

Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis anhand zellfreier bakterieller DNA-Technologie – klinische Implikationen

Microbiological diagnostics of sepsis based on cell-free bacterial DNA technology – clinical implications

Y. Kharkavyi¹ · S. Ziegler¹ · S. Grumaz² · C. Disqué² · S.G. Sakka¹

► **Zitierweise:** Kharkavyi Y, Ziegler S, Grumaz S, Disqué C, Sakka SG: Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis anhand zellfreier bakterieller DNA-Technologie – klinische Implikationen. *Anästh Intensivmed* 2022;63:434–438. DOI: 10.19224/ai2022.434

Zusammenfassung

In der Behandlung von Infektionen ist die Kenntnis des verursachenden Erregers von entscheidender Bedeutung. Insbesondere auf Intensivstationen stellen Diagnostik und Therapie von Infektionen nach wie vor eine große Herausforderung dar. Je schneller der Erreger identifiziert und adäquat behandelt wird, desto besser ist die Prognose. Moderne Methoden wie die zellfreie DNA-Sequenzierung aus Vollblutproben (Next Generation Sequencing – NGS) stellen neben der Blutkulturdiagnostik als Goldstandard ein zusätzliches Instrument in der (frühzeitigen) Erregerdiagnostik dar.

Wir berichten über einen 67-jährigen Mann mit kompliziertem Verlauf einer lateralen Oberschenkelhalsfraktur mit Notwendigkeit der Entfernung des infizierten Fremdmaterials, bei dem im Rahmen des intensivmedizinischen Aufenthalts mittels NGS-Analyse einer Vollblutprobe der Nachweis eines *Enterococcus faecalis* gelang. Dieser Erreger war zuvor im Lokalabstrich der Hüfte nachgewiesen worden. In Anbetracht dieses Befundes wurde trotz negativer Blutkulturen bei zunehmender Organ- dysfunktion mit Vasopressorpflicht und steigenden Infektparametern von einer Wundinfektion als Ursache der Sepsis ausgegangen. Aufgrund des Resultates des modernen Verfahrens wurde die operative Revision indiziert und die antiinfektive Therapie auf Ampicillin/Sulbactam deeskaliert. Unter 4-wöchiger antiinfektiver Therapie mit Ampicillin/

Sulbactam und mehrfachen operativen Revisionen kam es zu einem signifikanten Rückgang der laborchemischen Entzündungsparameter sowie zu einer deutlichen klinischen Stabilisierung der Organfunktionen mit Weaning vom Respirator. Der Fall zeigt, dass moderne Verfahren bei negativer Blutkulturdiagnostik einen positiven Erregernachweis liefern und in der Indikation für operative Maßnahmen und Änderungen im antiinfektiven Regime hilfreich sein können.

Summary

For adequate treatment of infections, knowledge of the responsible pathogen is of crucial relevance. Especially in critically ill patients, the diagnosis and treatment of infections are still a great challenge. The faster pathogen identification and treatment are established, the better outcome is likely to be. Modern techniques, such as cell-free DNA-sequencing from full blood samples (Next Generation Sequencing – NGS) are an attractive add-on to classical blood cultures for adequate and early pathogen identification.

Here, we report on a 67-year-old male with a complicated course after hip fracture and need for withdrawal of infected prosthetic material. During intensive care treatment of the patient, *Enterococcus faecalis* was identified by NGS analysis of full blood samples. This bacterium was also found previously in samples taken from the patient's infected hip region. Blood cultures remained negative, however, a deterioration in

- 1 Klinik für Intensivmedizin, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein gGmbH, Ev. Stift St. Martin, Akademisches Lehrkrankenhaus der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Koblenz (Chefarzt: Prof. Dr. S.G. Sakka)
- 2 Noscendo GmbH, Duisburg

Interessenkonflikt

Dr. Grumaz ist Mitbegründerin, Angestellte und Shareholder der Noscendo GmbH. Dr. Disqué ist Angestellte der Noscendo GmbH.

Finanzielle Unterstützung

keine

Schlüsselwörter

Sepsis – Erregerdiagnostik – zellfreie DNA-Sequenzierung – Next Generation Sequencing – Metagenomics

Keywords

Sepsis – Microbiological Diagnostics – Cell-free DNA sequencing – Next Generation Sequencing – Metagenomics

organ function and the need of vasopressor therapy indicated wound infection a likely cause of the sepsis. The result obtained by applying the modern technology led to surgical revision and de-escalation of anti-infective treatment to ampicillin/sulbactam. Under this 4-week anti-infective regimen and several surgical revisions infection markers dropped, and organ functions stabilised enabling weaning from the respirator. This case shows that modern diagnostic procedures in the presence of negative blood cultures may yield additional information which may be helpful in decision-making regarding surgical interventions and anti-infective treatment.

Einleitung

Eine Sepsis infolge einer Wundinfektion ist im intensivmedizinischen Alltag ein relativ häufig auftretendes Krankheitsbild und bei Vorliegen eines septischen Schocks mit einer hohen Letalität verbunden [1]. Die potenzielle Lebensbedrohung erfordert ein rasches, zielgerichtetes Handeln von Seiten der operativen Fächer, aber auch der Intensivmedizin – jeweils in enger Zusammenarbeit mit der Mikrobiologie und Hygiene [2]. Als eine Ursache für dieses Krankheitsbild ist die nicht sanierte Wundinfektion zu nennen. Therapeutische Prinzipien beinhalten die operative oder interventionelle Fokussanierung mit ggfs. chirurgischen Revisionseingriffen und Gewinnung von mikrobiologischem Material sowie eine kalkulierte, breite antibiotische Therapie [1].

Mit Hilfe der aus der mikrobiologischen Diagnostik gewonnenen Erkenntnisse inklusive Resistenzbestimmung ist vielfach eine Änderung der antiinfektiven Therapie – zumeist im Sinne einer Deeskalation – möglich und klinisch angezeigt. Wenngleich die Blutkulturdiagnostik unverändert Goldstandard in der Diagnostik der Sepsis ist, werden zunehmend moderne Verfahren wie die NGS-Analysen, beispielsweise basierend auf zellfreier DNA, entwickelt und klinisch evaluiert [3–6]. Im Folgenden beschreiben wir den Verlauf eines Patienten mit einem septischen Schock auf-

grund einer Wundinfektion (*E. faecalis*) nach komplizierter Oberschenkelhalsfraktur mit Infektion der eingebrachten Prothese und sekundärer Entfernung des eingebrachten Fremdmaterials, bei dem das moderne Verfahren sich als wegweisend erwies, während die klassische Blutkulturdiagnostik negativ blieb.

Fallbericht

Ein 67-jähriger, multimorbider Patient (182 cm, 130 kg, BMI 39,2 kg/m²) mit einem metabolischen Syndrom (arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie) und einem persistierenden Vorhofflimmern (CHA₂DS₂-VASc-Score 2) stellte sich in einem externen Krankenhaus der Regelversorgung nach einem Sturz und mit klinischem Bild einer komplizierten lateralen Oberschenkelhalsfraktur links vor. Aufgrund des berufsgenossenschaftlichen Heilverfahrens erfolgte die Zuverlegung in unsere Klinik. Nach operativer Versorgung mittels zementierter Duokopfprothese und Behandlung auf der unfallchirurgischen Normalstation wurde der Patient zur weiteren Therapie auf die geriatrische Station im Haus verlegt. Dort wurde bei progredienter Sekretion aus der Wunde und steigenden Infektparametern eine Wundheilungsstörung diagnostiziert. Mikrobiologisch konnte zu diesem Zeitpunkt *E. faecalis* (>10⁶ KBE/ml) im Urin nachgewiesen werden, aus dem Punktat der Hüfte gelang kein Erregernachweis. Es folgte die Entfernung der 4 Wochen zuvor implantierten Duokopfprothese, ein mehrschichtiges Debridement mit Schaffung einer Girdlestone-Situation und Wundverschluss über eine Drainage. Bei hohem intraoperativem Blutverlust und kardiozirkulatorischer Insuffizienz erfolgte die Übernahme des Patienten auf unsere Intensivstation. Das Management erforderte eine differenzierte Volumen- und Katecholamintherapie. Nach Stabilisierung des kardiopulmonalen Zustands konnte der Patient auf die unfallchirurgische Normalstation verlegt werden. Die Aufarbeitung der intraoperativ entnommenen Gewebeproben erbrachte in 3 von 5 Materialien *E. faecalis* (Ampicillin-sensibel), Blutkulturen wa-

ren negativ geblieben. Diese Resultate wurden nach einer mikrobiologischen Bearbeitung von 14 Tagen beschrieben. Es wurde kalkuliert mit Piperacillin/Tazobactam therapiert.

Im weiteren Verlauf kam es zu einer progredienten Verschlechterung des Allgemeinzustands des Patienten. Laborchemisch zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Entzündungsparameter. Der Patient bedurfte 3 Tage später einer Wundrevision mit ausgiebigem Debridement, Spülung sowie Probenentnahme, Verschluss und Einlage einer Redon-Drainage der Hüfte linksseitig. Mit Bild eines septischen Schocks (RR 75/38 mmHg, Vorhofflimmern mit einer HF 134/min, SpO₂ 80 % unter 4 Liter/min Sauerstoff) wurde er erneut auf die Intensivstation verlegt. Zum Zeitpunkt der Übernahme war der Patient vigilanzgemindert. Die Blutkulturdiagnostik (aerob und anaerob) erbrachte den Nachweis von *E. faecalis* (time to positivity: jeweils nach 11 h). Es erfolgte bei zunehmender respiratorischer Insuffizienz eine orotracheale Intubation und eine mittels eines erweiterten hämodynamischen Monitoringverfahrens gesteuerte differenzierte Volumen- und Vasopressorthherapie. Die kalkulierte antiinfektive Therapie mit Piperacillin/Tazobactam wurde fortgeführt.

An Folgetagen entwickelte der Patient Fieber bis 39,6°C, laborchemisch zeigten sich steigende Entzündungsparameter (Leukozyten, CRP, PCT) und eine zunehmende Vasopressorpflichtigkeit. Die antiinfektive Therapie wurde daher zunächst auf Meropenem und Fosfomycin eskaliert sowie alle invasiven Gefäßzugänge entfernt und unter Gewinnung von blutkulturellem Material (2 Pärchen) neu eingebracht. Eine Computertomographie des Thorax und Abdomens erbrachte im Vergleich zur Voruntersuchung regrediente pneumonische Infiltrate, sodass die Lunge nicht als Fokus der vermuteten systemischen Infektion in Betracht gezogen wurde. Es zeigten sich ein subkutaner Flüssigkeitsverhalt im Bereich der linken Hüfte und eine kleine kontrastmittelaufnehmende Flüssigkeitsansammlung auf der lateralen Seite des proximalen Oberschenkels links im

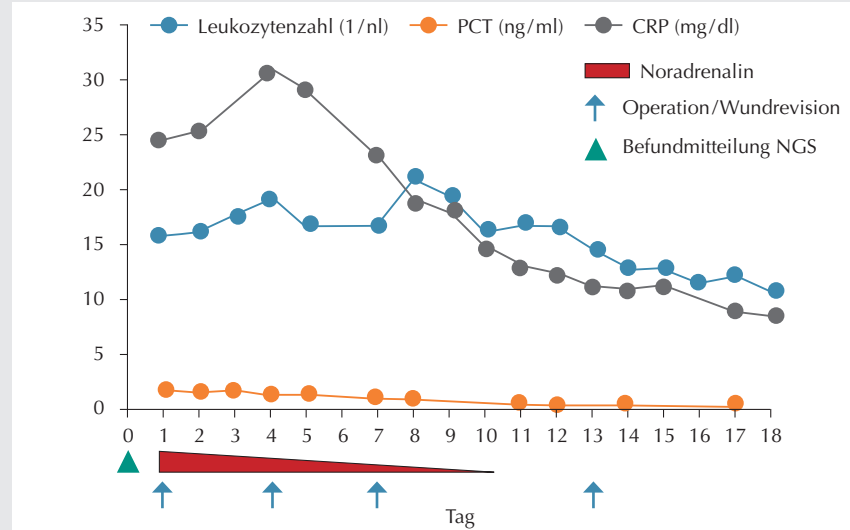
operativen Zugangsweg. Laborchemisch konnte ein Harnwegsinfekt als Ursache ausgeschlossen werden. Ebenso konnte mikrobiologisch kein Korrelat gefunden werden (Blutkulturen und Urin). Zu diesem Zeitpunkt lagen die Ergebnisse der vorangegangenen Operationen noch nicht vor. Aus unfallchirurgischer Sicht bestand keine Indikation zur operativen Wundrevision.

Parallel zur klassischen Blutkulturdiagnostik (2 Pärchen, Analytik im MVZ Labor Koblenz) wurde eine softwarebasierte molekularbiologische Untersuchung (Vollblutprobe) mittels NGS (Fa. Noscendo GmbH, Duisburg) initiiert. Bereits am Folgetag konnte dieses Verfahren den Nachweis von *Enterococcus faecalis* liefern. Aufgrund des molekularbiologischen Befundes wurde erneut zum Ausschluss einer intraabdominellen Pathologie eine Computertomographie des Abdomens durchgeführt, welche keine Hinweise dafür ergab. Es kam erneut zur interdisziplinären Fallbesprechung mit Kollegen der Unfall- und Allgemeinchirurgie, in deren Rahmen sich aufgrund dieses molekularbiologischen Befundes für eine operative Revision der Wunde entschieden wurde (Abb. 1).

Intraoperativ stellte sich ein lokaler Befund dar mit deutlichem klinischem Korrelat. Es erfolgte eine Spülung mit einer hypochlorithaltigen Lösung (Granudacyn®), ein Wunddébridement, eine Probenentnahme für die Mikrobiologie und Einlage eines Vakuum-Schwammes. Die mikrobiologische Analyse des intraoperativ entnommenen Materials erbrachte weder in subkutanen Biopsien, Schaft- und Pfannenregion noch Knochenprobenentnahmen einen Erregernachweis.

In der Folge bedurfte es weiterer Wundrevisionen. Parallel wurde das antibiotische Konzept anhand des Vorbefundes mit Resistogramm angepasst und die Therapie auf Ampicillin/Sulbactam (Tagesdosis 12 g) deeskaliert. An den Tagen 3, 6 und 12 nach der Revision (Abb. 1, Tag 1) wurden jeweils ein VAC-Wechsel mit chirurgischem Débridement mit Entfernung von Nekrosen sowie eine Wundspülung vorgenommen.

Abbildung 1



Darstellung von Infektparametern (Procalcitonin, PCT, Leukozytenzahl und C-reaktives Protein, CRP), Vasopressortherapie und chirurgischen Maßnahmen ab dem Tag der Information des positiven Nachweises anhand des NGS-Verfahrens (Tag 0).

Unter dieser antiinfektiven Therapie über insgesamt 4 Wochen und weiteren chirurgischen Maßnahmen stabilisierten sich die Organfunktionen. Die Vasopressortherapie konnte beendet werden, die laborchemischen Entzündungsparameter waren rückläufig. Der zwischenzeitlich perkutan-dilatativ tracheotomierte Patient konnte nach erfolgreichem Weaning erfolgreich dekanüliert werden.

Diskussion

Infektionen sind ein anhaltendes Problem in der intensivmedizinischen Betreuung schwerstkranker Patienten und mit einer erhöhten Letalität assoziiert [7]. Die potenzielle Lebensgefahr erfordert eine rasche mikrobiologische Darstellung und ein zielgerichtetes, interdisziplinäres Handeln mit systemischer Antibiotikatherapie sowie ggf. chirurgischer und/oder interventioneller Fokussanierung.

In unserem Fall wurde durch das moderne molekularbiologische Diagnostikverfahren einer Blutprobe innerhalb von 24 h der Nachweis eines grampositiven Erregers (*Enterococcus faecalis*) geliefert, was zu einer Änderung im klinischen Management mit Indikation

zu einem chirurgischen Eingriff und Deeskalation der antiinfektiven Therapie führte. Als indirekter Hinweis auf eine grampositive Sepsis, wie im vorliegenden Fall durch das moderne Verfahren angezeigt, kann die im Vergleich zu gramnegativen Erregern geringe Höhe des Procalcitonins betrachtet werden [8]. Der Abfall dieses Biomarkers unter den durchgeführten Maßnahmen ist passend zum klinischen Verlauf. Dass das intraoperativ gewonnene Material keinen mikrobiologischen Erregernachweis lieferte, ist möglicherweise mit dem Umstand der antiinfektiven Therapie mit Meropenem in Verbindung zu bringen.

Bei diesem modernen diagnostischen Verfahren handelt es sich um eine softwarebasierte Untersuchung von NGS-Daten, basierend auf der zellfreien DNA einer Vollblutprobe, in deren Rahmen mehr als 1.500 Erreger (Bakterien, DNA-Viren, Pilze oder Parasiten) innerhalb von 24 h identifiziert werden können [3–6]. Dieses Verfahren beruht auf der Sequenzierung zellfreier DNA im Plasma und benötigt eine Vollblutprobe von 2–5 ml. Die generierten Daten werden mithilfe einer lizenzierten und zugelassenen Software ausgewertet und auf vorhandene Erreger überprüft.

Aus unserem Fall lassen sich bestätigend zu bisherigen Arbeiten [9,10] zwei Aspekte ableiten: a) neben dem Potenzial eines Nachweises <24 h und der Tatsache, dass durch das NGS-Verfahren die diagnostische „Ausbeute“ gesteigert werden kann – dass überhaupt ein Erregernachweis gelingt, während die klassische Blutkultur negativ bleibt – und b), dass Änderungen im klinischen Management (operativ und antiinfektiv) die Folge sind. Eine möglichst frühzeitige Anpassung einer kalkulierten Therapie, überwiegend charakterisiert durch eine sog. Deeskalation, gehört zum rationalen Einsatz von Antiinfektiva. Mit einer Deeskalationsstrategie verbundene Aspekte beinhalten das Potenzial für eine geringere Resistenzentwicklung, bessere Überlebenschancen und Kostenreduktion [11].

In unserem Fall bleibt unklar, warum aus dem OP-Material mithilfe der klassischen mikrobiologischen Diagnostik kein Erregernachweis gelang. Neben Aspekten der Qualität und Repräsentativität der entnommenen Probe und der Menge an potenziell nachzuweisenden Erregern spielen möglicherweise prozessurale Punkte eine Rolle.

Wenngleich die aktuelle Datenlage zur NGS-Diagnostik keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulässt, sollte das Verfahren mitunter aufgrund der geringen Nachweisgrenze u. a. in Situationen eingesetzt werden, in denen die klassische Blutkulturdiagnostik mit all ihren Limitationen in der praktischen Umsetzung [12] negativ bleibt, oder z. B. bei einer Endokarditis, bei der eine geringe Erregerlast im Blut gegeben sein kann. Ebenso ist dieses Verfahren möglicherweise bei Patienten mit fehlenden klinischen Symptomen für eine systemische Infektion (Therapie mit Immunsuppressiva, eingeschränkte Immunantwort bei Patienten aus der Hämatologie) mit einem diagnostischen Vorteil verbunden. Bisherige Daten zu diesem Verfahren legen nahe, dass sich, neben der Bestätigung durch die Blutkultur, zusätzliche Ergebnisse nachweisen lassen [6]. Der klinische Stellenwert hinsichtlich abgeleiteter diagnostischer und therapeutischer Maßnahmen ist

bislang nicht ausreichend untersucht, ein positiver Einfluss auf das Outcome in Anbetracht der bis dato zu geringen Patientenzahl nicht nachgewiesen [6]. Im eigenen Fall wurde bei negativer Blutkulturdiagnostik aufgrund des Ergebnisses aus dem modernen Verfahren die Indikation für eine operative Revision und Umstellung der antiinfektiven Therapie abgeleitet. Neben den potenziellen Vorteilen des NGS-Verfahrens sind u. a. durch die geringe Nachweisgrenze und hohe Sensitivität bedingte Limitationen der Vollblutdiagnostik zu berücksichtigen. Mögliche (kutane) Kontaminationen (bakteriell oder fungal) und z. B. der Nachweis viraler Sequenzen können eine erschwerte Interpretation der Ergebnisse zur Folge haben. Von besonderer klinischer Relevanz ist, dass kein Resistogramm mitgeliefert wird. Hier gibt es allerdings erste Ansätze, die Diagnostik auch diesbezüglich zu erweitern. Es bedarf weiterer, größerer klinischer Studien zum Stellenwert dieses Verfahrens in der Intensivmedizin.

Zusammenfassung

Das Management von Patienten mit septischem Schock erfordert eine schnelle mikrobiologische Diagnosestellung und eine zielgerichtete Behandlung. Ein wesentlicher Faktor bei der Eradikation der infektiösen Mikroorganismen ist die gezielte Antibiotikatherapie mit ggf. chirurgischer und/oder interventioneller Fokussanierung. In diesem Kontext spielt eine rasche mikrobiologische Diagnostik und als Folge eine präzise Therapie für die gesamte Prognose kritisch kranker Patienten eine entscheidende Rolle. Moderne Verfahren wie Next-Generation Sequencing zellfreier DNA können hilfreich sein, um das Regime zur chirurgischen Fokussanierung und antiinfektiven Therapie zu definieren.

Ethische Aspekte

Den Autoren liegt eine schriftliche Zusage der juristisch als Vertreter des Patienten benannten Ehefrau zur Veröffentlichung der Daten nach Depersonalisierung vor.

Finanzielle Aspekte

Es liegt kein firmenseitiges Sponsoring vor. Die Testung der Blutproben erfolgte ohne Rechnungsstellung.

Literatur

1. Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, et al: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017;43:304–377
2. 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;34:1589–96
3. Clementi A, Virzì GM, Brocca A, Pastori S, de Cal M, Marcante S, et al: The role of cell-free plasma DNA in critically ill patients with sepsis. *Blood Purif* 2016;41:34–40
4. Long Y, Zhang Y, Gong Y, et al: Diagnosis of sepsis with cell-free DNA by next-generation sequencing technology in ICU patients. *Arch Med Res* 2016;47:365–371
5. Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, et al: Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med* 2016;8:73
6. Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, Stevens P, Karolina Glanz K, Decker SO, et al: Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock. *Crit Care Med* 2019;47:e394–e402
7. Vincent J-L, Sakr Y, Singer M, et al: Prevalence and outcomes of infection among patients in intensive care units in 2017. *JAMA* 2020;323:1478–1487
8. Oussalah A, Ferrand J, Filhine-Tresarrieu P, Aissa N, Aimone-Gastin I, Namour F, et al: Diagnostic accuracy of procalcitonin for predicting blood culture results in patients with suspected bloodstream infection: an observational study of 35,343 consecutive patients (A STROBE-Compliant Article). *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1774
9. Decker SO, Sigl A, Grumaz C, Stevens P, Vainshtein Y, Zimmermann S, et al: Immune-response patterns and next generation sequencing diagnostics for the detection of mycoses in patients

with septic shock- results of a combined clinical and experimental investigation. *Int J Mol Sci* 2017;18:1796

10. Schmoch T, Westhoff JH, Decker SO, Skarabis A, Hoffmann GF, Dohna-Schwake C, et al: Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in pediatric sepsis. *Medicine (Baltimore)* 2021;100:e26403
11. Timsit JF, Bassetti M, Cremer O, et al: Rationalizing antimicrobial therapy in the ICU: a narrative review. *Intensive Care Med* 2019;45:172–189
12. Emeraud C, Yilmaz S, Fortineau N, Cuzon G, Dortet L: Quality indicators for blood culture: 1 year of monitoring with BacT/Alert Virtuo at a French hospital. *J Med Microbiol* 2021;70.

Korrespondenz- adresse



Yurii Kharkavyi

Klinik für Intensivmedizin
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein,
Standort Ev. Stift St. Martin
Akademisches Lehrkrankenhaus
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Koblenzer Straße 115–155
56073 Koblenz, Deutschland

Tel.: 0261 137-0

Fax: 0261 137-1258

E-Mail: Yurii.kharkavyi@gk.de

ORCID-ID: 0000-0002-8605-7504