

Diagnose der Infektion und Stellenwert von Biomarkern

Frank M. Brunkhorst, R.P.H. Schmitz

2.1 Einleitung – 18

2.2 Mikrobiologische Sepsisdiagnostik – 18

2.2.1 Blutkulturdiagnostik – 18

2.2.2 Erregernachweis mittels kulturunabhängiger Verfahren – 25

2.3 Sepsisbiomarker – 30

2.3.1 Procalcitonin (PCT) – 31

2.3.2 C-reaktives Protein (CRP) – 33

2.3.3 Lipopolysaccharidbindendes Protein (LBP) – 34

2.3.4 Interleukin-6 (IL-6) – 34

2.4 Fazit – 34

Literatur – 35

2.1 Einleitung

Das bisherige Scheitern neuer Ansätze zur Behandlung der Sepsis ist eng mit den Defiziten einer differenzierten Diagnosemöglichkeit verbunden. Der Zeitpunkt der Diagnose und damit die frühzeitige Initiierung therapeutischer Maßnahmen ist jedoch die entscheidende Determinante der hohen Letalität (Levy et al. 2003).

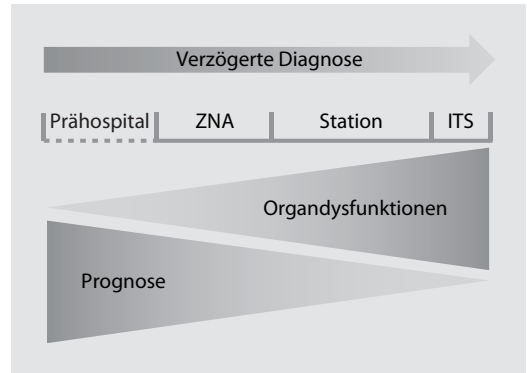
Sowohl im prä- als auch im intrahospitalen Verlauf der Erkrankung vergehen häufig mehrere Stunden bis Tage bis zur Diagnose und schließlich adäquaten Behandlung (■ Abb. 2.1), da es gegenwärtig keine angemessenen Mittel gibt, den Übergang einer lokal begrenzten Infektion zu einer schweren Sepsis sicher vorherzusagen. Ursache ist die geringe Spezifität klinischer Symptome und klassischer Inflamationszeichen für die Diagnose einer Sepsis (wie z. B. Temperaturerhöhung oder -erniedrigung, Leukozytose, Thrombozytenabfall und die Herzfrequenz). Eine frühzeitigere Diagnose mittels sensitiver und spezifischer Biomarker könnte dazu beitragen, die hohe Letalität und Morbidität zu reduzieren.

- **Die Diagnose der schweren Sepsis erfolgt häufig zu spät, weil der Übergang einer lokal begrenzten Infektion zu einer schweren Sepsis nicht sicher vorherzusagen ist. Klinische Symptome und klassische Inflamationszeichen sind für die Diagnose einer Sepsis nicht ausreichend spezifisch.**

2.2 Mikrobiologische Sepsisdiagnostik

2.2.1 Blutkulturdiagnostik

Der Nachweis von Mikroorganismen durch die Blutkultur ist für eine adäquate antimikrobielle Therapie der Sepsis unabdingbare Voraussetzung. Die Kenntnis des Erregers und seiner Antibiotikaempfindlichkeit mittels der Blutkulturdiagnostik erlaubt nach Einleitung einer empirischen Therapie eine gezielte antimikrobielle Therapie und stellt die Weichen für weitere diagnostische Maßnahmen. Dies verbessert die Prognose (Ibrahim et al. 2000;



■ **Abb. 2.1** Sowohl im prähospitalen als auch im intrahospitalen Verlauf der Sepsis können mehrere Stunden bis zur Erstdiagnose und damit Einleitung einer adäquaten Therapie vergehen (ZNA = Zentrale Notaufnahme, ITS = Intensivstation)

MacArthur et al. 2004), verkürzt die Liegedauer und hilft, eine antimikrobielle Übertherapie zu vermeiden. Die Blutkulturdiagnostik ist damit eines der wichtigsten mikrobiologischen Untersuchungsverfahren in der Therapie der Sepsis.

Je nach Infektionsursprung variiert die Positivität von Blutkulturen. Bei Endokarditis ist diese >90%, bei bestimmten Diagnosen allerdings vergleichsweise gering, z. B. <10% im Mittel bei der ambulant erworbenen Pneumonie oder dem Erysipel. Bei anderen Infektionen wie Pyelonephritis, Cholangitis, Leberabszess, septischer Arthritis, Spondylodiszitis sowie bei Fieber in Neutropenie liegt die Positivitätsrate dagegen sehr viel höher zwischen 30 und 70% (Seifert et al. 2007) (■ Tab. 2.1).

Der Nachweis einer Bakteriämie oder Fungämie bei schwerer Sepsis oder septischem Schock gelingt unter kontrollierten Studienbedingungen – wo eine Blutkulturdiagnostik für den Studieneinschluss gefordert wird – in ca. 30–40% der Fälle. So wiesen in der multizentrischen deutschen MAXSEP-Studie (Brunkhorst et al. 2012) 33% der Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock klinisch relevante Bakteriämien auf. Dabei war *Escherichia coli* der häufigste gramnegative Sepsiserreger (19%), während *Pseudomonas* spp. nur in ca. 4% nachgewiesen wurden (■ Abb. 2.2). Unter den grampositiven Erregern waren *Staphylococcus aureus* (7%) und Methicillin-empfindliche koagulase-negative Staphylokokken (22%) die häufigsten

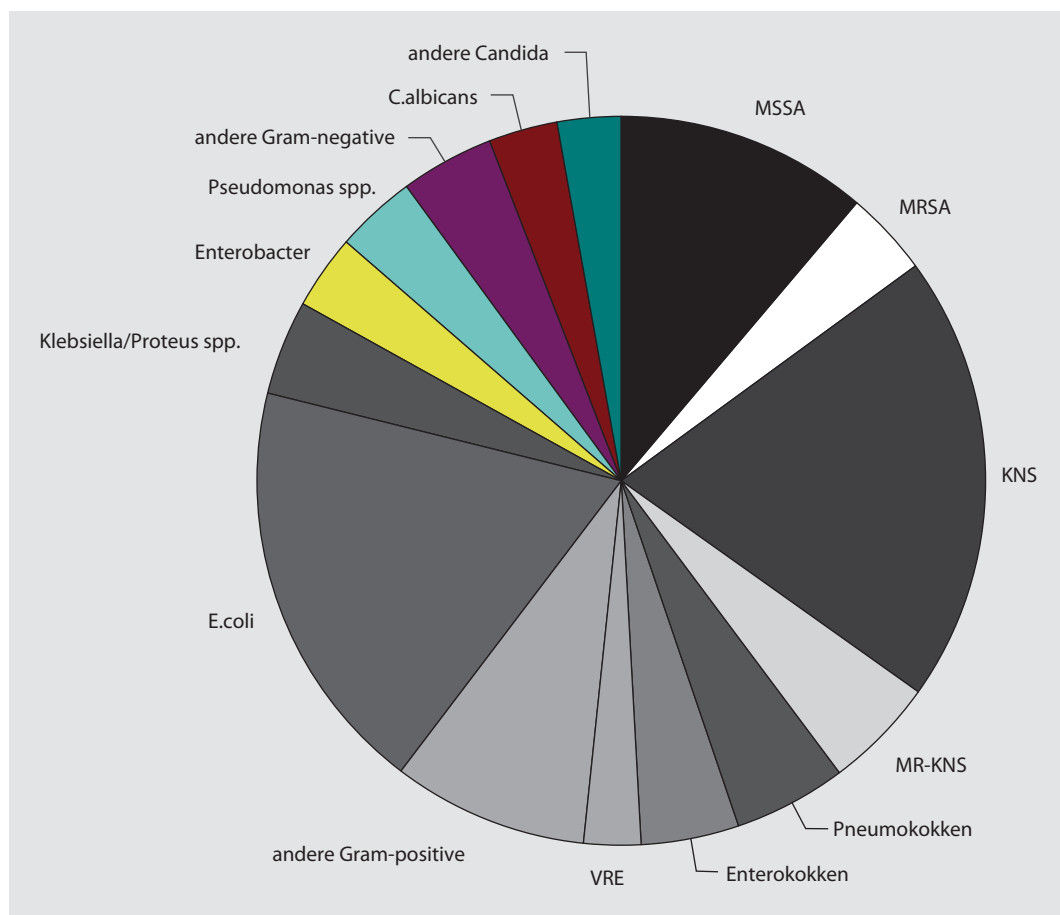
Tab. 2.1 Anteil mikrobiologisch dokumentierter Infektionen und Häufigkeit positiver Blutkulturen in randomisierten multizentrischen Studien zu adjunktiven und supportiven Therapieverfahren bei Patienten mit schwerer Sepsis und septischem Schock

Quelle	Patienten, (n)	Dokumentierte Infektion (%)	Atemwege (%)	Urogenital (%)	Abdominal (%)	Bakteriämie (%)
Bone et al. (1995)	530	100	42	33	22	40
Abraham et al. (1995)	994	73	28	18	15	39
Cohen u. Carlet (1996)	420	77	24	9	23	38
Bernard et al. (1997)	455	76	47	10	15	35
Abraham et al. (1997)	444	61	–	–	–	–
Opal et al. (1997)	696	85	37	11	31	37
Abraham et al. (1998)	1879	74	30	12	12	41
Dhainaut et al. (1998)	608	73	26	11	30	35
Angus et al. (2000)	1090	84	19	22	31	–
Panacek et al. (2000)	2634	72	26	–	25	39
Warren et al. (2001)	2314	62	34	7	28	34
Bernard et al. (2001)	1690	67	54	10	20	33
Abraham et al. (2003)	1754	74	51	12	28	30
Brunkhorst et al. (2008)	537	64	41	9	38,5	23
Brunkhorst et al. (2012)	551	80	45	14	36	33

Erreger, während Methicillin-resistente Staphylokokken (MRSA) nur in 4% der Fälle nachgewiesen wurden. *Candida albicans* und *C. glabrata* wurden in insgesamt 6% der Fälle nachgewiesen.

➤ **Im klinischen Alltag deutscher Intensivstationen sind jedoch nur ca. 10% der Blutkulturen bei Patienten mit schwerer Sepsis positiv.**

So konnte trotz klinischer Zeichen einer schweren Sepsis in der SepNet-Prävalenzstudie (► Abschn. 1.3) lediglich in 55% der Fälle die zugrundeliegende Infektion mikrobiologisch nachgewiesen und nur in 9,6% der Fälle durch eine positive Blutkultur dokumentiert werden (Engel et al. 2007). Der Anteil mikrobiologisch dokumentierter Infektionen nahm mit einer geringeren Größe des Krankenhauses und der damit verbundenen reduzierten

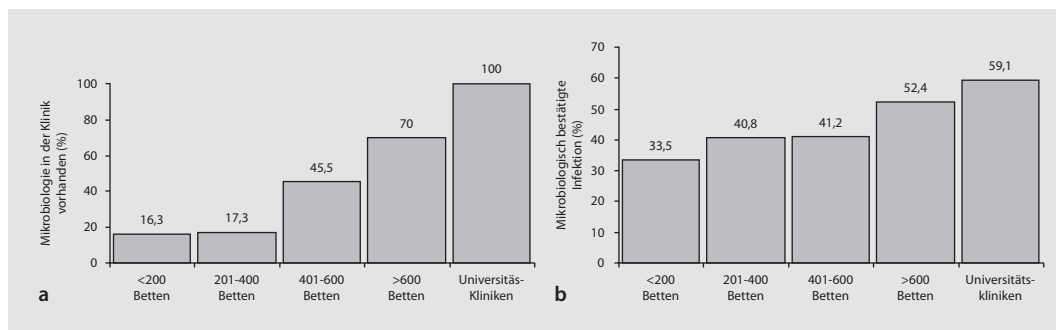


■ **Abb. 2.2** Prozentuale Verteilung von 231 Blutkulturisolaten bei 551 Patienten mit schwerer Sepsis bzw. septischem Schock, Ergebnisse der MAXSEP-Studie (Brunkhorst et al. 2012) [MSSA = Methicillin-sensitiver *Staphylococcus aureus* (7%), MRSA = Methicillin-resistenter *S. aureus* (4%), KNS = koagulase-negative Staphylokokken (22%), MR-KNS = Methicillin-resistente koagulase-negative Staphylokokken (5%), VRE = Vancomycin-resistente Enterokokken (3%)]

Verfügbarkeit eines mikrobiologischen Labors am Standort der Klinik ab (■ Abb. 2.3).

Die Rate an abgenommenen Blutkultur-Sets sollte je nach Ausrichtung des Krankenhauses (Regel-, Schwerpunkt-, Maximalversorgung) zwischen 100 und 200 auf 1.000 Patiententage, die Positivitätsrate (Anteil von positiven Blutkulturen unter allen abgenommenen Blutkulturen) nicht unter 5% und nicht über 15% betragen (Seifert et al. 2007; Baron et al. 2005). Die Referenzwerte stammen allerdings hauptsächlich aus US-amerikanischen »sentinel-reports«, und Befragungsstudien und wurden für Deutschland übernommen.

Aktuelle Daten weisen auf ein erhebliches und weithin unterschätztes Defizit in der Veranlassung einer adäquaten mikrobiologischen Diagnostik der Sepsis hin und legen einen nicht leitliniengerechten Umgang mit der Blutkulturdiagnostik insbesondere auf deutschen Intensivstationen nahe. Nach einer Erhebung des Nationalen Referenzzentrums für Surveillance von Nosokomialen Infektionen (NRZ) an 223 beteiligten Intensivstationen des Krankenhaus Infektions-Surveillance System (KISS) wurden im Jahr 2006 im Median 60 Blutkulturpaare (BK) pro 1.000 Patiententage mit einer großen Variationsbreite von 3,2–680/1.000 abgenommen (Gastmeier



■ **Abb. 2.3a, b** Verfügbarkeit eines mikrobiologischen Vor-Ort-Labors (a) und mikrobiologisch dokumentierte Infektionsraten bei Sepsis, schwerer Sepsis und septischem Schock auf deutschen Intensivstationen (b) in Abhängigkeit von den Bettenzahlen der Krankenhäuser mit Intensivstationen, welche über eine mindestens 24-stündige Beatmungsmöglichkeit verfügen. (Daten aus der SepNet-Prävalenzstudie 2003; Engel et al. 2007)

et al. 2011). Eine Erhöhung der BK-Untersuchungshäufigkeit von 1 BK-Set/10 Patiententage führte zu einer 1,37-fach höheren Inzidenzdichte bei allen Sepsisfällen (95%CI 1,12–1,6) bzw. zu einer 1,27-fach höheren Inzidenzdichte bei der ZVK-assoziierten Sepsis (95%CI 1,04–1,55). Die Autoren folgern, dass, sofern ein externes Benchmarking der Intensivstationen beabsichtigt ist, eine Adjustierung der ZVK-assoziierten Sepsisraten entsprechend der BK-Abnahmehäufigkeit zwingend erforderlich ist.

Praxistipp

Eine ausreichende Blutkultivierungsfrequenz sollte sich daher als Qualitätsstandard in der Sepsisdiagnostik etablieren.

Stellenwert der Blutkulturdiagnostik für die Surveillance von Antibiotikaresistenzen

Die WHO hat 2011 Antibiotikaresistenz, Krankenhausinfektionen und Infektionskontrollmaßnahmen zum wichtigsten klinischen Forschungsfeld erklärt. Der Überwachung der Resistenzentwicklung hat sich eine Reihe von Arbeitsgruppen national und international seit Längerem gewidmet. So werden unter dem Dach des European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARS-Net; ► <http://www.ecdc.europa.eu>), des German Network for Antimicrobial Resistance

System (GENARS), der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG), aber auch seitens bundeslandbezogener deutscher Netzwerke, wie des Antibiotika-Resistenz-Monitoring in Niedersachsen (ARMIN) seit Jahren kontinuierlich Resistenzstudien und laufende Beobachtungen durchgeführt. Die Grundlage für diese Auswertungen bilden überwiegend Daten aus dem stationären Bereich. Eine Erkenntnis dieser Studien ist die national unterschiedliche Entwicklung der Antibiotikaresistenz.

Zwischen verschiedenen Ländern, die im Rahmen von EARS-Net über Blutkultur- und Liquorbefunde an der Beobachtung der Resistenzentwicklung teilnehmen, sind deutliche Unterschiede festzustellen. Ein gemeinsames Problem dieser Surveillance-Daten stellt die Qualität der berichteten krankenhausbzw. patientenbezogenen sowie der laborbezogenen Bezugsgrößen (»denominator data«) zur Antibiotikaresistenz dar; so erfolgt die Angabe der Resistenz meistens lediglich als Resistenzrate in % (Anzahl resistente Erreger/Anzahl getestete Erreger) $\times 100$, pro Jahr).

Da der Anteil der resistenten Bakterien abhängig ist von Unterschieden in der klinischen Praxis der Blutkulturdiagnostik (Bouza et al. 1999), von Unterschieden in den Charakteristika der Institutionen (u. a. Krankentyp, Anteil an Intensivstationen) und dem Case-Mix auf den jeweiligen Stationen und im Krankenhaus sowie von Unterschieden in der Verfügbarkeit mikrobiologischer Laboratorien, kann eine populationsbezogene Einschätzung ohne

Kenntnis dieser Daten nicht valide erfolgen (Cardo et al. 2004; Voss et al. 1994).

Für den EARS-Net-Bericht werden seit 2008 jährlich per Fragebogen von den teilnehmenden Labors die Gesamtzahlen der prozessierten Blutkultur-Sets und von den klinischen Einrichtungen Angaben über Krankenhaustyp, Bettenzahlen, Patientenliegetage und Patientenaufnahmen erhoben. Die Zahl der Einrichtungen ist jedoch nicht repräsentativ. Klinische Daten, z. B. zum Case-Mix, oder patientenbezogene Daten, z. B. zur jeweiligen Fallschwere und zum Outcome werden nicht erhoben. Erschwerend kommt hinzu, dass sich die Strukturen der Gesundheitssysteme und die Affiliation zwischen Labors und Krankenhäusern in den einzelnen Ländern z. T. erheblich unterscheiden.

Im EARS-Net Report 2012 (► <http://www.ecdc.europa.eu>) lieferten nur 53 deutsche Krankenhäuser Informationen zur Bettenanzahl bzw. Liegedauer und lediglich 11 mikrobiologische Labors Informationen zur Gesamtanzahl der untersuchten Blutkultur-Sets. Im EARS-Net Report 2009 sind populationsbezogene Angaben zur Antibiotikaresistenz aufgrund der geringen Anzahl von Ländern mit Denominator-Angaben nicht mehr aufgeführt. Im Vergleich zu anderen an EARS-Net teilnehmenden europäischen Ländern ist das Verhältnis zwischen gemeldeten Antibiotikaresistenzdaten und Denominator-Daten in Deutschland am ungünstigsten ausgeprägt.

Weiterhin liegt Deutschland 2012 mit lediglich 16,6 (16,5 im EARS-Net Report 2011) Blutkultur-Sets auf 1.000 Patiententage neben Litauen (7,2), Bulgarien (7,5), Lettland (8,1), Ungarn (8,9), Tschechien (14,5), Österreich (16), der Slowakei (16,1) und Estland (2011: 16,6) im unteren Drittel der europäischen Länder (■ Abb. 2.4). In Deutschland werden, verglichen mit anderen europäischen Ländern, bis zu 4-mal weniger Blutkulturen abgenommen (Brunkhorst et al. 2010).

Praxistipp

Nach den bisherigen Empfehlungen sollte die Rate an abgenommenen Blutkultur-Sets je nach Ausrichtung des Krankenhauses

(Regel-, Schwerpunkt-, Maximalversorgung) zwischen 100 und 200 auf 1.000 Patiententage, die Positivitätsrate (Anteil von positiven Blutkulturen unter allen abgenommenen Blutkulturen) nicht unter 5% und nicht über 15% betragen (Seifert et al. 2007; Baron et al. 2005) (Referenzwerte hauptsächlich aus US-amerikanischen »sentinel-reports«; Befragungsstudien und wurden für Deutschland übernommen).

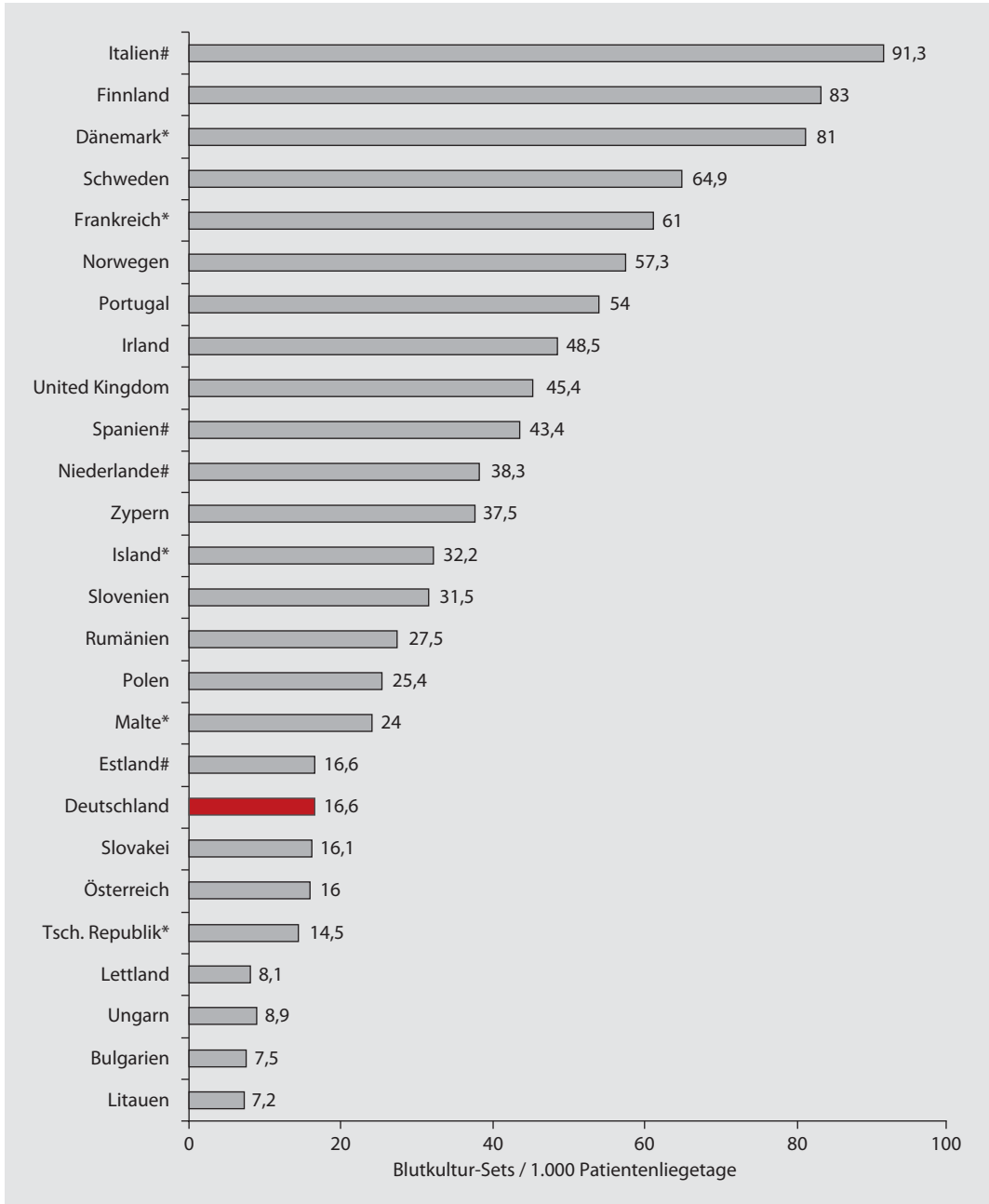
Möglichkeiten und Grenzen der Blutkulturdiagnostik

Die heute kommerziell angebotenen Blutkulturmedien ermöglichen das Wachstum fast aller bakteriellen und fungalen Mikroorganismen, die verursachend für eine Sepsis sind. Zudem werden Geräte mit automatisierten Detektionssystemen verwendet, die hoch sensitiv sind und über eine kurze Detektionszeit im Bereich von 24–48 h verfügen.

► Nach Detektion einer positiven Blutkulturflasche sollten umgehend ein Grampräparat angefertigt, Subkulturen angelegt und eine orientierende Empfindlichkeitsprüfung durchgeführt werden.

Die definitive Resistenztestung mit der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK) erfordert die Herstellung eines standardisierten Inokulums und erfolgt nach Erhalt ausreichenden Koloniewachstums. Subkulturen von Blutkulturflaschen werden aerob und anaerob mindestens 72 h bebrütet. Bei fehlendem Bakterienwachstum trotz mikroskopischem Bakteriennachweis im Grampräparat wird die Bebrütungszeit für die Agarmedien auf 5–7 Tage verlängert, um den Nachweis langsam wachsender Mikroorganismen zu ermöglichen.

Bei inzwischen weitgehend standardisiertem Vorgehen bei der Bearbeitung von Blutkulturflaschen im mikrobiologischen Labor hat insbesondere die leitliniengerechte Präanalytik (Indikationsstellung, Probenentnahmetechnik, Transportzeit) der einsendenden Kliniken einen hohen



■ **Abb. 2.4** Anzahl Blutkulturen pro 1.000 Patiententage (EARS-Report 2012 (*Daten von 2011, #Daten von 2010), Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe, ► <http://www.ecdc.europa.eu>).

Einfluss auf die Qualität des diagnostischen Ergebnisses. Die Kontaminationsrate beträgt bei leitliniengerechter Abnahmetechnik weniger als 3% (Spitalnic et al. 1995).

Indikation und Präanalytik für die Blutkulturdiagnostik

Blutkulturen sind unabhängig von einer bestimmten Fieberhöhe unmittelbar bei Auftreten einer auf eine Sepsis hindeutenden klinischen Symptomatik abzunehmen, z. B. bei Auftreten von Schüttelfrost. Die oft propagierte Abnahme im Fieberanstieg bringt keine Vorteile (Schrenzel 2007).

- **Prinzipiell sollten Blutkulturen vor Beginn einer antimikrobiellen Therapie abgenommen werden. Besteht die Indikation zur Abnahme von Blutkulturen bei laufender antimikrobieller Therapie, ist eine Therapiepause zu erwägen, alternativ sollte die Entnahme unmittelbar vor Applikation der nächsten Dosis erfolgen.**

Die Durchführung der Präanalytik ist in der ► Übersicht dargestellt (siehe auch ► Tab. 5.2).

Präanalytik bei der Abnahme von Blutkulturen

Strikt aseptische Punktionstechnik

- Hygienische Händedesinfektion.
- Einmalhandschuhe (nicht steril).
- Hautdesinfektion (z. B. mit 70%igem Alkohol für mindestens 1 min).
- Punktion ohne erneute Venenpalpation.
- Punktion einer peripheren Vene. Keine Entnahme aus intravenösen Kathetern (→ Kontaminationsgefahr).
- Ausnahme: Entnahme von je einer Blutkultur (aerob/anaerob) aus infektionsverdächtigem Katheter und aus einer peripheren Vene.

Kontaminationsfreie Inokulation der Blutkulturflaschen

- Kappen der Flaschen entfernen.

- Desinfektion des Durchstichseptums mit einem alkoholischen Präparat (Cave: Es darf kein Desinfektionsmittel in die Blutkulturflaschen gelangen).
- Lagerung der unbeimpften Blutkulturflaschen bei Raumtemperatur. Die Blutkulturflaschen nie gekühlt beimpfen.

Erforderliches Blutvolumen

- 8–10 ml pro Flasche (damit höchste Nachweisrate).
- Zuerst die anaerobe Flasche beimpfen (verhindert Eintritt von Luftblasen aus der Spritze in die anaerobe Flasche), dann die aerobe Flasche.
- Spezielle Medien für die Pädiatrie können mit Volumina von 1–3 ml beimpft werden.
- Blutkulturflaschen nicht belüften, Flaschenbarcode nicht überkleben.

Anzahl der erforderlichen Blutkulturen

- Eine Blutkultur (= 1 Flaschen-Set) besteht aus 2 Blutkulturflaschen mit einem aeroben und einem anaeroben Kulturmedium, ggf. wird zusätzlich noch ein Spezialmedium (z. B. zum Nachweis von Pilzen) verwendet.
- 2–4 Blutkulturen abnehmen (Entnahme einer einzigen Blutkultur ist nicht ausreichend, da ein negatives Ergebnis keinen Ausschluss der vermuteten Infektion erlaubt und der einmalige Nachweis von fakultativ pathogenen Erregern (z. B. koagulasenegative Staphylokokken) keine sichere Unterscheidung zwischen Kontamination und Infektion ermöglicht).

Entnahmezeitpunkt

- Mindestens 2 Blutkulturen vor Beginn der antimikrobiellen Therapie entnehmen, ansonsten am Ende des Dosierungsintervalls entnehmen.
- Die Blutkulturen können parallel aus 2 unterschiedlichen Entnahmestellen oder im Abstand von wenigen Minuten abgenommen werden.

- Zeitpunkt und Entnahmestelle auf dem Begleitschein vermerken.
- Nicht bei einer Venenpunktion die doppelte Blutmenge entnehmen und auf 2 Blutkulturen (4 Blutkulturflaschen) verteilen, sondern immer neu punktieren.

Probentransport

- Blutkulturflaschen so schnell wie möglich in das Labor bringen.
- Ist ein umgehender Transport ins Labor nicht möglich (z. B. bei nächtlicher Blutkulturabnahme), sollen die Blutkulturflaschen je nach Herstellerangabe bei Raumtemperatur oder bei 36°C gelagert werden.
- Lange Lagerungs- und Transportzeiten unbedingt vermeiden.

(nach Brunkhorst et al. 2010; Seifert et al. 2007)

Bei älteren oder immunsuppressiv behandelten Patienten, Intensivpatienten (z. B. nach Polytrauma oder Verbrennung), bei Patienten mit intravaskulären Implantaten (z. B. Herzklappen- oder Gefäßprothesen) sowie bei Neugeborenen sind trotz bakteriämischer Infektion die Kriterien einer Sepsis nicht immer vollständig erfüllt; die Indikation zur Abnahme von Blutkulturen ist in solchen Fällen entsprechend breiter zu fassen. Bei älteren Patienten ist außerdem zu berücksichtigen, dass eine Sepsis oft afebril verlaufen kann; auch hier besteht jedoch bei klinischem Verdacht die Indikation zur Blutkulturdiagnostik. Bei Patienten mit Neutropenie ist jedes Auftreten von Fieber (Temperatur >38°C) als mögliches Zeichen einer Sepsis zu werten, die Abnahme von Blutkulturen ist hier zwingend erforderlich (Buchheidt et al. 2003; Hughes et al. 2002; Link et al. 2003).

Üblicherweise erfolgt die Blutentnahme durch Punktion einer peripheren Vene, meist der V. cubitalis. Die Abnahme einer arteriellen Blutkultur ist nicht zu empfehlen. Auch ein intravaskulärer Katheter oder ein Portsystem kommt als alleiniger Entnahmeort nur ausnahmsweise in Frage, da eine erheblich höhere Kontaminationsrate besteht. Da mikrobielle Kontaminationen die

Beurteilung der Befunde erschweren und zu fehlerhafter Therapie und zusätzlichen Behandlungskosten führen können, ist ein aseptisches Vorgehen bei der Abnahme erforderlich (s. oben; ► Übersicht).

Praxistipp

Bei klinischem Verdacht auf eine Sepsis bzw. eines oder mehrerer der folgenden Kriterien: Fieber, Schüttelfrost, Hypothermie, Leukozytose, Linksverschiebung im Differentialblutbild, Erhöhung von Procalcitonin oder C-reaktivem Protein bzw. einer Neutropenie sollten vor Einleitung einer antimikrobiellen Therapie Blutkulturen abgenommen werden.

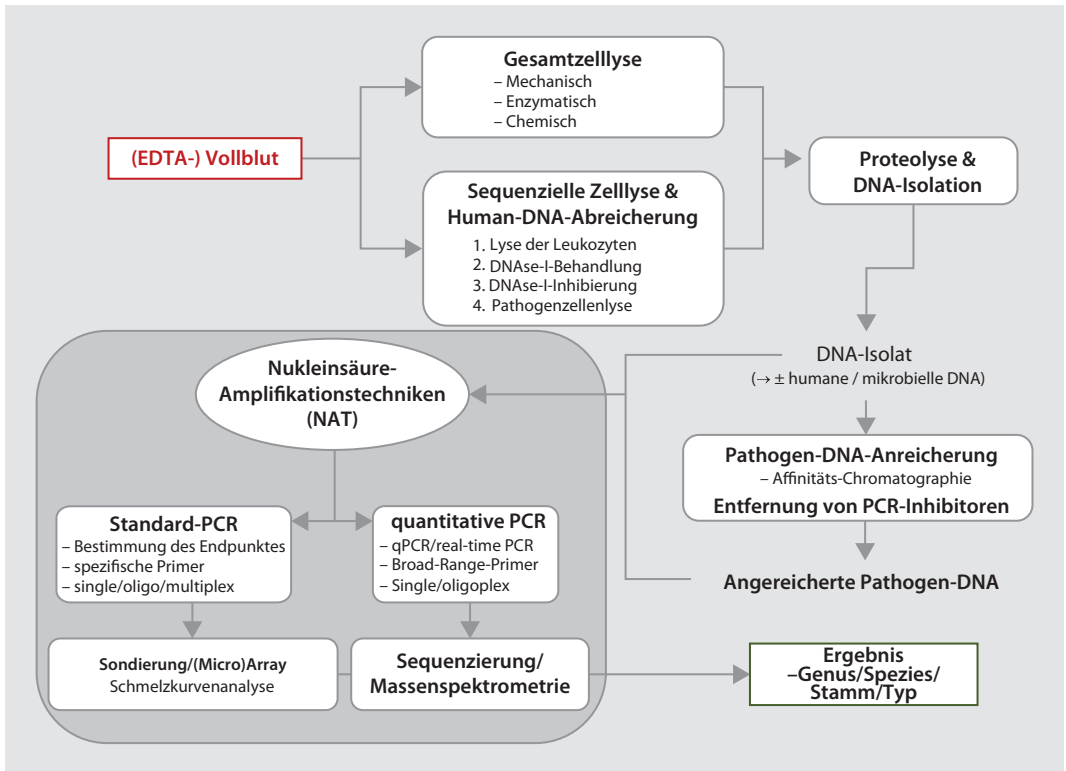
2.2.2 Erregernachweis mittels kulturunabhängiger Verfahren

Der Nachweis von bakteriellen und fungalen Pathogenen über Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT; basierend auf der Polymerasekettenreaktion, PCR) ohne kulturelle Voranreicherung der Erreger (z. B. in Blutkulturen) wird gegenwärtig als vielversprechender Ansatz zur Unterstützung antiinfektiver Maßnahmen in einem frühen Stadium der Sepsis diskutiert.

Unterschieden wird die Multiplex-PCR zum Nachweis einer begrenzten Zahl von Pathogenen mittels Oligonukleotid-Primern von einer Breitpektrum- (»broad-range«) PCR zum weit gefassten Nachweis mikrobieller genomischer DNA mit einem oder wenigen taxonspezifischen Primerpaaren (► Abb. 2.5).

Präanalytik und Analytik NAT-basierter Nachweisverfahren für Sepsiserreger in Vollblut

In ► Abb. 2.5 sind prinzipielle Arbeitsschritte dargestellt, die in kommerziellen Tests Anwendung finden. Der Aufschluss der mikrobiellen Zellen und eine nachfolgende Proteolyse sind Voraussetzung für die DNA-Isolation. Letztere dient zudem der Degradation von DNasen. Human-DNA-Abreicherung und Pathogen-DNA-Anreicherung sind alternative Strategien. Die Abreicherung erfolgt z. B. durch eine sequenzielle Lyse (SepsiTest,



■ Abb. 2.5 Präanalytik und Analytik NAT-basierter Nachweisverfahren für Sepsiserreger in Vollblut (Details s. Text)

Molz, Bremen): Im 1. Schritt werden die Leukozyten aufgeschlossen und die austretende DNA durch einen DNase-I-Enzymverdau abgebaut. Nach Inhibierung des DNA-spaltenden Enzyms werden in einem 2. Lyseschritt die mikrobiellen Zellen aufgeschlossen. Im Fall der Pathogen-DNA-Anreicherung (LOOXSTER, Analytik Jena) werden v. a. in bakterieller DNA häufig vorkommende, nicht methylierte CpG-Dinukleotide affinitätschromatographisch gebunden. Die nur zu geringen Teilen gebundene humane DNA wird zu 90% abgetrennt. Die in den Amplifikationsreaktionen generierten Target-spezifischen DNA-Anreicherungsprodukte (Amplikons) werden im Fall einer Breitspektrum-PCR sequenziert und die ermittelte Nukleotidsequenz in einer Datenbankrecherche einem bakteriellen oder fungalen Taxon zugeordnet. Alternativ kann die Sequenz massenspektrometrisch ermittelt werden (Plex ID,

Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA). Nach einer Standard-PCR ist eine Hybridisierung der Amplikons mit Taxon-spezifischen markierten ssDNA-Sonden Methode der Wahl. Diese ist auch nach einer qPCR möglich und kann mit einer Schmelzkurvenanalyse kombiniert werden (SeptiFast, Roche, Mannheim).

Zu den CE-zertifizierten und gegenwärtig kommerziell verfügbaren Verfahren zum Nachweis mikrobieller DNA im Vollblut zählen zwei quantitative (qPCR) Multiplex-PCR-Verfahren:

- **SeptiFast** (Roche Diagnostics Deutschland, Mannheim) weist mit einem übersichtlichen Panel spezies- und genusspezifischer Primer die wichtigsten Sepsiserreger und wenige Antibiotikaresistenzen (u. a. *mecA* und *vanA/B*) nach. Die generierten Amplikons werden mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sonden über eine Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen.

Sepsis und MODS

Werdan, K.; Müller-Werdan, U.; Schuster, H.-P.;

Brunkhorst, F.M. (Hrsg.)

2016, XXX, 393 S. 56 Abb. in Farbe., Hardcover

ISBN: 978-3-662-45147-2