinuierlich auf positive Blutkulturen screenen. Verschiedene Methoden zur Detektion positiver Blutkulturen werden verwendet. Diese Methoden beruhen meist auf Kohlenstoffdioxidproduktion der Bakterien und der daraus resultierenden Veränderung des pH-Werts. Der BD BACTEC® (BD Diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) erkennt Änderungen des pH-Werts durch Fluoreszenzsensoren. Der BACT/ALERT 3D® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) erkennt dies durch einen Farbumschlag, der kolorimetrisch gemessen wird und der VersaTREK® (TREK Diagnostic Systems, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) erkennt Veränderungen durch Redoxreaktionen. Durch Verwendung dieser Systeme kann eine Reduktion der Arbeitslast, der Inkubationszeit und des Anteils der Verunreinigung erzielt werden. (16)

Menchinelli et al. verglichen in einer Studie die Leistung von automatisierten Bebrütungssystemen: BACTEC FX, BACT/ALERT 3D und BACT/ALERT VIRTUO® System. Letzteres wurde entwickelt, um schneller positive Ergebnisse von Blutkulturen zu generieren. Es konnte gezeigt werden, dass es eine kürzere TTP hatte als der BACTEC und BACT/ALERT 3D. Die TTP war bei BACTEC und BACT/ALERT 3D ungefähr jeweils zwei Stunden länger. (83)

1.2.3 Identifikationsmethoden für Bakterien

Nachdem eine Blutkultur positiv wird, wird eine Identifikation des Erregers angestrebt. Dies beginnt mit der Gram-Färbung und wird in Abhängigkeit dieser entsprechend fortgesetzt.

1.2.3.1 Gram-Färbung

Die Gram-Färbung wurde vor über 100 Jahren ursprünglich entwickelt, um Gewebszellen von Bakterien zu unterscheiden. Sie stellt auch heute noch ein zentrales Element in der mikrobiologischen Diagnostik dar, da durch diese Färbung Bakterien in zwei Klassen unterteilt werden können. Die Klassifizierung der Bakterien beruht auf einem unterschiedlichen Aufbau der Bakterienzellwand. (84)

Die Zellwand von Bakterien ist komplex aufgebaut und hat viele Aufgaben. Murein stellt den wichtigsten Bauteil der Bakterienzellwand dar. Es umhüllt die gesamte Zelle netzartig und ist aus Polysaccharidketten, die durch Peptide quervernetzt sind, aufgebaut. Bei grampositiven Zellen findet man eine sehr dicke Mureinschicht, die aus bis zu 40 Schichten aufgebaut ist. Bei gramnegativen allerdings ist die Mureinschicht sehr dünn. Bei diesen findet man zusätzliche eine äußere Membran, in der sich pathogenetisch bedeutsame Polysaccharide befinden. Außerdem fungiert die äußere Membran als Permeabilitätsbarriere. (39)

Bevor das Präparat gefärbt werden kann, erfolgt eine thermische oder chemische Fixierung, um ein versehentliches Abschwemmen der Bakterien zu verhindern. Initial erfolgt bei der Gram-Färbung die Färbung mit Kristallviolett (Gentianviolett), wodurch alle Bakterien blau-violett gefärbt werden. Nach einer kurzen Einwirkzeit und Abkippen des Farbstoffs werden die Bakterien mit Lugol-Lösung, einer Jod/ Jodkali-Lösung, gespült, um die eingebrachte Farbe in der dicken Mureinschicht grampositiver Erreger zu fixieren. Anschließend erfolgt, nach einer kurzen Einwirkzeit und dem Abkippen der Lugol-Lösung, das Entfärben mittels Ethylalkohol, wodurch gramnegative Erreger aufgrund ihrer dünnen Mureinschicht entfärbt werden. Nach dem Abspülen des Objektträgers mit Wasser werden gramnegative Erreger mittels Karbolfuchsin gegengefärbt, um diese dennoch darstellen zu können. Karbolfuchsin muss ebenfalls kurz einwirken, bevor das Präparat mit Wasser gespült und getrocknet werden kann. (85,86)

Diese schnelldurchführbare Färbung hat mitunter klinische Relevanz, da grampositive Erreger anders auf manche Antibiotika reagieren als gramnegative. (84)

1.2.3.2 PNA-FISH® und QuickFISH®

Bei der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet man fluoreszenzmarkierte Oligopeptide, die an ribosomale DNA (rDNA) in den Erregern binden. Bei Bakterien verwendet man 16S rDNA und bei Pilzen 18S rDNA als Zielstrukturen. (87) Ein DNA-Strang mit bekannter Basenabfolge wird den Mikroorganismen zugeführt. Kommt es zur Bindung dieses Strangs, kann der andere Strang aufgrund des Prinzips der komplementären Basenpaarung identifiziert werden. Durch Beobachtung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop wird diese spezielle Färbung ausgewertet. (72,88)

Bei dem PNA-FISH® (OpGen, Maryland, USA, früher AdvanDx), verwendet man Peptid-Nukleinsäuren (peptide nucleic acid – PNA) um gewisse Keime, darunter *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken, auf Basis der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zu identifizieren. Ergebnisse können durch PNA-FISH in 2,5 Stunden generiert werden. Nachteile dieser Methode sind das notwendige Vorhandensein einer gewissen Keimlast ($>10^5$ CFU) und eine begrenzte Anzahl an identifizierbaren Keimen. (72,89)

Aufgrund der langen Wartezeiten bei PNA-Fish wurde QuickFISH® (OpGen) eingeführt, welches Ergebnisse in weniger als 30 Minuten liefert. (90) Es basiert ebenfalls auf der FISH-Technologie und ist für Staphylokokken, Enterokokken, gramnegative Erreger und Candida verfügbar. Um kosteneffizient zu arbeiten, wird die Durchführung des QuickFISH erst nach Durchführung der Gram-Färbung empfohlen. (91) Findet man beispielsweise in der Gram-Färbung grampositive Kokken in Gruppierungen kann man den *Staphylococcus aureus* durch QuickFISH durchführen, der *Staphylococcus aureus* grün färbt und Koagulase-negative Staphylokokken rot. Eine Unterscheidung ist somit leicht möglich. (91)

Deck et al. untersuchten in einer multizentrischen Studie die Performance von *Staphylococcus aureus* QuickFISH bei der Identifikation von *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken. *Staphylococcus aureus* konnte zu 99,5 % korrekt identifiziert werden und Koagulase-negative Staphylokokken in 98,8 % der Fälle. Aufgrund der schnellen Verfügbarkeit der Ergebnisse und der hohen Sensitivität der Methode erhofft man sich das Outcome der Patientinnen und Patienten zu verbessern. Vor allem in Bezug auf Kontamination von Blutkulturen kann diese Methode sehr hilfreich sein, da Koagulase-negative Staphylokokken meist im Zuge einer Verunreinigung in Blutkulturen gelangen. Ein Resistenzprofil kann mittels QuickFISH allerdings nicht ermittelt werden. (90)

1.2.3.3 Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry

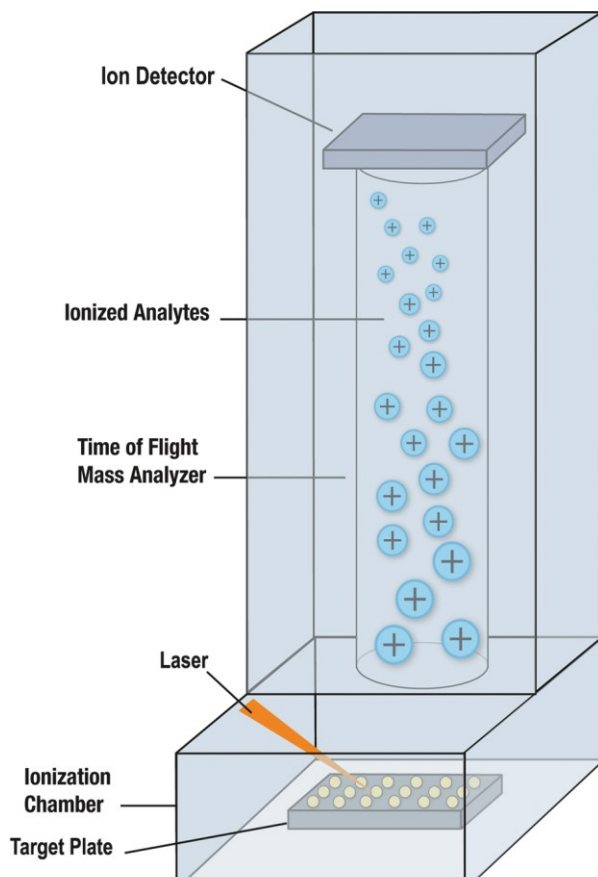
In den 1970 Jahren gab es bereits erste Bestrebungen Bakterien mittels Massenspektrometrie zu identifizieren, wenngleich diese Bestrebungen nicht auf Analysen von Proteinen basierten. (92) 1980 wurde das Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) entwickelt, eine Maschine, die Bakterien mittels ihrer Proteinzusammensetzung massenspektrometrisch identifiziert. (93) In den 1990 Jahren konnten Referenzdatenbanken und Software entwickelt werden, wodurch die Kommerzialisierung dieses Produkts möglich wurde. (94,95)

Die Identifikation von Bakterien stellt einen wichtigen Schritt in der mikrobiologischen Diagnostik dar und kann wesentliche therapeutische Konsequenzen haben. Früher verwendete man zur Identifikation von Bakterien phänotypische und biochemische Tests, die Stunden bis Tage dauerten. MALDI-TOF MS revolutioniert die Identifikation von Bakterien und Pilzen in der klinischen Mikrobiologie. Es stellt eine schnelle und genaue Methode zur Keimidentifikation dar. (96)

1.2.3.3.1 Funktionsweise MALDI-TOF MS

Die Verwendung erfordert eine Kolonie einer Bakterienkultur, Ameisensäure und eine Matrix. MALDI-TOF MS verwendet eine Matrix, die die Desorption und Ionisation von unbekanntem Bakterien durch Energiepulse eines ultravioletten N₂-Lasers unterstützt. Die Matrix besteht aus Substanzen, die die Energie des Lasers stark absorbiert, wie zum Beispiel α -Cyanohydroxymizinsäure. Des Weiteren trennt die Matrix die einzelnen Moleküle der Mikroorganismen voneinander. Moleküle der Matrix und der Bakterien werden desorbiert, wobei der Großteil der Energie des Lasers von den Matrixmolekülen, die dadurch ionisiert werden, aufgenommen wird. Durch zufällige Kollisionen der Matrixmoleküle, die sich jetzt in der Gasphase befinden, wird Energie von diesen auf die Bakterienmoleküle übertragen. Die Wolke an positiv geladenen mikrobiellen Proteinmolekülen, größtenteils ribosomalen Proteinen, werden durch ein positiv geladenes elektrostatisches Feld in ein „time of flight“ (TOF) Massenspektrometer geleitet.

Die Ionen bewegen sich dabei mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, abhängig von ihrer Größe, auf einen Ionendetektor zu. Der Ionendetektor befindet sich in am Ende einer Röhre, in der ein Vakuum herrscht. Kleinere Moleküle bewegen sich dabei viel schneller als größere. Auf diese Weise kann ein Massenspektrum generiert werden, das die Zahl der Ionen abhängig von ihrer Masse und der benötigten Zeit für die Bewegung zum Ionendetektor widerspiegelt. (94)



Das im Massenspektrometer erzeugte Profil eines Mikroorganismus ist kein individuelles Charakteristikum, sondern einzigartig für bestimmte Arten von Mikroorganismen. Durch Peaks in den jeweiligen massenspektrometrischen Profilen können Gattungen, Spezies und Stämme untereinander verglichen werden. Die massenspektrometrischen Ergebnisse eines Erregers werden mit Referenzdatenbanken verglichen, um diesen zu identifizieren. Obwohl der technische Hintergrund dieser Identifikationsmethode hochkomplex ist, sind keine Kenntnisse der Massenspektrometrie notwendig, um dieses Gerät zu bedienen. (94)

Abbildung 6: Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).

Die Target-Platte wird in die Ionisierungskammer des MALDI eingelegt. Es erfolgt der Beschuss mittels Laser, was Moleküle der Matrix und des Mikroorganismus löst. Die Matrixmoleküle nehmen den Großteil der Energie auf, geben diese aber durch Kollisionen auf die Moleküle der Mikroorganismen ab. Die positiven geladenen Ionen der Mikroorganismen, werden aufgrund ihrer Geschwindigkeit im elektrostatischen Feld massenspektrometrisch vermessen und ein Massenspektrum wird generiert.

Abbildung aus Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. Clin Infect Dis 2013 Aug;57(4):564-572. Verwendung der Abbildung genehmigt durch Oxford University Press ©.

1.2.3.3.2 Identifikation durch MALDI-TOF MS mittels Subkultur

Nachdem eine Blutkultur positiv wird, kann durch Aufbringen auf eine Agarplatte und Inkubation sichergestellt werden, dass eine Reinkultur analysiert wird. Nach einer Inkubationszeit von 12 bis 24 Stunden sind genügend Bakterien gewachsen, um diese Subkultur durch biochemische Methoden zu identifizieren.

Allerdings erhält man bereits nach weniger als sechs Stunden eine Reinkultur, die für die Identifikation mittels MALDI-TOF MS verwendet werden kann. (16)

Idelevich et al. zeigten, dass auch die Identifikation von Subkulturen, die kürzer als sechs Stunden auf Agarplatten bebrütet wurden, mittels MALDI-TOF MS möglich ist. Grampositive, aerobe Kokken konnten in 64,0 % und gramnegative, aerobe Stäbchen in 97,6 % aller Fälle bei weniger als sechsstündiger Inkubation identifiziert werden. Durch Verlängerung der Inkubationszeit auf acht Stunden, konnte eine Steigerung der Identifikation von grampositiven, aeroben Kokken auf 96,5 % erreicht werden, wohingegen bei den gramnegativen keine Steigerung zu beobachten war. (97)

Verroken et al. und Kohlmann et al. konnten ähnlich Ergebnisse erzielen. (98,99) Verroken et al. konnten nach einer fünfstündigen Inkubation einer positiven Blutkultur auf einer Columbia-Blutagarplatte eine korrekte Identifikation mittels MALDI-TOF MS zu 81,1 % erreichen. Fehler traten am häufigsten bei Anaerobiern und Pilzen auf. (99)

Kohlmann et al. hingegen inkubierten positive Blutkulturen vier Stunden auf Kochblutagarplatten und konnten bei veränderten Grenzwerten bei der Identifikation, Mikroorganismen zu 69,5 % korrekt identifizieren. Grampositive Kokken konnten in 68,4 % der Fälle korrekt identifiziert werden, wobei *Staphylococcus aureus* und Enterokokken zu 100 % korrekt identifiziert wurden. Gramnegative Erreger konnten zu 97,6 % identifiziert werden. Die korrekte Identifikation von grampositiven Stäbchen und Pilzen konnte nicht sicher gewährleistet werden. (98)

1.2.3.3 Identifikation durch MALDI-TOF MS ohne Subkultur

Bevor MALDI-TOF MS aus einer Blutkultur ohne Subkultur – ohne vorangegangenes Wachstum des Erregers auf einer Agarplatte – durchgeführt werden kann, müssen die Mikroorganismen aus den positiven Blutkulturen isoliert und danach gereinigt werden. Dazu werden Lyse-Zentrifugations-Methoden (100-102), Saponinen und anderen milden Detergenzien (103), Methoden um das Serum zu trennen (104) und das Sepsityper Kit (Bruker Daltonics Inc., Billerica, MA, USA) (105) verwendet. Durch diese Arten der Vorbereitung gewinnt man ein Pellet, das genug Material enthält, um weitere mikrobiologische Untersuchungen inklusive der Resistenztestung mittels Vitek 2 ® (bioMérieux) (106) durchzuführen. (16)

Die Genauigkeit der Identifikation mittels MALDI-TOF MS ohne Subkultur hängt wesentlich von der Anreicherungs-methode ab. Prod'hom et al. konnten in ihrer Studie eine korrekte Identifikation aus dem Bakterienpellet in 78,7 % der Fälle erreichen. Diese verwendeten die Lyse-Zentrifugations-Methode unter Zugabe von Ammoniumchlorid. Prod'hom et al. konnten zu 21,3 % keine korrekte Identifikation erzielen. Bei über 80 % der nicht korrekt identifizierten Erreger handelte es sich, um grampositive Kokken, hauptsächlich Streptokokken und Koagulase-negative Staphylokokken. (100) March-Rossello et al. konnten mit einer veränderten Zentrifugations-Methode eine korrekte Identifikation von gramnegativen in 97,3 % und von grampositiven in 98,4 % der Fälle erzielen. (107)

Meex et al. verglichen in ihrer Studie das Sepsityper Kit mit der Saponin-Methode. Beide Methoden erzielten ähnliche Identifikationsraten, wobei das Sepsityper Kit mit 67,29 % gering bessere Ergebnisse als die Saponin-Methode (66,36 %) erzielen konnte. Beide Methoden erzielten schlechte Ergebnisse bei der Identifikation von grampositiven Erregern, dennoch konnte das Sepsityper Kit hier 58,21 % korrekt identifizieren und die Saponin-Methode 52,24 %. Bei der Identifikation von gramnegativen Erregern konnten bessere Ergebnisse erzielt werden. Hier konnte die Saponin-Methode 90 % der Erreger korrekt identifizieren und das Sepsityper Kit hingegen nur 82,5 % korrekt identifizieren. (103)

Probleme bei der Identifikation von Bakterien aus Bakterienpellets treten vor allem bei Bakterien auf, die schwer zu lysieren sind, wie zum Beispiel *Klebsiella pneumoniae*, und bei eng verwandten Bakterienspezies, wie zum Beispiel Mitis-Streptokokken. (108) Ein weiterer Nachteil der Anreicherungs-methoden ist, dass diese viel mehr Arbeitszeit in Anspruch nehmen und teurer sind, als Methoden, die Subkulturen von Agarplatten gewinnen. Ergebnisse können dafür bereits eine Stunde, nachdem die Blutkultur positiv geworden ist, generiert werden. (98,109)

1.2.4 Empfindlichkeitstestung von Bakterien

Adäquate Therapien von bakteriellen Infektionen können durch Identifikation des Erregers und durch Austestung der Resistenzen unterstützt werden. (39) Wie bereits erwähnt, erhöht eine inadäquate antiinfektive Therapie die Mortalität bei Sepsis (54-56). Aber nicht nur in dieser Hinsicht ist die Empfindlichkeitstestung (AST) sehr bedeutsam, sondern auch für die Reduktion des Spektrums antibiotischer Therapien, wodurch der Selektionsdruck auf resistente Erreger und der negative Einfluss auf nützliche Bakterien des Menschen verringert werden kann. Des Weiteren kann eine Reduktion der Toxizität gewährleistet werden. (16)

1.2.4.1 Plättchendiffusionstest

Der Plättchendiffusionstest ist eine sehr häufig verwendete und gleichzeitig eine der ältesten Methoden, um die Empfindlichkeit von Bakterien zu testen. Damit kann ein weites Spektrum an antiinfektiven Substanzen ausgetestet werden. Diese Methodik ist ebenfalls für die meisten Bakterien verfügbar. (110) Vorteile dieser Methode sind einfache Durchführung, geringe Kosten, Möglichkeit viele Antibiotika und Mikroorganismen zu testen und einfache Interpretation. (111)

Agarplatten werden mit einem standardisierten Inokulum des entsprechenden Mikroorganismus beimpft, wobei das Inokulum dabei auf der Platte gleichmäßig verteilt wird. (110) Wird der Erreger aus einer positiven Blutkultur gewonnen, wird ein standardisiertes Volumen aus der Blutkultur (100-150 μL) direkt auf die Platte aufgetragen und ebenfalls gleichmäßig verteilt. (112) Eine gleichmäßige Verteilung erreicht man durch Verwendung eines automatischen Plattenrotators oder durch dreifaches Ausstreichen des Inokulums in verschiedene Richtungen. Vor allem bei grampositiven Erregern sollte auf eine gleichmäßige Verteilung geachtet werden. (110)

Danach werden Filterpapierscheiben, die ein Antibiotikum in gewünschter Konzentration enthalten, auf die Agarplatte aufgetragen. (111) Dabei sollte darauf geachtet werden, dass diese Plättchen in engem Kontakt mit der Oberfläche des Agars stehen und gleichmäßig aufgebracht werden. Die maximale Anzahl der Plättchen pro Platte sollte nicht überschritten werden, da es sonst zu überlappenden Hemmhöfen oder zu Interaktionen der Antibiotika kommen kann (maximal sechs Plättchen auf einer Agarplatte mit 90 mm Durchmesser). (110) Die Antibiotika diffundieren in den Agar und hemmen das Wachstum der Mikroorganismen, wodurch die Hemmhöfe entstehen. (111)

Anschließend werden die Agarplatten bei standardisierten Bedingungen (35 °C, bei manchen Erregern zusätzlich 4-6 % CO₂) für 16-20 Stunden inkubiert. Eine längere Bebrütung wird von der EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) nicht empfohlen, da dies zu Wachstum der Bakterien in die Hemmhöfe führen kann, woraus verfälschte Ergebnisse resultieren können. (110)

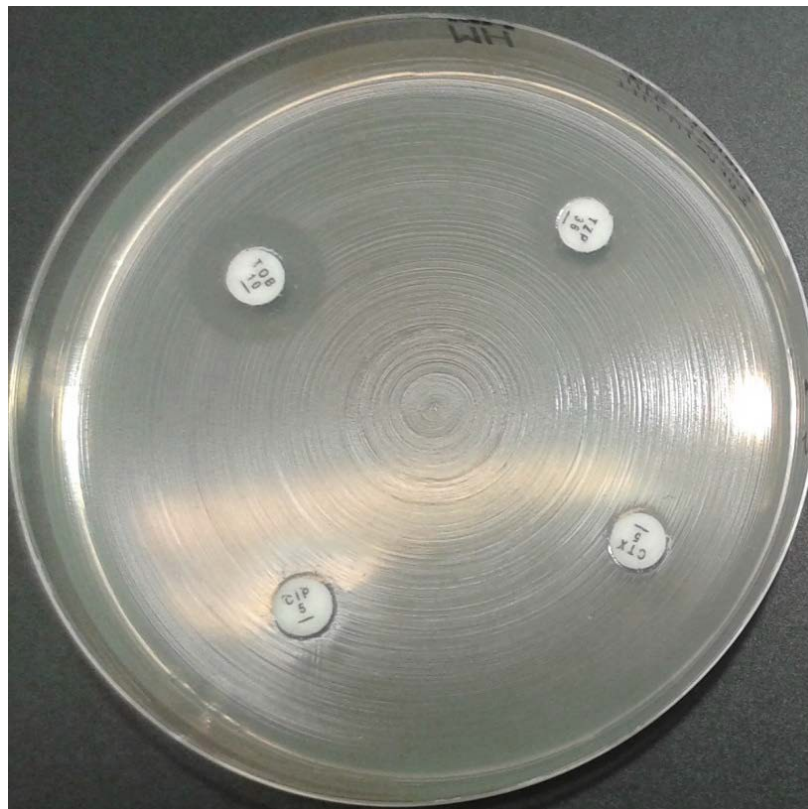


Abbildung 7: Antibiogramm mittels Plättchendiffusionstest.

Der Agar ist gleichmäßig von einem Bakterienrasen überzogen. Der Agar ist mit vier Antibiotika-Plättchen belegt. Anhand der Durchmesser der Hemmhöfe rund um das Antibiotikum, kann die Empfindlichkeit des Erreger gegenüber dessen abgelesen werden.

Bild modifiziert aus Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. 2018; Available at:

http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf.

Die Agarplatte sollte nach der Inkubationszeit einen gleichmäßigen Keimrasen aufweisen, mit Ausnahme der Hemmhöfe, die sich bei Wirkung der Antibiotika rund um das jeweilige Plättchen gebildet haben. Die Durchmesser der Hemmhöfe werden vermessen und können anhand der aktuell geltenden EUCAST-Guideline interpretiert werden. So kann speziell für jedes getestete Antibiotikum ein Ergebnis bezüglich Sensibilität oder Resistenz generiert werden. (110)

1.2.4.2 Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Unter der minimalen Hemmkonzentration (MHK) versteht man die geringste Konzentration eines Antibiotikums, die das sichtbare Wachsen eines Mikroorganismus verhindert. Die MHK kann allerdings nicht mit dem Plättchendiffusionstest bestimmt werden, da die Menge des Antibiotikums, das in den Agar diffundiert nicht genau quantifiziert werden kann. Es gibt dennoch Algorithmen zur ungefähren Abschätzung der MHK, die auf dem Durchmesser der Hemmhöfe basieren. (111) Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem Hemmhofdurchmesser und dem \log_2 MHK. Diese Korrelation stellt die Basis für die Bestimmung der Durchmesser der Hemmzonen dar. (39)

Zur Bestimmung der MHK werden ETEST® (bioMérieux) und Dilutionstest (Reihenverdünnungstest) verwendet. Letzterer wird auch automatisiert durchgeführt. (39,111,113)

1.2.4.2.1 ETEST® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich)

Der ETEST kombiniert das Prinzip der Verdünnungsreihe mit dem der Diffusionsmethode. Er basiert auf dem Erstellen eines Konzentrationsgradienten der antiinfektiven Substanz auf der Agarplatte. Hierfür wird ein Streifen, auf dem eine steigende Konzentration des Antibiotikums aufgetragen ist, auf den Agar aufgebracht. Um den Streifen herum bildet sich eine ellipsenförmige Zone der Wachstumshemmung. Die MHK kann dann am Ursprung der Ellipse am ETEST nach ausreichender Bebrütung abgelesen werden. (111,114)

In vielen Studien konnte die Genauigkeit des ETESTs gezeigt werden. (111,115,116) Baker et al. verglichen den ETEST mit der Mikro-Dilutionsmethode und mit der Agar-Dilutionsmethode. Sie konnten sowohl eine Übereinstimmung der MHK des ETESTs mit den genannten Methoden zeigen als auch eine Übereinstimmung der MHK bei den beiden Dilutionstests. (116) Pailhoriès et al. verglichen die MKH für Ertapenem des ETESTs mit der MHK der Agar-Dilutionsmethode und der des Vitekt 2 Systems (bioMérieux) an *Enterobacter cloacae*.

Pailhoriès et al. konnten Übereinstimmungen der MHKs bei ETEST und Agar-Dilutionsmethode feststellen, jedoch trat eine Diskrepanz mit den Ergebnissen des Vitek 2 auf. Die im Vitek 2 gemessene, höhere MHK führte meist zum Ergebnis „resistent“. Durch Vitek 2 als resistent eingestufte Erreger konnten nur zu 58 % durch die genannten anderen Methoden ebenfalls als resistent eingestuft werden. Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass Vitek 2 Carbapenemase-produzierende Erreger mit geringer Carbapenemresistenz besser identifizieren kann. (113)

Der ETEST kann ebenfalls zur Untersuchung von Interaktionen verschiedener Antibiotika verwendet werden. Zwei verschiedene Methodiken, um den Synergismus von Antibiotika mittels ETEST zu evaluieren, sind bekannt. (117) Bei der ersten Methode legt man den ersten ETEST-Streifen auf die Oberfläche des Agars und ersetzt diesen nach einstündiger Bebrütungszeit durch den zweiten ETEST-Streifen. Ein Synergismus der Antibiotika kann durch eine Abnahme der MHK, verglichen mit den einzelnen MHKs festgestellt werden. (117,118) Alternativ können die ETESTs auch im rechten Winkel übereinander auf den Agar gelegt werden. Bei Verwendung dieser Methodik muss allerdings im Anschluss an die Inkubation der fraktionelle Hemmkonzentrationsindex auf Basis der einzelnen MHKs berechnet werden. Ist dieser Index kleiner als 0,5 liegt ein Synergismus vor. (117,119) Einzelne ETESTs zur Bestimmung der MHKs der jeweiligen Substanzen werden auf die gleiche Agarplatte so aufgebracht, dass sie nicht mit den anderen interagieren können. (117,118)

1.2.4.2.2 Dilutionstests

Reihenverdünnungstests sind die akkurateste Methode, um die MHK zu bestimmen, da bei dieser Methode die Konzentration der antiinfektiven Substanz im Agar (Agar-Dilutionsmethode) oder im Nährmedium (Makro- oder Mikrodilutionsmethode) gut abgeschätzt werden kann. (111) Vitek 2 ® (bioMérieux) ist ein automatisiertes System zur Empfindlichkeitstestung und Identifikation, das auf der Mikrodilutionsmethode basiert. (120-122)

1.2.4.2.2.1 Bouillon-Dilutionsmethoden

Diese Reihenverdünnungstests verwenden antiinfektive Substanzen in aufsteigenden, sich verdoppelnden Konzentrationen und ein flüssiges Wachstumsmedium, das sich entweder in Röhren mit mindestens 2 Milliliter (Makrodilution) oder in Wells auf Mikrotitrierplatten mit sehr kleinen Volumina (Mikrodilution) befindet. Die Wells oder Röhren werden mit einem Inokulum eines Mikroorganismus mit 0,5 McFarland inkubiert und können nach ausreichender Bebrütung abgelesen werden. (111,123) Wachstum wird durch eine Trübung des Mediums signalisiert. (124)

Zur Erleichterung des Ablesens der MHK wurden verschiedene Hilfsmittel in die Mikrodilutionsmethode implementiert, wie zum Beispiel Zugabe von Tetrazoliumsalzen oder Resazurin. (111,125,126) Die Tetrazoliumsalze werden bei Vorhandensein von lebensfähigen Mikroorganismen zum wasserlöslichen, roten Farbstoff Formazan umgewandelt. (125) Resazurin wird bei der sogenannten „Alarm Blue Dye“ verwendet und gilt ebenfalls als Farbstoff, der Wachstum anzeigt. (126) Metabolische Aktivität der wachsenden Bakterien reduziert den blauen Farbstoff Resazurin, wodurch dieser eine pinke Farbe annimmt. (127)

Es konnte gezeigt werden, dass die Menge des Inokulums (128), die Art des Nährmediums (129) sowie die Inkubationszeit die Werte der MHK beeinflussen können. (130) Die EUCAST hat in ihrer Guideline zum Thema Bouillon-Dilutionsmethode auf den internationalen Standard verwiesen, um eine Standardisierung der Methode zu gewährleisten. Ergebnisse für die MHK gelten laut EUCAST nur dann als valide, wenn eine Reinkultur vorliegt, die korrekte Menge des Inokulums verwendet wurde und ein ausreichendes Wachstum in der Wachstumskontrolle nachweisbar ist. (124)

1.2.4.2.2.2 Vitek 2® (bioMérieux)

Der Vitek 2 ist die Weiterentwicklung des Vitek-classic, der in den 1960er-Jahren für die NASA entwickelt worden ist. (121) Dabei handelt es sich um eine automatisierte Methode zur Bestimmung der MHK auf Basis der Mikrodilutionsmethode. (122) Ein wesentlicher Vorteil der MHK-Bestimmung mittels Vitek ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Dies kann auf Standardisierung der Beimpfung, kontinuierliche Bebrütung auch während des Ablesens und Überprüfung des Geräts durch Selbsttests und Qualitätskontrollzertifikate zurückgeführt werden. (121)

Ein Inokulum mit 0,5-0,6 McFarland des Erregers muss zu Beginn erstellt werden. Dies wird dann automationsgesteuert in die Vitek-Karten gefüllt, welche anschließend versiegelt werden. Auf den Karten findet man 64 Vertiefungen, die mit einem Kulturmedium gefüllt sind. Sie stellen jeweils eine Wachstumskontrolle und entsprechende Verdünnungsreihen von Antibiotika dar.

Während der Inkubationszeit misst das Gerät im viertelstündlichen Intervall kolorimetrisch die Trübung in den einzelnen Vertiefungen der Karte. (121) Die Inkubationszeit jeder Karte wird automatisch aufgrund verschiedener Parameter bestimmt. Basierend auf dem Vergleich der Daten aus der Wachstumskontrolle mit den Daten aus der Verdünnungsreihe der Antibiotika kann der Vitek eine MHK errechnen. (120)

1.2.4.2.2.3 Agar-Dilutionsmethode

Bei dieser Methode werden unterschiedliche Konzentrationen eines Antibiotikums – typischerweise sich verdoppelnde – in den Agar eingebracht. Anschließend wird das Inokulum auf den Agar aufgetragen und die Platte wird inkubiert. Die MHK entspricht jener geringsten Konzentration der antiinfektiven Substanz, bei der kein Wachstum mehr festgestellt werden kann. (111)

1.3 Molekulare Methoden zur beschleunigten Sensibilitätstestung

Die Vorteile einer beschleunigten Sensibilitätstestung bei Sepsis – nämlich schnellere Optimierung der antiinfektiven Therapie, geringere Nebenwirkungen und Verminderung der Toxizität durch Vermeidung unnötiger Therapie (16) sowie Senkung der Mortalität (54,56) – wurden bereits oben erwähnt.

Zurzeit gelten Blutkulturen nach wie vor als diagnostischer Goldstandard, zur Identifikation und Suszeptibilitätstestung von Erregern aus der Blutbahn. (16,72,131) Dies ist auf die hohe Sensitivität von Blutkulturen und die leichte Durchführbarkeit der Sensibilitätstestung zurückzuführen. (16) Dennoch bestehen Nachteile in der Diagnostik mittels dieser Methoden. Einerseits benötigen herkömmliche Methoden zur Empfindlichkeitstestung relativ lange, um Ergebnisse zu liefern: Es dauert ungefähr einen Tag oder auch deutlich länger, bis Blutkulturen positiv werden und noch einen weiteren Tag, bis das Antibiogramm abgelesen werden kann. (16,72,132) Andererseits können bereits abgetötete Erreger mittels Blutkulturen nicht identifiziert werden, da sich diese nicht mehr vermehren können. Wurde vor Abnahme der Blutkulturen eine antibiotische Therapie eingeleitet, kann es zu einer Verzögerung oder sogar zu einem Scheitern der herkömmlichen Diagnostik kommen. (72,132,133)

Molekulare Methoden zur mikrobiologischen Diagnostik wurden im letzten Jahrzehnt als Alternativen zur herkömmlichen Diagnostik entwickelt. Ursprünglich wurden molekulare Methoden für langsamwachsende Erreger wie zum Beispiel Mycobakterien und *Helicobacter pylori* entwickelt. (132,134,135) Allerdings wurde dieses Prinzip auch auf andere Erreger übertragen, da in Zeiten von wachsender Resistenzentwicklung Sensibilitätstestungen für eine adäquate antiinfektive Therapie die Grundlage darstellen. (136) Einige dieser neuen Ansätze können mit positiven Blutkulturen durchgeführt werden, andere hingegen sind direkt aus einer Blutprobe durchführbar. (137) Die zurzeit verfügbaren Methoden aus Blutkulturen basieren auf vier verschiedenen Ansätzen: In-situ-Hybridisierungs-Methoden, DNA-Microarray-basierte-Methoden, Nukleinsäure-amplifizierende-Methoden und kombinierte Methoden. Methoden aus Vollblut basieren auf der Amplifikation von Nukleinsäuren, auf der magnetischen Resonanz von Wasserprotonen und auf der Metagenomik.

In Abbildung 8 wird gezeigt, welche molekulare Methode zu welchem Zeitpunkt durchgeführt werden kann. (72)

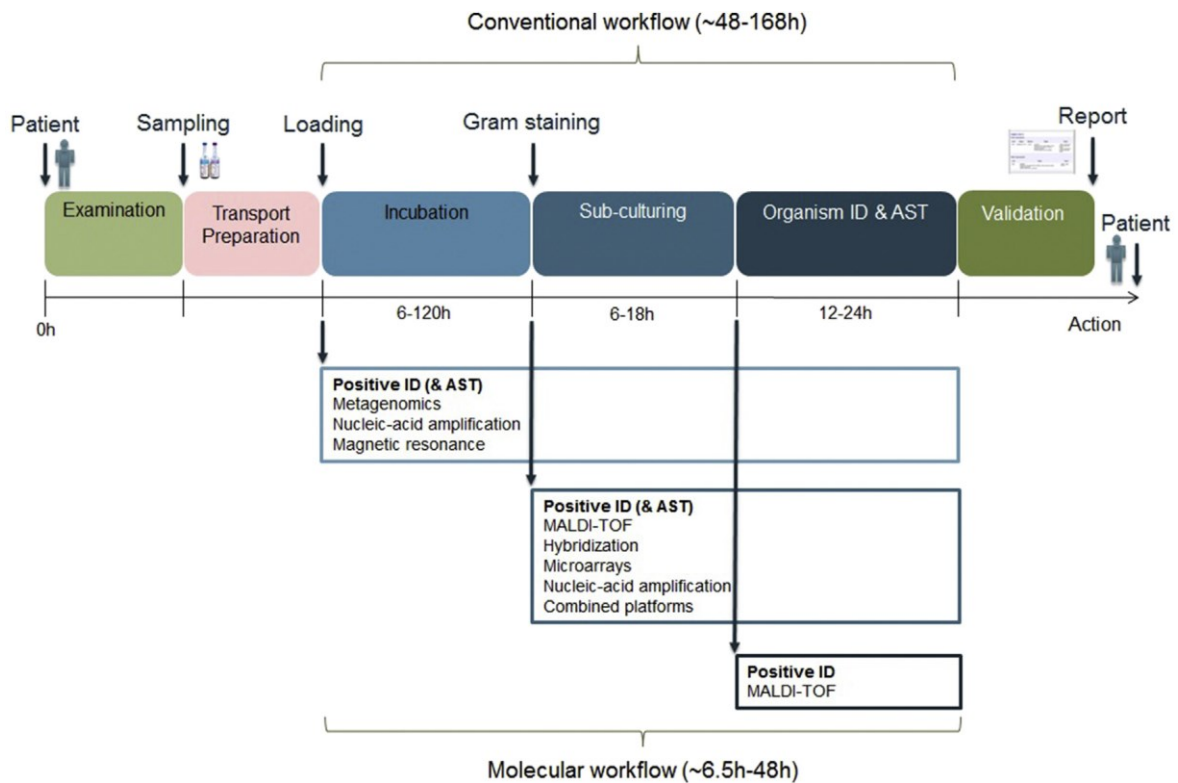


Abbildung 8: Mögliche Zeitpunkte, an denen molekulare Methoden zur Identifikation und teilweise zur Empfindlichkeitstestung eingesetzt werden können.
 Abbildung aus Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. Clin Microbiol Infect 2018 Sep;24(9):944-955. Verwendung der Abbildung genehmigt durch Elsevier©.

1.3.1 Anwendung molekularer Methoden aus positiven Blutkulturen

1.3.1.1 In-situ-Hybridisierungs-Methoden

Die Hybridisierung von zwei DNA-Strängen basiert auf dem Prinzip der komplementären Basenpaarung. Wie oben bereits erwähnt, wird dabei ein bekannter Strang einer unbekannt Probe hinzugefügt, die dadurch identifiziert werden soll. FISH basiert auf demselben Prinzip und das Ergebnis der Bindung kann durch ein Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Zu dieser Technik gehören die oben bereits erwähnten Methoden PNA-FISH und QuickFISH (Vergleiche 1.2.3.2). (72)

Ebenfalls auf dem Prinzip der Hybridisierung beruht das Accelerate PhenoTM (Accelerate DiagnosticsTM, Arizona, USA). Dabei handelt es sich um ein automatisiertes System, das zur Identifikation und Sensibilitätstestung von Bakterien und Pilzen eingesetzt werden kann. (72,138) Die Identifikation eines Erregers dauert circa 90 Minuten und die Sensibilitätstestung inklusive der MHK ungefähr sieben Stunden. Das Accelerate Pheno System verarbeitet die Probe automatisch und immobilisiert die Erreger, um diese als einzelne Zellen zu beobachten. Zelle für Zelle wird mittels FISH identifiziert.

Die Sensibilitätstestung wird mittels morphokinetischer Analyse der Zellen in der Schwarzlichtmikroskopie durchgeführt. Dabei wird das Wachstum einzelner, lebender, immobilisierter Zellen in der Anwesenheit von jeweils einer bestimmten Konzentration eines Antibiotikums sowie in der Abwesenheit von Antibiotika (Wachstumskontrolle) im circa zehnminütigen Intervall überprüft. Die so generierten Daten werden mithilfe der entsprechenden Grenzwerte (FDA und/oder CLSI) automatisch interpretiert. (138) Charnot-Katsikas et al. zeigten, dass das Accelerate Pheno System bei der Identifikation von grampositiven und gramnegativen Bakterien eine Sensitivität von 95,6 % erreichte, bei einer Spezifität von 99,5 %. Bei der Suszeptibilitätstestung erzielte das Accelerate Pheno sowohl hinsichtlich der MHK (\pm einer sich verdoppelnden Konzentrationsstufe des Antibiotikums) als auch bei der Interpretation der Ergebnisse als sensibel, resistent oder intermediär zu über 95 % korrekte Ergebnisse. (139)

In einer multizentrischen Studie evaluierten Pancholi et al. die Performance des Accelerate Pheno System im Vergleich zu der des Vitek 2 bei der Identifikation von Erregern. Zudem wurde die Leistung des Accelerate Pheno Systems bei der Sensibilitätsbestimmung der des Plättchendiffusionstests oder des Mikrodilutionstests gegenübergestellt. Bakterien und Pilze konnte das Accelerate Pheno System mit einer Sensitivität von 97,5 %, bei einer Spezifität von 99,5 %, korrekt identifizieren. In über 97 % der Fälle stimmte die Sensibilitätstestung des Accelerate Pheno Systems bei grampositiven Erregern mit oben genannten Referenzmethoden überein. Bei gramnegativen konnten Pancholi et al. ein Ergebnis von über 94 % erzielen. (138)

1.3.1.2 DNA-Mikroarray-basierte-Methoden

DNA-Mikroarrays bestehen aus kurzen Oligonukleotiden, die auf einem festen Medium befestigt sind. (72) Darauf werden markierte Nukleinsäuren aufgetragen, die an die befestigten Nukleinsäuren der Mikroarrays durch Hybridisierung binden. Durch diese Methode kann die relative Konzentration einer bestimmten DNA-Sequenz bestimmt werden. (Vergleiche Abbildung 9) Durch Verwendung eines Arrays mit einer sehr großen Anzahl an DNA-Sequenzen können Arrays zur Quantifizierung einer sehr großen Zahl von verschiedenen DNA-Sequenzen verwendet werden. (140,141)

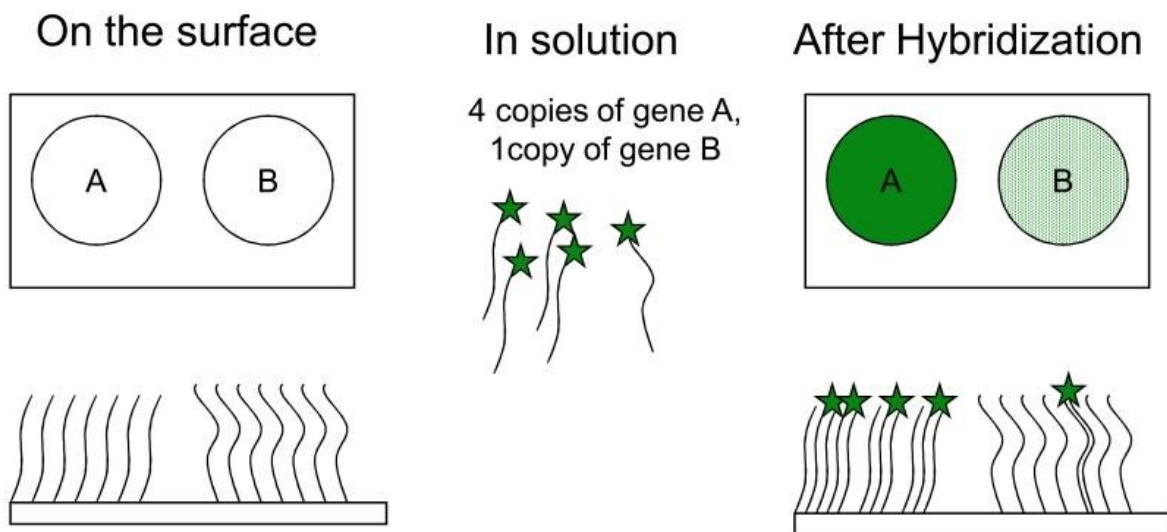


Abbildung 9: Vereinfachte Darstellung des Prinzips eines Mikroarray.

Abbildung aus Bumgarner R. *Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. Current Protocols in Molecular Biology* 2013 01/01; 2019/04;101(1):22.1.1-22.1.11. Verwendung der Abbildung genehmigt durch John Wiley & Sons Limited©.

Verigene® (Luminex® Corporation, früher Nanosphere, USA) basiert auf diesem Prinzip. Es stehen zwei verschiedene Panels zur Verfügung, die sowohl zur Identifikation von Erreger als auch zum Nachweis der üblichen Resistenzgene verwendet werden können. Eines dieser Panels ist für grampositive (12 Spezies) und deren Resistenzgene und das andere für gramnegative Bakterien (9 Spezies) und deren Resistenzgene. (72) Verigene identifiziert Bakterien und die assoziierten Resistenzgene mit einer Sensitivität von 81 %, bei einer Spezifität von über 98 %. (72,142,143) Ergebnisse liefert das Verigene-System nach ungefähr 2,5 Stunden. (72,142)

1.3.1.3 Nukleinsäure-amplifizierende-Methoden

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) stellt die meistverwendete Methode zur Vervielfältigung von Nukleotiden in der Identifikation von pathogenen Erregern dar. Eine PCR kann direkt aus dem Blut oder aus einer positiven Blutkultur durchgeführt werden. Derzeit sind sowohl die Breitspektrum-PCR als auch die Multiplex-PCR in Verwendung. (72) Breitspektrum-PCRs können die DNA von allen in einer Probe vorhandenen Erregern durch Verwendung von stark konservierter rDNA vervielfältigen. Diese stark konservierten DNA-Fragmente sind die 16S-rDNA bei Bakterien und die 18S-rDNA bei Pilzen. Durch Sequenzierung der DNA oder durch Verwendung von Real-time-PCR-Methoden können die Erreger identifiziert werden. (72,144-146) Multiplex-PCR-Assays hingegen zielen nur auf eine bestimmte Anzahl von Erregern ab, da sie nur gewisse chromosomale Regionen von Pathogenen amplifizieren. (72,144) Oft werden diese mit Assays kombiniert, die potentiell vorhandene Resistenzgene vervielfältigen können. (72)

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) ist ein neuerer Ansatz zur Amplifikation von Nukleinsäuren, der der PCR hinsichtlich Sensitivität und Effizienz sehr ähnlich ist. Ein wesentlicher Vorteil der LAMP ist, dass die DNA-Amplifikation unter isothermen Bedingungen abläuft. (72,147,148) Dadurch ist die Anschaffung von teurem Equipment, das für die PCR benötigt wird, nicht notwendig. (149)

FilmArray® (bioMérieux, Marcy l'Étoile, Frankreich) ist ein Multiplex-PCR-System, das automatisiert die Probe präpariert, mittels PCR amplifiziert und Ergebnisse automatisch erfasst sowie analysiert. Für die Identifikation von Blutstrominfektionen wurde das FilmArray® Blood Culture Identification Panel (BCID) entwickelt, das 24 Mikroorganismen (19 Bakterienspezies und 5 Pilzarten) und 4 Resistenzgene in einer Stunde identifizieren kann. Zu diesen Resistenzgenen zählen *mecA* (Methicillin), *vanA/B* (Vancomycin) und *KPC* (Carbapenem). Die benötigte Arbeitszeit dieses Vorgangs beträgt ungefähr zwei Minuten. (72,150)

Salimnia et al. führten eine, vom Hersteller finanzierte, multizentrische Studie mit 2 207 positiven, aeroben Blutkulturen durch, um Sensitivität und Spezifität des FilmArray-BCID-Panels zu evaluieren. In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass das FilmArray-BCID bei der Identifikation von Erregern eine Sensitivität von über 96 % aufweist. Die Resistenzgene vanA/B und KPC konnten mit 100-prozentiger Sensitivität und Spezifität identifiziert werden. Die Sensitivität und Spezifität für mecA lag bei über 98 %. (151,152) In kleineren Studien konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden. (153-155) Southern et al. zeigten in ihrer Studie eine Sensitivität von 80,4 % unter Berücksichtigung aller in die Studie eingeschlossenen Blutkulturen. Wurden allerdings nur Erreger berücksichtigt, die das BCID-Panel enthält, konnte eine Sensitivität von 94,6 % erreicht werden. Die Spezifität des BCID-Panels betrug 100 %. (154)

1.3.1.4 Kombinierte Methoden

Unlängst wurden Systeme entwickelt, die die Vorteile verschiedener molekularer Methoden kombinieren. Zu diesen zählen unter anderem der Sepsi Flow Chip und ePlex®. (72)

Der Sepsi Flow Chip (Master Diagnostics, Granada, Spain) ist ein diagnostischer Assay, der die meisten Erreger von Bakteriämien und deren Resistenzgene durch eine Multiplex-PCR gefolgt von einer Hybridisierungsmethode identifizieren kann. (156) Das System kann mehr als 36 Bakterien- und Candida-Spezies sowie 20 Resistenzmarker binnen drei Stunden identifizieren. (157) Galiana et al. konnten bei der Identifikation von Bakterien eine Sensitivität von 93,3 %, bei einer Spezifität von 100 % erzielen. In dieser Studie wurden Resistenzmarker mit einer Sensitivität von 93,6 % bei 100-prozentiger Spezifität identifiziert. Eine Übereinstimmung mit den Methoden der Standarddiagnostik konnte in 96,2 % der Fälle erzielt werden. (156)

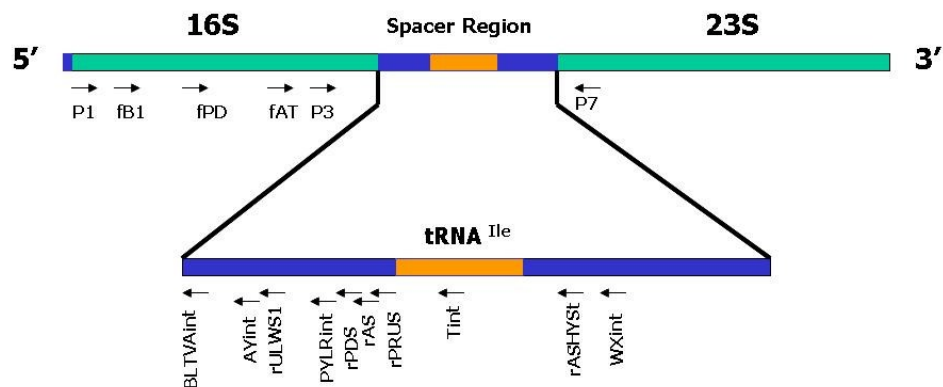
ePlex® (GenMarkDx®, Carlsbad, USA) ist ein völlig automatisiertes System, das auf molekularer Multiplex-Technologie basiert. Durch eine spezielle Form der Probenvorbereitung kann eine Reduktion der Kontaminationsgefahr sowie der Arbeitszeit ermöglicht werden. Nach einer Amplifikation des Genmaterials erfolgt eine elektrochemische Detektion der Ziel-DNA durch den eSensor® (GenMarkDx, USA). Der eSensor basiert auf der kompetitiven DNA-Hybridisierung und der elektrochemischen Detektion. Der Vorteil dieser Detektionsmethode ist, dass diese sehr spezifisch ist. (72,158) Zur Identifikation der Mikroorganismen und zum Nachweis von Resistenzgenen stehen verschiedene Panels (grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien, Pilze) zur Verfügung. Huang et al. hatten 2018 in einer Studie mit Panels gearbeitet, die sich noch in der Entwicklung befanden. Dennoch konnte sie 89 % der Proben korrekt identifizieren. Nachdem eine Blutkultur positiv geworden war, führten sie eine Gram-Färbung durch. Anschließend gaben Huang et al. die Proben in den ePlex und verglichen die Ergebnisse mit jenen des Plättchendiffusionstests und Vitek 2. Ergebnisse konnten mittels ePlex innerhalb von 1,5 Stunden geniert und Resistenzmarker konnten zu 100 % korrekt identifiziert werden. (159)

1.3.2 Anwendung molekularer Methoden direkt aus Vollblutproben (ohne vorangehende Inkubation)

Die Anwendung von molekularen Methoden aus Vollblutproben ermöglicht eine äußerst schnelle Identifikation des Erregers, da der zeitintensive Schritt der Inkubation entfällt. Auf diese Weise können außerdem Hindernisse der Blutkulturdiagnostik, wie zum Beispiel langsamwachsende Erreger umgangen werden. Ein weiterer Vorteil dieser Art der Diagnostik ist, dass für die Durchführung nur geringe Blutvolumina benötigt werden. (72,160)

Die meisten auf Vollblut basierenden Methoden verwenden PCR-Assays. Das Vorhandensein von Patienten-DNA und anderen Blutbestandteilen erschwert die Diagnostik mittels PCR, da diese die Kettenreaktion behindern können. (72,161,162) Außerdem besteht ein großes Risiko falsch-positive Ergebnisse zu erzielen: Nicht nur die DNA des ätiologisch verantwortlichen Mikroorganismus, sondern auch DNA von bereits abgetöteten Organismen und DNA, die durch Kontamination eingebracht wurde, werden von der PCR berücksichtigt. (160)

Ein neuer, vielversprechender Ansatz ist die Metagenomik. Dabei wird entweder das ganze vorhandene genetische Material oder ein spezieller Teil davon direkt aus der Probe analysiert. Die Sequenzierung des Genoms basiert entweder auf einem Amplikon (Amplikon-basierte Metagenomik) oder auf dem gesamten Genom (Shotgun-Metagenomik). Ersteres basiert auf der parallelen Sequenzierung der für Prokaryoten spezifischen 16S-rDNA und dem größeren Genkomplex 16S-23S-rDNA. (72,163-165) Zwischen der 16S-rDNA und der 23S-rDNA befindet sich eine Spacer-Region, die für die Taxonomie relevant ist. (166) (Vergleiche Abbildung 10)



Diagrammatic representation of a phytoplasma rRNA operon

Abbildung 10: Schematische Darstellung der ribosomalen DNA.

Abbildung aus https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Eucaryot_rdna.png

Die Amplikon-basierte Metagenomik wurde erfolgreich zur Diagnostik von Bakteriämien aus positiven Blutkulturen (163,164) und direkt aus Vollblut (165,168) eingesetzt. Bei Letzterer konnte eine ähnliche oder sogar höhere Sensitivität im Vergleich zu positiven Blutkulturen erzielt werden. Der Nachteil der Amplikon-basierten Metagenomik ist, dass nur eine Gruppe von Erregern zum Beispiel Bakterien identifiziert werden kann. (72)

Durch Anwendung von Shotgun-Metagenomik können hingegen alle Informationen über Bakterien und Viren aus einer Probe, sogar aus polymikrobiellen Proben, bereitgestellt werden. (169) Außerdem können durch diese Methode Virulenz- und Resistenzgene identifiziert werden. (170)

Das iDTECT™ Blood Dx (PathoQuest SAS, Paris, Frankreich) stellt eine neue Sequenzierungsmethode zur Identifikation von Mikroorganismen aus Blutproben dar, die auf Next generation Sequencing und metagenomischen Methoden beruht. (72,171) Durch Verwendung des metagenomischen Next generation Sequencing wird eine unverzerrte Identifikation von Pathogenen ermöglicht. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass man eine schier unglaublich große Zahl an Mikroorganismen blind identifizieren kann. (172) Die Firma Pathoquest gibt an, dass das iDTECT Blood Dx über 1 200 Bakterien und Viren identifizieren kann. (171) Parize et al. führten eine multizentrische, Proof-of-Concept Studie über ungezieltes Next generation Sequencing durch, die von der Firma Pathoquest finanziert wurde. Die Studie verglich ungezieltes Next generation Sequencing mit herkömmlichen mikrobiologischen Testverfahren (unter anderem Blutkulturen, serologische Tests, Antigen-Nachweisverfahren, PCR) zur Diagnose von Infektionen bei immunkompromitierten Patienten. Parize et al. konnten zeigen, dass das ungezielte Next generation Sequencing einen hohen negativen prädikativen Wert hat und mit dieser Methode mehr klinisch relevante Erreger als mit den konventionellen Methoden identifiziert werden konnten. (72,173)

1.3.3 Vor- und Nachteile der molekularen Diagnostik

Ein wesentlicher Vorteil der molekularen Diagnostik ist die kurze Wartezeit auf Ergebnisse. Vor allem bei Verwendung von Vollblut kann der Schritt der Blutkulturinkubation übersprungen werden, wodurch 16-24 Stunden bei schnell wachsenden Bakterien oder eventuell mehr Zeit bei langsamwachsenden Bakterien gespart werden können. (132) Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei manchen Methoden eine aufwändige Probenvorbereitung notwendig ist. (160)

Ein weiterer Vorteil der molekularen Diagnostik ist die sehr gute Identifikation von Erregern aus polymikrobiellen Proben. Ebenso können bereits abgetöteten Erreger sehr gut identifiziert werden. (132) Dabei sollte allerdings berücksichtigt werden, dass der Nachweis von bereits abgetöteten Erregern auch zu einem überschießenden Therapieregime oder zu nicht notwendiger antiinfektiver Therapie führen kann, da die Erreger bereits erfolgreich abgetötet worden sind. Zusätzlich werden auch Infektionen, die erfolgreich vom Immunsystem abgewehrt worden sind, von molekularen Methoden erkannt, zumal die DNA von Erregern nach ihrer Abtötung einige Tage in der Blutbahn persistiert. (160)

Neben den Kosten, die normalerweise bei molekularen Methoden höher sind als bei den konventionellen, sollte auch das relativ schmale Spektrum identifizierbarer Resistenzgene berücksichtigt werden. Im Vergleich zu den herkömmlichen Methoden können auf diese Weise weniger Informationen über die Resistenzen der Erreger generiert werden. Außerdem sollte berücksichtigt werden, dass diese sogenannten molekularen AntibioGramme keine Informationen über Sensibilitäten generieren sondern nur über potentielle Resistenzen. Nachgewiesene Resistenzgene können auch nicht aktiviert oder exprimiert sein, wodurch das Risiko einer überschießenden Therapie besteht. Ebenfalls muss berücksichtigt werden, dass es der molekularen Diagnostik aufgrund ihres Wesens unmöglich ist, noch unbekannte Resistenzgene nachzuweisen. Dieses Problem könnte jedoch überwunden werden, wenn alle Resistenzgene in einem Erreger identifiziert werden könnten. (132) Beispielsweise konnte bei *Staphylococcus aureus* gezeigt werden, dass bei Nachweis aller Resistenzgene durch Sequenzierung des gesamten Genoms die Ergebnisse mit den konventionellen, phänotypischen Methoden zur Sensibilitätstestung übereinstimmen. (174,175) Allerdings fehlt den Methoden, die das gesamte Genom eines Erregers analysieren, die klinische Relevanz, da diese sehr lange dauern. Molekulare AntibioGramme liefern außerdem keine MHKs. Konventionelle, mikrobiologische Methoden können aufgrund all dieser genannten Gründe nicht durch molekulare ersetzt werden. Molekulare AntibioGramme bieten jedoch die Möglichkeit, Informationen über Resistenzen von Erregern in kürzester Zeit zu gewinnen. (132)

Molekulare, phänotypische Methoden, wie das Accelerate Pheno, umgehen die Problematik der fraglichen Relevanz von Resistenzgenen und liefern MHKs, weswegen ein klar ersichtlicher Grund zur weiteren Erforschung und Verbesserung von phänotypischen Sensibilitätstestungen besteht. (137)

1.4 Beschleunigte Sensibilitätstestung von Blutkulturen gemäß EUCAST 2018

Die EUCAST präsentierte 2018 eine Art der beschleunigten Sensibilitätstestung, die nicht auf molekularen Methoden sondern auf der Plättchendiffusionsmethode beruht. Diese neue Methodik basiert auf einer verkürzten Bebrütungszeit von beimpften Agarplatten mit Antibiotikaplättchen. 100-150 µL Blut aus einer positiven Blutkultur werden dabei zur Beimpfung einer Agarplatten verwendet. Nach vier-, sechs- oder achtstündiger Bebrütung des Inokulums auf der Agarplatte, können bereits Aussagen über die Empfindlichkeit mancher Erreger gegenüber gewissen Antibiotika getroffen werden. Diese Methodik ist anwendbar für einige gramnegative Stäbchen (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) und einige grampositive Kokken (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* sowie *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*). Die Hemmhöfe von *Pseudomonas aeruginosa* können jedoch erst nach sechs- beziehungsweise achtstündiger Bebrütungszeit interpretiert werden. (112)

Diese Methodik ist bei zwei der häufigsten Erreger von Sepsis durchführbar: Opota et al. konnten zeigen, dass 42 % der von ihnen detektierten Bakteriämien durch *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* verursacht wurden. (16) Krause et al. konnten am Universitätsklinikum für Innere Medizin Graz 38,5 % der Bakteriämien auf *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* zurückführen. (17) Des Weiteren sind die anderen Bakterien, bei denen diese Methode durchführbar ist, ebenfalls häufig in Blutkulturen vorzufinden. (16,17) (Vergleiche Abbildung 1)

Für jeden der genannten Erreger sind Grenzwerte für jeden Zeitpunkt und für jede antiinfektive Substanz festgelegt worden (Vergleiche EUCAST Breakpoints RAST). Somit ist eine Einteilung der Bakterien in die Kategorien „sensibel“, „resistent“ oder „ATU“ (Area of Technical Uncertainty) möglich. Bei Überschreitung der jeweiligen Resistenzgrenzen entspricht die ATU einer Zone mit einem Millimeter bis drei Millimetern im Hemmhofdurchmesser. In diesem Bereich ist keine Differenzierung zwischen sensibel und resistent möglich. Je kürzer die Inkubationszeit umso häufiger tritt das Ergebnis ATU auf.

Ist die Interpretation des Antibiogramms nach vier Stunden nicht möglich, kann die Agarplatte, wenn diese innerhalb von zehn Minuten reinkubiert wird, für zwei weitere Stunden bebrütet und erneut abgelesen werden. Dies kann nach sechsstündiger Inkubationszeit wiederholt werden. (176) Bei der Anwendung der EUCAST RAST-Methodik muss allerdings beachtet werden, dass einige Parameter im Vergleich zur normalen Sensibilitätstestung mittels Plättchendiffusionstest verändert werden müssen. Zu diesen zählen die Bebrütungszeit der Blutkulturen, die Vorbereitung des Inokulums sowie die Grenzwerte der Hemmhöfe.

Werden Blutkulturen, nachdem diese als positiv detektiert worden sind, länger als 18 Stunden in automatisierten Blutkulturlesegeräten bebrütet, ist die Durchführung der EUCAST Methodik nicht möglich. Als Inokulum wird unverdünntes Blut aus positiven Blutkulturen verwendet. Zur Beimpfung werden 100-150 µL des unverdünnten Blutes auf die Agarplatte aufgetragen und gleichmäßig verteilt. Die Hemmhofdurchmesser sollten nur dann abgemessen werden, wenn sich ein gleichmäßiger Bakterienrasen auf der Agarplatte gebildet hat und die Ränder der Hemmhöfe scharf begrenzt sind. Leichtes Wachstum von Bakterien innerhalb des Hemmhofs kann ignoriert werden. Dies tritt vereinzelt nach kurzen Inkubationszeiten bei den gramnegativen Bakterien *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* in Kombination mit Betalaktam-Antibiotika auf. (112)

1.5 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Studie ist es, die Aussagekraft der neuen EUCAST-Methodik zu evaluieren. Dabei wird die RAST-Methode (Rapid Antimicrobial Suceptibility Testing) mit Standardmethoden verglichen. Zu den Standardmethoden zählen der Plättchendiffusionstest nach 24-stündiger Inkubationszeit und der Vitek 2. Ebenso wird in dieser Studie erhoben, ob die RAST-Methode zu einer Änderung der antiinfektiven Therapie führt und ob weitere, klinisch relevante Maßnahmen initiiert werden.

2 Material und Methoden

Alle positiven Blutkulturen der Universitätsklinik für Innere Medizin Graz, die in das Mikrobiologielabor der Sektion für Infektiologie und Tropenmedizin gesendet worden waren, wurden in die Studie eingeschlossen. Die positiven Blutkulturflaschen wurden nach standardisiertem Prozedere verarbeitet. Parallel wurde die neue EUCAST Methodik für RAST (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing) durchgeführt, falls diese anwendbar war. (112)

Nachdem das automatisierte Blutkultursystem BACTEC eine Blutkultur als positiv identifiziert hatte, wurde eine Gram-Färbung durchgeführt. War eine Blutkultur nicht binnen 18 Stunden, nachdem diese als positiv erkannt worden war, weiterverarbeitet worden oder war eine Blutkultur nach 09:00 Uhr morgens als positiv detektiert worden, wurde diese von der Studie ausgeschlossen. Bei Nachweis von mehr als einem Erreger in einer Probe, Pilzen, gramnegativen Kokken oder grampositiven Stäbchen mittels Gram-Färbung ist die Durchführung der neuen EUCAST-Methodik nicht möglich und die Proben wurden aus der Studie ausgeschlossen. Bei Nachweis von gramnegativen Stäbchen (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*), oder grampositiven Kokken wie *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* sowie *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* wurden 100 µL Blut aus der positiven Blutkultur entnommen und auf einer Müller-Hinten-Agarplatte gleichmäßig verteilt. Wurden in der Gram-Färbung grampositive Kokken in Haufen nachgewiesen, erfolgte deren Differenzierung in *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negative Staphylokokken (CNS) mittels QuickFISH (70,88,90). Koagulase-negative Kokken wurden von der Studie ausgeschlossen. Anschließend wurden die Antibiotikaplättchen auf den Agar aufgetragen und es erfolgte eine Inkubation bei 37 °C.

Nach vierstündiger Bebrütungszeit wurden die Hemmhofdurchmesser vermessen und die Ergebnisse wurden notiert. Zur selben Zeit erfolgte die Identifikation der Erreger durch MALDI-TOF MS. *Staphylococcus aureus* Isolate wurden mittels Gram-Färbung und QuickFISH identifiziert. War die Identifikation des Erregers möglich, konnten die Hemmhofdurchmesser anhand der RAST-Methodik interpretiert werden (112,176) War die Identifikation des Erregers allerdings nach vier Stunden nicht möglich, wurde MALDI-TOF MS nach sechs Stunden erneut durchgeführt. (97-99)

War die Identifikation nach sechs Stunden ebenfalls nicht möglich gewesen, wurden diese Proben aus der Studie ausgeschlossen. (112) Die Hemmhöfe können nur interpretiert werden, wenn das Wachstum der Bakterien konfluent ist und die Hemmhöfe klar begrenzt sind. War das Ablesen des Hemmhofdurchmessers nach vierstündiger Inkubation nicht möglich, wurde dies nach sechsstündiger Inkubation wiederholt. Die Hemmhofdurchmesser wurden ebenso nach sechs Stunden abgelesen und nach der RAST-Methodik für den entsprechenden Erreger interpretiert. (112,176) Unabhängig von der Interpretationsmöglichkeit des Antibiogramms erfolgte ein umgehendes infektiologisches Konsilium.

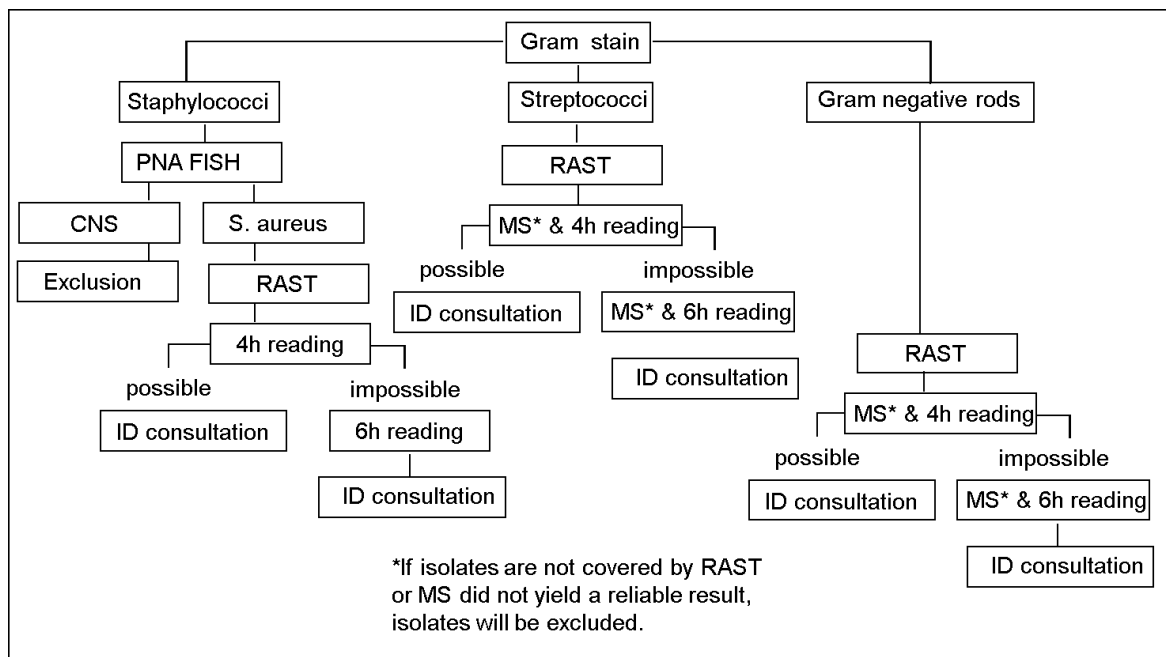


Abbildung 11: Studiendesign.

CNS= coagulase negative staphylococci; MS= mass spectrometry (MALDI-TOF); ID consultation= patient consultation from a member of the department of Infectious Diseases and Tropical Medicine.

Eine Standardempfindlichkeitstestung (AST) anhand der EUCAST-Guideline für Plättchendiffusionstests wurde mit allen Proben, die in die Studie aufgenommen worden waren, durchgeführt. Die Hemmhofdurchmesser wurden nach 18-24 Stunden gemessen und anhand der EUCAST-Grenzwerte interpretiert. (110) Die Ergebnisse der Standardplättchendiffusionsmethode wurden mit denen des RASTs verglichen. Traten zwischen den Ergebnissen besagter Methoden Diskrepanzen auf, erfolgte erneut eine konsiliarische Begutachtung der Patientin oder des Patienten durch das Team der Infektiologie. Die minimalen Hemmkonzentrationen wurden im Nachhinein mittels Vitek 2 am Institut für Hygiene, Mikrobiologie und Umweltmedizin erhoben.

Ein infektiologisches Konsilium besteht aus einer detaillierten Erhebung der Anamnese und Durchführung einer körperlichen Untersuchung. Eine schriftliche Empfehlung bezüglich der weiteren antibiotischen Therapie und weiterer diagnostischer Schritte wird dabei ausgestellt. Das Einverständnis der Patientinnen und Patienten zur Verwendung ihrer Daten wurden schriftlich eingeholt.

2.1 Ausschlusskriterien

Eine positive Blutkultur wurde bei Vorliegen von mindestens einer der folgenden Bedingungen von der Studie ausgeschlossen:

- Blutkultur nach 09:00 Uhr als positiv detektiert
- Blutkultur nicht binnen 18 Stunden, nachdem sie als positiv detektiert worden war, weiterverarbeitet
- Pilze in Blutkultur nachgewiesen
- Mehrere Erreger in einer Blutkultur nachgewiesen (polymikrobiell besiedelte Blutkultur)
- Erreger, bei denen die RAST-Methodik nicht einsetzbar gewesen war, nachgewiesen (112,176)
- Erreger nach sechs Stunden nicht identifizierbar
- Blutkultur Teil einer Serie, die bereits in die Studie aufgenommen worden war

2.2 Studiendauer und Stichprobengröße

Rückblickend wurden Blutkulturbefunde von 2017 zur Studienplanung begutachtet: 364 positive Blutkulturen, an denen die RAST-Methodik durchführbar gewesen wäre, wurden im mikrobiologischen Labor am Universitätsklinikum für Innere Medizin detektiert. Ungefähr 50 % dieser Proben wären aus dieser Studie ausgeschlossen worden, da diese teilweise nach 09:00 Uhr detektiert wurden beziehungsweise länger als 18 Stunden positiv gewesen sind. Somit stehen ungefähr 180 Blutkulturen pro Jahr für die RAST-Methodik zur Verfügung.

Die Studie startete am 16.01.2019. Diese Diplomarbeit inkludiert die ersten 50 Blutkulturen ab Studienbeginn, bei denen die RAST-Methodik durchführbar war. Die Datenerhebung für die Diplomarbeit endete am 23.05.2019.

2.3 Datenbeschaffung und Verarbeitung

Die im Zuge dieser Studie mittels RAST-Methodik interpretierten Ergebnisse der Antibiotogramme wurden auf ihre Verwertbarkeit geprüft. Im weiteren Verlauf wurden dann jene Ergebnisse, die als sensibel oder resistent interpretiert worden waren, zudem auf ihre Richtigkeit im Vergleich zu den Ergebnissen der Standardmethodik evaluiert. Als Referenzwerte bezüglich Korrektheit der Ergebnisse der RAST-Methodik galten die Plättchendiffusionsmethode nach 18-24 Stunden sowie der Vitek 2. Des Weiteren wurde die klinische Relevanz der RAST-Methodik hinsichtlich der Modifikation der empirischen Antibiose evaluiert. Die erhobenen Daten werden in absoluten Zahlen und in Prozentwerten gezeigt.

Die Empfehlungen aus den infektiologischen Konsilen werden retrospektiv analysiert. Die Parameter „antibiotische Therapie vor den Ergebnissen der RAST-Methodik“, „antibiotische Therapie nach den Ergebnissen der RAST-Methodik“ und „Empfehlungen bezüglich zusätzlicher mikrobiologischer Diagnostik“ werden evaluiert.

Es liegt ein positives Ethikvotum vor (EK-Nr: 31 -291 ex 18/19).

Diese Diplomarbeit ist Teil einer klinischen Studie um Frau Professor Ines Zollner-Schwetz, in der die beschleunigte Sensibilitätstestung von Blutkulturen nach EUCAST evaluiert werden soll (Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing and Infectious Disease Consultation). Meine wesentliche Aufgabe in diesem Prozess bestand in der Digitalisierung, Verwaltung und Verarbeitung der erhobenen Daten.

3 Ergebnisse – Resultate

Im Zeitraum vom 16.01.2019 bis zum 23.05.2019 wurden 50 Patientinnen und Patienten in diese Studie eingeschlossen. Die mikrobiologische Diagnostik wurde – wie oben bereits beschrieben – durchgeführt.

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv bestand aus 17 Frauen und 33 Männern. Das mittlere Alter der weiblichen Patientinnen sowie der männlichen lag bei 68 Jahren, mit einer Standardabweichung von 14 Jahren. Der Altersmedian der Frauen lag bei 69 Jahren (1. Quartil: 57 Jahre, 3. Quartil: 79 Jahre) und der der Männer bei 75 Jahren (1. Quartil: 60 Jahre, 3. Quartil: 78 Jahre).

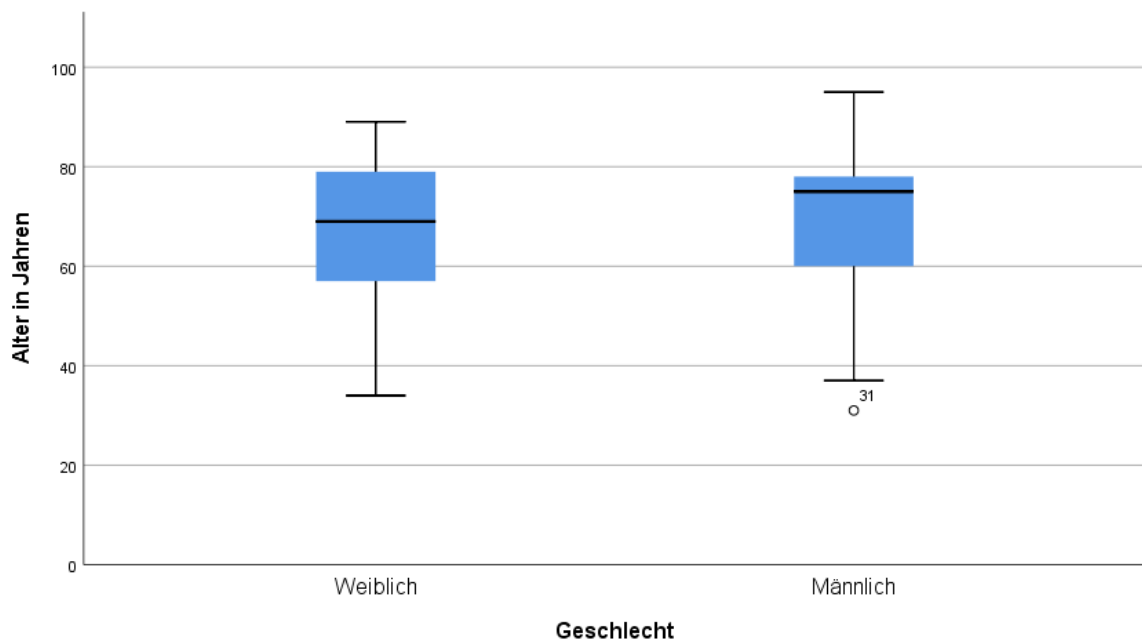


Abbildung 12: Darstellung des Alters der Probandinnen und Probanden im Bezug auf das Geschlecht.

3.2 Nachgewiesene Erreger

49 Erreger konnten nach vierstündiger Inkubation auf den Agarplatten korrekt identifiziert werden. 17 dieser waren *Staphylococcus aureus* Isolate, die nach der Gram-Färbung durch QuickFish identifiziert wurden. 32 Erreger, bei denen die RAST-Methodik durchführbar gewesen war, wurden nach vier Stunden mittels MALDI-TOF MS korrekt identifiziert. Ein Isolat wurde durch MALDI-TOF MS nach sechsständiger Inkubationszeit auf der Agarplatte korrekt identifiziert.

Am häufigsten konnte der gramnegative Erreger *Escherichia coli* in den Blutkulturen nachgewiesen werden: 20 *Escherichia coli* Isolate wurden nachgewiesen (40 %). Der zweithäufigste Erreger war mit 17 nachgewiesenen Isolaten *Staphylococcus aureus* (34 %). *Streptococcus pneumoniae* wurde viermal (8 %) nachgewiesen. Die anderen Erreger, bei denen die RAST-Methodik durchführbar gewesen war, wurden entsprechend ihrer Epidemiologie seltener in Blutkulturen nachgewiesen: *Enterococcus faecium* viermal (8 %), *Klebsiella pneumoniae* dreimal (6 %), *Enterococcus faecalis* und *Pseudomonas aeruginosa* jeweils einmal (2 %).

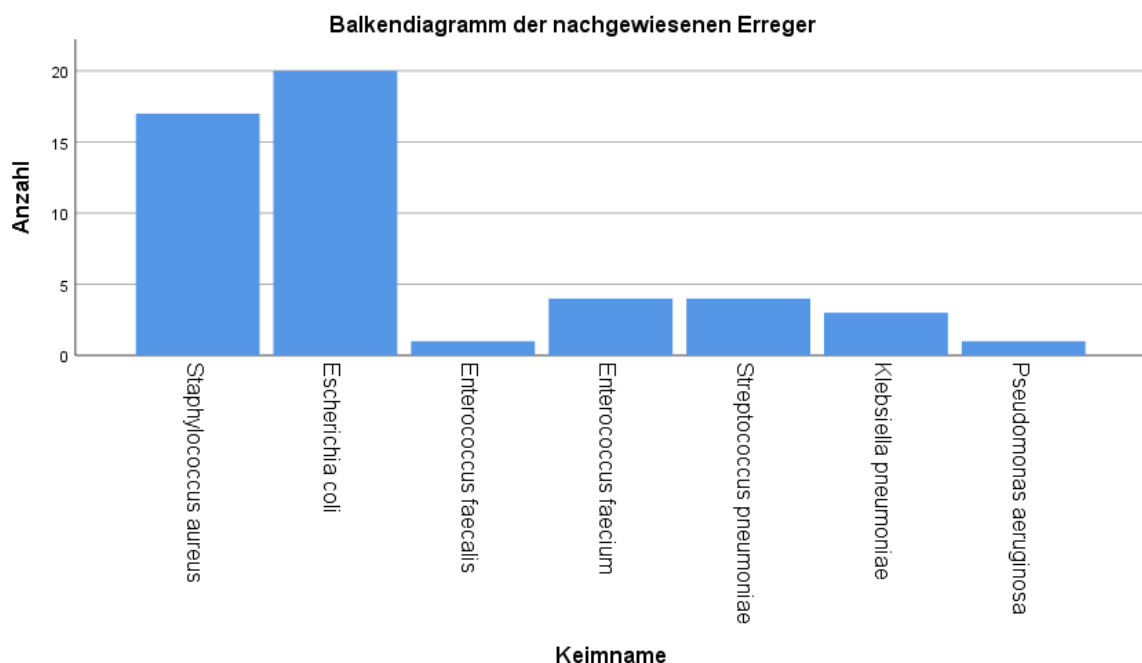


Abbildung 13: Anzahl der nachgewiesenen nach Keimname.

3.3 Häufigkeit von nicht verwertbaren Ergebnissen

207 von 582 Messungen (35,6 %) waren aufgrund eines nicht eindeutig interpretierbaren Hemmhofdurchmessers (ATU) beziehungsweise eines nicht ablesbaren Hemmhofdurchmessers nicht verwertbar. Ein nicht verwertbares Messergebnis (das heißt ATU oder nicht ablesbar) nach vier Stunden trat insgesamt 146 Mal auf (50,0 %). Nach sechs Stunden waren 61 Ergebnisse (21,0 %) nicht verwertbar. Im Detail: Insgesamt wurden 83 Ergebnisse (14,2 %) als ATU interpretiert. Die Anzahl des Ergebnisses ATU nach vier Stunden lag bei 53 (18,1 %), nach sechs Stunden bei 30 (10,3 %). 124 Ergebnisse (21,3 %) waren nicht ablesbar. Bei der Messung nach vier Stunden war in 93 Fällen (31,8 %) das eindeutige Ablesen des Hemmhofdurchmessers nicht möglich. Nach sechs Stunden war dies in 31 Fällen (10,7 %) nicht möglich. (Vergleiche Tabelle 1 und Tabelle 2)

	Nicht verwertbare Ergebnisse ¹	
<i>Escherichia coli</i> (n=20; m=312 ²)	95	30,4 %
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=17; m=136)	54	39,7 %
Enterokokken ³ (n=5; m=44 ⁴)	25	56,8 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=4; m=40)	23	57,5 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3; m=43 ⁵)	5	11,6 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁶ (n=1; m=7)	5	71,4 %
Summe (n=50; m=582)	207	35,6 %

Tabelle 1: Anzahl der nicht verwertbaren Ergebnisse in Bezug auf die einzelnen Erreger in absoluten Zahlen und Prozent.

n beschreibt die Anzahl der Isolate, *m* beschreibt die Anzahl der durchgeführten Messungen an den jeweiligen Erregern.

Anmerkungen:

¹ Nicht verwertbar entspricht ATU und nicht ablesbar

² Bei einem der *Escherichia coli* Isolate lösten sich alle Antibiotikaplättchen, nachdem die erste Messung nach vier Stunden durchgeführt wurde. Die Messung nach sechs Stunden konnte bei diesem Isolat aufgrund dessen nicht durchgeführt werden.

³ *Enterococcus faecium* (n=4; m=36) und *Enterococcus faecalis* (n=1; m=8)

⁴ Bei *Enterococcus faecium* wurde keine Messung von Linezolid nach vier Stunden durchgeführt; bei *Enterococcus faecalis* wurde keine Messung für Imipenem nach vier und sechs Stunden durchgeführt

⁵ Bei einem der *Klebsiella pneumoniae* Isolate lösten sich fünf Antibiotikaplättchen von der Agarplatte, nachdem die erste Messung nach vier Stunden durchgeführt wurde. Die Messung von Meropenem, Ciprofloxacin, Amikacin, Gentymycin und Tobramycin nach sechs Stunden konnte aufgrund dessen bei diesem Isolat nicht durchgeführt werden.

⁶ Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurden keine Grenzwerte für die Interpretation nach vier Stunden von der EUCAST veröffentlicht.

Bei dem *Pseudomonas aeruginosa* Isolat traten, die meisten nicht verwertbaren Ergebnisse auf (71,4 %). Die besten Ergebnisse hingegen konnte man bei den *Klebsiella pneumoniae* Isolaten erzielen: Fünf Ergebnisse waren nicht verwertbar (11,6 %). (Vergleiche Tabelle 1). Bei den *Streptococcus pneumoniae* Isolaten wurde in 80,0 % kein verwertbares Ergebnis nach vier Stunden erzielt.

Bei den *Escherichia coli* Isolaten konnte nach vier Stunden zu 50,0 % kein verwertbares Ergebnis erzielt werden. Die *Staphylococcus aureus* Isolate zeigten nach vier Stunden ähnliche Ergebnisse: 47,1 % der Isolate lieferten kein verwertbares Ergebnis. (Vergleiche Tabelle 2)

Auffallend ist eine Reduktion der nicht verwertbaren Ergebnisse im zeitlichen Verlauf. So trat das Ergebnis ATU nach vierstündiger Bebrütungszeit in 18,1 % der Fälle auf, wohingegen dies nur mehr bei 10,3 % nach sechs Stunden lag. Beim Ergebnis „nicht interpretierbar“ konnte eine Reduktion von 93 auf 31 Messergebnisse durch Verlängerung der Bebrütungszeit von vier auf sechs Stunden erzielt werden.

		ATU		nicht interpretierbar	
		Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent
<i>Escherichia coli</i> (n=20; m=312 ¹)	4 Stunden	38	23,8 %	42	26,3 %
	6 Stunden	11	7,2 %	4	2,6 %
	Gesamt	49	15,7 %	46	14,7 %
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=17; m=136)	4 Stunden	12	17,7 %	20	29,4 %
	6 Stunden	11	16,2 %	11	16,2 %
	Gesamt	23	16,9 %	31	22,8 %
Enterokokken ² (n=5; m=44 ³)	4 Stunden	1	5,0 %	13	65,0 %
	6 Stunden	6	25,0 %	5	20,8 %
	Gesamt	7	15,9 %	18	40,9 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=4; m=40)	4 Stunden	1	5,0 %	15	75,0 %
	6 Stunden	1	5,0 %	6	30,0 %
	Gesamt	2	5,0 %	21	52,5 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3; m=43 ⁴)	4 Stunden	1	4,2 %	3	12,5 %
	6 Stunden	1	5,3 %	0	0 %
	Gesamt	2	4,7 %	3	7,0 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ⁵ (n=1; m=7)	6 Stunden	0	0 %	5	71,4 %
Summe (n=50; m=582)	4 Stunden	53	18,2 %	93	31,9 %
	6 Stunden	30	10,3 %	31	10,7 %
	Gesamt	83	14,3 %	124	21,3 %

Tabelle 2: Anzahl und Prozent ATU und nicht interpretierbar bezogen auf die einzelnen Erreger sowie auf die entsprechenden Messzeitpunkte.

n beschreibt die Anzahl der Isolate, m beschreibt die Anzahl der durchgeführten Messungen an den jeweiligen Erregern.

Anmerkungen:

¹ Bei einem der *Escherichia coli* Isolate lösten sich alle Antibiotikaplättchen von der Agarplatte nachdem die erste Messung nach vier Stunden durchgeführt wurde. Aufgrund dessen konnte bei diesem Isolat die Messung nach sechs Stunden nicht durchgeführt werden.

² *Enterococcus faecium* (n=4; m=36) und *Enterococcus faecalis* (n=1; m=8)

³ Bei *Enterococcus faecium* wurde keine Messung von Linezolid nach vier Stunden durchgeführt; bei *Enterococcus faecalis* wurde keine Messung für Imipenem nach vier und sechs Stunden durchgeführt.

⁴ Bei einem der *Klebsiella pneumoniae* Isolate lösten sich fünf Antibiotikaplättchen von der Agarplatte nachdem die erste Messung nach vier Stunden durchgeführt wurde. Die Messung von Meropenem, Ciprofloxacin, Amikacin, Gentamicin und Tobramycin nach sechs Stunden konnte bei diesem Isolat aufgrund dessen nicht durchgeführt werden.

⁵ Bei *Pseudomonas aeruginosa* wurden keine Grenzwerte für die Interpretation nach vier Stunden von der EUCAST veröffentlicht.

3.3.1 *Staphylococcus aureus*

An 17 *Staphylococcus aureus* Isolaten wurden 136 Messungen nach vier und sechs Stunden an vier antiinfektiven Substanzen (Cefoxitin, Norfloxacin, Gentamicin und Clindamycin) durchgeführt. Der Hemmhofdurchmesser wurde bei den Messungen nach vier und sechs Stunden 23 Mal (16,9 %) als ATU interpretiert. Bei Cefoxitin wurden jeweils vier Ergebnisse nach vier und sechs Stunden als ATU interpretiert. Bei Norfloxacin wurde nach vier Stunden zweimal ATU festgestellt. ATU trat bei Gentamicin jeweils einmal nach vier und nach sechs Stunden auf. Bei Clindamycin wurde der Hemmhofdurchmesser nach vier Stunden in fünf Fällen als ATU und nach sechs Stunden in sechs Fällen. (Vergleiche Tabelle 3)

Der Hemmhofdurchmesser, der oben genannten antiinfektiven Substanzen, wurde in 31 von 136 Fällen (22,8 %) als „nicht interpretierbar“ eingestuft. Dies trat bei Cefoxitin nach vier Stunden einmal, bei Norfloxacin nach vier Stunden achtmal und nach sechs Stunden zweimal, bei Gentamicin nach vier Stunden dreimal sowie bei Clindamycin nach vier Stunden achtmal und nach sechs Stunden neunmal auf.

Insgesamt konnte im Zuge der beschleunigten Sensibilitätstestung an *Staphylococcus aureus* Isolaten zu 60,3 % ein verwertbares Ergebnis abgelesen werden. Die Zahl der nicht verwertbaren Ergebnisse betrug nach vier Stunden 32 (47,1 %) und nach sechs Stunden 22 (32,4 %).

13 nicht verwertbare Ergebnisse (76,5 %) traten bei Clindamycin nach vier Stunden und 15 (88,2 %) nach sechs Stunden auf. Die niedrigste Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen trat bei Gentamicin (gesamt: fünf; 14,7 %) auf.

<i>Staphylococcus aureus</i>		ATU		Nicht interpretierbar	
Cefoxitin	4 Stunden	4	23,5 %	1	5,9 %
	6 Stunden	4	23,5 %	0	0 %
Norfloxacilin	4 Stunden	2	11,8 %	8	47,1 %
	6 Stunden	0	0 %	2	11,8 %
Gentamicin	4 Stunden	1	5,9 %	3	17,7 %
	6 Stunden	1	5,9 %	0	0 %
Clindamycin	4 Stunden	5	29,4 %	8	47,1 %
	6 Stunden	6	35,3 %	9	53,0 %
Summe	4 Stunden	12	17,7 %	20	29,4 %
	6 Stunden	11	16,2 %	11	16,2 %
	Gesamt	23	16,9 %	31	22,8 %

Tabelle 3: Anzahl und Prozent der nicht verwertbaren Ergebnisse bei *Staphylococcus aureus* aufgespalten in ATU und nicht interpretierbar in Bezug auf die einzelnen antiinfektiven Substanzen und entsprechenden Messzeitpunkte.

3.3.2 *Escherichia coli*

An 20 *Escherichia coli* Isolaten wurden 312 Messungen durchgeführt, dabei wurde bei 49 Messungen (15,7 %) das Ergebnis ATU erzielt. Bei 46 (14,7 %) Messungen an den *E. coli* Isolaten konnte der Hemmhofdurchmesser nach vier- beziehungsweise sechsständiger Bebrütungszeit nicht abgelesen werden. Bei einem der Isolate lösten sich alle Antibiotikaplättchen nach Vermessung der Hemmhofdurchmesser nach vier Stunden von der Agarplatte, weswegen eine Messung nach sechs Stunden nicht mehr möglich war. Die Messung zum Endzeitpunkt nach 24 Stunden konnte dennoch durchgeführt werden.

Bei 95 der 312 durchgeführten Messungen (30,5 %) konnte durch die RAST-Methodik kein verwertbares Ergebnis erzeugt werden. Die Anzahl der nicht verwertbaren Ergebnisse nach vier Stunden betrug 80 (50,0 %), nach sechs Stunden hingegen nur mehr 15 (9,9 %). Es kam durch die sechsständige Bebrütungszeit zu einer deutlichen Reduktion des Ergebnisses „nicht interpretierbar“ im Vergleich zur vierständigen Bebrütungszeit (4 Stunden: 42 (26,3 %); 6 Stunden: 4 (2,6 %)).

Das Ergebnis nach vierständiger Bebrütung mit Piperacillin/Tazobactam konnte in 80,0 % der Messungen nicht verwertet werden. Nach sechsständiger Bebrütungszeit konnte eine Reduktion auf 42,1 % erreicht werden. Eine vierständige Bebrütung mit Gentamicin führte zur geringsten Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen (6; 30,0 %) im Vergleich zu anderen antiinfektiven Substanzen im gleichen Zeitraum.

Bei den Substanzen Cefotaxim, Meropenem und Amikacin lag die Anzahl der nicht verwertbaren Ergebnisse nach sechsständiger Bebrütungszeit jeweils bei Null. (Vergleiche Tabelle 4)

<i>Escherichia coli</i>		ATU		Nicht interpretierbar	
Piperacillin/ Tazobactam	4 Stunden	8	40,0 %	8	40,0 %
	6 Stunden	6	31,6 %	2	10,5 %
Cefotaxim	4 Stunden	0	0 %	9	45,0 %
	6 Stunden	0	0 %	0	0 %
Ceftazidim	4 Stunden	6	30,0 %	7	35,0 %
	6 Stunden	3	15,8 %	0	0 %
Meropenem	4 Stunden	8	40,0 %	2	10,0 %
	6 Stunden	0	0 %	0	0 %
Ciprofloxacin	4 Stunden	5	25,0 %	5	25,0 %
	6 Stunden	0	0 %	1	5,3 %
Amikacin	4 Stunden	6	30,0 %	3	15,0 %
	6 Stunden	0	0 %	0	0 %
Gentamicin	4 Stunden	2	10,0 %	4	20,0 %
	6 Stunden	1	5,3 %	1	5,3 %
Tobramycin	4 Stunden	3	15,0 %	4	20,0 %
	6 Stunden	1	5,3 %	0	0 %
Summe	4 Stunden	38	23,8 %	42	26,3 %
	6 Stunden	11	7,2 %	4	2,6 %
	Gesamt	49	15,7 %	46	14,7 %

Tabelle 4: Anzahl und Prozent der nicht verwertbaren Ergebnisse bei *Escherichia coli* aufgespalten in ATU und nicht interpretierbar in Bezug auf die einzelnen antiinfektiven Substanzen und entsprechenden Messzeitpunkte.

3.4 Diskrepanzen

Der Vergleich der Ergebnisse der beschleunigten Sensibilitätstestung nach vier- beziehungsweise sechsständiger Inkubationszeit mit denen der Standardmethodik ergab nur geringe Differenzen: Insgesamt konnten 12 Diskrepanzen (4,0 %) zwischen den Ergebnissen der RAST-Methodik und der Plättchendiffusionsmethode nach 24 Stunden festgestellt werden (Vergleiche Tabelle 5). Beim Vergleich der Ergebnisse zwischen der beschleunigten Sensibilitätstestung und den Ergebnissen des Vitek 2 zeigte sich eine Anzahl von 9 Diskrepanzen. Bei fünf Isolaten war jedoch eine erneute Züchtung nicht mehr möglich gewesen, weswegen eine Testung mittels Vitek 2 nicht durchführbar war. Davon waren alle der vier *Streptococcus pneumoniae* Isolate und ein *Klebsiella pneumoniae* Isolat betroffen.

Beim Vergleich der verschiedenen Messmethoden wurden unterschiedliche Ergebnisse als Diskrepanz aufgefasst. War die RAST-Methodik nicht durchführbar gewesen (kein ablesbarer Hemmhofdurchmesser) oder war ein Hemmhofdurchmesser als ATU interpretiert worden, wurde dies beim Vergleich mit den Standardmethoden nicht als Diskrepanz aufgefasst. Ebenso wurde das Vitek-2-Ergebnis „intermediär“ beim Vergleich mit dem Ergebnis der beschleunigten Sensibilitätstestung – unabhängig vom ihrem Ergebnis – nicht als Diskrepanz aufgefasst.

Erreger	Diskrepanzen	
<i>Staphylococcus aureus</i> (n=17; v=68)	2	2,9 %
<i>Escherichia coli</i> (n=20; v=160)	6	3,8 %
<i>Enterococcus faecium</i> (n=4; v=20)	1	5,0 %
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=1; v=4)	0	0 %
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=4; v=20)	2	10,0 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3; v=24)	1	4,2 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n=1; v=7)	0	0 %
Summe (n=50; v=303)	12	4,0 %

Tabelle 5: Darstellung der aufgetretenen Diskrepanzen aller Erreger in absoluten Werten und Prozent bei Vergleich der RAST-Methodik mit der Plättchendiffusionsmethode nach 24 Stunden.

n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen der jeweiligen Erreger.

Erreger	Antibiotikum	Ergebnisse folgender Methoden:			
		RAST (4h)	RAST (6h)	AST (24h)	Vitek 2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cefoxitin	R	ATU	S	S
	Norfloxacin	NP	R	S	S
<i>Escherichia coli</i>	Piperacillin/ Tazobactam	R	ATU	S	S
		R	NP	S	S
		R	S	S	S
	Ciprofloxacin ¹	ATU	S	R	S
	Tobramycin	S	R	R	R
S		S	R	R	
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ²	Oxacillin	NP	R	S	/
	Norfloxacin	R	R	S	/
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomycin	R	ATU	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Meropenem	R	S	S	S

Tabelle 6: Detaillierte Analyse der aufgetretenen Diskrepanzen zwischen den Messmethoden RAST, Standardplättchendiffusion und Vitek 2.

Verwendete Abkürzungen: RAST (4h/6h): Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing mit dem Ergebnis nach vier oder sechs Stunden; AST (24h): Antimicrobial Susceptibility Testing (entspricht der Standardplättchendiffusionsmethode) nach 24 Stunden; R: Resistent; S: Sensibel; ATU: Area of Technical Uncertainty; NP: Non possible, der Hemmhofdurchmesser ist nicht interpretierbar.

Anmerkungen:

¹ Bei Ciprofloxacin bei *E. coli* war eine Diskrepanz aufgetren, die durch den Vitek 2 nicht bestätigt werden konnte. Hier zeigten die Standardmethodiken unterschiedliche Ergebnisse.

² Die Verifizierung der Ergebnisse durch Vitek 2 war nicht möglich, da die Isolate nicht erneut anzüchtbar gewesen waren.

Tabelle 6 zeigt, dass ein Großteil der festgestellten Diskrepanzen (9; 75,0 %) aufgrund eines falschen Wertes nach vierstündiger Inkubationszeit auftraten. Fünf Ergebnisse nach sechstündiger Inkubation waren mit denen der Standardplättchendiffusionsmethode diskrepant (41,7 %). Bei zwei Testungen (16,7 %) stimmte sowohl das Ergebnis nach vierstündiger als auch das Ergebnis nach sechstündiger Inkubation nicht mit dem Ergebnis der Standardplättchendiffusionsmethode überein. Bei drei Testungen war das Ergebnis nach vierstündiger Inkubation falsch, das Ergebnis nach sechstündiger Inkubation stimmte allerdings mit dem der Standardplättchendiffusionsmethode überein. Neun von zwölf Ergebnissen (75,0 %) der RAST-Methode zeigten fälschlicherweise eine Resistenz des Erregers an. Zwei von zwölf Ergebnissen (16,7 %) zeigten fälschlicherweise eine Sensibilität des Erregers an. Zusätzlich konnten hier die oben angeführte Standardmethoden miteinander verglichen werden, wobei sich ein diskrepantes Ergebnis zeigte. (Vergleiche Tabelle 6)

3.4.1 *Staphylococcus aureus*

Bei den *Staphylococcus aureus* Isolaten konnte in zwei Fällen eine Diskrepanz zwischen der RAST-Methodik und der Plättchendiffusionsmethode nach 24 Stunden festgestellt werden (Vergleiche Tabelle 7). Diese beiden Diskrepanzen entstanden nicht bei demselben Erreger. Die Diskrepanz bei Cefoxitin entstand aufgrund eines falschen Ergebnisses nach vier Stunden, wobei die RAST-Methode fälschlicherweise eine Cefoxitin-Resistenz des Isolats anzeigte. Bei Norfloxacin zeigte die RAST-Methode eine falsche Resistenz des Isolats nach sechs Stunden.

<i>Staphylococcus aureus</i> (n=17; v=68)		Anzahl
Cefoxitin	Keine Diskrepanz	16
	Diskrepanz	1
Norfloxacin	Keine Diskrepanz	16
	Diskrepanz	1
Gentamicin	Keine Diskrepanz	17
	Diskrepanz	0
Clindamycin	Keine Diskrepanz	17
	Diskrepanz	0

Tabelle 7: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Staphylococcus aureus* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika. n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

Der Vergleich der Ergebnisse der beschleunigten Sensibilitätstestung mit jenen des Vitek 2 ergab in dieser Gruppe ebenfalls zwei Diskrepanzen, da die Ergebnisse des Vitek 2 mit denen des 24-Stunden-Antibiogramms übereinstimmten.

3.4.2 *Escherichia coli*

Bei den *Escherichia coli* Isolaten konnten insgesamt sechs Diskrepanzen (3,8 %) festgestellt werden (Vergleiche Tabelle 8). Bei einem der Isolate konnten die Hemmhofdurchmesser nach sechs Stunden nicht abgelesen werden, da sich die Antibiotikaplättchen von der Agarplatte gelöst hatten. Die Messung und Interpretation der Hemmhofdurchmesser nach 24 Stunden war dennoch möglich.

Drei der sechs Diskrepanzen traten bei Piperacillin/Tazobactam auf. In allen drei Fällen konnte nach vierstündiger Bebrütungszeit der Hemmhofdurchmesser als resistent gegenüber Piperacillin/Tazobactam interpretiert werden. Nach sechsstündiger Bebrütungszeit konnte einer der Hemmhofdurchmesser nicht abgelesen werden, einer wurde als ATU eingestuft und wiederum ein anderer als sensibel. Alle drei Isolate waren nach Interpretation der Standardmethoden gegenüber Piperacillin/Tazobactam sensibel. Bei diesen drei Isolaten traten bei anderen antiinfektiven Substanzen keine Diskrepanzen auf.

Bei Ciprofloxacin trat eine Diskrepanz bei einem der Isolate auf: Nach vierstündiger Bebrütungszeit wurde der Hemmhof als ATU interpretiert, nach sechsstündiger als sensibel. Der Vergleich mit der 24-stündigen Bebrütung lieferte eine Diskrepanz, da das Isolat gegenüber Ciprofloxacin resistent gewesen war. Bei diesem Isolat traten bei anderen Substanzen keine Diskrepanzen auf. Der Vitek 2 zeigte allerdings – ebenso wie die RAST-Methodik – eine Sensibilität des Isolats gegenüber Ciprofloxacin an.

Zwei Diskrepanzen traten bei dem Antibiotikum Tobramycin auf. Die RAST-Methodik lieferte bei beiden Isolaten nach vierstündiger Bebrütungszeit zwei als sensibel interpretierbare Hemmhöfe. Nach sechs Stunden galt einer der beiden immer noch als sensibel, der andere als resistent. Bei beiden Isolaten konnte durch die Standardmethoden eine Resistenz der Isolate gegenüber Tobramycin festgestellt werden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Vitek 2, konnten fünf Diskrepanzen festgestellt werden. Diese traten ebenso beim Vergleich der RAST-Methodik mit der Standardplättchendiffusionsmethode auf.

Da bei einer Testung von Ciprofloxacin bei einem der Isolate unterschiedliche Ergebnisse der Standardmethode auftraten, ist die Anzahl der Diskrepanzen beim Vergleich der RAST-Methode mit dem Vitek 2 niedriger als beim Vergleich der RAST-Methode mit der Standardplättchendiffusionsmethode. (Vergleiche Tabelle 6)

<i>Escherichia coli</i> (n=20, v=160)		Anzahl
Piperacillin/Tazobactam	Keine Diskrepanz	17
	Diskrepanz	3
Cefotaxim	Keine Diskrepanz	20
	Diskrepanz	0
Ceftazidim	Keine Diskrepanz	20
	Diskrepanz	0
Meropenem	Keine Diskrepanz	20
	Diskrepanz	0
Ciprofloxacin	Keine Diskrepanz	19
	Diskrepanz	1
Amikacin	Keine Diskrepanz	20
	Diskrepanz	0
Gentamicin	Keine Diskrepanz	20
	Diskrepanz	0
Tobramycin	Keine Diskrepanz	18
	Diskrepanz	2

Tabelle 8: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Escherichia coli* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika. n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

3.4.3 *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis*

Bei den Enterokokken konnte insgesamt eine Diskrepanz (4,2 %) nachgewiesen werden (Vergleiche Tabelle 9 und Tabelle 10). Bei *Enterococcus faecalis* (n=1) trat keine Diskrepanz auf, hingegen trat bei *Enterococcus faecium* (n=4) eine Diskrepanz auf.

Diese Diskrepanz wurde bei Vancomycin festgestellt. Das RAST-Ergebnis nach Interpretation des Hemmhofdurchmessers nach vier Stunden lautete resistent, nach sechs Stunden ATU und nach 24 Stunden sensibel. Das Ergebnis des Vitek 2 konnte die Sensibilität dieses Isolats gegenüber Vancomycin bestätigen und widerlegte – ebenso wie das Ergebnis des Standardplättchendiffusionstest – das Ergebnis der RAST-Methodik.

<i>Enterococcus faecium</i> (n=4, v=20)		Anzahl
Ampicillin	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0
Imipenem	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0
Gentamicin	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0
Vancomycin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	1
Linezolid ¹	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0

Tabelle 9: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Enterococcus faecium* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika..

n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

Anmerkungen:

¹ Bei der Substanz Linezolid wurde keine Vermessung des Hemmhofdurchmesser nach vier Stunden durchgeführt.

<i>Enterococcus faecalis</i> (n=1, v=4)		Anzahl
Ampicillin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Gentamicin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Vancomycin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Linezolid	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0

Tabelle 10: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Enterococcus faecalis* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika.

n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen der jeweiligen Erreger.

Es wurde keine Messung an Imipenem durchgeführt.

3.4.4 *Streptococcus pneumoniae*

Bei den *Streptococcus pneumoniae* Isolaten konnten zwei Diskrepanzen (10,0 %) festgestellt werden (Vergleiche Tabelle 11). Sowohl bei Oxacillin als auch bei Norfloxacin konnte eine Diskrepanz nachgewiesen werden. Diese Diskrepanzen traten nicht bei demselben Isolat auf.

Im Falle von Oxacillin konnte der Hemmhofdurchmesser nach vier Stunden nicht interpretiert werden, nach sechs Stunden konnte das Ergebnis resistent abgelesen werden. Die Plättchendiffusionsmethode lieferte das Ergebnis sensibel. Bei Norfloxacin war der Hemmhof nach vier und sechs Stunden als resistent interpretiert worden, obwohl sich das Isolat gegenüber Norfloxacin nach 24-stündiger Inkubation als sensibel zeigte.

Eine standardisierte Überprüfung der Ergebnisse mittels Vitek 2 war bei dieser Gruppe von Erregern nicht möglich, da die Keime auf den Agarplatten nicht erneut angewachsen sind.

<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n=4, v=20)		Anzahl
Oxacillin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	1
Norfloxacin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	1
Erythromycin	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0
Clindamycin	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0
Trimethoprim/Sulfamethoxazol	Keine Diskrepanz	4
	Diskrepanz	0

Tabelle 11: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Streptococcus pneumoniae* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika. n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

3.4.5 *Klebsiella pneumoniae*

Eine Diskrepanz (4,2 %) konnte bei einem der drei *Klebsiella pneumoniae* Isolaten festgestellt werden (Vergleiche Tabelle 12). Bei einem der *Klebsiella pneumoniae* Isolate lösten sich fünf Antibiotikaplättchen von der Agarplatte, nachdem die erste Messung nach vier Stunden durchgeführt worden war. Die Messung von Meropenem, Ciprofloxacin, Amikacin, Gentamicin und Tobramycin nach sechs Stunden konnte bei diesem Isolat aufgrund dieses Umstands nicht durchgeführt werden. Die Messung und Interpretation der Hemmhofdurchmesser nach 24 Stunden war allerdings möglich. Bei einem anderen Isolat konnte keine standardisierte Sensibilitätstestung mittels Vitek 2 durchgeführt werden, da der Erreger nicht mehr anzüchtbar gewesen war.

Die besagte Diskrepanz trat bei Meropenem auf: Der Hemmhofdurchmesser wurde nach vierstündiger Inkubation als resistent interpretiert. Nach sechs- und 24-stündiger Bebrütung sowie durch die Testung mittels Vitek 2 konnte allerdings das Ergebnis sensibel abgelesen werden.

<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=3, v=24)		Anzahl
Piperacillin/Tazobactam	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Cefotaxim	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Ceftazidim	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Meropenem	Keine Diskrepanz	2
	Diskrepanz	1
Ciprofloxacin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Amikacin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Gentamicin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0
Tobramycin	Keine Diskrepanz	3
	Diskrepanz	0

Tabelle 12: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Klebsiella pneumoniae* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika. n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

3.4.6 *Pseudomonas aeruginosa*

An dem *Pseudomonas aeruginosa* Isolat konnte keine Diskrepanz nachgewiesen werden.

<i>Pseudomonas</i> (n=1, v=7)		Anzahl
Piperacillin/Tazobactam	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Ceftazidim	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Imipenem	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Meropenem	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Ciprofloxacin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Gentamicin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0
Tobramycin	Keine Diskrepanz	1
	Diskrepanz	0

Tabelle 13: Vergleich der Ergebnisse der RAST-Methodik mit denen des Plättchendiffusionstests nach 24 Stunden bei *Pseudomonas aeruginosa* aufgespalten in die einzelnen Antibiotika. n beschreibt die Anzahl der Isolate, v beschreibt die Anzahl der möglichen Diskrepanzen.

Die standardisierte Sensibilitätstestung mittels Vitek 2 bestätigte die Ergebnisse der herkömmlichen Plättchendiffusionsmethode. Somit konnten bei *Pseudomonas auruginosa* keine Diskrepanzen der beschleunigten Sensibilitätstestung im Vergleich mit dem Vitek 2 gezeigt werden.

3.5 Änderung der Therapie und Einleitung weiterer Maßnahmen

Im Zuge dieser Studie wurden 37 Konsile am Patientenbett aufgrund der RAST-Methodik durchgeführt. Bei zwei weiteren an der Studie teilnehmenden Personen wurde die infektiologische Begutachtung erst auf Basis des Antibiogramms nach 24 Stunden durchgeführt. Bei zehn Patientinnen und Patienten wurde unter anderem aus folgenden Gründen keine konsiliarische Begutachtung am Patientenbett durchgeführt:

- Drei Patientinnen und/oder Patienten wurden in einem anderen Krankenhaus stationär aufgenommen.
- Drei Patientinnen und/oder Patienten verstarben, bevor ein Konsil durchgeführt worden war.
- Drei Patientinnen und/oder Patienten wurden aufgrund mangelnder Zeit der Infektologinnen beziehungsweise Infektiologen nicht begutachtet.
- Eine Patientin beziehungsweise ein Patient verließ das Krankenhaus, bevor ein Konsil durchgeführt worden war.

Zwei Konsile wurden telefonisch durchgeführt, wobei eines dieser eine Patientin beziehungsweise einen Patienten in einem anderen Krankenhaus betraf.

Durch die beschleunigte Sensibilitätstestung nach EUCAST wurde bei 17 Patientinnen und Patienten die laufende antiinfektive Therapie geändert (Vergleiche Tabelle 14). Dabei kam es bei sieben Patientinnen und Patienten zu einer Intensivierung der Therapie und bei zehn Patientinnen und Patienten konnte eine Deeskalation der antibiotischen Therapie durchgeführt werden.

Bei 15 Patientinnen und Patienten wurde nach persönlicher Begutachtung aufgrund der RAST-Methode keine Änderung der Therapie eingeleitet. Unter Berücksichtigung der telefonischen Konsile stieg die Gesamtzahl der Patientinnen und Patienten, bei denen die Therapie nicht geändert worden war, auf 16 an. Bei zwei persönlichen und einem telefonischen Konsil konnten aufgrund mangelnder Dokumentation keine Aussagen über die Therapieänderung getroffen werden.

		Häufigkeit	Häufigkeit in Prozent	Relative Häufigkeit in Untergruppe mit Konsil
Konsiliarische Begutachtung aufgrund von RAST (unter Berücksichtigung der telefonischen Konsile)	Keine Änderung der laufenden Antibiose	16	35,6	44,4
	Änderung der laufenden Antibiose	17	37,8	47,2
	Einleitung einer Antibiose	3	6,7	8,3
	<i>Gesamt</i>	36	80,0	100
Keine konsiliarische Begutachtung aufgrund von RAST	<i>Gesamt</i>	9	20,0	100
Gesamt		45	100	

Tabelle 14: Häufigkeitsdarstellung der Therapieänderung unter Berücksichtigung der telefonischen Konsile. Die Gesamtheit der Patientinnen und Patienten beträgt in dieser Tabelle nur 45, da fünf Konsile nicht miteinbezogen werden konnten. Zwei Konsile fanden erst nach vierundzwanzigstündiger Inkubation (AST) statt und bei drei weiteren wurde die Therapieempfehlung nicht ausreichend schriftlich dokumentiert.

Außerdem wurden durch die persönliche Begutachtung durch ein Mitglied des Teams der Infektiologie und durch das Ergebnis des Antibiogramms nach vier und sechs Stunden in 14 Fällen weitere Maßnahmen eingeleitet. Zu diesen zählten unter anderem die Anordnung einer Nachtestung des Isolats aufgrund einer bereits nachgewiesenen hohen Anzahl an Resistenzen auf andere antiinfektive Substanzen, die Anordnung von bildgebenden Verfahren, die Anordnung zur Entfernung beziehungsweise zum Wechsel von intravaskulären Kathetern und die Anordnung zur Testung auf eine katheterassoziierte Infektion. Bei 20 Patientinnen und Patienten wurden keine weiteren Maßnahmen eingeleitet.

4 Diskussion

4.1 Aussage und Bedeutung

Die klinische Bedeutung einer beschleunigten Sensibilitätstestung – vor allem in Bezug auf eine ehestmögliche adäquate antiinfektive Therapie und einer damit verbundenen Verbesserung der Überlebensrate – wurde bereits erläutert. (7,54) Umso wichtiger sind daher Verfahren in der beschleunigten Sensibilitätstestung, die zuverlässig korrekte Ergebnisse liefern. Die meisten der neuen Verfahren zur beschleunigten Sensibilitätstestung basieren nicht auf phänotypischen Methoden sondern auf genetischen. Aufgrund potentieller Fehlerquellen wie beispielsweise der Entwicklung von neuen Resistenzgenen und möglichen Diskrepanzen zwischen genetischer und phänotypischer Resistenz sind letztere kaum als zuverlässig zu werten. (132) Weiters eignen sie sich aus bereits angeführten Gründen nicht als Methoden zur Standarddiagnostik. Verfahren, die hingegen auf phänotypischen Methoden beruhen, haben im Bereich der Sensibilitätstestung eine sehr hohe Aussagekraft, benötigen aber in der Regel mehr Zeit als solche, die auf molekularen Methoden basieren. Dennoch gilt die Plättchendiffusionsmethode nach wie vor als diagnostischer Goldstandard in der Mikrobiologie. (16)

Aufgrund des starken Bedarfs nach einer schnelleren Testung von Sensibilitäten und nicht von Resistenzen, welche man bei molekularen Verfahren erhält, bestehen Bestrebungen phänotypische Methoden weiterzuentwickeln. Dieser Gedanke dürfte auch der Ursprung der RAST-Methode der EUCAST gewesen sein. Mithilfe dieser Methode kann eine erhebliche Reduktion der Dauer mikrobiologischer Diagnostik erreicht werden. Allerdings sollte berücksichtigt werden, dass die Aussagekraft der RAST-Methode bei manchen Erregern beziehungsweise antiinfektiven Substanzen relativ gering ist. Dies betrifft vor allem die vierstündige Bebrütungsdauer, nach der in dieser Studie 50,0 % der Ergebnisse nicht verwertbar waren und neun der zwölf nachgewiesenen Diskrepanzen auftraten. Bei manchen Erregergruppen, wie zum Beispiel *Streptococcus pneumoniae* wurden sogar 80,0 % der Ergebnisse nach vier Stunden als nicht verwertbar eingestuft. Nur die *Klebsiella pneumoniae* Isolate erreichten nach vier Stunden Ergebnisse mit mehr Aussagekraft (83,3 % der Ergebnisse verwertbar).

Insgesamt trat das Ergebnis ATU seltener auf als ein nicht interpretierbarer Hemmhofdurchmesser. Nach vierstündiger Bebrütung waren in dieser Studie 146 Messwerte (50,0 %) nicht verwertbar, davon waren 53 ATU (18,2 %) und 93 nicht interpretierbar (31,9 %). Durch eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf sechs Stunden konnte eine Reduktion der nicht verwertbaren Ergebnisse auf 61 (21,0 %) erzielt werden. Diese Reduktion ist vor allem einer besseren Ablesbarkeit des Hemmhofdurchmessers geschuldet: Durch die längere Inkubationszeit konnten wir das Ergebnis des nicht interpretierbaren Hemmhofdurchmessers von 93 (31,9 %) auf 31 (10,7 %) senken. Ähnlich, aber nicht so deutlich, verhielt es sich mit dem Ergebnis ATU. Aufgrund dieser Daten liegt die Vermutung nahe, dass eine Verlängerung der Bebrütungszeit auf acht Stunden ebenfalls zu einer Steigerung der Aussagekraft dieser Methode führt. Wie groß das Ausmaß der Steigerung der Aussagekraft allerdings ist, muss erst in weiteren Studien gezeigt werden. Aufgrund der mangelnder personeller Infrastruktur im Labor sowie bei den Infektiologinnen und Infektiologen haben wir uns gegen eine Untersuchung der achtstündigen Bebrütungszeit entschieden.

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse konnten wir in dieser Studie bei 207 von 582 Messungen (35,6 %) kein verwertbares Ergebnis erzielen. Dies ist vor allem auf das schlechte Ergebnis nach vier Stunden zurückzuführen. Trotz einer relativ geringen Zahl an diskrepanten Ergebnissen (im Vergleich zur Standardplättchendiffusionsmethode: 12 (4,0 %), im Vergleich zum Vitek 2: 9 (3,0 %)) darf die hohe Zahl an nicht verwertbaren Ergebnissen nicht vernachlässigt werden. Außerdem sollte bei Betrachtung der Diskrepanzen zwischen der RAST-Methode und dem Vitek 2 berücksichtigt werden, dass zwei Diskrepanzen womöglich auf eine nicht-durchführbare Züchtung der *Streptococcus pneumoniae* Isolate zurückzuführen sind.

Aufgrund der größeren Anzahl an *Staphylococcus aureus* (n=17) und *Escherichia coli* (n=20) Isolaten werden diese nachstehend gesondert diskutiert.

4.1.1 Staphylococcus aureus

Bei den 17 *Staphylococcus aureus* Isolaten waren nach vierstündiger Bebrütungszeit 47,1 % der Ergebnisse nicht verwertbar, nach sechs Stunden sank dieser Wert auf 32,4 %. Beim Vergleich der RAST-Ergebnisse mit jenen der Plättchendiffusionsmethode nach 24 Stunden traten zwei Diskrepanzen (2,9 %) auf.

Bei den Staphylokokken waren die Ergebnisse der antiinfektiven Substanz Gentamicin am besten verwertbar, da sowohl nach vier als auch sechs Stunden kaum nicht verwertbare Ergebnisse aufgetreten und keine Diskrepanzen nachweisbar gewesen waren (Vergleiche Tabelle 3 und Tabelle 7). Hingegen waren in dieser Studie nach vierstündiger Inkubation 29,4 % der Ergebnisse bei Cefoxitin nicht verwertbar, da der Hemmhofdurchmesser entweder als ATU interpretiert wurde oder nicht eindeutig interpretierbar war. Durch zwei-stündige Verlängerung der Inkubationszeit konnte keine wesentliche Reduktion der nicht verwertbaren Ergebnisse (23,5 %) erreicht werden. Zusätzlich trat bei Cefoxitin eine Diskrepanz auf. Diese vergleichbar schlechten Ergebnisse sind von großer Bedeutung, da Penicilline die Therapie der Wahl bei Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA) darstellen. Zeigt die RAST-Methode fälschlicherweise eine Resistenz des Erregers gegenüber Cefoxitin an, behandelt man demnach fälschlicherweise einen MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) mit allen entsprechenden Folgen wie zum Beispiel erhöhte Nebenwirkungsrate. Darüber hinaus ist die Verabreichung von Nicht- β -Laktam-Antibiotika bei einer Blutstrominfektion mit *Staphylococcus aureus* mit einem schlechteren Outcome assoziiert.(177-179)

Bei Clindamycin konnten wir mit einer Verlängerung der Inkubationszeit eine Steigerung der nicht verwertbaren Ergebnisse von 76,5 % auf 88,2 % feststellen: Dies trat sowohl bei dem Ergebnis ATU (4h: 29,4 %, 6h: 35,3 %) als auch bei dem Ergebnis nicht interpretierbar (4h: 47,1 %, 6h: 53,0 %) auf. (Vergleiche Tabelle 3) Dies ist atypisch, da durch die längere Inkubation mit den anderen antiinfektiven Substanzen bei den Staphylokokken eine Steigerung der Aussagekraft erzeugt werden konnte. Clindamycin war im Rahmen dieser Studie auch an Pneumokokken getestet worden, wo sich diese Dynamik nicht abzeichnete: Reduktion der nicht verwertbaren Ergebnisse von 75,0 % nach vierstündiger Inkubation auf 50,0 % nach sechsstündiger Inkubation. Demzufolge sollten die Hemmhofdurchmesser für Clindamycin bei *Staphylococcus aureus* nocheinmal überarbeitet werden. Diese Feststellung sollte allerdings hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit durch Studien mit größerer Anzahl an Erregern überprüft werden.

4.1.2 *Escherichia coli*

Insgesamt trat bei den *Escherichia coli* Isolaten ebenfalls eine hohe Zahl an nicht verwertbaren Ergebnissen (30,4 %) auf, allerdings ist dies vor allem auf die hohe Anzahl an nicht verwertbarer Ergebnisse nach vierstündiger Inkubation (50,0 %) zurückzuführen. Durch Verlängerung der Bebrütungszeit um zwei Stunden konnte diese Zahl um über 40 Prozentpunkte gesenkt werden. Somit konnten nach sechsstündiger Bebrütungszeit von *Escherichia coli* Isolaten bereits sehr gute Aussagen über ihr Resistenzverhalten getroffen werden. Unter Berücksichtigung der relativ geringen Wahrscheinlichkeit von diskrepanten Ergebnissen bei *Escherichia coli* – in dieser Studie 3,8 % – ermöglicht die RAST-Methode eine rasche und akkurate Detektion von Sensibilitäten von *Escherichia coli* nach sechsstündiger Bebrütungszeit. Aufgrund dieser Ergebnisse kann die RAST-Methode für *E. coli* Isolate mit sechsstündiger Inkubationszeit eindeutig empfohlen werden.

Mangelhafte Ergebnisse konnten wir allerdings bei Piperacillin/Tazobactam feststellen: Gesamt traten 24 nicht verwertbare Ergebnisse (61,5 %) auf. Trotz einer deutlichen Reduktion von 80,0 % auf 42,1 % durch Verlängerung der Bebrütung besitzt diese Methode bei dieser Substanz eine schlechte Aussagekraft. Vor allem unter Berücksichtigung, dass 50,0 % der Diskrepanzen von *Escherichia coli* bei Piperacillin/Tazobactam auftraten (Vergleiche Tabelle 4 und Tabelle 8).

Auffallend gute Ergebnisse lieferten Cefotaxim, Meropenem und Amikacin, denn deren Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen nach sechs Stunden lag jeweils bei null. In Anbetracht dessen, dass bei keiner dieser Substanzen Diskrepanzen zwischen der RAST-Methode und den Standardmethoden aufgetreten sind, sind diese Substanzen als Musterbeispiele für die RAST-Methode aufzufassen. Trotz der guten Ergebnisse dieser Substanzen nach sechsstündiger Inkubationszeit entsprachen die Ergebnisse nach vierstündiger Bebrütung denen des Durchschnitts (Cefotaxim: 45,0 %; Meropenem: 50,0 %; Amikacin: 45,0 %). Demnach sollte die Aussagekraft des Antibiogramms nach vier Stunden bei allen Substanzen kritisch hinterfragt werden. Diese Aussage kann durch Betrachtung der Ergebnisse von Gentamicin untermauert werden: Bei dieser Substanz konnte die geringste Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen nach vierstündiger Bebrütungszeit erzielt werden, dennoch lag diese bei 30,0 %.

Leider inkludiert die RAST-Methode nicht die Testung des Antiinfektivums Amoxicillin/Clavulansäure. Dies ist eine sehr wichtige Substanz in der Therapie von Infektionen mit *Escherichia coli*, insbesondere bei der Therapie von *Escherichia coli*-Bakteriämien mit unklarem Fokus. Darüber hinaus kann das Resistenzverhalten gegenüber Amoxicillin/Clavulansäure auch nicht von den getesteten Antibiotika abgeleitet werden.

4.1.3 Einfluss des RAST auf die antimikrobielle Therapie

Im Zuge von 37 konsiliarischen Begutachtungen am Patientenbett und zwei weiteren telefonischen Konsilen, wurde bei 17 Patientinnen und Patienten die antiinfektive Therapie verändert. Bei sieben der betroffenen Patientinnen und Patienten wurde die Therapie intensiviert. Hingegen konnte bei den verbleibenden zehn Patientinnen und Patienten eine Deeskalation der antimikrobiellen Therapie durchgeführt werden. Bei drei weiteren wurde aufgrund der Information der RAST-Methode eine antiinfektive Therapie eingeleitet. (Vergleiche Tabelle 14) Diese Daten zeigen eine eindeutige klinische Relevanz des Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing nach EUCAST. Die antiinfektive Therapie von 17 Patientinnen und Patienten konnte aufgrund der Ergebnisse des Antibiogramms früher optimiert werden.

Da zu einem früheren Zeitpunkt Aussagen über das Resistenzverhalten der nachgewiesenen Erreger hatten gemacht werden können, konnten im Zuge dieser Studie bei 14 Patientinnen und Patienten weitere diagnostische Schritte eingeleitet werden. Dazu zählten beispielsweise die Nachtestung von antiinfektiven Substanzen bei einer hohen Anzahl an Resistenzen im RAST.

Bei 16 weiteren Patientinnen und Patienten war die antiinfektive Therapie nicht verändert worden, was uns eine entsprechende Effektivität der empirisch eingeleiteten Therapie anzeigte. Somit dient die RAST-Methode nicht nur zur schnelleren Änderung der eingeleiteten antibiotischen Therapie sondern auch zur Bestätigung der Effektivität einer derartigen Therapie. Wie bereits oben erwähnt, ist die Einleitung einer adäquaten Antibiose eine der wichtigsten Schritte in der Behandlung von Sepsis. (7) Kumar et al. konnten zeigen, dass eine verzögerte Applikation einer antibiotischen Therapie die Mortalität jede Stunde um 7,6 % bei Patienten mit Hypotonie im septischen Schock erhöht. (54) Ob das RAST somit auch die Mortalität senken kann, ist zwar von größtem wissenschaftlichen Interesse, aber nicht Gegenstand dieser Studie.

Die Durchführung weiterer Studien, die diesen speziellen Aspekt berücksichtigen, ist zu empfehlen. Auch die Verminderung der Resistenzbildung, die im Zuge einer überschießenden antiinfektiven Therapie entstehen kann, sowie die Reduktion von Nebenwirkungen von überschießenden Therapieregimen sind wesentliche Vorteile der schnelleren Ergebnisse durch RAST. (16)

4.2 Limitationen

Aufgrund der geringen Anzahl an getesteten Erregern sinkt die Aussagekraft dieser Studie. Dies betrifft vor allem die Erregergruppen Enterokokken (5; 10 %), Pneumokokken (4; 8 %), Klebsiellen (3; 6 %) und *Pseudomonas aeruginosa* (1; 2 %). Von den getesteten 50 Erregern waren 20 *Escherichia coli* (40 %) und 17 *Staphylococcus aureus* Isolate (34 %) (Vergleiche Abbildung 13). Bei diesen beiden sollte durch die vergleichsweise hohe Anzahl an Isolaten eine gute Aussagekraft gewährleistet sein. Dennoch sollten die Ergebnisse dieser Studie durch Studien mit einer höheren Anzahl an Erregern überprüft werden. Die Durchführung weiterer Studien ist insbesondere bei den oben genannten Erregergruppen mit geringer getesteter Anzahl an Erregern von großem Interesse, weil durch die geringe Anzahl keine validen Aussagen zur RAST-Methode geliefert werden konnten.

Ein weiterer Schwachpunkt dieser Studie ist, dass die Ergebnisse der *Streptococcus pneumoniae* Isolate nie durch den Vitek 2 überprüft werden konnten, da die Erreger nicht erneut anzüchtbar gewesen waren. Dasselbe Problem trat auch bei einem der drei *Klebsiella pneumoniae* Isolate auf.

Der häufigere Grund für ein nicht verwertbares Ergebnis war ein nicht interpretierbarer Hemmhofdurchmesser: Gesamt traten 207 nicht verwertbare Ergebnisse (35,6 %) auf. Davon waren 124 Ergebnisse (21,3 %) nicht interpretierbar gewesen und 83 Mal entsprach der Hemmhofdurchmesser (14,3 %) der Area of Technical Uncertainty (Vergleiche Tabelle 2). Der Bereich, in dem ein Hemmhofdurchmesser keine eindeutige Aussagekraft hat, ist ein Bereich, den die EUCAST geschaffen hat, um die Fehlerquote zu senken. (112) Aus diesen Gründen kann die Anzahl des Ergebnisses ATU nur schwer vermindert werden. Hingegen könnte man womöglich durch Implementation neuer Gerätschaften beziehungsweise durch Einsatz vollautomatisierter Systeme die Anzahl des Ergebnisses nicht interpretierbar senken.

Dennoch sind die Bedingungen für einen eindeutig ablesbaren Hemmhofdurchmesser ebenso von der EUCAST vorgegeben. Das Potential dieser Überlegung muss durch weitere Studien überprüft werden.

Aufgrund der erhobenen Daten kann eine Implementation der RAST-Methode eindeutig empfohlen werden, da durch sie die antiinfektive Therapie von Patientinnen und Patienten mit einer Bakteriämie optimiert werden kann. Durch die RAST-Methode konnte in dieser Studie bei 17 Patientinnen und Patienten (37,8 %) die antiinfektive Therapie optimiert werden. Ob diese Methode die Mortalität der Betroffenen senken kann ist anzunehmen, muss allerdings erst durch weitere Studien bewiesen werden. Diese Studie zeigt außerdem, dass zwar eine hohe Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen auftrat (35,6 %), aber ebenso, dass die RAST-Methode nur mit einer geringen Wahrscheinlichkeit falsche Ergebnisse liefert (4,0 %). Somit können Ergebnisse der RAST-Methode mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit als korrekt angenommen werden. Die hohe Anzahl der nicht verwertbaren Ergebnisse könnte eventuell im Zuge des Implementationsprozesses entstanden sein. Größere Studien werden vielleicht ebenso initial eine höhere Anzahl an nicht verwertbaren Ergebnissen erzielen und im weiteren Verlauf ein vermindertes Auftreten nicht verwertbarer Ergebnisse feststellen.

5 Literaturverzeichnis

- (1) Pschyrembel Redaktion. Bakteriämie. Pschyremble Online; 04.2016.
- (2) Smith DA, Nehring SM. Bacteremia. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2018.
- (3) Majno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). J Infect Dis 1991 May;163(5):937-945.
- (4) Bullock B, Benham MD. Bacterial Sepsis. StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC; 2018.
- (5) Angus DC, van der Poll T. Severe sepsis and septic shock. N Engl J Med 2013 Nov 21;369(21):2063.
- (6) Churpek MM, Zdravcevic FJ, Winslow C, Howell MD, Edelson DP. Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. Am J Respir Crit Care Med 2015 Oct 15;192(8):958-964.
- (7) Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA 2016 02/23;315(8):801-810.
- (8) Improving the prevention, diagnosis and clinical management of sepsis. 2017; Available at: <https://www.global-sepsis-alliance.org/news/2017/5/26/wha-adopts-resolution-on-sepsis>. Accessed 03/07, 2019.
- (9) Reinhart K. Misdiagnosed 'Sepsis' Now a Global Health Priority for World Health Organization. 2017; Available at: <https://static1.squarespace.com/static/58a7025b8419c215b30b2df3/t/5927fdc21b10e36e86ff0901/1495793093068/WHA+Adopts+Resolution+on+Sepsis.pdf>. Accessed 03/07, 2019.
- (10) Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest 1992 Jun;101(6):1644-1655.

- (11) Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in older Americans. *J Am Geriatr Soc* 2012 Jun;60(6):1070-1077.
- (12) Gaieski DF, Edwards JM, Kallan MJ, Carr BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. *Crit Care Med* 2013 May;41(5):1167-1174.
- (13) Herold G. Sepsis. In: Herold G., editor. *Herold Innere Medizin Online*. 2019th ed.; 2019.
- (14) Antonio M, Gudiol C, Royo-Cebrecos C, Grillo S, Ardanuy C, Carratala J. Current etiology, clinical features and outcomes of bacteremia in older patients with solid tumors. *J Geriatr Oncol* 2019 Mar;10(2):246-251.
- (15) Munro APS, Blyth CC, Campbell AJ, Bowen AC. Infection characteristics and treatment of *Staphylococcus aureus* bacteraemia at a tertiary children's hospital. *BMC Infect Dis* 2018 Aug 10;18(1):387-018-3312-5.
- (16) Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect* 2015 Apr;21(4):313-322.
- (17) Krause R, Zollner-Scwetz I, Valentin T, Prattes J, Wunsch S, Strempl C, et al. Resistenzbericht 2018. 2019.
- (18) Forner L, Larsen T, Kilian M, Holmstrup P. Incidence of bacteremia after chewing, tooth brushing and scaling in individuals with periodontal inflammation. *J Clin Periodontol* 2006 Jun;33(6):401-407.
- (19) Maharaj B, Coovadia Y, Vayej AC. An investigation of the frequency of bacteraemia following dental extraction, tooth brushing and chewing. *Cardiovasc J Afr* 2012 Jul;23(6):340-344.
- (20) Kendrick SFW, Jones DEJ. Mechanisms of Innate Immunity in Sepsis. In: Baudoin SV., editor. *Sepsis*: Springer Verlag; 2008. p. 5-10.
- (21) Minasyan H. Sepsis: mechanisms of bacterial injury to the patient. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2019 Feb 14;27(1):19.

- (22) Hoebe K, Janssen E, Beutler B. The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2004 Oct;5(10):971-974.
- (23) MACKANESS GB. The Immunological Basis of Acquired Cellular Resistance. *J Exp Med* 1964 Jul 1;120:105-120.
- (24) Minasyan H. Phagocytosis and oxycytosis: two arms of human innate immunity. *Immunol Res* 2018 Apr;66(2):271-280.
- (25) Minasyan H. Mechanisms and pathways for the clearance of bacteria from blood circulation in health and disease. *Pathophysiology* 2016 Jun;23(2):61-66.
- (26) Minasyan HA. Erythrocyte and leukocyte: two partners in bacteria killing. *Int Rev Immunol* 2014 Nov-Dec;33(6):490-497.
- (27) Minasyan H. Sepsis and septic shock: Pathogenesis and treatment perspectives. *J Crit Care* 2017 Aug;40:229-242.
- (28) Ryan GB, Majno G. Acute inflammation. A review. *Am J Pathol* 1977 Jan;86(1):183-276.
- (29) Quinn GA, Maloy AP, Banat MM, Banat IM. A comparison of effects of broad-spectrum antibiotics and biosurfactants on established bacterial biofilms. *Curr Microbiol* 2013 Nov;67(5):614-623.
- (30) Dalla Serra M, Coraiola M, Viero G, Comai M, Potrich C, Ferreras M, et al. Staphylococcus aureus bicomponent gamma-hemolysins, HlgA, HlgB, and HlgC, can form mixed pores containing all components. *J Chem Inf Model* 2005 Nov-Dec;45(6):1539-1545.
- (31) Chalmeau J, Monina N, Shin J, Vieu C, Noireaux V. alpha-Hemolysin pore formation into a supported phospholipid bilayer using cell-free expression. *Biochim Biophys Acta* 2011 Jan;1808(1):271-278.
- (32) Ophir T, Gutnick DL. A role for exopolysaccharides in the protection of microorganisms from desiccation. *Appl Environ Microbiol* 1994 Feb;60(2):740-745.

- (33) Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompарт CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* 2004 Dec;72(12):7107-7114.
- (34) Van Houdt R, Michiels CW. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Res Microbiol* 2005 Jun-Jul;156(5-6):626-633.
- (35) Smith HE, Damman M, van der Velde J, Wagenaar F, Wisselink HJ, Stockhofe-Zurwieden N, et al. Identification and characterization of the *cps* locus of *Streptococcus suis* serotype 2: the capsule protects against phagocytosis and is an important virulence factor. *Infect Immun* 1999 Apr;67(4):1750-1756.
- (36) Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev* 2005 Jul 29;57(10):1486-1513.
- (37) Cho S., Law J., Ng CK. Effect of Growth at Sub-lethal Concentrations of Kanamycin on the Cell Membrane Integrity and Amount of Capsular Glucuronic Acid in Wild-type *Escherichia coli* and Strain with a *cpsB* Mutation. *Journal of Experimental Microbiology and Immunology* 2009;13:29-35.
- (38) Fischer E, Braun V. Permeability barrier of bacterial cell envelopes as cause of resistance to antibiotics (author's transl). *Immun Infekt* 1981;9(3):78-87.
- (39) Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. *Allgemeine Bakteriologie. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 12th ed.: Thieme; 2010. p. 162-243.
- (40) Hernandez-Jimenez E, Del Campo R, Toledano V, Vallejo-Cremades MT, Munoz A, Largo C, et al. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: which do human macrophages prefer? *Biochem Biophys Res Commun* 2013 Nov 29;441(4):947-952.
- (41) Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 1999 May;11(3-4):217-21; discussion 237-9.
- (42) Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 2010 Apr;35(4):322-332.

- (43) Murga R, Miller JM, Donlan RM. Biofilm formation by gram-negative bacteria on central venous catheter connectors: effect of conditioning films in a laboratory model. *J Clin Microbiol* 2001 Jun;39(6):2294-2297.
- (44) Stoodley P, Wilson S, Hall-Stoodley L, Boyle JD, Lappin-Scott HM, Costerton JW. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Appl Environ Microbiol* 2001 Dec;67(12):5608-5613.
- (45) Allan EJ, Hoischen C, Gumpert J. Bacterial L-forms. *Adv Appl Microbiol* 2009;68:1-39.
- (46) Devine KM. Bacterial L-forms on tap: an improved methodology to generate *Bacillus subtilis* L-forms heralds a new era of research. *Mol Microbiol* 2012 Jan;83(1):10-13.
- (47) Mercier R, Kawai Y, Errington J. General principles for the formation and proliferation of a wall-free (L-form) state in bacteria. *Elife* 2014 Oct 30;3:10.7554/eLife.04629.
- (48) Michailova L, Kussovsky V, Radoucheva T, Jordanova M, Markova N. Persistence of *Staphylococcus aureus* L-form during experimental lung infection in rats. *FEMS Microbiol Lett* 2007 Mar;268(1):88-97.
- (49) Markova N, Slavchev G, Michailova L. Presence of mycobacterial L-forms in human blood: Challenge of BCG vaccination. *Hum Vaccin Immunother* 2015;11(5):1192-1200.
- (50) Nguyen HB, Rivers EP, Knoblich BP, Jacobsen G, Muzzin A, Ressler JA, et al. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004 Aug;32(8):1637-1642.
- (51) Okorie ON, Dellinger P. Lactate: biomarker and potential therapeutic target. *Crit Care Clin* 2011 Apr;27(2):299-326.
- (52) Rivers EP, Katranji M, Jaehne KA, Brown S, Abou Dagher G, Cannon C, et al. Early interventions in severe sepsis and septic shock: a review of the evidence one decade later. *Minerva Anestesiol* 2012 Jun;78(6):712-724.
- (53) Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit Care Med* 2017 Mar;45(3):486-552.

- (54) Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006 Jun;34(6):1589-1596.
- (55) Zhang D, Micek ST, Kollef MH. Time to Appropriate Antibiotic Therapy Is an Independent Determinant of Postinfection ICU and Hospital Lengths of Stay in Patients With Sepsis. *Crit Care Med* 2015 Oct;43(10):2133-2140.
- (56) Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med* 2014 Aug;42(8):1749-1755.
- (57) Paul M, Shani V, Muchtar E, Kariv G, Robenshtok E, Leibovici L. Systematic review and meta-analysis of the efficacy of appropriate empiric antibiotic therapy for sepsis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010 Nov;54(11):4851-4863.
- (58) Ramachandran G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence* 2014 Jan 1;5(1):213-218.
- (59) Brown KN, Percival A. Penetration of antimicrobials into tissue culture cells and leucocytes. *Scand J Infect Dis Suppl* 1978;(14)(14):251-260.
- (60) Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987;38:417-432.
- (61) Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev* 1993 Jan;6(1):57-68.
- (62) Lubran MM. Bacterial toxins. *Ann Clin Lab Sci* 1988 Jan-Feb;18(1):58-71.
- (63) McDermott C, Sheridan M. Staphylococcal toxic shock syndrome caused by tampon use. *Case reports in critical care* 2015;2015:640373; 640373-640373.
- (64) Thomas D, Withington PS. Toxic shock syndrome: a review of the literature. *Ann R Coll Surg Engl* 1985 05;67(3):156-158.

- (65) Lappin E, Ferguson AJ. Gram-positive toxic shock syndromes. *Lancet Infect Dis* 2009 May;9(5):281-290.
- (66) Butler T. The Jarisch-Herxheimer Reaction After Antibiotic Treatment of Spirochetal Infections: A Review of Recent Cases and Our Understanding of Pathogenesis. *Am J Trop Med Hyg* 2017 Jan 11;96(1):46-52.
- (67) Negussie Y, Remick DG, DeForge LE, Kunkel SL, Eynon A, Griffin GE. Detection of plasma tumor necrosis factor, interleukins 6, and 8 during the Jarisch-Herxheimer Reaction of relapsing fever. *J Exp Med* 1992 May 1;175(5):1207-1212.
- (68) Butler T, Hazen P, Wallace CK, Awoke S, Habte-Michael A. Infection with *Borrelia recurrentis*: pathogenesis of fever and petechiae. *J Infect Dis* 1979 Nov;140(5):665-675.
- (69) Vincent JL, Brealey D, Libert N, Abidi NE, O'Dwyer M, Zacharowski K, et al. Rapid Diagnosis of Infection in the Critically Ill, a Multicenter Study of Molecular Detection in Bloodstream Infections, Pneumonia, and Sterile Site Infections. *Crit Care Med* 2015 Nov;43(11):2283-2291.
- (70) Makristathis A, Riss S, Hirschl AM. A novel fluorescence in situ hybridization test for rapid pathogen identification in positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect* 2014 Oct;20(10):O760-3.
- (71) Tissari P, Zumla A, Tarkka E, Mero S, Savolainen L, Vaara M, et al. Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study. *Lancet* 2010 Jan 16;375(9710):224-230.
- (72) Peker N, Couto N, Sinha B, Rossen JW. Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches. *Clin Microbiol Infect* 2018 Sep;24(9):944-955.
- (73) Gonsalves WI, Cornish N, Moore M, Chen A, Varman M. Effects of Volume and Site of Blood Draw on Blood Culture Results. *J Clin Microbiol* 2009 11/01;47(11):3482.
- (74) Valentin T., Zollner-Schwetz I., Hönigl M., Krause R., Strempl C., Neuhold B., Valentin A. Empfehlung für die Abnahme von Blutkulturen. 2015.

- (75) Binkhamis K, Forward K. Effect of the Initial Specimen Diversion Technique on Blood Culture Contamination Rates. *J Clin Microbiol* 2014 03/01;52(3):980.
- (76) Patton RG, Schmitt T. Innovation for Reducing Blood Culture Contamination: Initial Specimen Diversion Technique. *J Clin Microbiol* 2010 12/01;48(12):4501.
- (77) Liunbruno GM, Castalano L, Piccinini V, Pupella S, Grazzini G. Reduction of the risk of bacterial contamination of blood components through diversion of the first part of the donation of blood and blood component. *Blood Transfus* 2009;7:86-93.
- (78) Hall KK, Lyman JA. Updated Review of Blood Culture Contamination. *Clin Microbiol Rev* 2006 10/01;19(4):788.
- (79) Kassis C, Rangaraj G, Jiang Y, Hachem RY, Raad I. Differentiating Culture Samples Representing Coagulase-Negative Staphylococcal Bacteremia from Those Representing Contamination by Use of Time-to-Positivity and Quantitative Blood Culture Methods. *J Clin Microbiol* 2009 10/01;47(10):3255.
- (80) Lamy B, Roy P, Carret G, Flandrois JP, Delignette-Muller ML. What is the relevance of obtaining multiple blood samples for culture? A comprehensive model to optimize the strategy for diagnosing bacteremia. *Clin Infect Dis* 2002 Oct 1;35(7):842-850.
- (81) Altindis M, Koroglu M, Demiray T, Dal T, Ozdemir M, Sengil AZ, et al. A Multicenter Evaluation of Blood Culture Practices, Contamination Rates, and the Distribution of Causative Bacteria. *Jundishapur J Microbiol* 2016 Jan 2;9(1):e29766.
- (82) Levin PD, Hersch M, Rudensky B, Yinnon AM. The use of the arterial line as a source for blood cultures. *Intensive Care Med* 2000 Sep;26(9):1350-1354.
- (83) Menchinelli G, Liotti FM, Fiori B, De Angelis G, D'Inzeo T, Giordano L, et al. In vitro Evaluation of BACT/ALERT(R) VIRTUO(R), BACT/ALERT 3D(R), and BACTEC FX Automated Blood Culture Systems for Detection of Microbial Pathogens Using Simulated Human Blood Samples. *Front Microbiol* 2019 Feb 19;10:221.
- (84) O'Toole GA. Classic Spotlight: How the Gram Stain Works. *J Bacteriol* 2016 Nov 4;198(23):3128-16. Print 2016 Dec 1.

- (85) Suerbaum S, Hahn H, Buchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF. Methoden der mikrobiologischen Diagnostik. In: Suerbaum S, Hahn H, Buchard GD, Kaufmann SHE, Schulz TF, editors. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 7th ed. Hannover, Berlin und Hamburg: Springer; 2012. p. 129-147.
- (86) Kayser FH, Böttger EC, Zinkernagel RM, Haller O, Eckert J, Deplazes P. *Allgemeine Aspekte der medizinischen Mikrobiologie*. Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie. 12th ed.: Thieme; 2010. p. 2-43.
- (87) Paolucci M, Landini MP, Sambri V. Conventional and molecular techniques for the early diagnosis of bacteraemia. *Int J Antimicrob Agents* 2010 12/01;36:S6-S16.
- (88) Patel N, Miller D, Relhan N, Flynn, Harry W., Jr. Peptide Nucleic Acid-Fluorescence In Situ Hybridization for Detection of Staphylococci From Endophthalmitis Isolates: A Proof-of-Concept Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017 08;58(10):4307-4309.
- (89) Florio W, Morici P, Ghelardi E, Barnini S, Lupetti A. Recent advances in the microbiological diagnosis of bloodstream infections. *Crit Rev Microbiol* 2018 May;44(3):351-370.
- (90) Deck MK, Anderson ES, Buckner RJ, Colasante G, Coull JM, Crystal B, et al. Multi-center evaluation of the Staphylococcus QuickFISH method for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci directly from blood culture bottles in less than 30 minutes. *J Clin Microbiol* 2012 Jun;50(6):1994-1998.
- (91) Martinez RM, Bauerle ER, Fang FC, Butler-Wu SM. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 2014 Jul;52(7):2521-2529.
- (92) Anhalt JP, Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry. *Anal Chem* 1975 02/01;47(2):219-225.
- (93) Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem* 1988 10/15;60(20):2299-2301.
- (94) Patel R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. *Clin Infect Dis* 2013 Aug;57(4):564-572.

- (95) Mellmann A, Cloud J, Maier T, Keckevoet U, Ramminger I, Iwen P, et al. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria. *J Clin Microbiol* 2008 Jun;46(6):1946-1954.
- (96) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier PE, Rolain JM, et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 Aug 15;49(4):543-551.
- (97) Idelevich EA, Schule I, Grunastel B, Wullenweber J, Peters G, Becker K. Rapid identification of microorganisms from positive blood cultures by MALDI-TOF mass spectrometry subsequent to very short-term incubation on solid medium. *Clin Microbiol Infect* 2014 Oct;20(10):1001-1006.
- (98) Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol* 2015 Jun-Aug;305(4-5):469-479.
- (99) Verroken A, Defourny L, Lechgar L, Magnette A, Delmee M, Glupczynski Y. Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015 Feb;34(2):405-413.
- (100) Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry for Direct Bacterial Identification from Positive Blood Culture Pellets. *J Clin Microbiol* 2010 04/01;48(4):1481.
- (101) Stevenson LG, Drake SK, Murray PR. Rapid Identification of Bacteria in Positive Blood Culture Broths by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010 02/01;48(2):444.
- (102) Croxatto A, Prod'hom G, Durussel C, Greub G. Preparation of a blood culture pellet for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing. *Journal of visualized experiments : JoVE* 2014 10/15(92):e51985; 51985-e51985.
- (103) Meex C, Neuville F, Descy J, Huynen P, Hayette M, De Mol P, et al. Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF

MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J Med Microbiol* 2012;61(11):1511-1516.

(104) Moussaoui W, Jaulhac B, Hoffmann A-, Ludes B, Kostrzewa M, Riegel P, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clinical Microbiology and Infection* 2010 11/01;16(11):1631-1638.

(105) Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR. Identification of Bacteria in Blood Culture Broths Using Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Sepsityper™ and Time of Flight Mass Spectrometry. *PLOS ONE* 2011 08/16;6(8):e23285.

(106) Prod'hom G, Durussel C, Greub G. A simple blood-culture bacterial pellet preparation for faster accurate direct bacterial identification and antibiotic susceptibility testing with the VITEK 2 system. *J Med Microbiol* 2013;62(5):773-777.

(107) March–Rosselló GA, Muñoz–Moreno MF, García-Loygorri–Jordán de Urriés MC, Bratos–Pére MA. A differential centrifugation protocol and validation criterion for enhancing mass spectrometry (MALDI-TOF) results in microbial identification using blood culture growth bottles. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 2013 05/01;32(5):699-704.

(108) Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *femsre* 2012;36(2):380-407.

(109) Sekercioglu AO, Cekin Y, Ogunc D, Ongut G, Baysan BO, Colak D, et al. Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI- TOF MS) for Early Identification of Septic Patients. *Clin Lab* 2017 Apr 1;63(4):839-844.

(110) Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method Version 7.0. 2019; Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Manual_v_7.0_EUCAST_Disk_Test_2019.pdf. Accessed 03/19, 2019.

(111) Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal* 2016 Apr;6(2):71-79.

- (112) Methodology - EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from positive blood culture bottles. 2018; Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/Methodology_EUCAST_RAST_v1_20181126.pdf. Accessed 12/20, 2018.
- (113) Pailhoriès H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarié C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. *International Journal of Infectious Diseases* 2014 01/01;18:94-96.
- (114) ETEST®. 2017; Available at: <https://www.biomerieux.at/klinische-diagnostik/etestr>. Accessed 03/19, 2019.
- (115) Berghaus LJ, Giguère S, Guldbach K, Warner E, Ugorji U, Berghaus RD. Comparison of Etest, Disk Diffusion, and Broth Macrodilution for *In Vitro* Susceptibility Testing of *Rhodococcus equi*. *J Clin Microbiol* 2015 01/01;53(1):314.
- (116) Baker CN, Stocker SA, Culver DH, Thornsberry C. Comparison of the E Test to agar dilution, broth microdilution, and agar diffusion susceptibility testing techniques by using a special challenge set of bacteria. *J Clin Microbiol* 1991 Mar;29(3):533-538.
- (117) Doern CD. When does 2 plus 2 equal 5? A review of antimicrobial synergy testing. *J Clin Microbiol* 2014 12;52(12):4124-4128.
- (118) Lewis RE, Diekema DJ, Messer SA, Pfaller MA, Klepser ME. Comparison of Etest, checkerboard dilution and time-kill studies for the detection of synergy or antagonism between antifungal agents tested against *Candida* species. *J Antimicrob Chemother* 2002 Feb;49(2):345-351.
- (119) White RL, Burgess DS, Manduru M, Bosso JA. Comparison of three different in vitro methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard, and E test. *Antimicrob Agents Chemother* 1996 Aug;40(8):1914-1918.
- (120) Michalik S. **How does VITEK® 2 Generate MIC Values?**. 2017; Available at: <https://www.biomerieux-microbio.com/education/how-does-vitek-2-generate-mic-values/>. Accessed 03/20, 2019.

- (121) Dahouk SA, Autenrieth IB, Bartz H, Becker K, Beyer W, Braun RW, et al. **Automatisierung in der Mikrobiologie (Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung)**. In: Dahouk SA, Autenrieth IB, Bartz H, Becker K, Beyer W, Braun RW, et al, editors. Mikrobiologische Diagnostik. 2nd ed. Stuttgart, New York, Dheli, Rio: Thieme; 2009. p. 13-15.
- (122) VITEK® 2 für die Antibiotikaempfindlichkeitsprüfung. 2018; Available at: <https://www.biomerieux.de/industrielle-mikrobiologie/veterinar/vitekr-2-fuer-die-antibiotikaempfindlichkeitspruefung>. Accessed 03/20, 2019.
- (123) Al-Bakri A, Afifi FU. Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. J Microbiol Methods 2007 01/01;68(1):19-25.
- (124) EUCAST reading guide for broth microdilution. 2019; Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2019_manuals/Reading_guide_BMD_v_1.0_2019.pdf. Accessed 03/20, 2019.
- (125) Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism. J Clin Microbiol 2003 01/01;41(1):506.
- (126) Reis RS, Neves I, Lourenço SLS, Fonseca LS, Lourenço M, Cristina S. Comparison of Flow Cytometric and Alamar Blue Tests with the Proportional Method for Testing Susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to Rifampin and Isoniazid. J Clin Microbiol 2004 05/01;42(5):2247.
- (127) Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, Espuny MJ, Manresa A. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. J Appl Microbiol 2009 05/01; 2019/03;106(5):1558-1568.
- (128) Miyake N, Kadowaki M, Sato Y, Eriguchi Y, Nagasaki Y, Harada Y, et al. Influence of inoculum size on MICs for methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Jpn J Antibiot 2011 Aug;64(4):231-237.

- (129) Meletiadis J, Meis JFGM, Mouton JW, Verweij PE. Analysis of Growth Characteristics of Filamentous Fungi in Different Nutrient Media. *J Clin Microbiol* 2001 02/01;39(2):478.
- (130) Gomez-Lopez A, Aberkane A, Petrikkou E, Mellado E, Rodriguez-Tudela J, Cuenca-Estrella M. Analysis of the Influence of Tween Concentration, Inoculum Size, Assay Medium, and Reading Time on Susceptibility Testing of *Aspergillus* spp. *J Clin Microbiol* 2005 03/01;43(3):1251.
- (131) Dubourg G, Raoult D. Emerging methodologies for pathogen identification in positive blood culture testing. *Expert Rev Mol Diagn* 2016;16(1):97-111.
- (132) Arena F, Giani T, Pollini S, Viaggi B, Pecile P, Rossolini GM. Molecular antibiogram in diagnostic clinical microbiology: advantages and challenges. *Future Microbiol* 2017 Apr;12:361-364.
- (133) Fenollar F, Raoult D. Molecular diagnosis of bloodstream infections caused by non-cultivable bacteria. *Int J Antimicrob Agents* 2007 11/01;30:7-15.
- (134) Gazi MA, Islam MR, Kibria MG, Mahmud Z. General and advanced diagnostic tools to detect *Mycobacterium tuberculosis* and their drug susceptibility: a review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2015 May;34(5):851-861.
- (135) Megraud F, Benejat L, Ontsira Ngoyi EN, Lehours P. Molecular Approaches to Identify *Helicobacter pylori* Antimicrobial Resistance. *Gastroenterol Clin North Am* 2015 Sep;44(3):577-596.
- (136) Barlam TF, Cosgrove SE, Abbo LM, MacDougall C, Schuetz AN, Septimus EJ, et al. Implementing an Antibiotic Stewardship Program: Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Clin Infect Dis* 2016 May 15;62(10):e51-77.
- (137) Özenci V, Rossolini GM. Rapid microbial identification and antimicrobial susceptibility testing to drive better patient care: an evolving scenario. *J Antimicrob Chemother* 2019 Jan 1;74(Supplement_1):i2-i5.

- (138) Pancholi P, Carroll KC, Buchan BW, Chan RC, Dhiman N, Ford B, et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol* 2018 Mar 26;56(4):10.1128/JCM.01329-17. Print 2018 Apr.
- (139) Charnot-Katsikas A, Tesic V, Love N, Hill B, Bethel C, Boonlayangoor S, et al. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J Clin Microbiol* 2017 Dec 26;56(1):10.1128/JCM.01166-17. Print 2018 Jan.
- (140) Bumgarner R. Overview of DNA microarrays: types, applications, and their future. *Curr Protoc Mol Biol* 2013 Jan;Chapter 22:Unit 22.1.
- (141) Bumgarner R. Overview of DNA Microarrays: Types, Applications, and Their Future. *Current Protocols in Molecular Biology* 2013 01/01; 2019/04;101(1):22.1.1-22.1.11.
- (142) Wojewoda CM, Sercia L, Navas M, Tuohy M, Wilson D, Hall GS, et al. Evaluation of the Verigene Gram-positive blood culture nucleic acid test for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol* 2013 Jul;51(7):2072-2076.
- (143) Mancini N, Infurnari L, Ghidoli N, Valzano G, Clementi N, Burioni R, et al. Potential Impact of a Microarray-Based Nucleic Acid Assay for Rapid Detection of Gram-Negative Bacteria and Resistance Markers in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol* 2014 04/01;52(4):1242.
- (144) Stavnsbjerg C, Frimodt-Møller N, Moser C, Bjarnsholt T. Comparison of two commercial broad-range PCR and sequencing assays for identification of bacteria in culture-negative clinical samples. *BMC Infect Dis* 2017 Mar 27;17(1):233-017-2333-9. eCollection 2017.
- (145) Qian Q, Tang YW, Kolbert CP, Torgerson CA, Hughes JG, Vetter EA, et al. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J Clin Microbiol* 2001 Oct;39(10):3578-3582.

- (146) Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. *J Infect* 2008 Oct;57(4):307-316.
- (147) Misawa Y, Yoshida A, Saito R, Yoshida H, Okuzumi K, Ito N, et al. Application of loop-mediated isothermal amplification technique to rapid and direct detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in blood cultures. *J Infect Chemother* 2007 Jun;13(3):134-140.
- (148) Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res* 2000 Jun 15;28(12):E63.
- (149) Perera RS, Ding XC, Tully F, Oliver J, Bright N, Bell D, et al. Development and clinical performance of high throughput loop-mediated isothermal amplification for detection of malaria. *PLoS One* 2017 Feb 6;12(2):e0171126.
- (150) **FilmArray™ Multiplex PCR System.** 2018; Available at: <https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/filmarray-multiplex-pcr-system>. Accessed 03/26, 2019.
- (151) Salimnia H, Fairfax MR, Lephart PR, Schreckenberger P, DesJarlais SM, Johnson JK, et al. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol* 2016 Mar;54(3):687-698.
- (152) Cooper-Jones B, Farrah K. A Rapid Test for Microbial Identification in Patients With Suspected Sepsis. *CADTH Issues in Emerging Health Technologies Ottawa (ON):* . You are permitted to reproduce this document for non-commercial purposes, provided it is not modified when reproduced and appropriate credit is given to CADTH; 2016.
- (153) Fhooblall M, Nkwanyana F, Mlisana KP. Evaluation of the BioFire((R)) FilmArray((R)) Blood Culture Identification Panel on positive blood cultures in a regional hospital laboratory in KwaZulu-Natal. *Afr J Lab Med* 2016 Sep 30;5(1):411.
- (154) Southern TR, VanSchooneveld TC, Bannister DL, Brown TL, Crismon AS, Buss SN, et al. Implementation and performance of the BioFire FilmArray(R) Blood Culture Identification panel with antimicrobial treatment recommendations for bloodstream infec-

tions at a midwestern academic tertiary hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2015 Feb;81(2):96-101.

(155) Zheng X, Polanco W, Carter D, Shulman S. Rapid identification of pathogens from pediatric blood cultures by use of the FilmArray blood culture identification panel. *J Clin Microbiol* 2014 Dec;52(12):4368-4371.

(156) Galiana A, Coy J, Gimeno A, Guzman NM, Rosales F, Merino E, et al. Evaluation of the Sepsis Flow Chip assay for the diagnosis of blood infections. *PLoS One* 2017 May 18;12(5):e0177627.

(157) Avda L, Ciencias T. Sepsis flow chip kit. (Máster Diagnóstica S.L.). 2016; Available at: http://www.vitro.bio/portals/0/Images/VitroProductos/Diagnostico/MAD-003936M-HS24-24_MII.pdf. Accessed 03/26, 2019.

(158) Martinez RM, Wolk DM. Bloodstream Infections. *Microbiol Spectr* 2016 Aug;4(4):10.1128/microbiolspec.DMIH2-0031-2016.

(159) Huang TD, Melnik E, Bogaerts P, Evrard S, Glupczynski Y. Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections. *J Clin Microbiol* 2019 Jan 30;57(2):10.1128/JCM.01597-18. Print 2019 Feb.

(160) Opota O, Jaton K, Greub G. Microbial diagnosis of bloodstream infection: towards molecular diagnosis directly from blood. *Clin Microbiol Infect* 2015 Apr;21(4):323-331.

(161) Al-Soud WA, Radstrom P. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J Clin Microbiol* 2001 Feb;39(2):485-493.

(162) Handschur M, Karlic H, Hertel C, Pfeilstocker M, Haslberger AG. Preanalytic removal of human DNA eliminates false signals in general 16S rDNA PCR monitoring of bacterial pathogens in blood. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2009 May;32(3):207-219.

(163) Sabat AJ, van Zanten E, Akkerboom V, Wisselink G, van Slochteren K, de Boer RF, et al. Targeted next-generation sequencing of the 16S-23S rRNA region for culture-independent bacterial identification - increased discrimination of closely related species. *Sci Rep* 2017 Jun 13;7(1):3434-017-03458-6. eCollection 2017.

- (164) Decuyper S, Meehan CJ, Van Puyvelde S, De Block T, Maltha J, Palpouguini L, et al. Correction: Diagnosis of Bacterial Bloodstream Infections: A 16S Metagenomics Approach. *PLoS Negl Trop Dis* 2017 Jul 28;11(7):e0005811.
- (165) Gyarmati P, Kjellander C, Aust C, Kalin M, Ohrmalm L, Giske CG. Bacterial Landscape of Bloodstream Infections in Neutropenic Patients via High Throughput Sequencing. *PLoS One* 2015 Aug 13;10(8):e0135756.
- (166) Johansen J, Kovacik L, Casamatta D, Fučíková K. Utility of 16S-23S ITS sequence and secondary structure for recognition of intrgeneric and intergeneric limits within cyanobacterial taxa: *Leptolyngbya corticola* sp. nov. (Pseudanabaenaceae, Cyanobacteria). ; 2011.
- (167) **File:Amit Yadav Phytoplasma rRNA operon.jpg**. 2009; Available at: https://en.wikipedia.org/wiki/File:Amit_Yadav_Phytoplasma_rRNA_operon.jpg. Accessed 03/27, 2019.
- (168) Faria MM, Conly JM, Surette MG. The development and application of a molecular community profiling strategy to identify polymicrobial bacterial DNA in the whole blood of septic patients. *BMC Microbiol* 2015 Oct 16;15:215-015-0557-7.
- (169) Gyarmati P, Kjellander C, Aust C, Song Y, Ohrmalm L, Giske CG. Metagenomic analysis of bloodstream infections in patients with acute leukemia and therapy-induced neutropenia. *Sci Rep* 2016 Mar 21;6:23532.
- (170) Quince C, Walker AW, Simpson JT, Loman NJ, Segata N. Shotgun metagenomics, from sampling to analysis. *Nat Biotechnol* 2017 Sep 12;35(9):833-844.
- (171) **A new approach to pathogen identification**. 2018; Available at: https://www.pathoquest.com/?page_id=69. Accessed 03/28, 2018.
- (172) Gu W, Miller S, Chiu CY. Clinical Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pathogen Detection. *Annu Rev Pathol* 2019 Jan 24;14:319-338.
- (173) Parize P, Muth E, Richaud C, Gratigny M, Pilmis B, Lamamy A, et al. Untargeted next-generation sequencing-based first-line diagnosis of infection in immunocompromised

adults: a multicentre, blinded, prospective study. *Clin Microbiol Infect* 2017 Aug;23(8):574.e1-574.e6.

(174) Gordon NC, Price JR, Cole K, Everitt R, Morgan M, Finney J, et al. Prediction of *Staphylococcus aureus* antimicrobial resistance by whole-genome sequencing. *J Clin Microbiol* 2014 Apr;52(4):1182-1191.

(175) Aanensen DM, Feil EJ, Holden MT, Dordel J, Yeats CA, Fedosejev A, et al. Whole-Genome Sequencing for Routine Pathogen Surveillance in Public Health: a Population Snapshot of Invasive *Staphylococcus aureus* in Europe. *MBio* 2016 May 5;7(3):10.1128/mBio.00444-16.

(176) Zone diameter breakpoints for rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) directly from blood culture bottles. 2018; Available at: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/EUCAST_RAST_Breakpoint_Table_v_1.0_final_PDF.pdf. Accessed 11/30, 2018.

(177) Schweizer ML, Furuno JP, Harris AD, Johnson JK, Shardell MD, McGregor JC, et al. Comparative effectiveness of nafcillin or cefazolin versus vancomycin in methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia. *BMC Infect Dis* 2011 Oct 19;11:279-2334-11-279.

(178) Nissen JL, Skov R, Knudsen JD, Ostergaard C, Schonheyder HC, Frimodt-Moller N, et al. Effectiveness of penicillin, dicloxacillin and cefuroxime for penicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a retrospective, propensity-score-adjusted case-control and cohort analysis. *J Antimicrob Chemother* 2013 Aug;68(8):1894-1900.

(179) Paul M, Zemer-Wassercug N, Talker O, Lishtzinsky Y, Lev B, Samra Z, et al. Are all beta-lactams similarly effective in the treatment of methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* bacteraemia? *Clin Microbiol Infect* 2011 Oct;17(10):1581-1586.