



Diagnostik bakterieller Erreger nosokomialer Infektionen

Autoren:

Professor Dr. Franz-Josef Schmitz

Chefarzt

Institut für Laboratoriumsmedizin, Mikrobiologie,
Hygiene, Umweltmedizin und Transfusionsmedizin
Mühlenkreisklinken Minden

Dr. Kora Huber

Mikrobiologin

Consultant Infektiologie

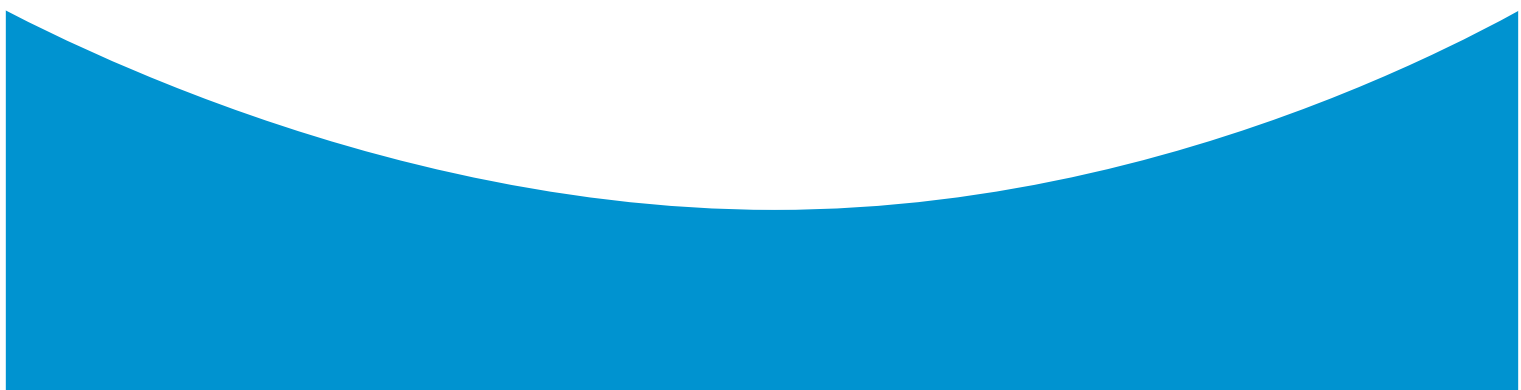
Hintergrund

Nosokomiale, bakterielle Infektionen, die während eines Klinikaufenthalts erworben werden, stellen eine zunehmende Herausforderung für die moderne Medizin dar. Eine wirksame Behandlung dieser Infektionen mit Antibiotika ist jedoch mehr denn je von essentieller Bedeutung, da zahlreiche (neue) Therapieansätze und medizinische Maßnahmen nur durch die Möglichkeit einer effizienten Infektionsbehandlung ethisch vertretbar sind. Hierzu gehören neben großen chirurgischen Operationen auch invasive Eingriffe sowie das Immunsystem schwächende Behandlungsstrategien bei älteren, multimorbiden oder abwehrgeschwächten Patienten mit malignen Erkrankungen. Auch die Durchführung von Stammzell- oder Organtransplantationen ist nur möglich, wenn zur Behandlung potenzieller Infektionen, die als Folge der Immunsuppression auftreten können, effiziente Therapieoptionen zur Verfügung stehen.

Entscheidend für die Durchführung einer erfolgreichen antibakteriellen Therapie ist neben der mikrobiologischen Diagnostik zur Identifizierung der infektionsauslösenden nosokomialen Erreger auch die Bestimmung ihrer Antibiotikaempfindlichkeit, die Aufschluss darüber gibt, welche antibakteriellen Substanzen geeignet sind und für die Behandlung empfohlen werden können. Immer mehr Bedeutung hat heute auch der Nachweis potenzieller bakterieller Resistenzen und deren zugrunde liegende Resistenzmechanismen (siehe hierzu auch die CME-Module „Resistenzmechanismen“ Teil 1 und Teil 2). Durch Verzögerungen beim Resistenznachweis ist die Gefahr einer inadäquaten Antibiotikatherapie deutlich erhöht, mit den Folgen eines längeren Klinikaufenthalts, höherer Kosten und einem höheren Letalitätsrisiko für den betroffenen Patienten. Insbesondere Abwehrgeschwächte und kritisch Kranke auf der Intensivstation haben ein erhöhtes Risiko für nosokomiale Infektionen durch resistente Bakterien, deren zugrunde liegende Resistenzmechanismen oft nur durch zusätzliche Testverfahren nachgewiesen werden können.

Zentrales Ziel der mikrobiologischen Diagnostik ist es, in Patientenproben Infektionserreger nachzuweisen und Aussagen zu deren Resistenz gegen antimikrobielle Substanzen (Antibiotika) zu erhalten, um eine gezielte, effektive Therapie zu ermöglichen. Je früher Informationen über den Erreger vorliegen, desto eher kann von anfänglich kalkulierter und auf Erfahrungswerten basierender Therapie auf einen gezielten Behandlungsansatz umgestellt werden (Schubert und Wieser 2013). Sowohl die Ergebnisse zur Erregeridentifizierung als auch die Angaben zur Empfindlichkeit bzw. Resistenz sollten daher möglichst rasch vorliegen. Testsysteme, die gleichzeitig schnell und zuverlässig sind, stehen jedoch nicht immer zur Verfügung, und auch der Kostenfaktor spielt hier eine nicht untergeordnete Rolle. Es gilt daher, Risikopatienten frühzeitig zu erkennen, um entsprechende Maßnahmen rechtzeitig einzuleiten. Entscheidend für gute Ergebnisse ist die engmaschige Kommunikation zwischen Einsender und Labor sowie die patientennahe klinische Mikrobiologie.

Die klinische, diagnostische Mikrobiologie liefert dabei nicht nur Therapieempfehlungen im Einzelfall für den Patienten, von dem der (die) Erreger isoliert wurde(n), sondern gibt darüber hinaus retrospektiv Kenntnis über die lokale Epidemiologie der Erreger und deren Resistenzsituation bei bestimmten Infektionen auf unterschiedlichen Stationen und bei besonderen Risikopatienten. Diese Kenntnisse sind essenziell für die Wahl einer adäquaten empirischen Initialtherapie, die sofort und ohne Kenntnis des mikrobiologischen Befunds erfolgen muss. Die adäquate Antibiotikawahl für eine empirische Initialtherapie ist insbesondere bei kritisch kranken Patienten mit schweren Infektionen von entscheidender Bedeutung.



Materialauswahl, Probenentnahme, Lagerung und Transport

Die bakteriologische Erregerdiagnostik beschränkt sich nicht nur auf die Anwendung vorgegebener, definierter Testverfahren, sondern beinhaltet ein Zusammenspiel mehrerer wichtiger Faktoren und Maßnahmen. Hierzu gehören:

- Die Indikationsstellung und Probenauswahl, die fachgerechte Entnahme der Probe sowie deren Verpackung, Lagerung und Transport. Dies wird auch als „präanalytische Phase“ bezeichnet.
- In der „analytischen Phase“ erfolgt die Probenannahme im Labor, die Eingangskontrolle, die Probenanlage sowie die Analytik und technische Validation.
- In der dritten, „postanalytischen Phase“ gibt es die medizinische Validation, die Befundbewertung, die Befundmitteilung und die Einleitung der Therapie.

(Geiss 2009)

Die Verantwortung für ein gutes mikrobiologisches Ergebnis lastet somit auf mehreren Schultern, und die fachgerecht durchgeführte Indikationsstellung, Probenauswahl, Probenentnahme, Verpackung, Lagerung und der richtige Transport sind die Voraussetzungen für aussagekräftige, valide Laborergebnisse (Abb. 1).

Grundsätzlich unterscheidet man mikrobiologische Untersuchungen

- zum Erregernachweis im Rahmen einer manifesten Infektion, wie z. B. Anlegen einer Urinkultur bei Harnwegsinfektionen bzw. einer Blutkultur bei Sepsis,
- zum Ausschluss bestimmter Erreger bei bestehender Infektion (z. B. Streptokokken-Schnelltest nach Rachenabstrich oder Legionella-Antigen-Nachweis im Urin),
- zum Screening multiresistenter Erreger (z. B. Screening Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* [MRSA]; Anlegen von Überwachungskulturen bei Intensivpatienten) (Geiss 2009).

Die Indikation für die mikrobiologische Diagnostik bestimmt somit die Art der Probe, wobei die Probennahme direkt am Ort der Infektion möglichst kontaminationsfrei erfolgen muss. Dies gelingt am leichtesten bei Proben von normalerweise sterilen Orten wie Blut, Spinalflüssigkeit, Gelenkflüssigkeit, Biopsiematerial oder Aspiraten von entzündetem Gewebe. Problematischer wird die kontaminationsfreie Entnahme bei den Proben von Orten mit Standortflora wie Urin, Sputum, Stuhl sowie bei Abstrichen oder Drainagen von Infektionsorten (z. B. Oropharynx, Darm, Vaginaltrakt).

Kritische Punkte für die Erregeridentifizierung

- **Art der Probenentnahme**
- **Kontamination bei Probennahme oder später**
- **Differenzierung zwischen ursächlichem Erreger und Begleitflora**
- **Wahl des Transportmediums**
- **Wahl des Anreicherungsmediums**
- **Zeitverzögerung durch Transport**

Abbildung 1: Kritische Faktoren, die entscheidend für eine valide mikrobiologische Erregeridentifizierung sind.

Für die Probennahme im Klinikalltag ist Folgendes zu beachten:

- Eine ausreichend lange Hautdesinfektion sollte bei **Punktionen durch die Hautoberfläche** erfolgen. Anmerkung: Es ist davon auszugehen, dass etwa zwei Drittel aller Nachweise von Koagulase-negativen Staphylokokken in Blutkulturen als Kontamination durch bakterielle Hautflora zu bewerten sind.
- Bei **Proben von Wunden** sollte der Abstrich mittels Tupfer nach Entfernung oberflächlicher Nekrosen möglichst vom Wundgrund erfolgen.
- Bei **Urinproben** ist die Verwendung von Mittelstrahlurin nach sorgfältiger Reinigung von Harnröhrenöffnung und Umgebung mit Leitungswasser indiziert. CAVE: Eine Urinkultur unter bestehender Antibiotikatherapie ist nur bedingt sinnvoll, demgegenüber ist der Antigennachweis im Urin hiervon nicht beeinträchtigt. Punktionsurin liefert die

validesten Testergebnisse. Lagerung und Transport der Nativurin-Probe sollten immer gekühlt erfolgen, da sich die Keimzahl bei Raumtemperatur relativ rasch verändert (CAVE: falsch positiver Befund). Es gibt zwei Möglichkeiten für den Transport: Nativurin im sterilen Schraubkappenröhrchen oder Aufbringen des Urins auf einen Ein-tauch-Nährboden.

- **Stuhlproben** sollten möglichst von 3 verschiedenen Stellen entnommen werden. Lagerung und Transport erfolgen in Stuhlröhrchen. Ein schneller Transport ist wichtig, da ansonsten eine Vermehrung der Begleitflora erfolgt (Anmerkung: Dies ist besonders wichtig bei Salmonellen-, Shigellen- oder Yersinien-Verdacht).

(Geiss 2009, Halangk und Lauf o.J.)

Probennahme für Blutkulturdiagnostik

Besondere Bedeutung kommt der Blutkulturdiagnostik zu, insbesondere bei Patienten mit Sepsis oder Sepsisverdacht.

- Die Blutentnahme (aus peripherer Vene) sollte zu Beginn der Fieberattacke möglichst vor Beginn der Antibiotikatherapie erfolgen (eine Bakteriämie geht dem Fieber etwa 1 Stunde voraus). Die Haut muss an der Punktionsstelle gründlich desinfiziert werden (Jod/Alkohol), Blutkulturflaschen sollten nach Möglichkeit vorgewärmt werden.
- Entscheidend ist – nach sorgfältiger Händedesinfektionen/sterilen Handschuhen – eine kontaminationsfreie Blutentnahme, die niemals aus einem länger liegenden Gefäßkatheter erfolgen sollte.
- Die Sensitivität kann durch Erhöhung der entnommenen Blutmenge bis zur maximalen Füllstandsmenge gesteigert werden, gleichzeitig ist aber auch eine Mindestbefüllung erforderlich.

- Es sollten mindestens zwei Blutkulturen, die durch separate Venenpunktion entnommen wurden, untersucht werden.
- Mit drei Blutkulturen während eines Sepsis-Schubs liegt die Sensitivität bei 95–98 %.
- Bewährte Blutkultursysteme sollten verwendet werden, und der schnelle und richtige Transport ist entscheidend. CAVE: Blutkulturflaschen für automatisierte Verfahren müssen immer bei Raumtemperatur gelagert und transportiert werden.
- Die Verwendung von Blutkulturmedien (Mischen einer definierten Menge Blut mit Agar) ist nicht nur auf die Sepsis-Diagnostik beschränkt, sondern kann generell bei allen durch Punktion gewonnenen Körperflüssigkeiten wie Aszites, Galle, Gelenkpunktat u. a. verwendet werden, aber nicht bei Urin.

(Geiss 2009, Halangk und Lauf o.J.)

Probennahme für die Diagnostik Katheter-assoziiierter Infektionen

Katheter zur Punktion oder Daueranwendung gehören in der Klinik zum Standardrepertoire und stellen eine der wichtigsten Infektionsquellen dar. Von wenigen Ausnahmen abgesehen wird eine Entfernung des Katheters empfohlen; der Versand einer 3 bis 5 cm langen Katheterspitze – mit steriler Schere abschneiden – sollte in einem leeren, sterilen Röhrchen erfolgen (schneller Transport, da ansonsten Austrocknungsgefahr).

Sofern ein Gefäßkatheter nicht ohne Weiteres entfernt werden kann, ist eine Differenzialblutkultur möglich mit Entnahme einer Probe aus dem liegenden Katheter bei zusätzlicher Punktion eines Blutgefäßes an anderer Stelle. Sofern in beiden Blutkulturen der gleiche Erreger nachgewiesen wird, gilt dies als Beweis für eine Katheter-assoziierte Sepsis (Geiss 2009, Halangk und Lauf o.J.).

Proben für Anaerobier-Diagnostik

Klinische Hinweise auf Infektionen mit anaeroben Bakterien sind z. B. fötider Geruch des Eiters, Gasbildung in Gewebe oder Exsudat, nekrotisierendes Gewebe oder Pseudomembranen. Nach Geiss (2009) sind eine sorgfältige Gewinnung des Untersuchungsmaterials, die Sicherstellung anaerober Transportbedingungen und die Verwendung geeigneter sauerstofffreier Transportmedien von entscheidender Bedeutung für einen erfolgreichen Nachweis anaerober Bakterien. Sofern in dieser Phase der Diagnostik Fehler gemacht werden, können diese später bei der Kultivierung nicht mehr kompensiert werden. Grundsätzlich können alle Materialien aus normalerweise sterilen Körperbereichen (Punktate, Eiter, Blut, Biopsate, Lavagematerial) auf Anaerobier untersucht werden, ungeeignet sind jedoch Proben aus Bereichen mit anaerober Normalflora wie z. B. Rektalabstriche oder Sputum.

Ausnahme ist die Anzucht von *Clostridium difficile*, die in Stuhlproben zum Nachweis von *Clostridium-difficile*-Toxin erfolgt.

Der Nachweis anaerober Erreger bei schleimhautnahen Infektionen (z. B. bei Dentalinfektionen) sollte generell durch Materialgewinnung mittels Punktion und Aspiration mit Nadel und Spritze erfolgen (Hamman 2009).

Wichtige Hinweise zur Lagerung und zum Transport der mikrobiologischen Proben sind in Abbildung 2a zusammengefasst. Abbildung 2b zeigt allgemeine Empfehlungen für Lagertemperaturen bakteriologischer Proben (Hamman 2009).

Nach erfolgter Probenentnahme, gegebenenfalls Lagerung und Transport, erreicht die mikrobiologische Probe das Labor zur bakteriellen Erregeridentifizierung und Empfindlichkeitstestung.

Empfehlungen für Lagerung und Transport bakteriologischer Proben für die mikrobiologische Diagnostik:

- Je kürzer die Lager- und Transportzeit und die Verwendung geeigneter Transportmedien, desto mehr entspricht das kulturelle Ergebnis dem ursprünglichen mikrobiologischen Zustand am Ort der Infektion. **CAVE:** Bei größerem zeitlichen Verzug kann die Keimzusammensetzung der Probe verfälscht werden, u. a. durch Absterben relevanter Keime (z. B. *Haemophilus*, Pneumokokken, Meningokokken) oder durch eine Überwucherung der Krankheitserreger durch schnellwachsende Normalflora.
- Ein Punktat, ein Biopsat, etwas Sekretflüssigkeit oder eine Gefäßkatheterspitze werden am besten in einem sterilen Schraubverschlussröhrchen eingeschickt (ggf. unter Zugabe von Kochsalzlösung [1 ml], um Austrocknung zu verhindern).
- Für den Nachweis von Anaerobiern, wie *Bacteroides* spp., muss über ein spezielles Transportmedium eine sauerstofffreie Zone hergestellt werden.

Abbildung 2a: Empfehlungen für Lagerung und Transport bakteriologischer Proben für die mikrobiologische Diagnostik (Geiss 2009).

Empfehlungen für Lagertemperaturen bakteriologischer Proben für die mikrobiologische Diagnostik:

- Kühlschranktemperatur:** Sputum, Bronchialsekret, Punktatflüssigkeiten, Urin, Katheterspitzen, Stuhl
- Raumtemperatur:** Abstrichtupferproben, Proben in (modernem) Blutkulturmedium, Liquor
- Brutschranktemperatur:** Urine in Eintauchnährböden

Abbildung 2b: Empfehlungen für Aufbewahrung und Lagerung bakteriologischer Proben für die mikrobiologische Diagnostik (Hamman 2009).

Bakterielle Diagnostik mit konventionellen Methoden

Eine bakteriologische Untersuchung beginnt – nach konventioneller Methode – mit der mikroskopischen Betrachtung eines auf einem Objektträger angefertigten Ausstrichpräparats. Auch im Zeitalter der molekularen Verfahren hat die Mikroskopie und die Kultur von Bakterien auf Nährböden nach wie vor eine zentrale diagnostische Bedeutung. Die Bakterienform (Stäbchen, Kokken, Streptokokken, Staphylokokken, Schrauben, Spirillen) und das Färbeverhalten mittels Gramfärbung (Differenzierung in gramnegative und grampositive Bakterien) ermöglichen eine erste Klassifikation (siehe hierzu auch CME-Modul „Bakterien als Erreger nosokomialer Infektionen“). Anreicherungskultur und Isolierung unterschiedlicher Bakterien durch das Anlegen von Reinkulturen müssen erfolgen, Probenmaterial wird auf verschiedenen Nährböden ausgestrichen und Kolonienform und -farbe nach 24 Stunden registriert. Durch die Anzucht ist es möglich, Krankheitserreger von der Normalflora zu trennen. Anschließend erfolgt eine erneute mikroskopische Betrachtung.

Abbildung 3 gibt einen Überblick über den bakteriologischen Untersuchungsablauf im Labor mittels konventioneller Methoden.

Entscheidend für die Erregeridentifizierung ist ihre Differenzierung anhand biochemischer Reaktionen wie spezieller Stoffwechselreaktionen, die anhand von Farbindikatoren in vorgefertigten Agarmedien nachgewiesen werden können. Hierzu gehört die „Bunte Reihe“ (siehe Abb. 3), anhand derer Bakterien aufgrund ihrer spezifischen Stoffwechseleigenschaften un-

terschieden werden können. Zur Erregeridentifizierung werden Enzymaktivitäten, Substratabbau und bakterielle Fähigkeiten wie Beweglichkeit überprüft. Die kleine Bunte Reihe ist die älteste, traditionellste Methode, die vor allem zur Identifikation von Enterobacteriaceae verwendet wird und Aufschluss darüber gibt, ob der isolierte Erreger z. B. zur Spezies *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* oder *Enterobacter cloacae* gehört. Weitere detailliertere Erkenntnisse können durch Serotypisierung erfolgen, anhand derer verschiedene Stämme einer Spezies unterschieden werden können.

Bei Vorliegen des Erregers in Reinkultur kann das Resistenzmuster anhand des Antibiotogramms bestimmt werden (Abb. 3).

Ein Nachteil der konventionellen bakteriologischen Diagnostik ist der Zeitfaktor, denn um eine erfolgreiche Erregeridentifizierung durchzuführen, vergehen in der Regel 1–3 Tage für die Erregeridentifizierung und danach weitere 1–3 Tage für die Resistenztestung. Allerdings betragen die Zeiten meist jeweils 1 Tag und bei Reinkulturen – aber auch bei Mischkulturen – startet die Resistenzbestimmung häufig schon parallel zur Identifizierung.

Bei manchen Infektionen lassen sich die Erreger nicht oder nicht zeitnah anzüchten. Die Infektion kann hier indirekt über serologische Verfahren, d. h. den Nachweis der spezifischen, vom Patienten gebildeten Antikörper geführt werden (<http://www.mikrobiologie.uk-erlangen.de/>).

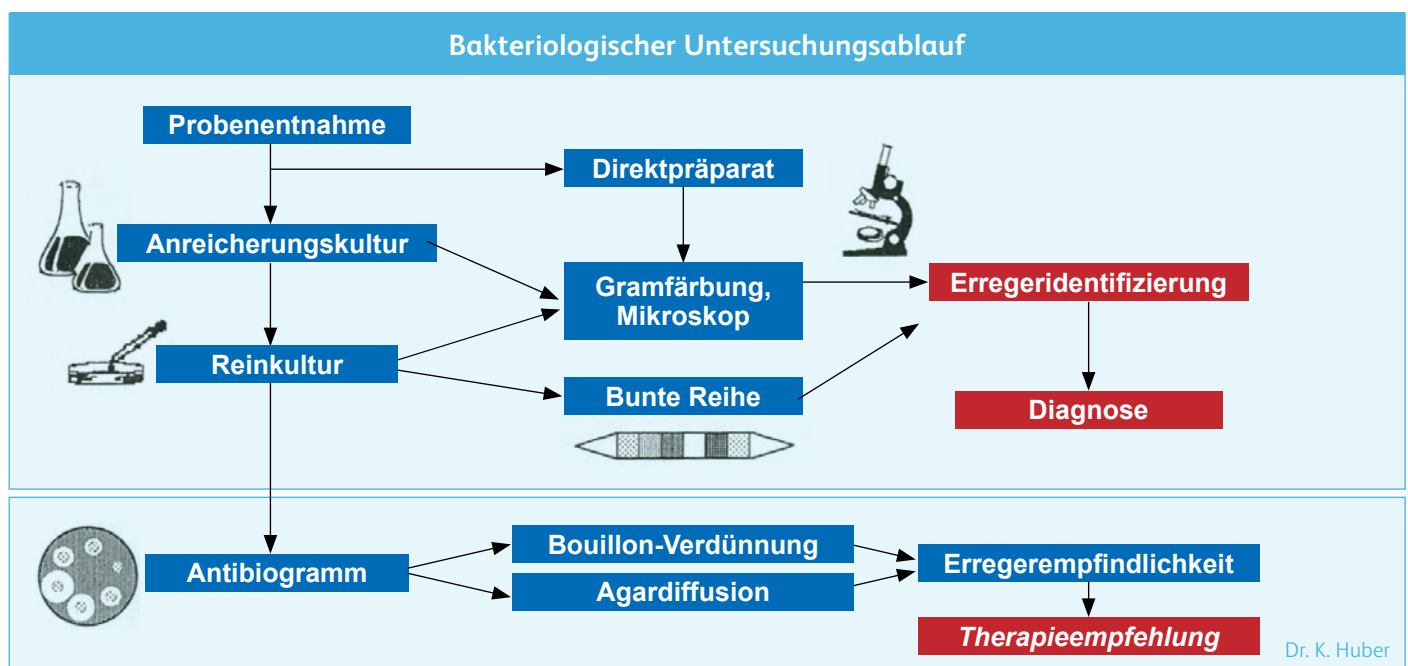


Abbildung 3: Bakteriologischer Untersuchungsablauf (Übersicht) unter Einsatz konventioneller mikrobiologischer Methoden.

Molekulare bakterielle Diagnostik

Ein neuer Ansatz der Diagnostik verzichtet auf das Mikroskopieren, Kultivieren und die Untersuchung der biochemischen und immunologischen Eigenschaften, sondern konzentriert sich auf das bakteriologische Erbgut, also die genetische Ausstattung der infektiösauslösenden Bakterien. Der Erregernachweis erfolgt über molekularbiologische Verfahren, die heute aus der mikrobiologischen Diagnostik nicht mehr wegzudenken sind und die vor allem auf der Vermehrung von Nukleinsäuren (Polymerase-Ketten-Reaktion, PCR) basieren. Der erste Schritt fast aller molekularbiologischen Diagnostikverfahren ist die Aufreinigung von Nukleinsäuren aus dem Probenmaterial, auf welche der spezifische Erregernachweis folgt (Schubert und Wieser 2013). Ein Themenschwerpunkt des Fachgebiets Nosokomiale Infektionen stellen Forschungen und Entwicklungen zur schnellen und molekularen Diagnostik sowie Typisierung von bakteriellen Erregern basierend auf verwandten Technologie-Plattformen dar (DNS-Array-Technologie, Hochdurchsatz-SNP-Analyse, verschiedene PCR-basierte Verfahren etc.). Hierbei sollen aus populationsbiologischen und molekularepidemiologischen Untersuchungen spezifische Marker abgeleitet werden, welche für Stämme mit bestimmtem Potenzial oder Gruppen von

PCR-Verfahren

Die PCR oder Polymerase-Kettenreaktion ist eine molekularbiologische Methode, mit der kurze DNA-Abschnitte auf einfache Weise vervielfältigt werden. Man benötigt dazu die DNA-Vorlage, das Enzym DNA-Polymerase, das die Vervielfältigung katalysiert, Ansatzstücke für die Polymerase, die sogenannten Primer, und Desoxynukleosidtriphosphate, die DNA-Bausteine. Gesteuert wird die Vervielfältigung über mehrere Zyklen von Temperaturerhöhungen und -senkungen. Schon seit den 80er Jahren gibt es das PCR-Verfahren, das bekannte Abschnitte der Erbinformation (DNA, RNA) von Erregern nachweisen kann. Die PCR ermöglicht es, in einer Probe vorhandene DNA oder RNA zu vermehren und mit bekannten Gensequenzen zu vergleichen. Findet man in der Probe die Erbinformation eines Erregers, deutet das auf die Infektion mit diesem Erreger hin.

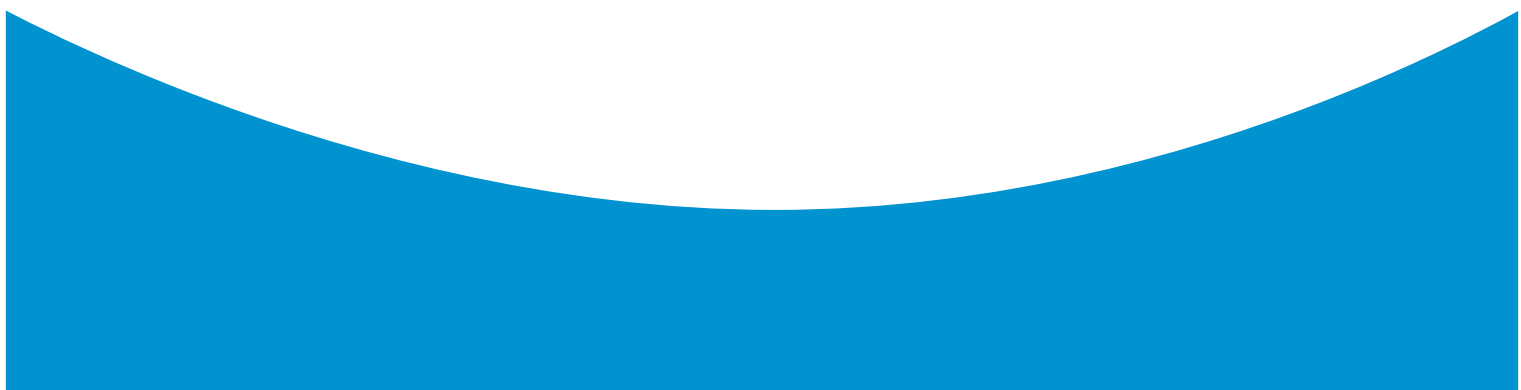
Die PCR benötigt deutlich weniger Zeit als die Kultur. Die PCR ist ein relativ schnelles Verfahren, das aufgrund der hohen Spezifität und Sensitivität auch aus Direktmaterial Ergebnisse

Stämmen mit gemeinsamen Merkmalen hochspezifisch sind. Ziel ist hierbei eine schnellere Detektion von Erregern bzw. ihrer Merkmale, wie erhöhte Pathogenität, Epidemizität (Ausbreitungsfähigkeit) und verschiedenen Determinanten für Antibiotikaresistenz (Robert Koch-Institut 2016).

Die molekulare Diagnostik beruht derzeit hauptsächlich auf der Analyse von Erbsubstanz oder Proteinen der Erreger. Der Hauptunterschied zu klassischen kulturbasierten Verfahren ist meistens die höhere Geschwindigkeit. Manche Erreger sind gar nicht anzüchtbar, sodass ihr direkter Nachweis nur über molekulare Verfahren gelingt. In der molekularbiologischen Diagnostik werden zunehmend vollautomatische Systeme eingesetzt, bei denen nach Eingabe des Probenmaterials die Nukleinsäure-Extraktion, -Amplifikation sowie -Detektion und die Auswertung der Proben sowie aller benötigten Kontrollen automatisch erfolgt. Diese sehr schnellen und einfach anzuwendenden Systeme sind derzeit noch relativ kostenintensiv, sowohl hinsichtlich Geräteanschaffung wie auch der Verbrauchsmaterialien (Schubert und Wieser 2013).

noch am selben Tag liefern kann (Schubert und Wieser 2013). Sie wird daher bei zeitkritischen Fragen oder zum Nachweis von nicht anzüchtbaren Infektionserregern eingesetzt.

Die im Mikrobiologischen Institut eingesetzten PCR-Verfahren dienen zum einen dem Nachweis eines konkreten Erregers, was bei Verdacht auf resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA) auch im Schnelltest erfolgt, und zum anderen dem Nachweis von krankheitsvermittelnden Bakterienprodukten (sog. Virulenzfaktoren wie z. B. Pantone-Valentine-Leukozidin PVL). Letzteres ist auch dann noch möglich, wenn der Erreger durch die antibiotische Therapie bereits abgetötet und somit nicht mehr kultivierbar ist (<http://www.mikrobiologie.uk-erlangen.de/>).



MALDI-TOF-Verfahren

Die auf Stoffwechselreaktionen beruhenden konventionellen Verfahren zur Identifizierung von Bakterien können weitgehend durch eine massenspektrometrische Analyse der Erregereweisse abgelöst werden, welches einem Fingerabdruck gleichkommt (sog. MALDI-TOF-Verfahren). Hierdurch kann die Zeit bis zur Erregerdiagnose um mindestens 24 Stunden verkürzt werden (Abb. 4). Die MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) Massenspektrometrie hat sich in den letzten Jahren zur bakteriellen Identifikation durchgesetzt und andere Verfahren weitgehend verdrängt. Sie basiert auf der Analyse ribosomaler Proteinspektren von Reinkulturen und ist von der DNA der Erreger unabhängig (Schubert und Wieser 2013).

Ganz ohne Nachteile sind die neuen molekularbiologischen Methoden jedoch nicht. Ein generelles Problem molekularbiologischer Methoden, in denen eine winzige Menge Erbinformation zigtausendfach vervielfacht wird, ist, dass leicht falsch positive Ergebnisse auftreten können. Während die Sensitivität hervorragend ist, ist die Spezifität somit häufig unzureichend. Außerdem müssen die Gendatenbanken, auf denen die computergestützte Auswertung des DNA-Chips beruht, im Hinblick auf neue Anti-

biotikaresistenzen ständig aktualisiert werden, da Resistenzen nur dann erkannt werden können, wenn auch die entsprechende DNA-Sequenz bekannt ist.

Zudem ist trotz der Vielfalt moderner molekularer Verfahren die kulturelle Anzucht weiterhin notwendig. Sie hat meist nicht nur eine höhere Sensitivität, sondern erlaubt auch die einfache Trennung von Mischkulturen sowie eine Unterscheidung zwischen toten und lebenden (anzüchtbaren) Organismen und dies zu meist deutlich geringeren Kosten. Für eine zuverlässige Resistenztestung ist außerdem aufgrund der Vielfalt an möglichen Resistenzmechanismen der Genotyp der phänotypischen Resistenztestung unterlegen. Zudem sollte beachtet werden, dass der Nachweis von Resistenzgenen nicht automatisch zu einer phänotypischen Resistenzentwicklung führt.

Die stete Weiterentwicklung molekularer Testsysteme zielt darauf ab, schnell hochspezifische Resultate zu liefern und die Tests möglichst einfach durchführbar zu machen. Bei vertretbaren Laborkosten werden sich die molekularen Verfahren in der Zukunft mehr und mehr durchsetzen (Schubert und Wieser 2013).

PCR in der mikrobiologischen Diagnostik

- In der jüngsten Vergangenheit hat ein vollkommen neuartiger Ansatz zur Differenzierung von Bakterien und Pilzen die molekulare Diagnostik erweitert:
- Die Identifikation von Keimen mittels MALDI-TOF-MS, die auf der Analyse ribosomaler Proteine beruht.



Abbildung 4: Molekulare Diagnostik mittels MALDI-TOF-Verfahren.

Methoden der phänotypischen Empfindlichkeitsprüfung und Resistenzbestimmung

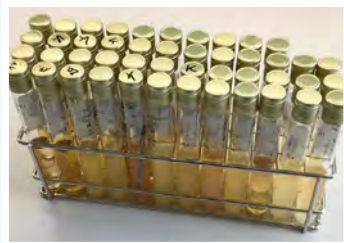
Da antibiotikaresistente Bakterien eine zunehmende Herausforderung für die moderne Medizin darstellen, sind für eine effiziente Behandlung infizierter Patienten neben der Identifizierung der infektiösauslösenden Erreger deren Antibiotika-Empfindlichkeit sowie auftretende Resistenzen von essenzieller Bedeutung. An erster Stelle bei der Empfindlichkeits- bzw. Resistenzbestimmung im Labor stehen die Bakterien-Isolierung aus dem eingesandten Probenmaterial und die Anzucht

einer Reinkultur als Grundvoraussetzung für die phänotypische *In-vitro*-Testung (Rodloff et al. 2008). Diese konventionellen Verfahren sind jedoch zeitaufwendig und benötigen üblicherweise 18 bis 24 Stunden, bei langsam wachsenden Bakterien auch deutlich länger. Es stehen verschiedene Methoden und Testsysteme für die Bestimmung der Empfindlichkeit von Bakterien gegenüber unterschiedlichen Antibiotika zur Verfügung (Abb. 5).

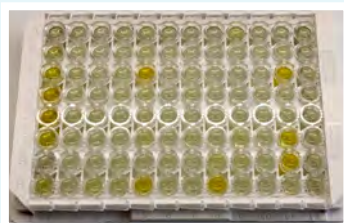
Methoden der phänotypischen Empfindlichkeitsprüfung

MHK-Bestimmung

Bouillon-Verdünnung



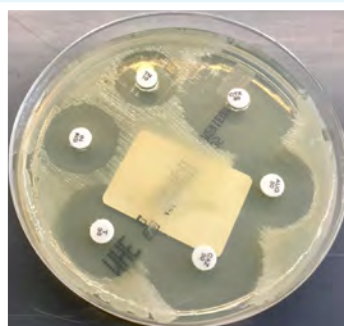
Mikrodilution



E-Test



Agardiffusionstest



Automatisierte Systeme

Vitek (Biomérieux)



Abbildung 5: Unterschiedliche Testmethoden, die für die phänotypische Empfindlichkeitstestung bzw. Resistenzbestimmung zur Verfügung stehen

Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) mittels Mikrodilution, Agardilution oder E-Test

Die minimale Hemmkonzentration (MHK), also die niedrigste Antibiotikakonzentration, bei der kein sichtbares Bakterienwachstum stattgefunden hat (siehe Abb. 6), ist ein Messwert für einen einzelnen Bakterienstamm. So haben unterschiedliche Stämme einer Bakterienart häufig unterschiedliche MHK-Werte. Um dies zu berücksichtigen, hat man den Begriff MHK_{90} eingeführt. Die MHK_{90} ist eine statistische Angabe über eine größere Anzahl von Stämmen. Der MHK_{90} -Wert gibt somit die Konzentration an, bei der 90 % dieser Stämme durch das Antibiotikum im Wachstum gehemmt werden. Die Bestimmung der MHK kann mittels verschiedener Testmethoden erfolgen. Mikrodilution und Agardilution beruhen auf dem

klassischen Reihenverdünnungstest (Abb. 6) bei Reduzierung der Größenverhältnisse vom Makro-Bouillon-Verdünnungstest auf einen Verdünnungstest im Mikromaßstab. Bei der Agardilution wird das Antibiotikum nicht in Bouillon, sondern in Agar verdünnt. Pro Mikrotiterplatte können z. B. zehn Antibiotika getestet werden. Industriell hergestellte Mikrotiterplatten, in die das Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen (1:2-Verdünnung) bereits pipettiert ist, ermöglichen eine große Zeiteinsparung und werden auch zur Erregerdiagnostik eingesetzt. Es gibt auch kombinierte Mikrotiterplatten zur Erregerdiagnostik (Testung spezieller biochemischer Prozesse) und Resistenzbestimmung (Testung verschiedener Antibiotika).

Bouillon-Verdünnungsmethode
als Röhrchen-Verdünnungstest oder auch auf Mikrotiterplatten

1 Antibiotikum-Verdünnungsreihe mit Bouillon

32 16 8 4 2 1 0,5

2 mg/l Antibiotikum-Konzentrat

3 Beimpfen mit Bakterienlösung (Inokulum)

Bebrüten bei 37°C für ca. 18 Std., danach Ablesung: die minimale Hemmkonzentration (MHK) ist die kleinste Konzentration, bei der kein sichtbares Wachstum stattgefunden hat.

MHK = 4 mg/l

Dr. K. Huber

Abbildung 6: Bouillon-Verdünnungsmethode als Vorlage für Mikrotiterplatten.

Bei der **MHK-Bestimmung mittels E-Test** (Abb. 7) werden Kunststoffstreifen verwendet, deren eine Seite mit einer Skala von MHK-Werten kalibriert ist, die 15 Verdünnungsstufen mit dem Faktor 0,5 einschließt. Auf der anderen Streifenseite ist ein definierter Antibiotikagradient aufgebracht. Nach Auflegen des Streifens auf die mit Bakteriensuspension (= Inoculum) beimpfte Agarplatte entsteht unter dem Streifen ein kontinuierlicher Antibiotikagradient. Nach Inkubation der Platten

entsprechend der vorgegebenen Inkubationsbedingungen der getesteten Mikroorganismen werden die Platten abgelesen, sofern ausreichendes Wachstum erzielt ist und eine Hemmhofellipse deutlich sichtbar ist. Die MHK wird am Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der Skala abgelesen. Der Endpunkt wird an der Stelle der vollständigen Wachstumshemmung abgelesen (keine Trübung oder Einzelkolonien).

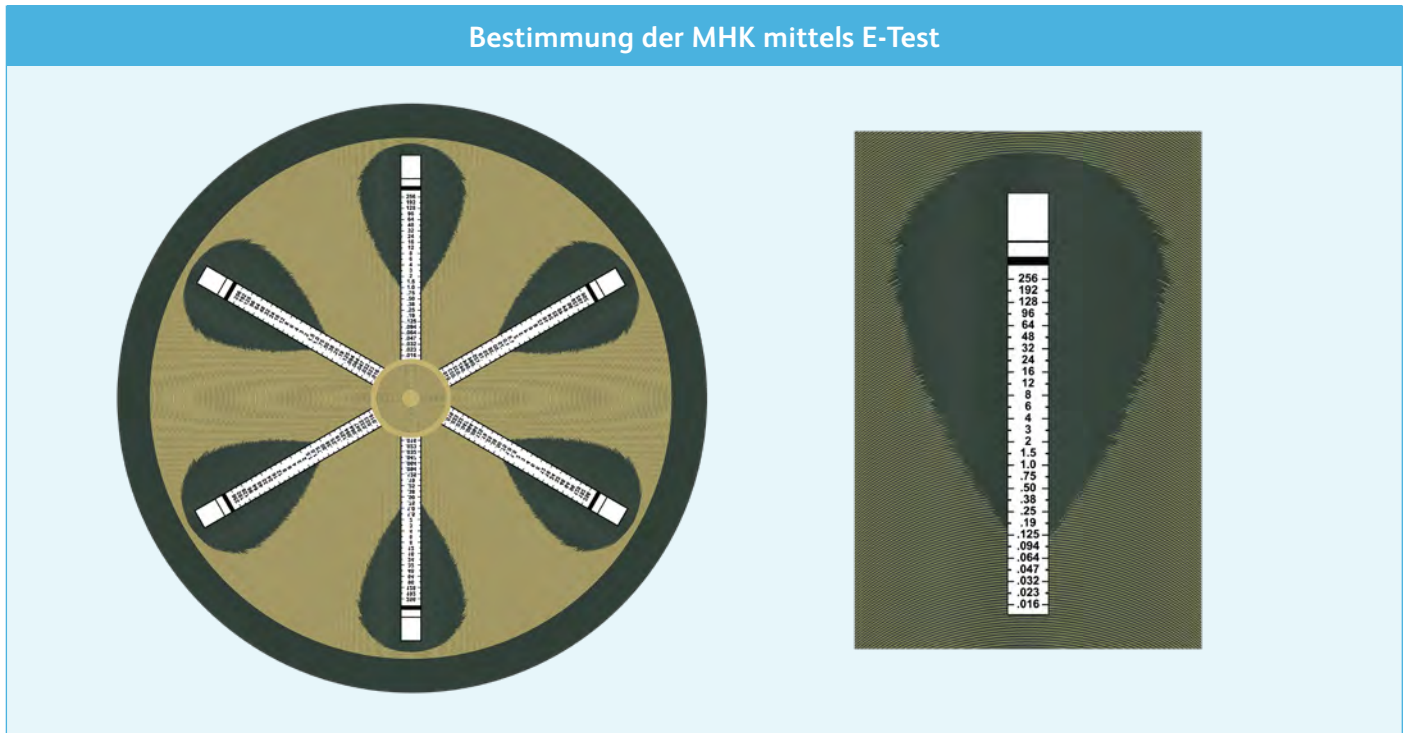


Abbildung 7: Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) unter Einsatz der E-Test-Methode.

Empfindlichkeitstestung mittels Agardiffusion

Antibiotika-beschickte Testblättchen werden auf eine sterile Agarplatte aufgelegt, auf die zuvor die zu testende Bakterienkultur aufgebracht wurde. Die Antibiotika diffundieren in den Agar und hemmen dort das Wachstum der sensitiven Bakterien. Etwa 18 bis 24 Stunden später kann auf den Platten dann ein sogenannter Hemmhof abgelesen werden, der die

Wirkung der Antibiotika markiert (Abb. 8). Vom Durchmesser des Hemmhofs kann auf die minimale Hemmkonzentration (MHK) zurückgeschlossen werden, also jene Konzentration an Antibiotikum, die am Infektionsort mindestens erreicht werden muss, um die Erregervermehrung zu hemmen.

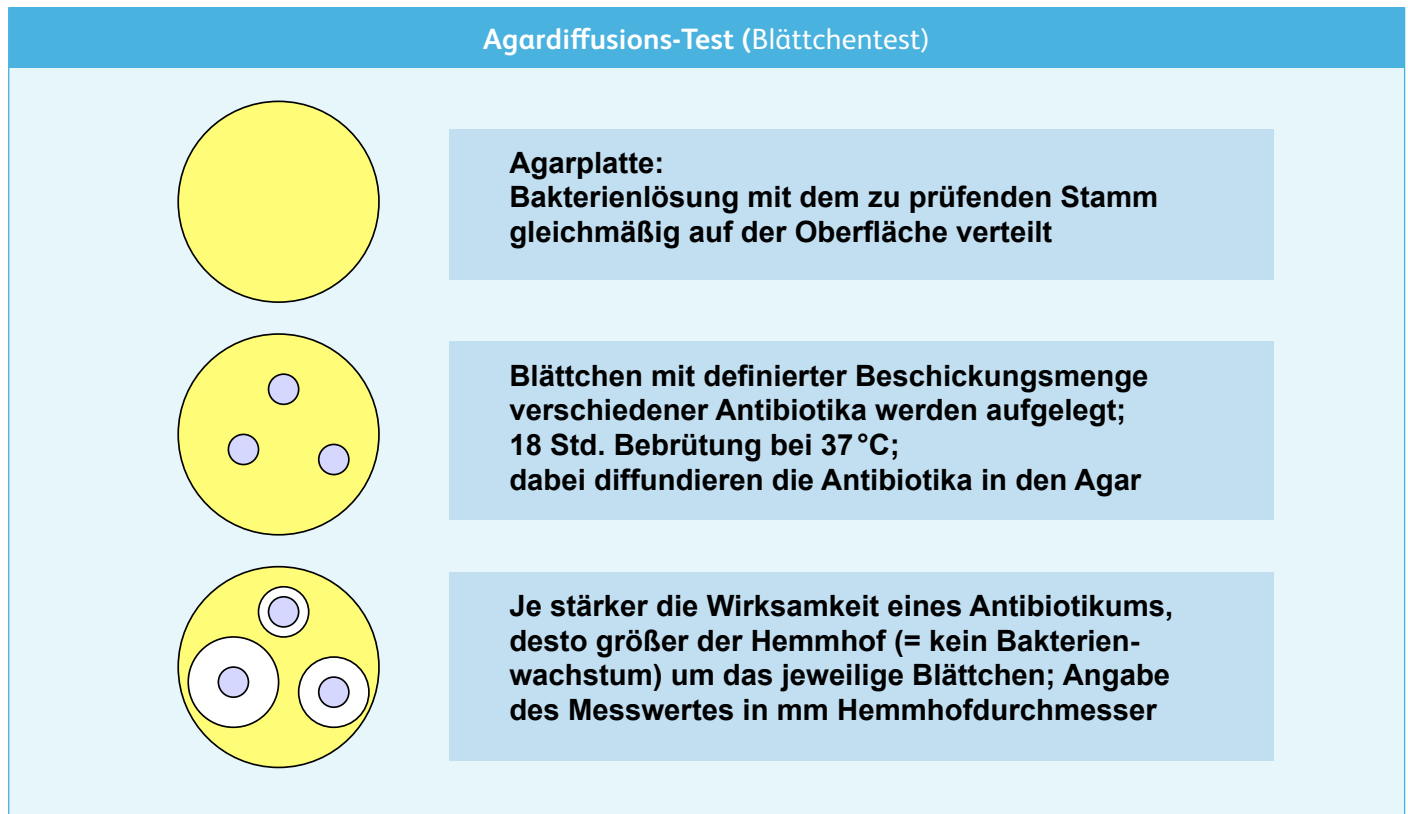


Abbildung 8: Schematischer Ablauf der Empfindlichkeitstestung mittels Agardiffusion..

Grenzwerte als Bewertungsmaßstab für „empfindlich, intermediär und resistent“

Die Wirksamkeit eines Antibiotikums wird über seine *In-vitro*-Wirksamkeit definiert. Der numerische Wert der minimalen Hemmkonzentration (MHK) und des Hemmhofdurchmessers (HHD) geben Informationen darüber, ob ein Erreger *in vitro* gegenüber dem getesteten Antibiotikum empfindlich ist. Die klinische Einstufung der Ergebnisse dieser *In-vitro*-Testungen erfolgt mithilfe von Grenzkonzentrationen, den sogenannten Grenzwerten (im Englischen „Breakpoints“) in die Kategorien „sensibel“, „intermediär“ oder „resistent“. Mitunter werden auch nur die beiden Kategorien „sensibel“ oder „resistent“ angewendet. Diese Ergebnisse werden dem behandelnden Arzt übermittelt und können zur Optimierung der Behandlung eines einzelnen Patienten genutzt werden. Die *in vitro* ermittelten Ergebnisse können allerdings nicht in jedem Fall auf die *In-vivo*-Situation im Patienten übertragen werden, geben aber in der Regel einen richtigen Hinweis für die Therapie. Weiterhin liefern diese Daten auch Informationen zur Epidemiologie und Resistenzsituation – beides wesentliche Kriterien, die für die Wahl der antibiotischen empirischen Initialtherapie entscheidend sind. Diese muss begonnen werden, bevor die Laborergebnisse vorliegen und eine gezielte Therapie nach Erreger und mikrobiologischem Testergebnis erfolgen kann. Mittlerweile liegen für die meis-

ten Antibiotika europäisch harmonisierte Grenzwerte vor, die vom European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) festgelegt wurden (EUCAST 2013). Die Gründung des EUCAST geht auf eine Anfrage der European Medicines Agency (EMA) an die European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) zurück. Die EMA sah in der Harmonisierung von Grenzwerten eine wichtige Voraussetzung für die Auswertung von Empfindlichkeitsdaten im Rahmen europaweiter Zulassungsverfahren für Antibiotika. In Analogie wurden auch für die älteren Antibiotika entsprechende Grenzwerte definiert. Die Mitglieder des EUCAST setzen sich aus Vertretern der nationalen Grenzwertkomitees (in Deutschland die DIN-Kommission) zusammen. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass eine Angleichung der von EUCAST erarbeiteten Grenzwerte an die nationalen Empfehlungen erfolgt. Parallel existieren die entsprechenden US-amerikanischen Empfehlungen des Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Die Grenzwerte für das gleiche Antibiotikum gegenüber derselben Erregerspezies können bei EUCAST und CLSI unterschiedlich ausfallen, was deutliche Unterschiede in den dokumentierten Resistenzraten zur Folge haben kann (Bodmann PEG-Empfehlungen 2010).

Die Festlegung der Grenzwerte für ein Antibiotikum erfolgt auf der Basis vieler Daten. Berücksichtigt werden für die jeweilige Substanz unter anderem:

- Indikationsgebiete
- Dosierung
- Pharmakokinetik
- Pharmakodynamik
- gegebenenfalls die konzentrationsabhängige Toxizität
- Ergebnisse klinischer Prüfungen
- Analyse von Fällen mit Therapieversagen

(Rodloff et al. 2008)

Antibiotika können für ganz unterschiedliche Indikationen zugelassen sein, z. B. für die Behandlung von Harnwegs- und Atemwegsinfektionen, Bauchrauminfektionen oder Sepsis. Unterschiedliche Antibiotikumkonzentrationen in verschiedenen Geweben/Organen können die Festlegung der Grenzwerte erschweren. Sofern neue Indikationsgebiete ergänzt werden, müssen die Grenzwerte eventuell angepasst werden.

Unterschiedliche Dosierungsempfehlungen in Abhängigkeit zur Art der Infektion oder der Schwere der Erkrankung werden unter anderem über den Intermediärbereich berücksichtigt. Insbesondere als intermediär getestete Infektionserreger sollten mit einer hohen Dosis des entsprechenden Antibiotikums behandelt werden (Rodloff et al. 2008).

Von besonderer Bedeutung für die Grenzwertfindung sind die pharmakokinetischen Eigenschaften eines Antibiotikums. Zur Pharmakokinetik zählen insbesondere:

- die Dauer der Halbwertszeit
- der Anteil der Eiweißbindung der Substanz
- die Serumspiegelverläufe
- die Konzentrationen in unterschiedlichen Geweben

Probandendaten werden heute mittels Monte-Carlo-Simulation auf große Kollektive übertragen und geben einen besseren Eindruck möglicher interindividueller Schwankungen

(Rodloff et al. 2008)

Auch die Pharmakodynamik eines Antibiotikums wird bei der Festlegung von Grenzwerten entsprechend berücksichtigt.

Zu den wichtigen pharmakodynamischen Daten zählen:

- MHK-Verteilungen für die in den Indikationsbereichen vorkommenden Infektionserreger
- Vergleiche von MHK und minimaler bakterizider Konzentration
- Absterbekinetiken
- Inokulumeffekte
- tierexperimentelle Daten

(Rodloff et al. 2008)

MHK-Verteilungen für eine Erregerspezies weisen oft eine bimodale Verteilung auf. Der epidemiologische Cut-off-Wert trennt auf der Grundlage von MHK-Werten eine Wildtyp-Population (= natürlich empfindliche Population mit niedrigen MHK-Werten) von einer Nicht-Wildtyp-Population (Bakterienstämme mit [zusätzlich] erworbenen Resistenzeigenschaften und demnach höheren MHK-Werten) (Wallmann et al.

2014). Um die Grenzwerte festzulegen, ist die Kombination der Monte-Carlo-Simulationen aus der Pharmakokinetik mit tierexperimentellen Daten aus der Pharmakodynamik wegweisend. Klinische Prüfungen erlauben eine Analyse der Zusammenhänge zwischen MHK-Werten der Infektionserreger und dem klinischen bzw. mikrobiologischen Therapieergebnis (Rodloff et al. 2008).

Grenzwerte (Breakpoints) für Antibiotika geben an, dass bei einem bestimmten Hemmhofdurchmesser bzw. einem bestimmten MHK-Wert die Erreger als:

- sensibel, intermediär oder resistent

eingestuft werden können. Grenzwerte werden für parenterale und orale Antibiotika von Kommissionen festgelegt (EUCAST, CLSI).

Die Grenzwertfindung erfolgt anhand der Pharmakokinetik (Serumkonzentrationen, Gewebekonzentrationen, Verteilung u. a.), der Pharmakodynamik (Absterbekinetiken, tierexperimentelle Daten u. a.) sowie anhand der Erregerelimination *in vivo*. Hierbei erfolgt eine Korrelation der bakteriologischen Erregereradikation in kontrollierten klinischen Studien (*In-vivo*-Ergebnisse) mit den im Labor ermittelten MHK-Werten dieser Erreger (*In-vitro*-Testergebnisse)

(Rodloff et al. 2008)

Automatisierte Systeme VITEK® (bioMérieux) und Phoenix™ (Becton Dickinson)

Vorgefertigte – mit Antibiotika in verschiedenen Konzentrationen beschickte – Testkarten werden mit Bakteriensuspension beimpft und inkubiert. Das Bakterienwachstum wird über photometrische Trübungsmessung registriert und per Computer ausgewertet. Bestimmte Resistenzmechanismen – als Beispiel sind hier MRSA und ESBL-bildende Enterobacteriaceae zu nennen – können über das System erfasst werden. Für zahlreiche Keim-Antibiotika-Kombinationen gibt es somit kommerzielle, miniaturisierte Systeme, die eine automatische Messung der minimalen Hemmkonzentration erlauben. Softwaregestützte

Expertensysteme übernehmen dabei die prinzipielle Interpretation der gemessenen MHKs und liefern oftmals in deutlich weniger als 24 Stunden eine Einschätzung, ob bei einem gegebenen Erreger und einem gegebenen Antibiotikum klinisch ein Therapieerfolg erwartet werden kann oder nicht. Die tatsächliche Zeitersparnis gegenüber der eher manuellen Agardiffusion kann im optimalen Fall 12 bis 14 Stunden betragen. Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen Testmethoden zeigt Abbildung 9.

Methoden der phänotypischen Empfindlichkeitsprüfung		
Methode	Read-out	Vor- / Nachteile
Mikrodilution	MHK	<ul style="list-style-type: none"> ● Exakt ● Arbeitsaufwendig ● Keine Automatisierung
Gradiententest	MHK	<ul style="list-style-type: none"> ● Flexibel ● QM ● Unhandlich ● Keine Automatisierung
Agardiffusion	S/I/R	<ul style="list-style-type: none"> ● Leicht durchführbar ● Flexibel ● Keine Automatisierung
Automatisierte Systeme	MHK (z. T. abgeleitet)	<ul style="list-style-type: none"> ● Leicht durchführbar ● Skalierbar ● Nur indirekte Methode ● Unflexibel

Abbildung 9: Vor- und Nachteile der unterschiedlichen phänotypischen Testmethoden (nach Rohde, UKE Hamburg).

Für die First-line-Testung stehen automatisierte Systeme oder Agardiffusion zur Verfügung; sofern auffällige Resistenzphänotypen vorliegen, erfolgt eine gezielte Nachtstung (E-Test > Mikrodilution). Inhärente Probleme sind die enge Bindung an die Hersteller-Panel (Überarbeitung/Anpassung nur langsam) sowie die Notwendigkeit des Anstoßes der Nachtstung in der Klinik, einhergehend mit einer verzögerten Verfügbarkeit

von relevanten Daten in der Frühphase der Behandlung. Auch werden Reservesubstanzen in einigen Laboren erst verzögert getestet. Die Werte der minimalen Hemmkonzentrationen (MHK-Werte) der automatisierten Systeme werden nicht immer herausgegeben, da nicht die Zahl als solche, sondern das Verhältnis zum Grenzwert von Bedeutung ist. Da sich Grenzwerte für Antibiotika an verschiedenen Parametern orientieren

(siehe hierzu Kapitel Grenzwerte), kann z. B. für ein bestimmtes Antibiotikum ein höherer MHK-Wert als sensibel eingestuft werden, wenn dessen Grenzwert vergleichsweise höher liegt, als bei niedrigerer MHK eines anderen Antibiotikums, dessen Grenzwert für sensibel deutlich niedriger angesetzt wurde.

Zur Analysegeschwindigkeit von Probenentnahme über Kultur zur Empfindlichkeitsprüfung und deren Ergebnis siehe Abbildungen 10a und 10b.

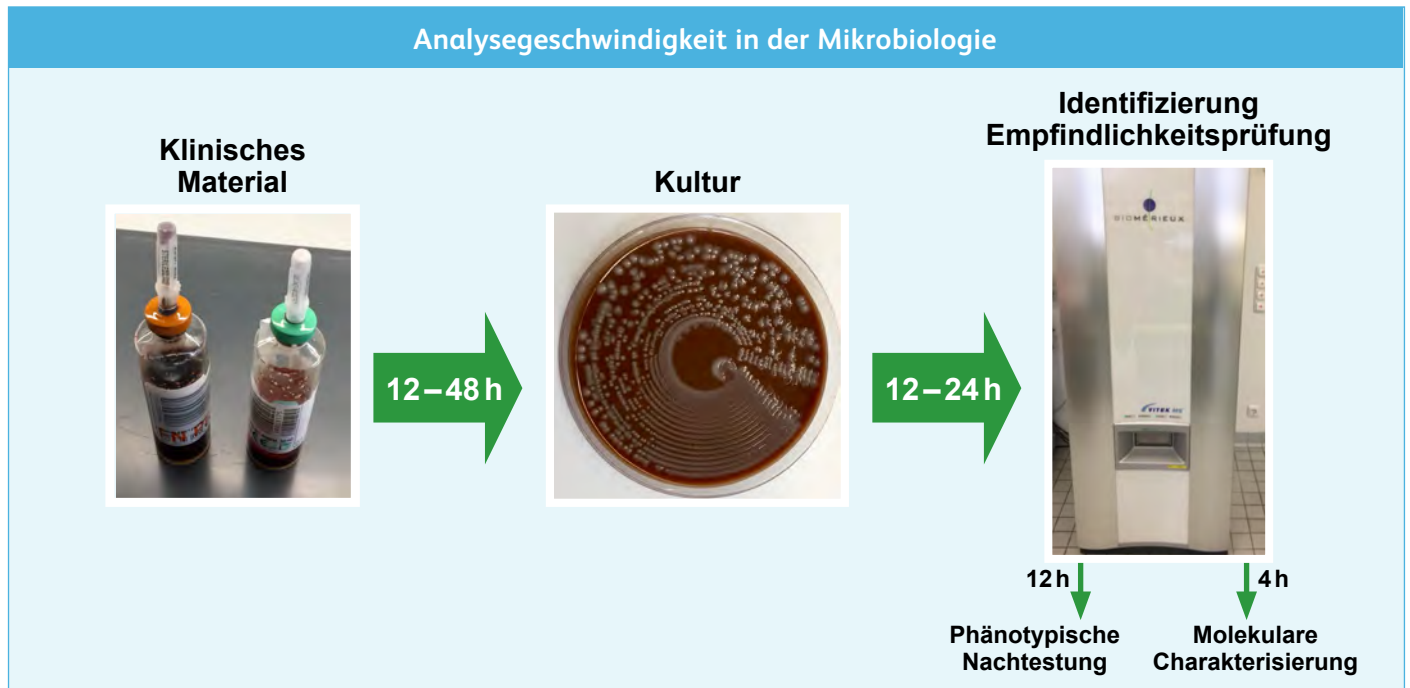


Abbildung 10a: Analysegeschwindigkeit in der Mikrobiologie (nach Rohde, UKE Hamburg).

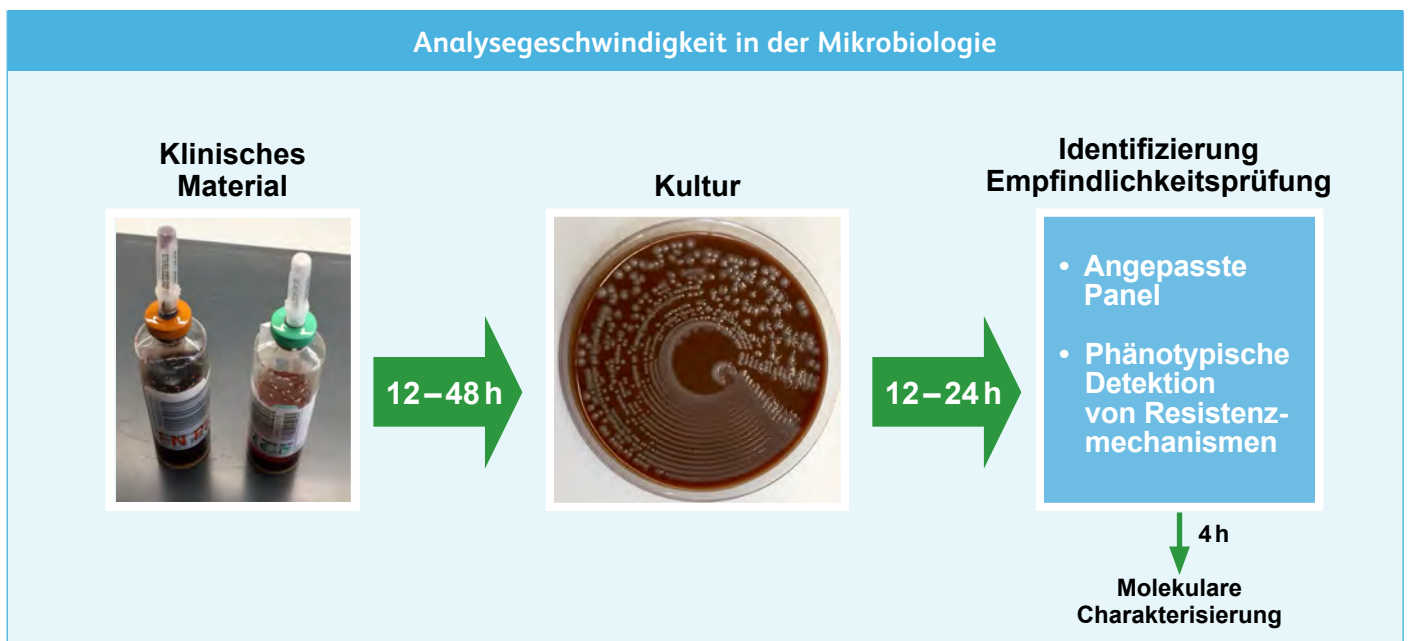


Abbildung 10b: Analysegeschwindigkeit in der Mikrobiologie (nach Rohde, UKE Hamburg).

Molekularbiologische Verfahren zur Empfindlichkeitsprüfung und Resistenzbestimmung

Molekularbiologische Verfahren zeichnen sich – wo anwendbar – durch besondere Schnelligkeit aus. Sie sind kulturunabhängig und können sogar direkt von Patientenproben, beispielsweise von einem Abstrich, durchgeführt werden, sodass die Zeit für Isolierung und Reinkultur entfällt und die Tests innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden können. Anwendbar ist dies für den Resistenzmechanismus bei Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Im Falle von MRSA stellen die PCR-basierten Methoden somit eine wesentliche Säule im Hygienemanagement dar. Je früher ein MRSA-Träger als solcher erkannt wird, desto rascher können adäquate Maßnahmen ergriffen werden, um die Übertragung dieses MRSA auf andere Personen im Krankenhaus zu verhindern. Diese schnelle und zuverlässige Diagnostik ermöglicht seit einigen Jahren ein konsequentes Screening von Patienten aus Risikogruppen, die ins Krankenhaus eingeliefert werden. Auch für andere Bakterienarten sind solche Testmethoden wünschenswert, insbesondere bei multiresistenten gramnegativen Erregern, beispielsweise Enterobacteriaceae wie *E. coli* oder *Klebsiella pneumoniae*. Im Gegensatz zu MRSA, bei denen im Wesentlichen ein Gen für den Resistenzmechanismus verantwortlich ist, gibt es bei Enterobacteriaceae jedoch eine Vielzahl an unterschiedlichen Resistenzmechanismen (siehe hierzu auch die CME Module „Resistenzmechanismen“ Teil 1 und Teil 2), die mittels normaler

PCR nicht alle erfasst werden können. Auch ist ein vorhandenes Resistenzgen noch nicht allein entscheidend für die tatsächliche Ausprägung der Resistenz, sodass eine zusätzliche Prüfung der Bakterienkultur auf Agar nötig sein kann. Beispiel: Bei der Bewertung der Carbapenem-Empfindlichkeit im Rahmen der Routine-Empfindlichkeitsprüfung ist die reine Anwendung der klinischen Grenzwerte nicht geeignet, um mit ausreichender Sicherheit Carbapenemase-produzierende Isolate zu erkennen. Auch bei MHK-Werten unterhalb der klinischen Grenzwerte/Breakpoints ist die Carbapenem-Therapie nicht sicher. Eindeutiger ist der molekulare Nachweis von Resistenzdeterminanten. Als Beispiel sei hier der „Cepheid GeneXpert MDRO Assay“ direkt aus z. B. Rektalabstrich, Stuhl etc. genannt, der innerhalb von ca. 1 Stunde erfolgen kann. Allerdings ist hier kein Nachweis der OXA-Carbapenemasen (insbesondere OXA-23 und OXA-48) und IMP-Carbapenemasen möglich; nur KPC, VIM und NDM können erfasst werden (siehe hierzu CME-Module „Resistenzmechanismen“ Teil 1 und Teil 2).

Übersicht wichtiger Maßnahmen zur bakteriellen Diagnostik und Empfindlichkeitsprüfung bzw. Resistenztestung bei bakteriellen Erregern nosokomialer Infektionen

Für Bakterien, die häufig als Erreger nosokomialer Infektionen in der Klinik isoliert werden, gibt Tabelle 1 eine Übersicht und Zusammenstellung der verfügbaren diagnostischen Maßnahmen.

Tabelle 1: Bakteriologische Diagnostik: Überblick zu Diagnostik und Untersuchungsmaterial (<http://www.tu-dresden.de/medimm/> Technische Universität Dresden 2016).

Erreger	Untersuchungsmaterial	Nachweisverfahren	Bemerkungen
Aerobe Bakterien (kultivierbar)			
<p><u>Aerobe Kokken</u> (<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Neisseria</i> spp.)</p> <p><u>Aerobe Stäbchen</u></p> <p>– Enterobakterien (<i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Proteus</i> spp., <i>Salmonella</i> spp., <i>Shigella</i> spp., <i>Yersinia</i> spp. etc.)</p> <p>– Nonfermenter (<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Stenotrophomonas</i> spp.)</p>	<ul style="list-style-type: none"> – Blutkultur – Abstrich – Sputum – Bronchialsekret – Bronchialalveoläre Lavage (BAL) – Urin – Punktat – Sekret – Biopsiematerial – Liquor – Stuhl 	<ul style="list-style-type: none"> – Mikroskopie (abhängig von der Art des Materials) – Erregerkultur und biochemische Prüfung – Ggf. molekularbiologischer Nachweis (PCR). Sequenzierung (Speziesidentifizierung) – Resistenztestung (Mikrodilution, Agardiffusion, E-Test) pathogener Erreger – Antigennachweis <p>Anforderungen:</p> <ul style="list-style-type: none"> – „Bakterielle Erreger und Resistenz“ – bei Stuhlproben „Ambulante Enteritiserreger (TPE)“ – Tuberkulosedagnostik – Screening-Diagnostik (MRE-Diagnostik) 	<ul style="list-style-type: none"> – Resistenztestung in Abhängigkeit von Material, Art und Anzahl der Erreger – Blutkulturen immer gepaart (aerob/anaerob) einsenden! Bei Kindern sind die Kinderflaschen erforderlich. – für molekularbiologischen Nachweis (PCR) aus Urogenitalabstrichen ist ein Spezial-Entnahmeset notwendig.
	– Serum (2 ml)	– Antikörperserologie	– Als Hinweis auf systemische Infektionen oder extraintestinale Komplikationen (Reaktive Arthritis, etc.)

Literatur

Bodmann KF, Grabein B. Empfehlungen zur kalkulierten parenteralen Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2010. *Chemother J* 2010;19: 179–255

Geiss HK. Präanalytik: Materialauswahl, Probenentnahme, Lagerung und Transport. In: *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie – Parasitologie*. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.). 2. Aufl., Stuttgart: Thieme 2009:126–134

Hammann R. Präanalytik: Materialauswahl, Probenentnahme, Lagerung und Transport. In: *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie – Parasitologie*. Neumeister B, Geiss HK, Braun RW, Kimmig P (Hrsg.). 2. Aufl., Stuttgart: Thieme 2009:132–133

Universitätsklinikum Erlangen, Institut für Klinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene. *Moderne Mikrobiologische Diagnostik mit Bereitschaftsdienst*. <http://www.mikrobiologie.uk-erlangen.de/diagnostik> (Letzter Zugriff 3. September 2018)

Technische Universität Dresden, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene. *Bakteriologische Diagnostik. Version 04/2016*. <https://tu-dresden.de/med/mf/mib/ressourcen/dateien/diagnostik/Laborleistungsverzeichnis/Bakteriologische-Diagnostik.pdf?lang=de> (Letzter Zugriff 4. September 2018)

Robert Koch-Institut. *Fachgebiet 13 Nosokomiale Infektionserreger und Antibiotikaresistenzen. Stand 5. Dezember 2016*, https://www.rki.de/DE/Content/Institut/OrgEinheiten/Abt1/FG13/fg13_node.html (Letzter Zugriff 4. September 2018)

Halangk D, Lauf H. *Grundlagen der mikrobiologischen Diagnostik*. http://www.med.uni-magdeburg.de/unimagdeburg_mm/Downloads/Institute/IMMB/Leistungsspektrum/Grundregeln+der+mikrobiologischen+Diagnostik.pdf (Letzter Zugriff 4. September 2018)

Rodloff A, Bauer T, Ewig S, Kujath P, Müller E. *Sensibel, intermediär und resistent – Wirkintensität von Antibiotika*. *Dtsch Arztebl* 2008;105(39):657–662

Schubert S, Wieser A. *Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik*. *Biospektrum* 2013;19(7):743–747

Wallmann J, Kaspar H, Potschka H. *Klinische Grenzwerte für die Klassifizierung von MHK-Werten unter Berücksichtigung der Bakterienspezies, Indikation und Tierart*. In: *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. Löscher W, Ungemach FR, Kroker R (Hrsg.). Stuttgart: Thieme 2014:716–721

Witte W, Strommenger B, Klare I, Werner G. *Bakterielle Erreger von Krankenhausinfektionen mit besonderen Resistenzen und Multiresistenzen*. *Bundesgesundheitsbl – Gesundheitsforsch – Gesundheitsschutz* 2004;47:352–362

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *Clinical breakpoints. Stand 7. Januar 2013*, www.eucast.org/clinical_breakpoints

