

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Hygiene

Ärztlicher Direktor: Prof. Dr.med. S. Stenger

Entwicklung und klinische Evaluation eines
molekularen Schnellverfahrens zur Sepsis-
Diagnostik bei immunsupprimierten Patienten

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Juliane Winter
geboren in Göppingen

2009

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Wellinghausen

2. Berichterstatter: PD Dr. Schulz

Tag der Promotion: 18.11.2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Sepsis.....	1
1.1.1 Historisches	1
1.1.2 Definitionen.....	2
1.1.3 Epidemiologie	3
1.1.4 Erregerspektrum	4
1.1.5 Therapie	4
1.1.6 Diagnostik.....	5
1.2 MolYsis.....	7
1.3 Zielsetzung des Projekts	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Material.....	10
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	10
2.1.2 Verbrauchsmittel.....	10
2.1.3 Diagnostische ProbengefäÙe.....	10
2.1.4 Kommerzielle Reagenzienkits.....	10
2.1.5 Oligonukleotide und Sonden.....	11
2.1.6 Mikroorganismen	13
2.1.7 Geräte.....	14
2.2 Methoden	15
2.2.1 Präparation chromosomaler DNA	15
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion.....	16
2.2.3 Klinische Studie an Patientenblut (<i>Blutkultur-PCR-Studie</i>)	24
2.2.4 PCR-Algorithmus	29
3 Ergebnisse	31
3.1 Klinische Studie an Patientenblut (Blutkultur-PCR-Studie)	31
3.1.1 Patientenkollektiv	31
3.1.2 Probenkollektiv	35
3.1.3 Parallele Blutkulturen.....	35
3.1.4 PCR-Ergebnisse	40

PCR-Untersuchungen zur Identifizierung bakterieller Erreger	40
PCR-Untersuchungen zur Identifizierung gram-positiver Erreger	43
PCR-Untersuchungen zur Identifizierung gram-negativer Erreger	57
PCR-Untersuchungen zur Identifizierung von <i>Candida</i> spp.	59
4 Diskussion	66
4.1 Methodik	66
4.2 Ergebnisse der Blutkultur-PCR-Studie.....	68
4.2.1 Eubakterielle Gramdifferenzierende PCR (Gramdiff-PCR)	68
4.2.2 <i>Staphylococcus</i> spp.-spezifische Staph-FL/LC-PCR (Staph-PCR).....	69
4.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i> -spezifische S.aur-PCR (Nuc-FL/LC).....	70
4.2.4 <i>Candida</i> spp.-spezifische-PCR Can-FL/LC (Can-PCR).....	73
4.2.5 Sonstige PCR-Assays	75
<i>Enterococcus/Streptococcus</i> spp.-PCR Ent-FL/LC (Ent/Strep-PCR)	75
<i>Enterobacteriaceae</i> -spezifische PCR Entbac-TM	75
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -spezifische PCR Ps aeru-TM	76
<i>Candida albicans</i> -spezifische C.alb-FL/LC-PCR.....	76
4.3 Schlussfolgerung	77
5 Zusammenfassung.....	78
6 Literaturverzeichnis	79
7 Anhang.....	87
8 Eigene Publikationen	95
9 Danksagung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
6-FAM	6-Carboxy-Fluorescein
A. dest.	destilliertes Wasser
AB	Antibiotikum
Abb.	Abbildung
abdom.	abdominal
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
AML	Akute Myeloische Leukämie
ATCC	American Type Culture Collection
AZ	Allgemeinzustand
bds.	beidseits
BK	Blutkultur
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
C.alb.-PCR	<i>Candida albicans</i> -spezifische PCR-Reaktion
CA	Carcinom
ca.	circa
Cand.	Candida
Can-PCR	<i>Candida</i> spp.-spezifische PCR-Reaktion
CFU	Colony Forming Units
chron.	chronisch
CLL	Chronisch Lymphatische Leukämie
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CRP	C-reaktives Protein
CUP	Carcinoma of Unknown Primary
d	Tage
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Abkürzungsverzeichnis

E.coli-TM PCR	<i>Escherichia coli</i> -spezifische PCR-Reaktion
<i>E.faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E.faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ED	Erstdiagnose
Ent/Strep-PCR	<i>Enterococcus/Streptococcus</i> -spezifische PCR-Reaktion
Entbac-TM-PCR	<i>Enterobacteriaceae</i> -spezifische PCR-Reaktion
Ent-FL/LC PCR	<i>Enterococcus</i> -spezifische PCR-Reaktion
Epi-FL/LC PCR	<i>Staphylococcus epidermidis</i> -spezifische PCR-Reaktion
FiO ₂	inspiratorische Sauerstoff-Fraktion
Fr	Freitag
Gram-Diff-PCR	Gramdifferenzierende PCR-Reaktion
h	Stunden
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
IE	Infektionsepisode
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
ITP	Idiopathisch-Thrombozytopenische Purpura
kg	Kilogramm
klin.	klinisch
KMT	Knochenmarkstransplantation
KNS	Koagulase-Negative Staphylokokken
kPa	Kilopascal
l	Liter
LCH	Langerhans-Zell-Histiozytose
M. Hodgkin	Morbus Hodgkin
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MecA-PCR	MecA-Gen-spezifische PCR-Reaktion
MecHP1/HP2 PCR	MecA-Gen-spezifische PCR-Reaktion
MGUS	Monoklonale Gammopathie Unbestimmter Signifikanz
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mi	Mittwoch
min	Minuten
ml	Milliliter
MM	Multiples Myelom

Abkürzungsverzeichnis

mm ³	Kubikmillimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
Mo	Montag
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
n.v.	nicht vorhanden
ng	Nanogramm
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
Nr.	Nummer
Nuc-FL/LC PCR	<i>Staphylococcus aureus</i> -spezifische PCR-Reaktion
O ₂	Sauerstoff
OMF	Osteomyelofibrom
P	Prophylaxe
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PaO ₂	arterieller Sauerstoff-Partialdruck
pap.	papillär
Pat.	Patient
PBSCT	Periphere Blut-Stammzell-Tranplantation
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PNH	Paroxysmale Nächtliche Hämoglobinurie
pos.	positiv
Pseu aeru TM -PCR	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> -spezifische PCR-Reaktion
rcf	relative centrifugal force
regelm.	regelmäßig
rpm	rotation per minute
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
S.aur-PCR	<i>Staphylococcus aureus</i> -spezifische PCR-Reaktion
<i>S.epidermidis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
SCID	Severe Combined Immunodeficiency Disorder
SD	Schilddrüse
sek	Sekunden
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
spp.	Spezies

Staph-PCR	<i>Staphylococcus</i> -spezifische PCR
<i>Strep.</i>	<i>Streptococcus</i>
Tab.	Tabelle
tägl.	täglich
TTP	Thrombotisch-Thrombozytopenische Purpura
UV	Ultraviolett
V.a.	Verdacht auf
v.Chr.	vor Christus
Z.n.	Zustand nach
ZVK	Zentral-Venöser-Katheter

1 Einleitung

1.1 Sepsis

Die Sepsis stellt ein komplexes Krankheitsbild dar und geht mit einer hohen Mortalität einher. Das folgende Kapitel soll einen kurzen Überblick über die geschichtliche Verwendung des Begriffes, heute gültige Definitionen und einige epidemiologische Zahlen geben, sowie den aktuellen Stand der Therapie und Diagnostik erläutern.

1.1.1 Historisches

„Wundfäule“, „roter Streifen“, „Blutvergiftung“ – so wird das Krankheitsbild der Sepsis umgangssprachlich oft bezeichnet.

Dabei liegt die Verwendung des Begriffes „Sepsis“ schon lange zurück. Er wurde bereits ca. 460-370 v.Chr. von Hippokrates eingeführt und diente damals der Beschreibung der Wundfäule. Das Wort leitet sich vom griechischen „σηπω“ ab und bedeutet so viel wie „faul machen“. Ibn Sina (979-1037) stellte die Beobachtung auf, dass diese „Fäulnis des Blutes“ mit Fieber einhergeht.

Es wurden mehrere kausale Überlegungen angestellt. So wurden unter anderem schädliche Substanzen aus der Luft (Herrmann Boerhave, 1668-1738) oder der Kontakt der Wunde mit Sauerstoff (Justus von Liebig) für die Wundfäule verantwortlich gemacht. Erst Louis Pasteur (1822-1895) stellte einen Zusammenhang zwischen dem Prozess der Fäulnis und Verwesung und Bakterien dar.

Der Internist H. Lennhartz definierte dann Anfang des 20. Jahrhunderts den Begriff der Sepsis neu. Er bezeichnete nun nicht mehr die Wundfäule, sondern eine bakterielle Erkrankung.

Die Sterblichkeitsrate der Sepsis war trotz der zunehmenden Einführung antiseptischer Maßnahmen, wie Geräte- und Hautdesinfektion, hoch. Erst nach der Einführung der Antibiotika Mitte des 20. Jahrhunderts konnte ein Rückgang der Sterblichkeit verzeichnet werden [2].

Der Intensivmediziner Roger C. Bone stellte dann 1989 eine noch heute gültige Definition der Sepsis auf: „Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“ [9]

1.1.2 Definitionen

Bei einer **Sepsis** kommt es auf Grund einer Infektion zu einer generalisierten hyperinflammatorischen Reaktion des Immunsystems, die auch als Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) bezeichnet wird [3]. Demnach müssen folgende zwei Kriterien zur Definition einer Sepsis vorliegen [1]:

I Nachweis einer Infektion (mikrobiologischer Nachweis, klinische Kriterien)

II SIRS (mindestens zwei Kriterien):

- Fieber ($\geq 38^\circ\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^\circ\text{C}$)
- Tachykardie: Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$
- Tachypnoe ($\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4,3 \text{ kPa} / \leq 33 \text{ mmHg}$)
- Leukozytose ($\geq 12000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\text{mm}^3$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild

Die Sepsis stellt somit eine systemische Infektionserkrankung dar, die mit einer Streuung von Bakterien oder Pilzen über den Blutweg einhergeht und für den Menschen akut lebensbedrohlich ist.

Von einer **schweren Sepsis** spricht man, wenn zusätzlich zur Infektion Organkomplikationen im Sinne einer Dysfunktion bestehen [3]. In diesem Fall muss zusätzlich zu den oben genannten Kriterien für eine Sepsis (I und II), folgendes Kriterium erfüllt sein:

III Akute Organdysfunktion (mindestens ein Kriterium) [1]:

- akute Enzephalopathie
- arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10 \text{ kPa} / \leq 75 \text{ mmHg}$ (unter Raumluft) oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnis von $\leq 33 \text{ kPa} / \leq 250 \text{ mmHg}$ (unter O_2 -Gabe)
- metabolische Azidose: Base Excess $\leq -5 \text{ mmol/l}$ oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\text{x}$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches

- relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30 % innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$
- renale Dysfunktion: Diurese von $\leq 0.5 \text{ ml/kg/h}$ für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2x$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches

Der **septische Schock**, die schwerste Verlaufsform der Sepsis, beschreibt eine Sepsis mit den klinischen Zeichen des Schocks [3]. Zusätzlich zu den oben genannten Kriterien I und II muss ein systolischer Blutdruck $\leq 90\text{mmHg}$ für mindestens eine Stunde vorliegen bzw. ein mittlerer arterieller Druck von $\leq 65 \text{ mmHg}$ oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck $\geq 90\text{mmHg}$ oder den arteriellen Mitteldruck $\geq 65\text{mmHg}$ zu halten. Die Hypotonie muss trotz adäquater Volumengabe bestehen bleiben und darf nicht durch andere Ursachen zu erklären sein [1].

Als **Bakteriämie/Candidämie** wird hingegen das Vorkommen lebensfähiger Bakterien/Hefen im Blut bezeichnet [3].

1.1.3 Epidemiologie

Durchgeführte Studien auf Intensivstationen in deutschen Kliniken zeigten, dass die Prävalenz für eine Sepsis bei 12,4 % und für eine schwere Sepsis bei 11,0 % liegt [16]. Patienten mit schwerer Sepsis wiesen eine Mortalität von 55,2 % auf [16]. Die durchschnittliche Liegedauer in der Klinik betrug 12,3 Tage [16].

Die Inzidenz der Sepsis steigt jährlich um circa 9 % und wird somit auch zukünftig ein ernstzunehmendes Problem darstellen [7, 57].

Ca. 9 % der Patienten mit Sepsis entwickeln im weiteren Verlauf eine schwere Sepsis und 3 % davon einen septischen Schock, was die Mortalität weiter erhöht und außerdem immense Kosten verursacht [7, 26, 57].

Faktoren, die das Entstehen eines septischen Schocks begünstigen, sind zusätzlich zu iatrogenen und genetischen Faktoren, das Vorliegen von Karzinomen, Immundefizienz oder chronischem Organversagen [7].

1.1.4 Erregerspektrum

Während in den 80er und 90er Jahren vor allem gramnegative Organismen als Erreger der Sepsis nachgewiesen wurden, verschiebt sich nun das Verhältnis immer mehr in Richtung grampositiver Pathogene [37, 44, 57]. Gemessen an allen als positiv gemeldeten Blutkulturen, werden heute in ca. zwei Dritteln der Kulturen grampositive Erreger nachgewiesen [7, 59]. Den größten Anteil haben hierbei Koagulase-negative Staphylokokken (KNS), gefolgt von *Staphylococcus aureus* [7, 51, 52, 59]. Weitere relevante Keime sind außerdem *Enterococcus* spp. und *Streptococcus* spp. [7, 37, 59].

Unter den gramnegativen Erregern, die ein knappes Drittel aller positiven Blutkulturen ausmachen [7, 59], entfällt der Hauptteil auf *Enterobacteriaceae*, am häufigsten hierbei *Escherichia coli*. Als weitere Erreger sind vor allem *Klebsiella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* spp. zu nennen [7, 50, 59].

In 3-10 % aller positiven Blutkulturen werden *Candida* spp. nachgewiesen, am häufigsten *C. albicans*, *C. tropicalis* und *C. glabrata* [7, 37, 59].

1.1.5 Therapie

Eine möglichst schnelle und gezielte Antibiotika- bzw. Antimykotika-Gabe ist die Therapie der Wahl und essentiell für die Prognose des Patienten [40, 57].

Bis zum Nachweis und der genauen Identifizierung des Erregers, sowie einer Resistenzbestimmung muss eine empirische Therapie des Patienten erfolgen. Allerdings ist eine möglichst rasche und adäquate antibiotische Therapie zum einen ein wesentlicher Faktor zur Verbesserung der Prognose [26, 29, 30, 57]. So liegt, nach einer Studie von Kollef et al., die Mortalität der Sepsis unter inadäquater Antibiotika-Therapie bei 52 %, unter adäquater Antibiotika-Therapie aber nur bei 23 % [29]. Auch die Liegedauer der Patienten in der Klinik verringert sich bei adäquater Therapie von zehn auf sieben Tage [29]. Des Weiteren steigt die Wahrscheinlichkeit, dass Patienten mit Sepsis eine schwere Sepsis oder einen septischen Schock mit Multiorganversagen erleiden, unter inadäquater Antibiotika-Therapie deutlich an [29].

Zum anderen begünstigt jede initial falsche antimikrobielle Therapie die Entstehung von Resistenzen, was in jedem Fall zu vermeiden ist [43, 57].

Um dies zu verhindern und die Prognose der Patienten zu verbessern, ist es von großer Bedeutung, dass die Identifizierung des Erregers möglichst schnell vonstatten geht und somit eine adäquate antibiotische oder antimykotische Therapie rasch erfolgen kann.

1.1.6 Diagnostik

Den Goldstandard in der Diagnostik der Sepsis stellt der mikrobiologische Nachweis der Erreger im Blut der Patienten mittels Blutkulturen dar [7, 41, 45, 52]. Obwohl dieses Diagnostikverfahren mittlerweile weitgehend automatisiert abläuft, dauert es in der Regel zwischen zwei und fünf Tagen bis ein Nachweis der Keime erfolgt oder ein negatives Resultat vorliegt [7]. Speziell bei *Candida*-Spezies kommt es sogar meist erst nach fünf Tagen zu einem nachweisbaren Wachstum in der Blutkultur, was die Detektion dieser Keime besonders erschwert.

Die Sensitivität der Blutkultur-Diagnostik sinkt vor allem dann, wenn der Patient vor der Blutabnahme bereits Antibiotika erhalten hat, die das Wachstum der Keime hemmen können, oder wenn es sich um besonders anspruchsvolle oder langsam wachsende Organismen, z.B. Hefen, handelt [4, 7, 36, 41, 43, 45, 52].

Gerade bei immunsupprimierten Patienten, die oft eine antibiotische Prophylaxe erhalten, kommen Infektionen mit Pilzen gehäuft vor [45, 52, 57]. Diese Patientengruppe erfüllt somit gleich zwei Kriterien, die unter Umständen zu einer geringeren Sensitivität der Blutkulturdiagnostik beitragen können. Kann ein kultureller Nachweis nicht erfolgen oder dauert dieser zu lange und erfolgt die adäquate Therapie deshalb zu spät, verschlechtert dies die Prognose der Patienten, die Mortalität steigt [45].

Einen neuen Ansatz in der Diagnostik von Blutstrominfektionen stellen molekularbiologische Methoden dar, die auf einen Nachweis der DNA der Erreger abzielen. Dazu wurden bereits verschiedene Techniken eingesetzt und evaluiert: Hybridisierungsverfahren [27, 46], Detektion mittels Microarray [11, 53, 58], sowie zahlreiche PCR-basierte Methoden, die entweder durch anschließende Sequenzierung eine Identifikation des Erregers ermöglichen [31, 33, 45], oder den Nachweis direkt durch einen Erreger-spezifischen PCR-Assay führen [12, 35, 47, 56].

Besonders die PCR-gestützten Verfahren erlangen zunehmend an Bedeutung.

Der große Vorteil dieser Methoden liegt zum einen im viel geringeren Zeitaufwand. So kann die Identifizierung des Erregers innerhalb weniger Stunden erfolgen und nimmt nicht, wie bei der kulturellen Diagnostik, unter Umständen mehrere Tage in Anspruch [6, 7]. Außerdem werden zum Nachweis der DNA mittels PCR keine vitalen Erreger benötigt. Dies kommt besonders Patienten zu Gute, die bereits Antibiotika erhalten haben und bei denen oft kein kultureller Nachweis der Keime mehr gelingt [6, 36]. Ein weiterer Vorteil der PCR-gestützten molekularbiologischen Diagnostik ist, dass damit auch der Nachweis von sehr anspruchsvollen Erregern, z.B. Hefen, gelingt, die kulturell nur schwer angezüchtet werden können.

Insgesamt besteht die Hoffnung, dass vor allem immunsupprimierte Patienten von einer schnelleren Diagnostik profitieren. Sie sind auf Grund ihrer schlechten Immunkompetenz besonders auf eine schnelle und gezielte antimikrobielle Therapie angewiesen, um ihre Prognose bei Infektionen mit Bakterien oder Pilzen zu verbessern. Außerdem konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass die Blutkulturdiagnostik bei Patienten nach Knochenmarks- oder Stammzelltransplantation eine besonders geringe Sensitivität aufweist [39, 54]. Hier wäre die PCR-Diagnostik eine viel versprechende Alternative.

Ein Problem der neuen Methoden liegt in der zum Teil noch zu geringen Sensitivität im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik [35, 47]. Als mögliche Gründe dafür werden ein zu geringes Blutvolumen, aus dem der DNA-Nachweis erfolgen soll, und inhibierende Komponenten, wie humane DNA und Immunglobuline, diskutiert [19, 25, 41, 47]. Erschwerend kommt noch hinzu, dass die Menge der humanen DNA in den Blutproben die der Erreger-DNA bei weitem übersteigt, sodass es durch den hohen humanen DNA Hintergrund häufig zu Kreuzreaktionen bei der Diagnostik kommt.

Es wurden bereits verschiedene Erreger-spezifische-PCR-Assays entwickelt, die allerdings nur dann zum Einsatz kommen können, wenn der Verdacht auf eine Infektion mit einem bestimmten Erreger vorliegt. Zum generalisierten Screening auf eine Blutstrominfektion sind sie nicht geeignet.

1.2 *MolYsis*

Wie bereits oben erwähnt, stellt der Nachweis von Erregern im Blut mittels PCR eine schnelle und viel versprechende Diagnostikmethode dar. Um die Sensitivität zu verbessern und die neue Methode somit für den Klinikalltag etablieren zu können, entwickelte die Firma Molzym GmbH & Co. KG, Bremen ein neues Konzept zur Entfernung des humanen DNA-Hintergrundes aus Blutproben. Dieses soll zum einen die Inhibition der PCR verhindern und zum anderen eine DNA-Isolierung auch aus größeren Blutvolumina ermöglichen. Die Sensitivität von PCR-basierten Methoden soll so erhöht werden.

Zu Grunde liegt das so genannte „*MolYsis*-Prinzip“: Zur Lyse der Blutzellen wird ein spezieller Puffer verwendet, der zwar die Zellmembran der Blutzellen angreift, nicht aber die Zellwand der Bakterien. Die humane DNA liegt nun frei vor und kann durch die MolDNAse degradiert werden, während die bakterielle DNA noch von der Zellwand geschützt vorliegt und somit nicht abgebaut werden kann. Nun kann in einem weiteren Schritt die Lyse der bakteriellen Zellen mit anschließender DNA-Isolierung der bakteriellen DNA erfolgen.

Das „*MolYsis*-Prinzip“ ist in Abb. 1 schematisch dargestellt.

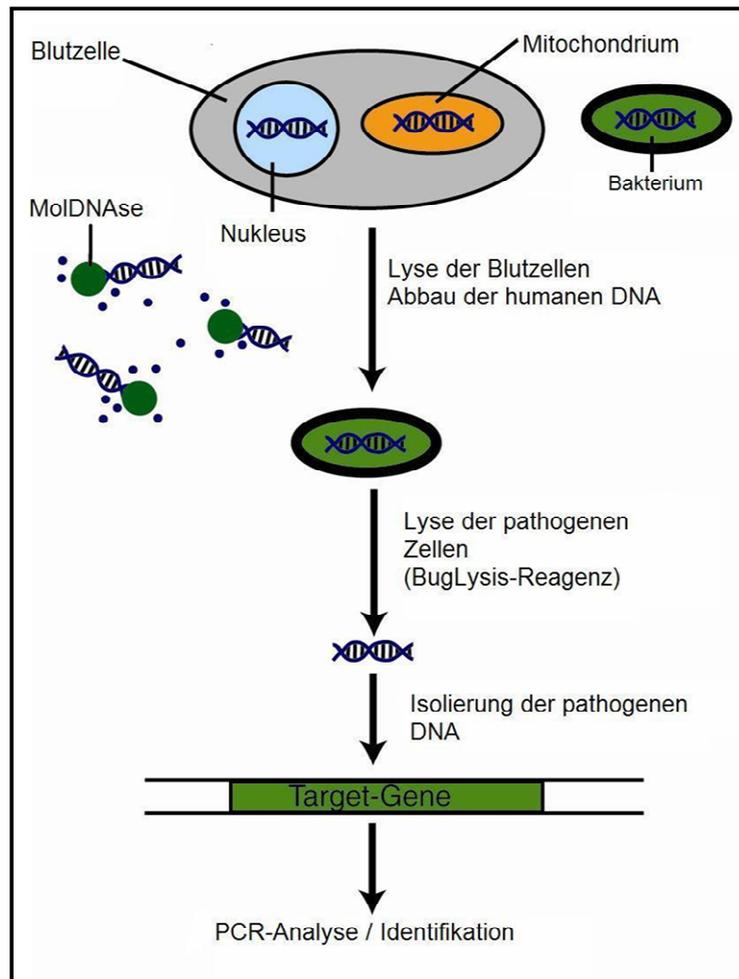


Abb. 1: Schematische Darstellung des „MolYsis-Prinzips“ (Molzylm, Bremen)

DNA: Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Anschließend kann nun der Nachweis der mikrobiellen DNA mittels real-time PCR erfolgen.

1.3 Zielsetzung des Projekts

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit liegt in der Beantwortung der Frage, ob sich mithilfe von DNA-Isolierung mittels *MolYsis* und anschließender real-time PCR-Untersuchungen aus Nativblut von immunsupprimierten Patienten mit klinischem Verdacht auf Bakteriämie oder Fungämie mikrobielle DNA im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik früher und / oder sensitiver nachweisen lässt. Dazu soll ein PCR-Algorithmus entwickelt werden, der die häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen beinhaltet und somit zum generalisierten Screening bei Verdacht auf eine Infektion geeignet ist.

Anschließend soll in Kooperation mit der Firma Molzym, Bremen, in einer prospektiven Studie an immunsupprimierten Patienten der Uniklinik Ulm das neue Verfahren im direkten Vergleich zur Blutkulturdiagnostik getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa, destilliertes Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Isoseptol	Klinikumsapotheke Universität Ulm
Natriumhypochlorit	Hedinger, Stuttgart
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.2 Verbrauchsmittel

Filterpipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
LightCycler [®] Kapillaren 20 µl	Roche, Mannheim
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2 ml	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße 10 und 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.3 Diagnostische Probengefäße

S-Monovette [®] Citrat 1,4, 2,9 und 5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Bactec [™] Aerobic Plus/F BC Flaschen	BD Biosciences, Heidelberg
Bactec [™] Anaerobic Plus/F BC Flaschen	BD Biosciences, Heidelberg
Bactec [™] Peds Plus/F BC Flaschen	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.4 Kommerzielle Reagenzienkits

Zur Aufreinigung chromosomaler DNA:

MolYsis Complete	Molzylm, Bremen
------------------	-----------------

Zur Durchführung der Polymerase Kettenreaktion (PCR):

Taq DNA-Polymerase mit 10fach Puffer	Qiagen, Hilden
LightCycler [®] FastStart DNA Master ^{Plus} HybProbe	Roche, Mannheim

2.1.5 Oligonukleotide und Sonden

Primer

(bezogen von Thermo Scientific, Ulm und Tib MolBiol, Berlin)

Name	Sequenz 5´-3´	Zielgen	Referenz
DG74	AGGAGGTGATCCAACCGCA	16S rDNA (eubakteriell) Bindestelle Referenzseq 1 Base 225292-225311	Greisen et al. [22]
FungL1046	CCGATCCCTAGTCGGCATAG	18S rDNA (panfungal) Bindestelle Referenzseq 2 Base 1911-1931	Einsele et al. [15]
FungL543	ATTGGAGGGCAAGTCTGGTG	18S rDNA (panfungal) Bindestelle Referenzseq 2 Base 543-563	Einsele et al. [15]
mecA-F2	GGTGAAGATATACCAAGTGAT TA	Gen <i>mecA</i> (Methicillin- Resistenz) Bindestelle Referenzseq 7 Base 1605-1627	Martineau et al. [38]
mecA-R2	GTGAGGTGCGTTAATATTGC	Gen <i>mecA</i> (Methicillin- Resistenz) Bindestelle Referenzseq 7 Base 1765-1784	Martineau et al. [38]
nuc274-F	GATTGATGGTGATACGGT	Gen <i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>) Bindestelle Referenzseq 3 Base 887998-8880016	Costa et al. [13]
nuc274-R	CAAGCCTTGACGAACTA	Gen <i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>) Bindestelle Referenzseq 3 888255-888271	Costa et al. [13]
RW01	AACTGGAGGAAGGTGGGGAT	16S rDNA (eubakteriell) Bindestelle Referenzseq 1 Base 224941-224961	Greisen et al. [22]

Referenzseq 1: NC 000913 *E. coli* K12

Referenzseq 2: E 15168 *C. albicans* 18S Gen

Referenzseq 3: CP 000046 *S. aureus* COL

Referenzseq 7: X53593 *Staphylococci mecA* Gen

DNA – Sonden für real-time PCR-Analysen

(bezogen von Tib MolBiol, Berlin)

Name	Sequenz und Markierung (5´-3´)	Zielsequenz	Referenz
C.alb-FL	AGCCTTTCTTCTGGGTAGCCAT T –FL	18S rDNA Bindestelle Referenzseq 2 Base 687-710	Klingspor et al. [28]
C.alb-LC	LC Red640 – TGGCGAACCAGGACTTTTACTTT GA	18S rDNA Bindestelle Referenzseq 2 Base 712-737	Klingspor et al. [28]
Can-FL	CCAAGGACGTTTTTCATTAATCAA GA – FL	18S rDNA Bindestelle Referenzseq 2 Base 935-959	Klingspor et al. [28]
Can-LC	LC Red640 - CGAAAGTTAGGGGATCGAAGATG	18S rDNA Bindestelle Referenzseq 2 Base 961-983	Klingspor et al. [28]

Material und Methoden

Entbac-TM	6 FAM - CATGAATCACAAAGTGGTAAG CGCCC XT	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 9 Base 1456-1481	Wellinghausen et al. [56]
Ent-FL	TCTAGCGACTCGTTGTACTIONTCC CATTGT – FL	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 8 Base 1202-1229	Wellinghausen et al. [56]
Ent-LC	LC 640 – GCACGTGTGTAGCCCAGGTCA TAAG	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 8 Base 1230-1255	Wellinghausen et al. [56]
Gram- anchor	CGGAGGAAGGTGGGGATGAC GTCAA – FL	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 1 Base 224943-224967	Bestmann [8]
Gram-neg	LC Red640 - TCATCATGGCCCTTACG	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 1 Base 224969-224985	Bestmann [8]
Gram-pos	LC Red705 - TCATCATGGCCCTTACG	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 1 Base 224969-224985	Bestmann [8]
Mec-HP1	CAGGTTACGGACAAGGTGAAA TACTGATT – FL	Gen <i>mecA</i> (Methicillin- Resistenz) Bindestelle Referenzseq 7 Base 1689-1718	Reischl et al. [48]
Mec-HP2	LC Red640 – ACCCAGTACAGATCCTTTCAAT CTATAGCG	Gen <i>mecA</i> (Methicillin- Resistenz) Bindestelle Referenzseq 7 Base 1719-1749	Reischl et al. [48]
Nuc-FL	GTTTGACAAAGGTCAAAGAACT GATAAAT – FL	Gen <i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>) Bindestelle Referenzseq 3 Base 888172-888201	Costa et al. [13]
Nuc-LC	LC Red705 – TGGACGTGGCTTAGCGTATAT TTAT	Gen <i>nuc</i> (<i>S. aureus</i>) Bindestelle Referenzseq 3 Base 888203-888227	Costa et al. [13]
Staph-FL	CAACTTTATGGGATTTGCTTGA CCTCGC – FL	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 4 Base 1276-1303	Wellinghausen et al. [56]
Staph-LC	LC Red640 – GTTTCGCTGCCCTTTGTATTGT CCATT	16S rDNA Bindestelle Referenzseq 4 Base 1248-1274	Wellinghausen et al. [56]

FL: Fluorescein;

LC Red640: LightCycler-Red- 640-N-
Hydroxy-Succinimid-Ester

LC Red705: LightCycler-Red- 705-N-
Hydroxy-Succinimid-Ester

6 FAM: 6-Carboxy-Fluorescein

Referenzseq 1: NC 000913 *E. coli* K12

Referenzseq 2: E 15168 *C. albicans* 18S Gen

Referenzseq 3: CP 000046 *S. aureus* COL

Referenzseq 4: X 68417 *S. aureus* 16S Gen

Referenzseq 7: X53593 *Staphylococci mecA* Gen

Referenzseq 8: AB033635 *E. faecalis* 16S Gen

Referenzseq 9: J01859 *E. coli* 16S Gen

2.1.6 Mikroorganismen

Gram-positive Bakterien

Art	Herkunft
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 51299
<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC 29213
<i>Enterococcus faecium</i>	DSM 19434
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	ATCC 29213
<i>Staphylococcus aureus</i> (small colony variants, MSSA)	Klinisches Isolat
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	ATCC 43300
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
<i>Streptococcus oralis</i>	ATCC 35037
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 49619
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 20566
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	DSM 11865
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ATCC 6303
<i>Streptococcus pyogenes</i>	ATCC 12344

DSM: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen

Gram-negative Bakterien

Art	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922

Pilze

Art	Herkunft
<i>Candida albicans</i>	ATCC 14053
<i>Candida albicans</i>	ATCC 24433

ATCC: American Type Culture Collection

2.1.7 Geräte

Bactec™ 9240	BD Biosciences, Heidelberg
Biofuge Pico	Heraeus, Hanau
Captair® bio PCR-Werkbank	Erlab, Köln
Eismaschine AF 10	Scotsman, Mailand, Italien
Gefrierschränke	Liebherr, Ochsenhausen
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Laminar Air Flow Herasafe	Heraeus, Hanau
LightCycler® 1.5	Roche, Mannheim
Pipetboy acu	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Gilson, Limburg-Offheim
Polypropylen Adapter für 50 ml-Gefäße im JA-10 Rotor	Beckman Coulter, Krefeld
QIAcube	Qiagen, Hilden
Thermocycler TProfessional	Biometra, Göttingen
Thermocycler Hybaid Touchdown	MWG-Biotech, Eberstadt
Tiefkühlschrank -70 °C HeraFreeze	Heraeus, Hanau
UV-Schirm 312 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortexer Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Zentrifuge Avanti® J-25 mit Rotor JA-10	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.8 Computerprogramme

LightCycler® Software 3.5
Microsoft Office 2003 (Word, Excel, Access, Powerpoint)

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation chromosomaler DNA

Mit MolYsis Produkten

Standardprotokoll nach Empfehlung des Herstellers:

- Zugabe von 50 µl CM-Puffer zu 200 µl Probe, 5 sek vortexen
- 5 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zugabe von 50 µl DB1-Puffer und 10 µl MolDNAse, 5 sek vortexen
- 15 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation (10 min, 13.000 rpm)
- Verwerfen des Überstandes
- Lösen des Pellets in 1 ml RS-Buffer, 10 sek vortexen
- Zentrifugation (5 min, 13.000 rpm)
- Verwerfen des Überstandes
- Lösen des Pellets in 90 µl RL-Puffer
- Zugabe von 10 µl BugLysis-Lösung
- 30-45 min Inkubation bei 37-45 °C
- Zugabe von 150 µl RP-Puffer und 10-20 µl Proteinase K, 5 sek vortexen
- 10-30 min Inkubation bei 45-56 °C
- Zugabe von 250 µl CS-Puffer, 10 sek vortexen
- Zugabe von 250 µl AB-Puffer, 5 sek vortexen
- Beladen des Membransäulchens mit der Probe
- Zentrifugation (30 sek, 13.000 rpm)
- Zugabe von 400 µl WB-Puffer
- Zentrifugation (30 sek, 13.000 rpm)
- Zugabe von 400 µl Ethanol (70 %)
- Zentrifugation (3 min, 13.000 rpm)
- Umsetzen des Membransäulchen auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß
- Zugabe von 100 µl auf 70 °C erwärmten EB-Puffer
- 1 min Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugation (1 min, 13.000 rpm)
- Lagerung der DNA-Lösungen bei 4 °C oder bei -20 °C für spätere Analysen

MolYsis Complete

Zur Isolierung chromosomaler DNA von Mikroorganismen aus Patientenblutproben wurde *MolYsis Complete* verwendet. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Puffervolumina von CM und DB1 wurden wie folgt an die Probenvolumina angepasst:

1 ml Ausgangsvolumen	250 µl je Puffer, Reaktion im 2 ml Reaktionsgefäß
2 ml Ausgangsvolumen	800 µl je Puffer, Reaktion im 50 ml Reaktionsgefäß
5 ml Ausgangsvolumen	2 ml je Puffer, Reaktion im 50 ml Reaktionsgefäß

50 ml Reaktionsgefäße wurden in der Zentrifuge Avanti[®] J-25 mit Rotor JA-10 mit Hilfe von Adaptereinsätzen für diese Reaktionsgefäße bei Raumtemperatur 10 min bei 11.000 rcf zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 1 ml RS-Puffer gelöst und für die nachfolgenden Reaktionen in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zu allen Nativblutproben von Patienten des Universitätsklinikums Ulm wurden vor Inkubation mit BugLysis zusätzlich 1,4 µl β-Mercaptoethanol gegeben. Die Inkubationszeit von BugLysis betrug 30 min bei 37 °C, die Inkubation von Proteinase K wurde 10 min bei 56 °C durchgeführt.

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase und freien Desoxynukleotiden wird ein DNA-Fragment (Matrize) zwischen zwei definierten, an Strang bzw. Gegenstrang hybridisierenden Oligonukleotiden vervielfältigt. Die Reaktionsfolge besteht aus wiederholter, hitzeinduzierter Strangtrennung des DNA-Doppelstrangs, Oligonukleotid-Hybridisierung und der DNA-Synthese. Dem Verfahren liegt das Protokoll von Mullis und Faalona zugrunde [42]. In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR zum Nachweis von DNA, zur Detektion und zur Identifizierung von Pathogenen aus klinischen Patientenproben verwendet. Um Kontamination durch Fremd-DNA zu vermeiden, wurde bei der Durchführung von PCR-Läufen eine Captair[®] bio PCR-Werkbank verwendet. Alle Bestandteile der PCR-Ansätze, ausgenommen die Matrizen-DNA wurden unter der Werkbank in die Reaktionsgefäße gegeben. Zu Dekontaminationszwecken wurde die Arbeitsfläche der Werkbank vor und nach der Benutzung 10 min mit der dafür vorgesehenen UV-Lampe bestrahlt. Zusätzlich wurden die Arbeitsfläche und die

verwendeten Pipetten, Reaktionsgefäßhalter und Zentrifugen nach jeder Benutzung mit Natriumhypochlorit gereinigt.

Real-time PCR

Zur Quantifizierung amplifizierter DNA bereits während eines PCR-Laufs ohne spätere Analysen, kann man sich den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen in der so genannten real-time PCR Methode zunutze machen. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei verschiedene real-time PCR-Formate, basierend auf Hybridisierungssonden und TaqMan[®]-Sonden verwendet. Die theoretische Funktionsweise dieser zwei Verfahren ist in Abb. 2 schematisch dargestellt. Die Hybridisierungssonden waren mit Fluorescein und LightCycler[®] Red 640 oder LightCycler[®] Red 705 markiert, für TaqMan[®]-Sonden wurde FAM (6-Carboxy-Fluorescein) als Farbstoff gewählt. Zur Durchführung aller real-time PCR Formate wurde das Gerät LightCycler[®] 1.5 benützt. Wenn im Text nicht anders angegeben, wurde für alle real-time PCR Läufe das kommerziell erhältliche Reagenzienkit *LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe* verwendet. Die real-time PCR wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die real-time PCR-Läufe wurden mithilfe des Computerprogramms LightCycler Software 3.5 ausgewertet.

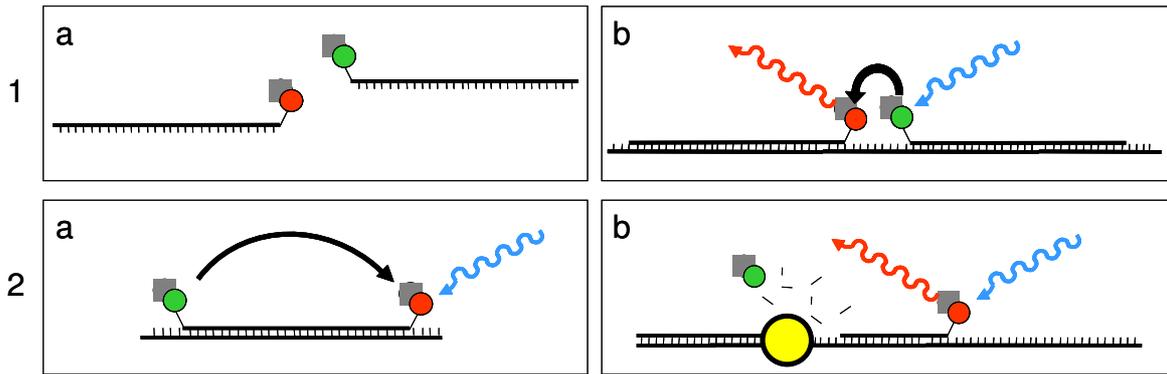


Abb. 2: Schematische Darstellung der verwendeten real-time PCR-Formate. (S.Gebert)

DNA: Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

1: Bei der Verwendung von sequenzspezifischen Hybridisierungssonden werden eine Akzeptor- (rot) und eine Donator-Sonde (grün) in den Ansatz gegeben (1a). Wenn beide Sonden durch Hybridisierung an die amplifizierte Matrizen-DNA in einen bestimmten räumlichen Abstand gebracht werden (1b), kommt es durch einstrahlendes Licht (blauer Pfeil) zum Elektronentransfer (schwarzer Pfeil) der Donator-Sonde und zur daraufhin messbar fluoreszierenden Akzeptor-Sonde (roter Pfeil).

2: Sequenzspezifische TaqMan[®]-Sonden (2a) bestehen aus einem fluoreszierenden Farbstoff (rote Kugel) und einem ebenfalls an die Nukleinsäure gebundenen Fluoreszenz-quenchenden Farbstoff (grüne Kugel). Erst wenn in der Synthesephase der PCR (1b) der quenchende Farbstoff durch den Sondenabbau der Polymerase (gelbe Kugel) in räumliche Entfernung gebracht wird, kommt es zur messbaren Fluoreszenz des Farbstoffs (roter Pfeil).

Standard real-time PCR-Ansatz mit Hybridisierungssonden:

- 3 µM je Donor- und Akzeptorsonde
 - 0,25-2 µM je 3´- und 5´-Oligonukleotid
 - 4 µl *LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe*
 - 5 µl Matrizen-DNA
 - A. dest.
- Endvolumen 20 µl

Standard real-time PCR-Ansatz mit TaqMan[®]-Sonden:

- 2 µM TaqMan[®]-Sonde
 - 0,5 µM je 3´- und 5´-Oligonukleotid
 - 4 µl *LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe*
 - 5 µl Matrizen-DNA
 - A. dest.
- Endvolumen 20 µl

Standard real-time PCR-Lauf

Denaturierung 10 min 95 °C

Amplifizierung $\left. \begin{array}{l} 10 \text{ sek } 95 \text{ °C} \\ 10 \text{ sek } x \text{ °C} \\ y \text{ sek } 72 \text{ °C} \end{array} \right\} 35\text{-}50 \text{ Zyklen, Temperaturänderung } 20 \text{ °C/sek}$

Schmelzpunktanalyse 40 °C – 95 °C, Temperaturänderung 0,1 °C/sek

Die Annealingtemperatur (x °C) lag 2-5 °C unterhalb der vom Hersteller angegebenen Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotide. Die Dauer der DNA-Synthese (y sek) berechnete sich nach der Länge des zu erwartenden PCR-Produkts. Für eine Länge von 1000 Basenpaaren wurden 40 sek veranschlagt.

Bei der Verwendung von Hybridisierungs-Sonden wurde zur Quantifizierung des PCR-Produkts ein Fluoreszenzmesspunkt nach jedem Hybridisierungsschritt während der Amplifikationsphase durchgeführt. Zur Ermittlung der Schmelztemperatur zwischen Hybridisierungs-sonden und PCR-Produkt wurde die Fluoreszenz während der Schmelzpunktanalysephase kontinuierlich gemessen.

Bei der Verwendung von TaqMan[®]-Sonden wurde ein Fluoreszenzmesspunkt nach der Synthesephase der Amplifikationsphase durchgeführt. Auf die Schmelzpunktanalyse wurde bei TaqMan[®]-Sonden verzichtet.

Um ein positives PCR-Ergebnis aufgrund von DNA-Kontamination der verwendeten Materialien auszuschließen, wurde in jedem PCR-Lauf eine Negativ- oder H₂O-Kontrolle ohne Zugabe von Matrizen-DNA mitgeführt.

Der PCR-Ansatz zur Durchführung der Gramdifferenzierenden PCR (Gramdiff-PCR):

- 3 µM je Hybridisierungssonde
- 0,25 µM Primer RW01
- 0,5 µM Primer DG74
- 4 µl *LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe*
- 5 µl Matrizen-DNA

6,5 µl A. dest.
Endvolumen 20 µl

Zum PCR-Ansatz wurden unterschiedliche Konzentrationen der jeweiligen Primer gegeben, da es bei symmetrischer Primerkonzentration zu einem sog. Hook-Effekt des gemessenen Fluoreszenzanstiegs kam. Laut Mitteilung des Herstellers kommt dieser dadurch zustande, dass der amplifizierte Gegenstrang mit den Hybridisierungs sonden um die Bindung an den DNA-Strang konkurriert und somit die Fluoreszenz bei hohen Konzentrationen des amplifizierten PCR-Produkts exponentiell abfällt. Durch geringere Konzentrationen an Gegenstrang-bildendem Primer im PCR-Ansatz konnte der Fluoreszenzabfall vermieden werden.

Die Gramdiff-PCR wurde mit folgendem LightCycler[®]-Programm durchgeführt:

Denaturierung	10 min	95 °C	} 37-40 Zyklen, Temperaturänderung 20 °C/sek
	10 sek	95 °C	
Amplifizierung	10 sek	55 °C	
	20 sek	72 °C	
Schmelzpunktanalyse	40 °C – 95 °C, Temperaturänderung 0,1 °C/sek		

Der PCR-Ansatz zur Durchführung der *Staphylococcus* spp.-spezifischen Staph-FL/LC-PCR (Staph-PCR):

0,5 µM	Primer DG74
0,5 µl	Primer RW01
0,2 µM	HybProbe Staph FL
0,2 µM	HybProbe Staph LC
4 µl	<i>LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe</i>
5 µl	Matrizen-DNA
7 µl	A. dest.
Endvolumen 20 µl	

Der PCR-Ansatz zur Durchführung der *Staphylococcus aureus*-spezifischen S.aur-PCR (Nuc-FL/LC):

1 µM	Primer nuc274F
0,25 µM	Primer nuc274R
0,15 µM	nuc274-FL
0,15 µM	nuc274-LC705
4 µl	<i>LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe</i>
5 µl	Matrizen-DNA
7 l	A. dest.
Endvolumen 20 µl	

Die Staph-PCR und die S.aur-PCR wurden mit folgendem LightCycler[®]-Programm durchgeführt:

Denaturierung	10 min	50 °C	} 50 Zyklen, Temperaturänderung 20 °C/sek
Amplifizierung	10 sek	95 °C	
	10 sek	50 °C	
	15 sek	72 °C	
Schmelzpunktanalyse	40 °C – 95 °C, Temperaturänderung 0,1 °C/sek		

Der PCR-Ansatz zur Durchführung der *Enterococcus/Streptococcus* spp.-PCR Ent-FL/LC (Ent/Strep-PCR) :

0,25 µM	Primer DG74
1,25 µM	Primer RW01
0,15 µM	HybProbe Ent FL
0,15 µM	HybProbe Ent LC
4 µl	<i>LightCycler[®] FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe</i>
5 µl	Matrizen-DNA
6 µl	A. dest.
Endvolumen 20 µl	

Auch hier wurden zur Vermeidung des Hook-Effektes asymmetrische Konzentrationen der jeweiligen Primer zum PCR-Ansatz gegeben (s. oben).

Die Ent/Strep.-PCR wurde mit folgendem LightCycler®-Programm durchgeführt:

Denaturierung	10 min	50 °C	} 50 Zyklen, Temperaturänderung 20 °C/sek
Amplifizierung	10 sek	95 °C	
	10 sek	50 °C	
	15 sek	72 °C	
Schmelzpunktanalyse	40 °C – 95 °C, Temperaturänderung 0,1 °C/sek		

Der PCR-Ansatz zur Durchführung der *Candida* spp.-spezifischen-PCR Can-FL/LC (Can-PCR):

0,25 µM	Primer FungL543
0,75 µM	Primer FungL1046R
0,15 µM	Can-LC640neu
0,15 µM	Can-FLneu
4 µl	<i>LightCycler® FastStart DNA Master^{Plus} HybProbe</i>
5 µl	Matrizen-DNA
7 µl	A. dest.
Endvolumen 20 µl	

Auch hier wurden zur Vermeidung des Hook-Effektes asymmetrische Konzentrationen der jeweiligen Primer zum PCR-Ansatz gegeben (s. oben).

Die Cand-PCR wurde mit folgendem LightCycler®-Programm durchgeführt:

Denaturierung	10 min	95 °C	} 50 Zyklen, Temperaturänderung 20 °C/sek
Amplifizierung	10 sek	95 °C	
	10 sek	58 °C	
	20 sek	72 °C	
Schmelzpunktanalyse	50 °C – 80 °C, Temperaturänderung 0,1 °C/sek		

Zusätzlich zu diesen PCR-Assays wurden noch weitere durchgeführt: Die *Enterobacteriaceae*-spezifische Taqman[®]-Sonde Entbac-TM ist der Publikation von Wellinghausen et al. entnommen und in diesem Rahmen umfangreich evaluiert worden [56]. Die *mecA*-Gen-spezifischen Hybridisierungssonden Mec-HP1/HP2 zum Nachweis des Methicillinresistenz-vermittelnden Gens *mecA* sind der Publikation von Reischl et al. entnommen und ebenfalls umfangreich evaluiert [49]. Die Sonden C.alb-FL und C.alb-LC, zum Nachweis von *Candida albicans*, sind der Publikation von Klingspor et al. entnommen und bereits in diesem Rahmen evaluiert worden [28].

Die PCR-Assays wurden mit unverändertem Protokoll übernommen. Die Sequenzen der zugehörigen Primer und Sonden sind in Kapitel 2.1.5 angegeben.

Quantitative real-time PCR

Mithilfe des LightCycler-Gerätes und dessen Software lassen sich aus definierten DNA-Mengen Standardkurven erstellen und als solche definieren. Dies ermöglicht eine absolute Quantifizierung der DNA. Durch Mitführen eines Referenzwertes in einem PCR-Lauf, der innerhalb der erstellten Standardkurve liegt, lässt sich nach Beendigung des PCR-Laufes die DNA-Konzentration der einzelnen Ansätze ermitteln. Dazu wird mithilfe der Software die vorab erstellte Standardkurve in den Lauf eingelesen. In der vorliegenden Arbeit wurde die quantitative real-time PCR verwendet, um bakterielle DNA in klinischen Blutproben quantitativ zu messen. Beim Erstellen von Standardkurven wurde eine Suspension mit *Staphylococcus epidermidis* oder *Escherichia coli* hergestellt und 1:10-Verdünnungsstufen der Lösung erstellt. Es wurden 50 µl von 5-6 Verdünnungsstufen der Bakteriensuspension in je 5 ml Blut von gesunden Probanden gegeben. Die DNA der gespikten Blutproben wurde mithilfe von *MolYsis Complete* isoliert und in die real-time PCR eingesetzt. Um die isolierte DNA zu stabilisieren wurde das Isolat mit MS2RNA in einer Endkonzentration von 10 ng/µl versetzt und bei 4 °C gelagert.

Inhibitionskontrollen in real-time PCR Läufen

Zur Positivkontrolle wurde für jeden PCR-Lauf die DNA eines, für die jeweilige PCR relevanten Erregers, in der Konzentration 1 ng/µl mitgeführt. Die

verwendeten Spezies sind in Kapitel 2.1.6 aufgelistet. Dies diente zum Ausschluss PCR-inhibierender Substanzen in den DNA-Proben. Die eingesetzte DNA-Konzentration lag 10-100fach über der Nachweisgrenze der PCR.

2.2.3 Klinische Studie an Patientenblut (*Blutkultur-PCR-Studie*)

Der Hauptaspekt der vorliegenden Arbeit war die Frage, ob sich mithilfe von real-time PCR-Untersuchungen aus Nativblut von immunsupprimierten Patienten mit klinischem Verdacht auf Bakteriämie oder Fungämie mikrobielle DNA im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik früher und/ oder sensitiver nachweisen lässt. Diese Fragestellung wurde im Rahmen einer klinischen Studie (*Blutkultur-PCR-Studie*) im Zeitraum von 09. Dezember 2007 bis 31. August 2008 an insgesamt 973 Blutproben von 421 Patienten des Uniklinikums Ulm mit klinischem Verdacht auf Sepsis untersucht. Als immunsupprimiert galten davon 208 Patienten, von denen 490 Proben bearbeitet wurden (Einschlusskriterien siehe unten). Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Ulm wurde mit dem Aktenzeichen 175/07 erteilt.

Es wurden Patienten von folgenden Stationen eingeschlossen:

- Kinderklinik-Stationen 2 (Allgemeine Pädiatrie), 3, 6 und 7 (Hämatologie und Knochenmarktransplantation)
- Kindertagesklinik
- Infektionsstation M1C
- Notaufnahme Innere Medizin M1B
- Knochenmarkstransplantationsstation M3E
- Innere Medizin Intensiv-Station M3G
- Hämatologisch-internistische Stationen M4A-D

Einschlusskriterien für Patienten in die Studie umfassten:

- a) SIRS oder Sepsis gemäß den Kriterien der Deutschen Sepsisgesellschaft [1] bei Patienten auf Intensivstationen
- b) Fieber (>38,5 °C) in Neutropenie bei hämatologischen Patienten
- c) Verdacht auf neonatale Sepsis nach den NEO-KISS-Kriterien. Diese beinhalten mindestens zwei der folgenden Kriterien:

- Fieber (>38 °C) oder Hypothermie (<36,5 °C) oder Temperaturinstabilität
 - Tachykardie (>200/min) oder vermehrte Bradykardien (<80/min)
 - Rekapillarierungszeit >2 sek
 - vermehrte Apnoe (>20 sek)
 - unerklärte metabolische Azidose,
 - Hyperglykämie (>140 mg/dl)
 - andere Sepsiszeichen wie Hautkolorit, laborchemische Zeichen (CRP, IL), erhöhter Sauerstoffbedarf, instabiler Allgemeinzustand, Apathie
- d) Verdacht auf Bakteriämie bei Patienten, die nicht a) bis c) zuzuordnen sind, z. B. bakterielle Endokarditis

Die vorliegende Arbeit berücksichtigte bei der Auswertung der Daten nur das Patientenkollektiv der immunsupprimierten Patienten. Als Einschlusskriterien für diese Gruppe galten folgenden Erkrankungen der Patienten:

- Hereditäre Immundefekte
- Erworbene Immundefizienz
 - bei hämatologischen oder onkologischen Erkrankungen (Chemotherapie, PBSCT, KMT), („Fieber in Neutropenie“)
 - durch HIV-Infektion
 - durch schwere Immunsuppression im Rahmen von Vaskulitiden

Zur PCR-Analyse wurde den Patienten Blut in S-Monovetten[®] Citrat vom behandelnden Pflegepersonal abgenommen. Von erwachsenen Patienten wurden 5 ml Blut entnommen und von Kindern 1,4 oder 2,5 ml. Das Pflegepersonal wurde angewiesen, nicht mehr als 5 Blutentnahmen bei Erwachsenen und 3 bei Kindern durchzuführen. Alle Patienten bzw. bei minderjährigen Patienten die Eltern wurden über die Durchführung und die freiwillige Teilnahme an der Studie aufgeklärt. Die Einwilligungserklärung für die Übereignung des Blutes und die Erlaubnis zur Erfassung der Daten wurde von jedem eingeschlossenen Patienten bzw. bei minderjährigen Patienten von den Eltern schriftlich bestätigt. War der Patient zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht einwilligungsfähig, fand eine post-hoc Aufklärung statt.

Die beiden Verfahren zur Sepsisdiagnostik (PCR und Blutkultur) sollten direkt miteinander verglichen werden. Darum wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, dass die Blutentnahmen für die Blutkulturdiagnostik und für die PCR-Diagnostik zum selben Zeitpunkt und aus derselben Injektion, d. h. aus derselben Blutprobe, durchgeführt wurden. Das abgenommene Citrat-Blut wurde mithilfe eines Aufklebers vom behandelnden Pflegepersonal an die parallel abgenommene Blutkulturflasche geklebt, um eine eindeutige Zuordnung sicherzustellen. Die Proben wurden auf dem herkömmlichen Probentransportweg des Klinikums bei Raumtemperatur von den jeweiligen Klinikstationen in das mikrobiologische Diagnostiklabor gebracht. Von Montag bis Freitag wurde die Isolierung der mikrobiellen DNA der Blutproben jeweils um 10 Uhr und um 15 Uhr mit dem Reagenzienkit *MolYsis Complete*, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, unter einer Captair® bio PCR-Werkbank durchgeführt. Übernacht und über das Wochenende bzw. Feiertage wurden die Blutproben bis zum nächsten Werktag bei 4 °C aufbewahrt. Die isolierte DNA wurde aufgeteilt und 50 µl für die spätere real-time PCR-Analyse bei 4 °C gelagert. Der restliche Teil der Probe wurde bei -20 °C gelagert.

Zur besseren Übersicht und zur Gewährleistung des Datenschutzes wurden den Proben Nummern gegeben. Alle Proben eines Patienten wurden chronologisch entsprechend der Blutabnahmezeit erfasst und sortiert. Die Nummerierung wurde nach dem Schema Zahl und Buchstabe vergeben, wobei die Zahl für einen Patienten stand und der Buchstabe für eine Probe, z.B. war Probe 7c die 3. Probe von Patient 7. Die mikrobielle DNA der ersten drei eingegangenen Blutproben von jedem Patienten wurde direkt zum nächstmöglichen Zeitpunkt nach Probeneingang isoliert. Gingen von einem Patienten mehr als drei Proben ein, wurden diese bei 4 °C aufbewahrt bis das Ergebnis der parallel abgenommenen Blutkultur feststand. Falls kulturell keine Mikroorganismen nachgewiesen werden konnten, wurde die Probe nicht in die Studie eingeschlossen. Falls die Blutkultur vom Bactec™-Gerät positiv gemeldet wurde, wurde die mikrobielle DNA der Probe zum nächstmöglichen Zeitpunkt isoliert. Blutproben eines Patienten, die innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen abgenommen wurden, wurden in eine Infektionsepisode eingeschlossen. Lagen zwischen dem Abnahmezeitpunkt von zwei Blutproben mehr als drei Wochen oder war der Patient zwischenzeitlich nach

Hause entlassen worden, wurde von einer neuen Infektionsepisode ausgegangen und diese wurde neu in das Kollektiv aufgenommen.

Die Proben wurden in einer passwortgeschützten Microsoft Office Access-Datenbank erfasst. Dabei wurden folgende Informationen zu den Blutproben und den Patienten erfasst:

Angaben zum Patient:

Name, Alter, Geschlecht, Station, Angaben zur Infektion (sofern vorhanden), Vorerkrankungen, Antibiotikatherapie während oder bis zu 48 h vor der Blutentnahme, sowie das Ergebnis von allen anderen Probenmaterialien, die vier Wochen vor Blutentnahme bis vier Wochen nach Blutentnahme im mikrobiologischen Diagnostiklabor des Uniklinikums Ulm eingegangen sind.

Angaben zur Blutprobe:

Probennummer, Datum und Uhrzeit der Blutentnahme, Datum und Uhrzeit des Probeneingangs im Labor, Datum der DNA-Isolierung, Lagerungszeit der Probe vor der DNA-Isolierung, Volumen, sowie die Ergebnisse der PCR-Analysen.

Angaben zur parallel abgenommenen Blutkultur:

Abnahmestelle (zentral, peripher, arteriell o. a.), laborinterne Nummer der Blutkultur, Ergebnis der Kulturdiagnostik, sowie die Zeit bis zu Positivmeldung des Bactec™-Gerätes.

Zum Vergleich der beiden Diagnostikmethoden (Blutkultur und PCR) wurden statistische Berechnungen durchgeführt. Die Sensitivität und die Spezifität der PCR-Untersuchungen im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik wurden nach folgenden Formeln berechnet:

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl der Blutkultur- und PCR-positiven}}{\text{Anzahl der Blutkultur-positiven}}$$

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl der Blutkultur- und PCR-negativen}}{\text{Anzahl der Blutkultur-negativen}}$$

Der negative bzw. positive Vorhersagewert der PCR-Untersuchung im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik berechnete sich nach folgenden Formeln:

$$\text{Positiver Vorhersagewert} = \frac{\text{Anzahl der richtig positiven}}{\text{Anzahl der richtig positiven} + \text{Anzahl der falsch positiven}}$$

$$\text{Negativer Vorhersagewert} = \frac{\text{Anzahl der richtig negativen}}{\text{Anzahl der richtig negativen} + \text{Anzahl der falsch negativen}}$$

2.2.4 PCR-Algorithmus

Ziel dieser Arbeit war die zeit- und kosteneffektive Identifizierung potentieller Sepsiserreger mithilfe von real-time PCR basierter Detektion bakterieller bzw. Pilz-DNA aus Blut von immunsupprimierten Patienten mit klinischem Verdacht auf Bakteriämie oder Sepsis. Auf Seite 4 Kapitel 1.1.4 ist das Erregerspektrum der Sepsis bzw. Bakteriämie wiedergegeben. Es wurde versucht, mit Hilfe eines Algorithmus der etablierten und zur Verfügung stehenden PCR-Assays sowohl ein breites Spektrum der häufigsten Erreger abzudecken als auch ein zeitnahes Ergebnis zu ermöglichen.

Mit Hilfe der Gram-Diff-PCR, die bei allen Proben als erstes durchgeführt wird, soll der Nachweis erbracht werden, ob sich überhaupt Bakterien-Spezies in der Blutprobe befinden und wenn ja, ob diese den grampositiven oder den gramnegativen Spezies zugerechnet werden können. Je nach Ergebnis erfolgen dann die weiteren PCR-Untersuchungen. Bei einem positiven Signal im Kanal F3 sind dies PCR-Untersuchungen zum Nachweis grampositiver Erreger (Staphylokokken-, Enterokokken- und Streptokokken-Spezies, siehe Abb. 3). Wird das Signal im Kanal F2 positiv, soll nachfolgend auf gramnegative Keime untersucht werden (*Enterobacteriaceae*-Spezies und *Pseudomonas aeruginosa*, siehe Abb. 3). Außerdem wird von allen Proben eine PCR zum Nachweis von *Candida*-Spezies durchgeführt, um auch Pilzinfektionen detektieren zu können.

Die PCR-Assays wurden wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die Sequenzen der Primer und Sonden sind im Kapitel Material auf den Seiten 11 und 12 angegeben.

Nach Wisplinghof et al. beinhaltet der in Abb. 3 dargestellte PCR-Algorithmus >90 % aller durch Blutkulturdiagnostik identifizierten bakteriellen und Pilz-Spezies monomikrobieller Blutstrominfektionen [59]. Mit Ausnahme der Bestimmung von MRSA ist der PCR-Algorithmus in jedem Fall mit drei PCR-Läufen beendet.

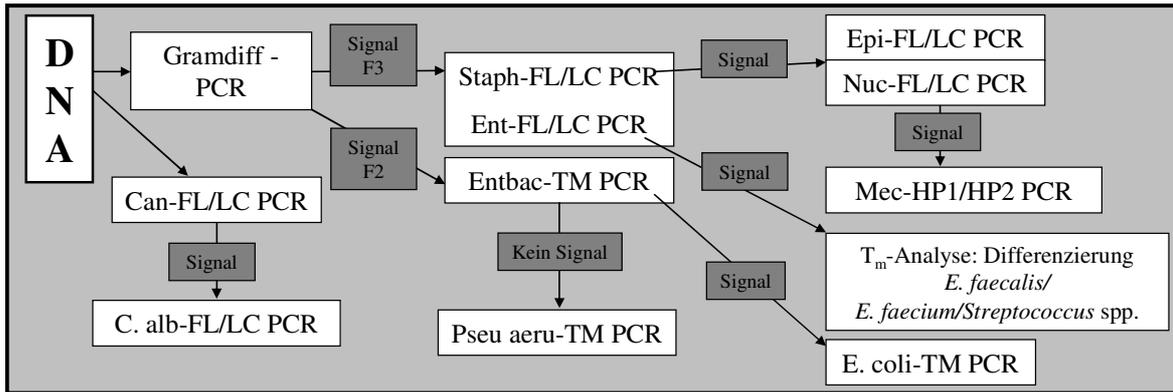


Abb. 3: Schematische Darstellung des Algorithmus aus gestaffelten real-time PCR-Läufen zur Identifizierung der Erreger von Blutstrominfektionen (S.Gebert)

DNA: Desoxyribonukleinsäure; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Gramdiff-PCR: Gramdifferenzierende PCR-Reaktion

Can-FL/LC PCR: *Candida* spp.-spezifische PCR-Reaktion

C.alb-FL/LC PCR: *Candida albicans*-spezifische PCR-Reaktion

Staph-FL/LC PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR-Reaktion

Ent-FL/LC PCR: *Enterococcus*-spezifische PCR-Reaktion

Pseu aeru-TM PCR: *Pseudomonas aeruginosa*-spezifische PCR-Reaktion

Epi-FL/LC PCR: *Staphylococcus epidermidis*-spezifische PCR-Reaktion

Nuc-FL/LC PCR: *Staphylococcus aureus*-spezifische PCR-Reaktion

Mec-HP1/HP2 PCR: *MecA*-Gen-spezifische PCR-Reaktion

E.coli-TM PCR: *Escherichia coli*-spezifische PCR-Reaktion

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*; *E. faecium*: *Enterococcus faecium*

spp.: Spezies

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war die Bearbeitung der Fragestellung, ob ein molekulares PCR-Diagnostikverfahren in Blutproben von immunsupprimierten Patienten mit Verdacht einer Bakteriämie oder Fungämie Vorteile gegenüber der herkömmlichen Blutkulturdiagnostik hat. Zur optimierten Isolierung von Erreger-DNA wurde in Kooperation mit der Firma Molzym, Bremen das „*MoYsis*-Verfahren“ verwendet und in der Dissertation „Molekulare Schnell Diagnostik bei Sepsispatienten“ von Susanne Gebert für die Fragestellung an unterschiedlichen Probenmaterialien optimiert [20]. Das neue diagnostische Verfahren wurde dann im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie, der *Blutkultur-PCR-Studie* an 384 Patienten des Universitätsklinikums Ulm mit klinischem Verdacht auf Bakteriämie oder Sepsis mit der Standarddiagnostik, der Blutkulturdiagnostik, verglichen.

3.1 Klinische Studie an Patientenblut (*Blutkultur-PCR-Studie*)

Ziel der *Blutkultur-PCR-Studie* war der direkte Vergleich der herkömmlichen Blutkulturdiagnostik mit der molekularen Diagnostik basierend auf real-time PCR-Analysen in Kombination mit dem DNA-Aufreinigungsverfahren *MoYsis Complete* aus Nativblut. In Kapitel 2.2.3 und 2.2.4 sind Details zum Projektplan und zur Durchführung der Studie erläutert.

3.1.1 Patientenkollektiv

Zwischen dem 07. Dezember 2007 und 31. August 2008 wurden 384 Patienten, davon 55 Kinder (jünger als 18 Jahre) und 329 Erwachsene, in die Studie eingeschlossen.

Die vorliegende Arbeit befasst sich speziell mit dem Patientenkollektiv der immunsupprimierten Patienten. Hierfür ergeben sich folgenden Zahlen: es wurden Proben von 208 immunsupprimierten Patienten untersucht, davon 155 Erwachsene und 53 Kinder.

Blutproben eines Patienten, die innerhalb eines Zeitraumes von acht Tagen abgenommen wurden, wurden in eine Infektionsepisode eingeschlossen. Lagen

zwischen dem Abnahmezeitpunkt von zwei Blutproben mehr als drei Wochen oder war der Patient zwischenzeitlich nach Hause entlassen worden, wurde von einer neuen Infektionsepisode ausgegangen und diese wurde neu in das Kollektiv aufgenommen. In einigen wenigen Fällen wurde innerhalb der ersten acht Tage in der parallel entnommenen Blutkultur nachfolgender Blutproben ein anderer klinisch relevanter Erreger nachgewiesen als in den vorhergehenden. Hier wurde dann aufgrund eines neuen Erregers eine neue Infektionsepisode angenommen und diese neu in das Kollektiv aufgenommen. Insgesamt wurden somit 284 Infektionsepidemien von immunsupprimierten Patienten, davon 86 von Kindern und 198 von Erwachsenen, eingeschlossen.

Bezogen auf Infektionsepidemien, bestand die Gruppe der Kinder aus 51 Jungen und 35 Mädchen, die der Erwachsenen aus 125 männlichen Patienten und 73 weiblichen Patienten. Details zur Altersstruktur der eingeschlossenen Patienten bezogen auf Infektionsepidemien zeigt Abb. 4.

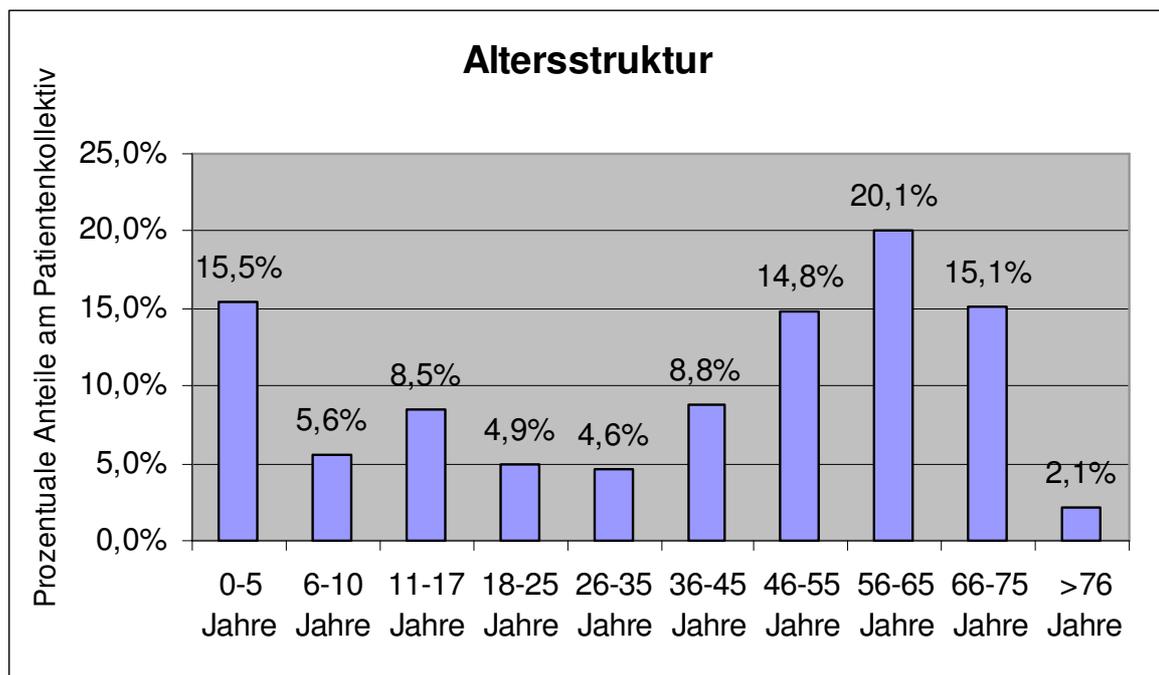


Abb. 4: Altersstruktur des Patientenkollektivs der immunsupprimierten Patienten der Blutkultur-PCR-Studie bezogen auf Infektionsepidemien

Alle eingeschlossenen immunsupprimierten Patienten wurden auf den in Tab. 1 und Tab. 2 aufgelisteten Stationen behandelt. Die Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Patienten, bezogen auf Infektionsepidemien auf den jeweiligen Stationen, ist in den Tabellen angegeben.

Tab. 1: Stationsverteilung des immunsupprimierten Patientenkollektivs der Blutkultur-PCR-Studie

IE: Infektionsepisoden

	M1B	M1C	M3E	M3G Intensiv	M4A/B	M4C/D	Kinder- klinik gesamt
Anzahl an IE	2 (0,7 %)	8 (2,8 %)	38 (13,4 %)	17 (6,0 %)	43 (15,1 %)	87 (30,6 %)	89 (31,3 %)

Tab. 2: Stationsverteilung der immunsupprimierten Kinderklinik-Patienten der Blutkultur-PCR-Studie

IE: Infektionsepisoden

	Kinder 2	Kinder 3	Kinder 6	Kinder 7	Kinder Tagesklinik
Anzahl an IE	1 (1,1 %)	48 (53,9 %)	3 (3,4 %)	23 (25,8 %)	14 (15,7 %)

Es wurden 89 Infektionsepisoden von Patienten der Kinderklinik in die Studie eingeschlossen. Die Diskrepanz zu der Anzahl an Infektionsepisoden von eingeschlossenen Kindern (86) kommt dadurch zustande, dass ein Patient mit zwei Infektionsepisoden der Kindertagesklinik und ein Patient mit einer Infektionsepisode der Kinderstation 3 zum Blutentnahmezeitpunkt bereits älter als 18 Jahre waren und aus diesem Grund nicht zum Patientenkollektiv „Kinder“ gezählt wurden.

Die Grunderkrankungen der immunsupprimierten Patienten zeigt Tab. 3.

Tab. 3: Schematische Darstellung der Grunderkrankungen des Patientenkollektives der immunsupprimierten Patienten

Grunderkrankungen	Anzahl an Patienten	prozentualer Anteil
Erworbene Immundefekte	6	2,9 %
Gehirntumore	4	1,9 %
Hereditäre Immundefekte	11	5,3 %
Leukämien	102	49,0 %
Lymphome	31	14,9 %
Sonstige hämatologische Neoplasien	36	17,3 %
Sonstige Tumoren	18	8,7 %
Gesamt	208	100,00 %

Die größte Gruppe der Grunderkrankungen, die der Leukämien, ist in Tab. 4 genauer aufgeschlüsselt. Der größte Anteil entfällt auf die akuten Leukämien, die knapp 85% der Leukämien ausmachen. Unter den akuten Leukämien ist die Akute Myeloische Leukämie (AML) am häufigsten vertreten.

Die Unterteilung der weiteren Grunderkrankungen ist im Anhang auf Seite 87 in Tab. 19 wiedergegeben.

Tab. 4: Aufteilung der Leukämien in die verschiedenen Subgruppen.

Grunderkrankung	Subgruppen	Anzahl an Patienten	prozentualer Anteil
Leukämien	Akute lymphatische Leukämie	29	28,4 %
	Akute myeloische Leukämie	57	55,9 %
	Chronisch lymphatische Leukämie	12	11,8 %
	Chronisch myeloische Leukämie	2	2,0 %
	prolymphozytäre Leukämie	2	2,0 %
	gesamt	102	100,0 %

3.1.2 Probenkollektiv

Insgesamt wurden von den 208 immunsupprimierten Patienten in 284 Infektionsepisoden 490 Proben untersucht, davon 335 Proben von Erwachsenen und 155 Proben von Kindern. Bezüglich der Anzahl der Proben pro Infektionsepisode siehe Tab. 5.

Tab. 5: Verteilung der untersuchten Blutproben pro Infektionsepisode

IE: Infektionsepisoden

	1 Blutprobe	2 Blutproben	3 Blutproben	>3 Blutproben
Anzahl an IE	134	101	44	5

In den Fällen, in denen mehr als drei Proben pro Infektionsepisode untersucht wurden, wurden zweimal fünf und dreimal vier Proben untersucht.

3.1.3 Parallele Blutkulturen

Das Fehlen der parallel abgenommenen Blutkultur (BK), eine falsche oder nicht mehr nachvollziehbare Zuordnung stellten Ausschlusskriterien dar. Daher war für alle in die Studie eingeschlossenen Blutproben ein Ergebnis der parallelen Blutkulturdiagnostik verfügbar. Die parallel abgenommenen Blutkulturen wurden in 202 Fällen peripher, in 285 Fällen aus zentralen Kathetern (davon in 138 Fällen aus Hickman-Kathetern) und in 2 Fällen arteriell entnommen. Für eine Blutprobe war die Information zur Abnahmestelle nicht verfügbar.

Die zu den Blutproben parallel abgenommenen Blutkulturen blieben in 396 Fällen negativ (80,8 %). In 87 Fällen wurde das Wachstum von Bakterien und in 7 Fällen das Wachstum von Hefen in den Blutkulturen nachgewiesen (19,2 % aller eingeschlossenen Blutkulturen, siehe Tab. 6). Bezogen auf Erwachsene und Kinder wurden bei den Erwachsenen 78 der parallel abgenommenen Blutkulturen positiv (23,3 % aller eingeschlossenen Blutkulturen bei Erwachsenen). Bei den Kindern waren es insgesamt nur 16 positive Blutkulturen (10,3 % aller eingeschlossenen Blutkulturen bei Kindern). Somit wurden bei den in die Studie eingeschlossenen Kindern deutlich weniger Blutkulturen positiv, als bei den eingeschlossenen Erwachsenen.

Insgesamt wurde in 101 Fällen ein Erreger in der Blutkultur nachgewiesen. Die Diskrepanz zu der Anzahl an positiven Blutkulturen (94) entsteht dadurch, dass in acht Blutkulturen mehrere Erreger gleichzeitig gewachsen sind. In 77 (76,2 %) Blutkulturen wurden grampositive Erreger identifiziert, am häufigsten Koagulase-negative-Staphylokokken (42,6 %), *Enterococcus* spp. (11,0 %) und *Streptococcus* spp. (10,0 %). *Staphylococcus aureus* wuchs in 5,0 % der positiven Blutkulturen. Gramnegative Bakterien konnten in 17 (16,8 %) Fällen nachgewiesen werden. Die häufigsten Erreger waren *Escherichia coli* (8,0 %), *Acinetobacter* spp. (3,0 %) und *Klebsiella* spp. (2,0 %). *Candida*-Spezies wurden in sieben (6,9 %) der positiven Kulturen gefunden. Abb. 5 zeigt die schematische Darstellung des Erregerspektrums.

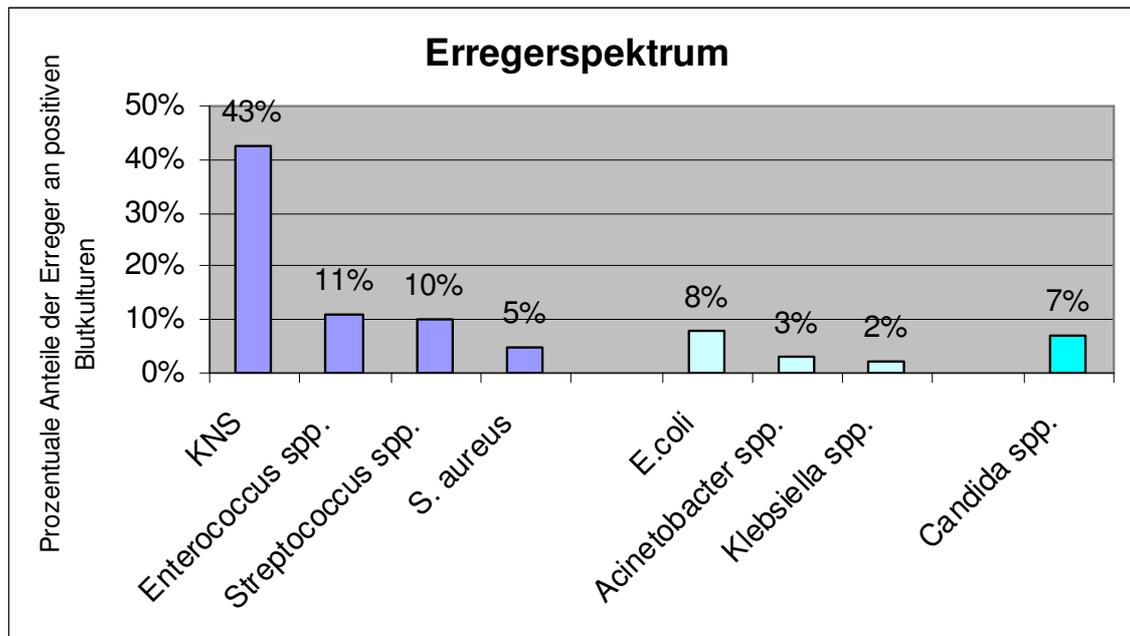


Abb. 5: Schematische Darstellung des Erregerspektrums in der Blutkultur-PCR-Studie

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken; spp.: Spezies
S. aureus: *Staphylococcus aureus*; *E. coli*: *Escherichia coli*

Die Ergebnisse und das Erregerspektrum der positiven Blutkulturen sind in Tab. 6 wiedergegeben.

Tab. 6: Ergebnisse der Diagnostik und Erregerspektrum der parallel zu den Blutproben abgenommenen Blutkulturen (BK) im Rahmen der Blutkultur-PCR-Studie

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken; spp.: Spezies

MSSA: Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*

Identifizierte Spezies	BK-Ergebnisse	
	Reinkultur	Mischkultur
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	1
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	1	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	1
<i>Bacillus pumilus</i>	2	-
<i>Candida albicans</i>	2	-
<i>Candida glabrata</i>	-	1
<i>Candida tropicalis</i>	4	-
<i>Corynebacterium striatum</i>	1	-
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	-
<i>Enterobacter</i> spp.	1	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	1
<i>Enterococcus faecium</i>	9	1
<i>Escherichia coli</i>	7	1
<i>Fusobacterium</i> spp.	2	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	-
KNS	4	3
<i>Lactococcus lactis</i>	1	1
<i>Micrococcus luteus</i>	2	-
<i>Morganella morganii</i>	1	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	4	-
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	-	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	4
<i>Streptococcus anginosus</i>	1	-
<i>Streptococcus mitis</i>	1	-
<i>Streptococcus oralis</i>	4	-
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	-	1
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	-
Summe Blutkulturen	86	8

In acht Fällen wurde mehr als ein Erreger in den parallelen Blutkulturen identifiziert. Diese Mischkulturen sind in der folgenden Tab. 7 mit dem Nachweis der identifizierten Erreger aufgelistet.

Tab. 7: Übersicht der parallel abgenommenen Blutkulturen (BK) mit gleichzeitigem Nachweis unterschiedlicher Erreger (Mischkulturen)

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken
spp.: Spezies

Identifizierte Spezies	BK-Ergebnisse
<i>Enterococcus faecalis</i> + <i>Escherichia coli</i>	1
<i>Staphylococcus aureus</i> + <i>Streptococcus parasanguinis</i> + KNS	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + KNS	1
<i>Acinetobacter</i> spp. + KNS	1
<i>Lactococcus lactis</i> + <i>Staphylococcus epidermidis</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Streptococcus salivarius</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i> + <i>Acinetobacter baumannii</i>	1
<i>Enterococcus faecium</i> + <i>Candida glabrata</i>	1
Summe Blutkulturen	8

Durch unsterile Abnahme der Blutkulturen kommt es immer wieder zur Kontamination der Kulturen. Diese zeigen dann lediglich ein Wachstum von Keimen, die der Hautflora des Menschen angehören. Bei den Erregerspezies, die typischerweise als Kontaminanten in Blutkulturen auftreten (*Staphylococcus epidermidis*, andere Koagulase-negative Staphylokokken, *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Propionibacterium* spp. und *Micrococcus luteus*) wurde deshalb eine positive Blutkultur nach folgenden Kriterien beurteilt: Wurde nur eine Blutkultur von mehreren, die innerhalb 24 Stunden abgenommen wurden, positiv, so wurde diese als kontaminiert und damit als nicht klinisch relevant bewertet. Wurde innerhalb 24 Stunden nur eine Kultur abgenommen und war diese positiv, so konnte zu einer eventuellen Kontamination keine Aussage getroffen werden. Bei mehreren positiven Blutkulturen innerhalb 24 Stunden wurde das Ergebnis als klinisch relevant bewertet.

Nach diesen Kriterien, sowie unter Berücksichtigung der klinischen Angaben zum Patienten und den mikrobiologischen Befunden anderer Materialien wurde

bewertet, ob es sich um eine Blutstrominfektion oder eine Kontamination handelt. Unter den positiven Blutkulturen bestand bei 16 (18,4 % aller 87 bakteriellen Nachweise bzw. 17,0 % aller positiven Blutkulturen) der Verdacht auf Kontamination. Die klinische Relevanz des positiven Blutkulturergebnisses konnte in sieben Fällen (8,1 % aller 87 bakteriellen Nachweise bzw. 7,5 % aller positiven Blutkulturen) nicht beurteilt werden. Alle Blutkulturen mit dem Nachweis typischer Kontaminanten sind in Tab. 8, entsprechend ihrer klinischen Bewertung aufgelistet.

Tab. 8: Ergebnisse der parallel abgenommenen Blutkulturen (BK) aufgeteilt nach der Bewertung der klinischen Relevanz; Angabe: Reinkultur/Mischkultur

Berücksichtigt sind nur positive Blutkulturen mit typischen Kontaminationskeimen
KNS: Koagulase-negative Staphylokokken; spp.: Spezies

Identifizierte Spezies	Klinisch relevante BK-Ergebnisse	Klinisch nicht relevante Ergebnisse (Verdacht auf Kontamination)	Klinisch nicht beurteilbare BK
<i>Corynebacterium</i> spp.	1/0	1/0	0/0
KNS	0/0	2/1	2/0
<i>Micrococcus luteus</i>	0/0	2/0	0/0
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18/2	10/1	5/0

Bei allen positiv gemeldeten Blutkulturflaschen wurde die Dauer der Inkubationszeit bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät erfasst. Die Inkubationszeiten sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9: Dauer bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät der parallel zu den Blutproben abgenommenen Blutkulturen (BK) in Stunden (h)

Berücksichtigt sind alle positiv gemeldeten Blutkulturen

	Klinisch relevante BK-Ergebnisse	Klinisch nicht relevante BK-Ergebnisse	Klinisch nicht beurteilbare BK-Ergebnisse	Subgruppe <i>Candida</i> -Kulturnachweise
Mittelwert	17,8 h	27,9 h	27,8 h	45,9 h
Minimum	2,9 h	3,9 h	14,7 h	18,2 h
Maximum	91,6 h	87,9 h	54,0 h	83,9 h

Blutkulturen mit klinisch relevanten bakteriellen Erregernachweisen werden signifikant früher im Bactec™-Gerät positiv gemeldet als Blutkulturen mit Verdacht auf Kontaminationskeime. Hefen benötigen wesentlich länger, bis das Wachstum vom Bactec™-Gerät detektiert wird, als Bakterien-Spezies.

3.1.4 PCR-Ergebnisse

Im folgenden Kapitel sind die Ergebnisse der PCR-Untersuchungen für die Proben von immunsupprimierten Patienten der *Blutkultur-PCR-Studie* erläutert. Alle PCR-Ergebnisse wurden mit dem Ergebnis der parallel entnommenen Blutkultur direkt verglichen und ausgewertet. Für Auswertungen, die sich auf einzelne Proben beziehen, wurden die Ergebnisse beider Diagnostikverfahren einer einzelnen Probe bzw. Blutkultur miteinander verglichen. Für Auswertungen, die sich auf die Infektionsepisoden der Patienten beziehen, gilt folgendes: Wenn ein Patient mindestens ein positives Ergebnis einer parallelen Blutkultur pro Infektionsepisode aufwies, wurde die Infektionsepisode in die Rubrik „positives BK-Ergebnis“ aufgenommen. Ebenso wurde eine Infektionsepisode in die Rubrik „positives PCR-Resultat“ aufgenommen, wenn mindestens eine der untersuchten Proben pro Infektionsepisode positiv in der PCR war.

PCR-Untersuchungen zur Identifizierung bakterieller Erreger

Eubakterielle Gramdifferenzierende PCR (Gramdiff-PCR)

Ursprünglich war das Vorgehen nach dem auf Seite 29 erläuterten Algorithmus für PCR-Untersuchungen der Proben der *Blutkultur-PCR-Studie* vorgesehen. Die Proben der ersten 123 Patienten des gesamten Studienkollektives wurden daher mit der Gramdiff-PCR untersucht. Für jede dieser Proben wurde eine interne Inhibitionskontrolle mitgeführt (Durchführung siehe S. 23). Keine der Proben zeigte PCR-Inhibition. Nach 123 Patienten wurde eine Zwischenauswertung durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine sehr geringe Sensitivität der Gramdiff-PCR im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik (<20 %). Daraufhin wurde die Gramdiff-PCR nicht mehr von allen Proben durchgeführt, sondern es wurden vorwiegend Proben ausgewählt, welche ein positives Ergebnis der parallelen Blutkultur zeigten. Dabei

standen die Blutkulturergebnisse bei der Durchführung und Interpretation der PCR nicht zur Verfügung. Nach einer weiteren Zwischenauswertung nach Einschluss von Patient Nr. 199 wurde schließlich beschlossen, auf die Durchführung der Gramdiff-PCR für die nachfolgenden Patienten zu verzichten. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Gramdiff-PCR für die immunsupprimierten Patienten erläutert, dabei wurden die Ergebnisse in Abbildung 6a und 6b für Erwachsene und Kinder getrennt ausgewertet. Insgesamt wurden 197 Proben von immunsupprimierten Patienten untersucht, keine der untersuchten Proben zeigte Inhibition der PCR. Die Ergebnisse sind in den Abb. 6, 6a und 6b schematisch dargestellt.

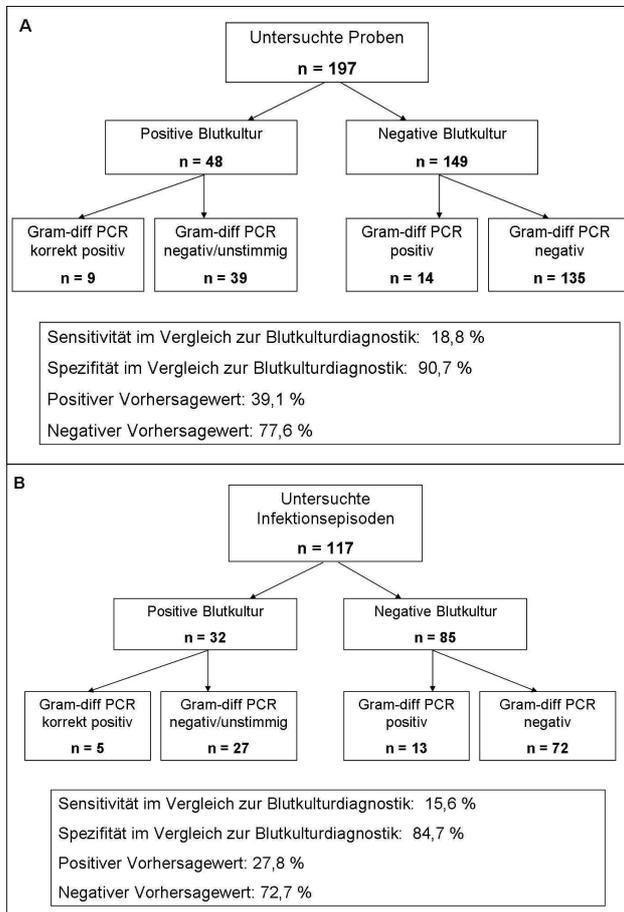


Abb. 6: Sensitivität und Spezifität der Gramdiff-PCR bei *allen* immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

Das Gramdiff-PCR-Resultat wurde korrekt bewertet, wenn ein Signal in dem für den kulturell nachgewiesenen Erreger entsprechenden Fluoreszenzkanal der PCR (F2/F3) messbar war.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
Gramdiff-PCR: Gramdifferenzierende PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Abb. 6a: Sensitivität und Spezifität der Gramdiff-PCR bei erwachsenen immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

Das Gramdiff-PCR-Resultat wurde korrekt bewertet, wenn ein Signal in dem für den kulturell nachgewiesenen Erreger entsprechenden Fluoreszenzkanal der PCR (F2/F3) messbar war.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
Gramdiff-PCR: Gramdifferenzierende PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

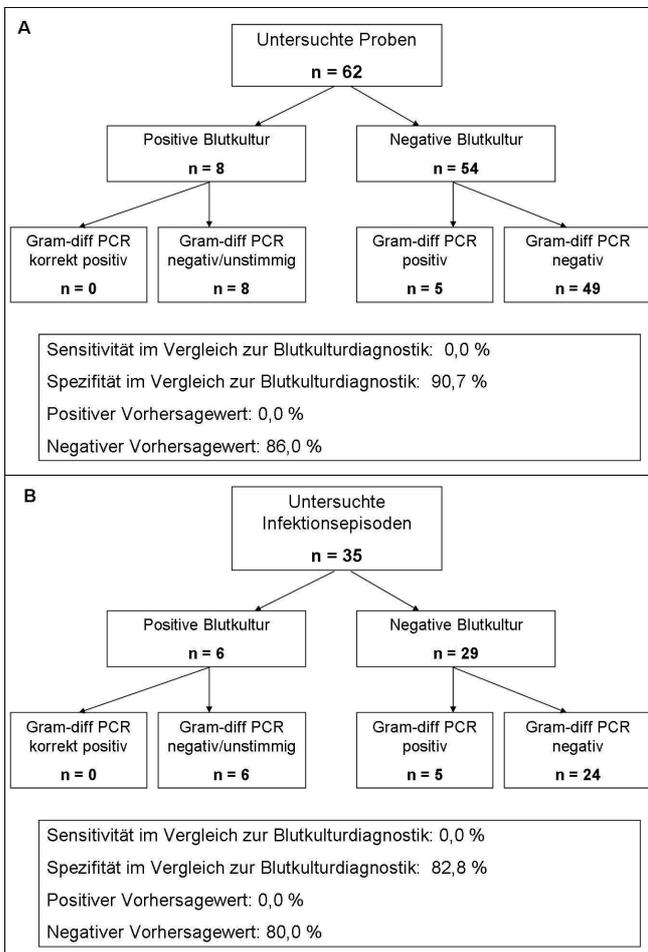
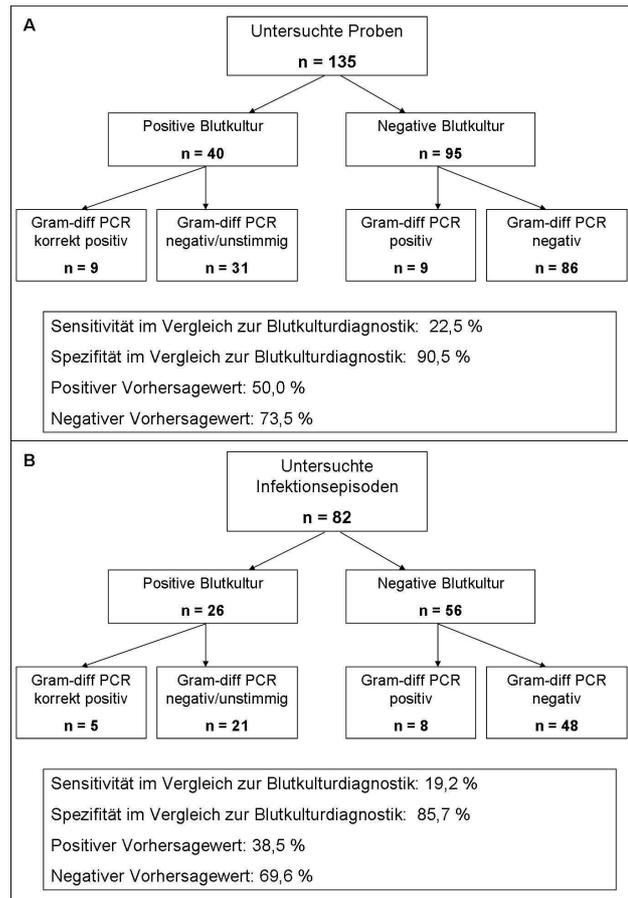


Abb. 6b: Sensitivität und Spezifität der Gramdiff-PCR bei immunsupprimierten Kindern im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

Das Gramdiff-PCR-Resultat wurde korrekt bewertet, wenn ein Signal in dem für den kulturell nachgewiesenen Erreger entsprechenden Fluoreszenzkanal der PCR (F2/F3) messbar war.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
Gramdiff-PCR: Gramdifferenzierende PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Alle mit der Gramdiff-PCR untersuchten Proben mit positivem PCR-Resultat und/oder positivem Ergebnis der Blutkulturdiagnostik sind im Anhang auf Seite 90 Tab. 20 mit der zugewiesenen Nummer aufgelistet. Gelb unterlegt sind alle Proben mit positivem PCR-Resultat bei negativem Ergebnis der Blutkulturdiagnostik. Grün unterlegt sind alle Proben mit korrektem PCR-Resultat entsprechend dem, in der parallelen Blutkultur diagnostizierten Erreger. Rot unterlegt sind alle Proben mit positivem Blutkultur-Befund bei negativem oder nicht-korrektem PCR-Resultat der parallelen Probe. Von 14 Patienten mit positivem PCR-Resultat, aber gleichzeitig negativem Blutkultur-Ergebnis, standen neun während der Blutentnahme unter Antibiotika-Therapie oder hatten prophylaktisch ein Antibiotikum erhalten.

PCR-Untersuchungen zur Identifizierung gram-positiver Erreger

Staphylococcus spp.-spezifische Staph-FL/LC-PCR (Staph-PCR)

Staphylokokken-Spezies sind die häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen. Alle Blutproben von immunsupprimierten Patienten der *Blutkultur-PCR-Studie* wurden deshalb mit der *Staphylococcus* spp.-spezifischen Staph-PCR untersucht. Bezogen auf alle untersuchten Blutproben mit positivem *Staphylococcus* spp.-Nachweis in der parallelen Blutkultur liegt die Sensitivität der PCR im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik bei 60,0 %, bezogen auf Infektionsepisoden bei 46,7 % (siehe Abb. 7). Die Spezifität liegt bei über 93 %.

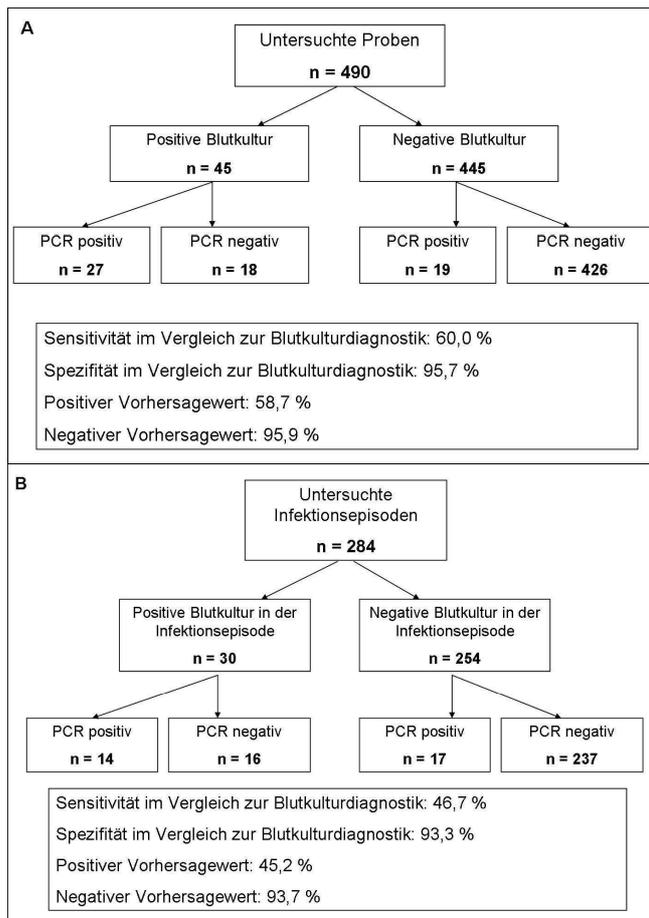


Abb. 7: Sensitivität und Spezifität der Staph-PCR bei immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

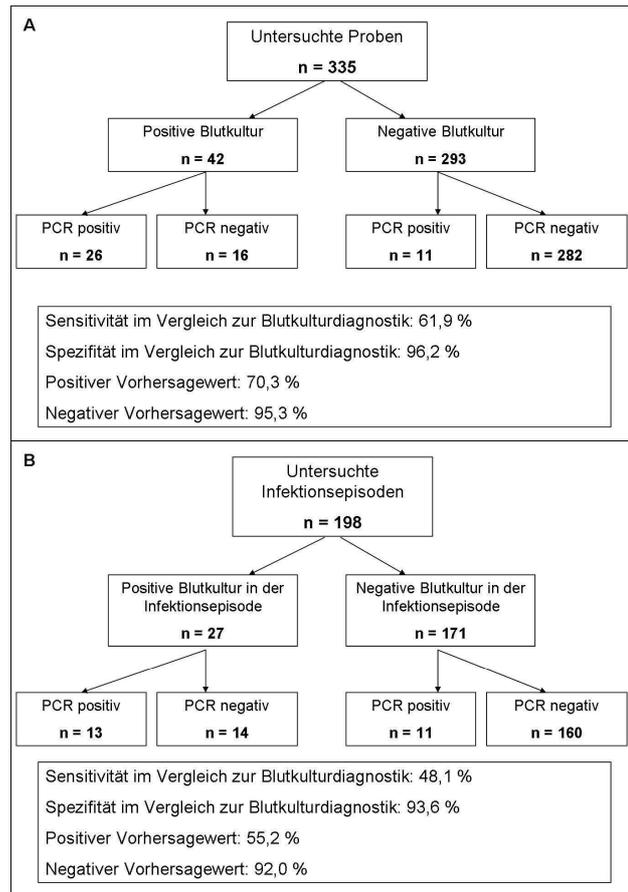
B: Untersuchte Infektionsepisoden
 Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Wertet man nur die Blutproben von erwachsenen immunsupprimierten Patienten aus, so erhält man, bezogen auf die einzelnen Proben, eine Sensitivität von 61,9 % und eine Spezifität von über 96 % im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik (siehe Abb. 7a).

Abb. 7a: Sensitivität und Spezifität der Staph-PCR bei immunsupprimierten Erwachsenen im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben
B: Untersuchte Infektionsepisoden
 Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR
 PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion



Beim Patientenkollektiv der immunsupprimierten Kinder wurden insgesamt nur in drei der 155 untersuchten Proben kulturell Staphylokokken-Spezies nachgewiesen. Eine Probe davon zeigte ein positives Ergebnis in der Staph-PCR. Hier würde sich somit rechnerisch eine Sensitivität im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik von 33,3 % ergeben. Auf Grund der zu geringen Fallzahl ist dies allerdings nicht aussagekräftig. Die Spezifität lag bei 94,7 % bezogen auf alle untersuchten Proben und bei 92,7 % bezogen auf die untersuchten Infektionsepisoden (siehe Abb. 7b).

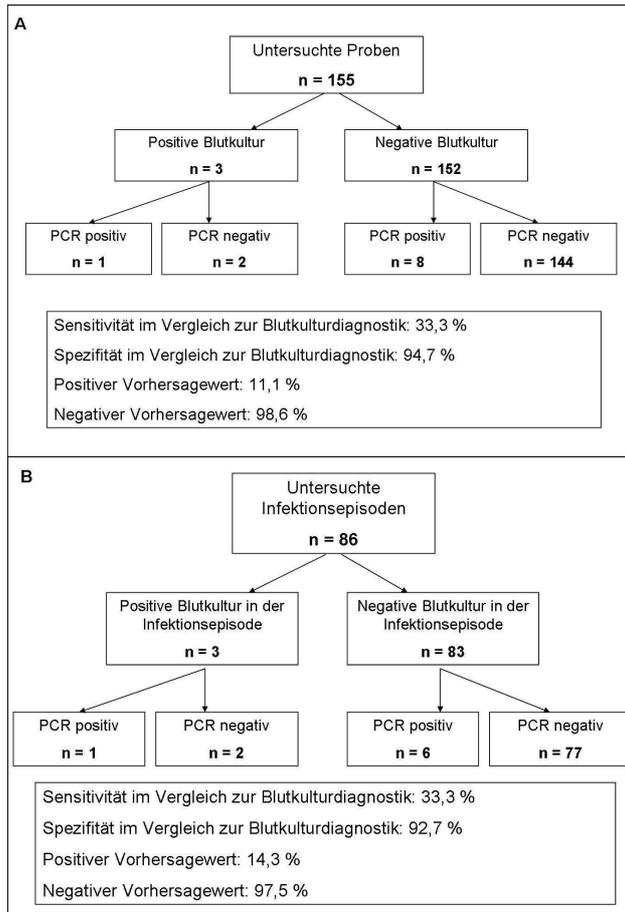


Abb. 7b: Sensitivität und Spezifität der Staph-PCR bei immunsupprimierten Kindern im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
 Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Tab. 10 zeigt alle Proben, bei denen in der parallelen Blutkultur *Staphylococcus*-Spezies gewachsen sind, die aber gleichzeitig ein negatives Staph-PCR-Resultat aufwiesen. Hier fällt auf, dass von den 18, in der Blutkultur positiven Proben, nur vier als klinisch relevant eingestuft wurden (in Tab. 10 fett markiert, siehe auch Tab. 11).

Das Blutkulturergebnis zeigte in 14 Fällen *Staphylococcus epidermidis*, in drei Fällen Koagulase-negative Staphylokokken und in einem Fall einen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*.

Tab. 10: Proben mit positivem *Staphylococcus spp.*-Ergebnis in der Blutkultur (BK), aber negativem PCR-Ergebnis

Antibiotika (AB) vor BK-Abnahme wurden berücksichtigt, wenn sie mindestens in den letzten 48 Stunden vor der Blutentnahme verabreicht wurden; die Zahl in Klammern gibt an, wie viele Tage (d) das Antibiotikum schon gegeben wurde ausgehend vom Abnahmedatum der BK; P steht für prophylaktische Antibiotika-Gabe

Mo: Montag; Mi: Mittwoch; Fr: Freitag; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken;

MRSA: Methicillin-Resistenter *Staphylococcus aureus*; *Staph.*: *Staphylococcus*

AML: akute myeloische Leukämie; ALL: akute lymphatische Leukämie;

CLL: chronisch lymphatische Leukämie; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom

Proben-Nr.	Alter	Station	Vorerkrankung	AB vor BK-Abnahme	BK-Ergebnis	Klinisch relevant
40a	58	M3G Intensiv	Multiples Myelom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
124b	73	M4A	AML	nein	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
145e	57	M4C	ALL	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr, Levofloxacin täglich (P)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
147a	54	M3E	AML	nein	<i>Staph. epidermidis</i>	Nicht beurteilbar
161a	58	M4A	CLL	nein	KNS	Nein
197c	42	M4C	NHL	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
230a	45	M4C	ALL	nein	KNS	Nicht beurteilbar
299b	24	M4B	maligner Keimzelltumor	Levofloxacin täglich (P)	<i>Staph. epidermidis</i>	Ja
312a	48	M3E	CLL	Levofloxacin täglich (P)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nicht beurteilbar
347a	36	M4A	Morbus Hodgkin	Cefuroxim/Levofloxacin (2d)	KNS	Nein
399a	13	Kinder Tagesklinik	Rhabdomyosarkom	nein	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
806b	46	M3E	AML	Meropenem (4d), Clarithromycin (6d)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
806a	46	M3E	AML	Imipenem (2d), Clarithromycin (2d)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nicht beurteilbar
808a	17	Kinder 3	Ewing-Sarkom	Cotrimoxazol regelmäßig	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
824a	47	M4C	AML	Piperacillin/Tazobactam (0d)	MRSA	Ja
836a	70	M4C	AML	Clarithromycin (16d)	<i>Staph. epidermidis</i>	Nein
846b	59	M3G Intensiv	AML	Erythromycin (7d), Tigecyclin (6d)	<i>Staph. epidermidis</i>	Ja
846a	59	M3G Intensiv	AML	Erythromycin (7d), Tigecyclin (6d)	<i>Staph. epidermidis</i>	Ja

Da Staphylokokken-Spezies, insbesondere *Staphylococcus epidermidis* und andere Koagulase-negative Staphylokokken, oft als Kontaminanten in Blutkulturen auftreten, muss die klinische Relevanz des Ergebnisses stets überprüft werden.

Von den 45 Blutkulturen, die ein Wachstum von *Staphylococcus* spp. aufwiesen, wurden 25 als klinisch relevant eingestuft. In 21 Fällen zeigte hier auch die Staph-PCR ein positives Ergebnis. Somit ergibt sich eine Sensitivität von 84,0 % für die klinisch relevanten Blutproben. Sie liegt damit deutlich über der Sensitivität für alle untersuchten Proben (60,0 %). Tab. 11 zeigt die genaue Aufschlüsselung der *Staphylococcus* spp.-positiven Blutkulturen.

Tab. 11: Aufschlüsselung der *Staphylococcus* spp.-positiven Blutkulturen (BK) nach ihrer klinischen Relevanz

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

	Ergebnis klinisch relevant	Ergebnis nicht klinisch relevant / nicht beurteilbar
Positive BK	25	20
PCR +	21	6
PCR -	4	14

In Tab. 12 sind alle Proben aufgelistet, die bei negativem Blutkultur-Ergebnis in der Staph-PCR positiv waren.

Tab. 12: Proben mit positivem Staph-PCR-Resultat, aber negativem Blutkultur(BK)-Ergebnis

Antibiotika vor BK-Abnahme wurden berücksichtigt, wenn sie mindestens in den letzten 48 Stunden vor der Blutentnahme verabreicht wurden; die Zahl in Klammern gibt an, wie viele Tage (d) das Antibiotikum (AB) schon gegeben wurde ausgehend vom Abnahmedatum der BK; P steht für prophylaktische Antibiotika-Gabe

Nachweise von *Staphylococcus* spp.: Zeitpunkt in Anzahl der Tage vor/nach BK-Abnahme

Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

ALL: akute lymphatische Leukämie; HIV: humanes Immundefizienz-Virus;

MDS: myelodysplastisches Syndrom;

SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disorder

MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken

Proben-Nr.	Station	Erkrankung	AB vor BK-Abnahme	<i>Staphylococcus</i> spp.-Nachweis
7a	Kinder 7	ALL, Rhabdomyosarkom	alle 14d Cotrimoxazol (P)	-
7b	Kinder 7	ALL, Rhabdomyosarkom	alle 14d Cotrimoxazol (P)	-
56a	M4C	Akute myeloische Leukämie	Levofloxacin (19d) (P)	-
57a	M4C	Non-Hodgkin- Lymphom	Cotrimoxazol+Levofloxacin regelmäßig (P), Piperacillin/Tazobactam (1d)	-
61b	Kinder 3	Abdominales Burkitt-Lymphom	Nein	-
62a	M3G Intensiv	Morbus Hodgkin	Piperacillin/Tazobactam (2d),Amikacin (2d)	MRSA im Rachen-/Nasen- /Anal-und Rektalabstrich, Sputum, Bronchial- und Trachealsekret (+0d)
65b	M3E	MDS	Levofloxacin regelmäßig (P), Imipenem/Cilastin (10d), Vancomycin (0d)	-
849a	M1C	HIV	Sulfadiazin (17d)	-
78a	Kinder 6	SCID	Nein	-
93a	M4B	Non-Hodgkin- Lymphom	Imipenem/Cilastin (2d), Metronidazol	-
94b	M4C	Akute myeloische Leukämie	Imipenem/Cilastin	-
139a	M3G Intensiv	Akute myeloische Leukämie	Nein	-
245c	M4C	Multipl. Myelom	Levofloxacin regelmäßig (P)	-
250a	M4C	Akute myeloische Leukämie	Levofloxacin regelmäßig (P)	-
284a	M4C	Morbus Hodgkin	Nein	-

Ergebnisse

295a	Kinder Tagesklinik	Neruoblastom Rezidiv	Nein	-
300a	Kinder 3	ALL	Nein	<i>S. aureus</i> im Mundabstrich (+25d)
300b	Kinder 3	ALL	Nein	<i>S. aureus</i> im Mundabstrich (+25d)
333b	M3E	Multiples Myelom	Imipenem/Cilastin (2d), Levofloxacin regelmäßig (P)	KNS im Mundabstrich (+12d)

Zwölf der 19 Proben wurden unter Antibiotika-Gabe abgenommen. Bei vier Proben fanden sich *Staphylococcus*-Spezies in anderen kulturellen Materialien. Die *Staphylococcus aureus*-PCR war bei allen Proben negativ.

Staphylococcus aureus-spezifische S.aur-PCR (Nuc-FL/LC)

Staphylococcus aureus ist ein hoch pathogener Erreger von Blutstrominfektionen. Infektionen mit diesem Keim weisen eine hohe Mortalität auf. Es ist daher notwendig, eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* diagnostisch von Infektionen mit anderen *Staphylococcus* spp. abzugrenzen. Alle Proben der *Blutkultur-PCR-Studie* wurden mit der *Staphylococcus aureus*-spezifischen S.aur-PCR untersucht. Die Ergebnisse für alle immunsupprimierten Patienten sind in Abb. 8 schematisch dargestellt und erläutert. Abb. 8a und 8b zeigen die Ergebnisse für Erwachsene und Kinder.

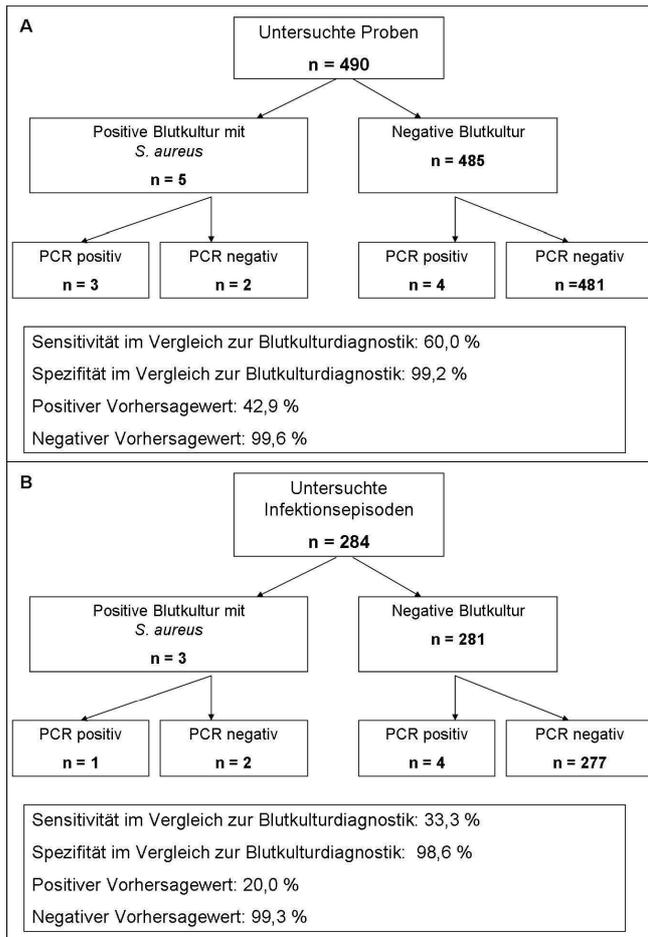
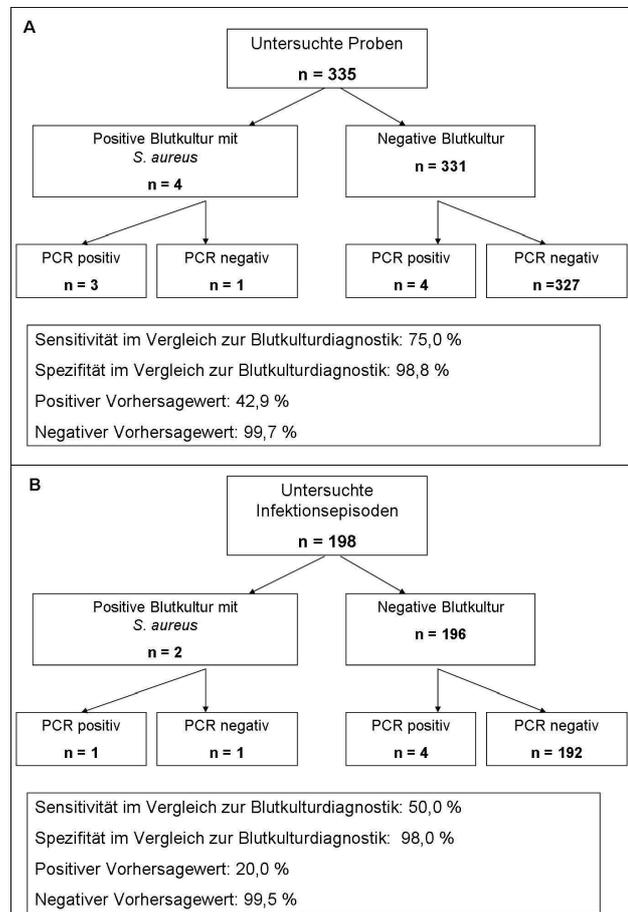


Abb. 8: Sensitivität und Spezifität der S.aur-PCR bei immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben
B: Untersuchte Infektionsepisoden
S.aureus: *Staphylococcus aureus*
S.aur-PCR: *Staphylococcus aureus*-spezifische PCR
PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Abb. 8a: Sensitivität und Spezifität der S.aur-PCR bei immunsupprimierten Erwachsenen im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben
B: Untersuchte Infektionsepisoden
S.aureus: *Staphylococcus aureus*
S.aur-PCR: *Staphylococcus aureus*-spezifische PCR
PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion



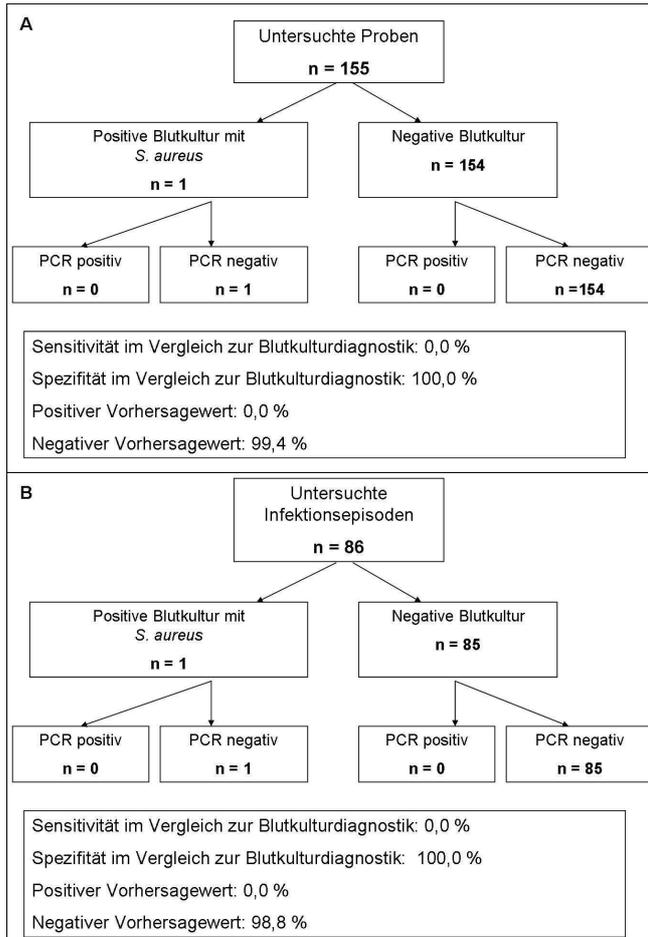


Abb. 8b: Sensitivität und Spezifität der S.aur-PCR bei immunsupprimierten Kindern im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden

S.aureus: *Staphylococcus aureus*

S.aur-PCR: *Staphylococcus*

aureus-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Beim Patientenkollektiv der Kinder wurde während der gesamten Studie unter allen abgenommenen Blutkulturen nur einmal ein *Staphylococcus aureus* in einer Blutkultur nachgewiesen. Die berechneten Werte für die Sensitivität sind daher nicht aussagekräftig. Genauere Angaben zu der parallel abgenommenen Probe siehe unten.

Staphylococcus spp. können durch Expression des *mecA*-Gens Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Oxacillin und seinen Derivaten erhalten. Da es speziell bei *Staphylococcus aureus* therapeutisch von großer Bedeutung ist, ob eine Methicillin-resistente- oder eine Methicillin-sensible-Spezies vorliegt, wurden alle Proben, in deren paralleler Blutkultur *Staphylococcus aureus* nachgewiesen wurde, mit der Mec-HP1/2-PCR untersucht.

Tab. 13 zeigt die fünf Proben, bei denen in der Blutkultur *Staphylococcus aureus* gewachsen war.

Tab. 13: Proben mit positivem *S. aureus* Ergebnis in der Blutkultur (BK)

Antibiotika (AB) vor BK-Abnahme wurden berücksichtigt, wenn sie mindestens in den letzten 48 Stunden vor der Blutentnahme verabreicht wurden; die Zahl in Klammern gibt an, wie viele Tage (d) das Antibiotikum schon gegeben wurde ausgehend vom Abnahmedatum der BK

S.aur-PCR: *Staphylococcus aureus*-spezifische PCR; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR

MecA-PCR = Mec-HP1/2-PCR= MecA-Gen-spezifische PCR

KNS: Koagulase-negative-Staphylokokken; *Strep.*: *Streptococcus*

MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*

MSSA: Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*

TTP: thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie

Proben-Nr.	Alter	Station	Vor- erkrankung	AB vor BK- Abnahme	BK- Ergebnis	S.aur- PCR	Staph- PCR	MecA- PCR
104a	71	M4B	TTP	Nein	MRSA	++	++	+
104c	71	M4B	TTP	Nein	MRSA	++	+++	+
104b	71	M4B	TTP	Nein	MRSA	++	+++	+
812a	3	Kinder 3	ALL	Nein	MSSA + <i>Strep.</i> <i>Para-</i> <i>sanguinis</i> + KNS	negativ	+	negativ
824a	47	M4C	AML	Piperacillin/ Tazobactam (0d)	MRSA	negativ	negativ	negativ

Bei den ersten drei Proben, die alle vom gleichen Patienten (Nr. 104) und aus derselben Infektionsepisode stammen, wurde ein Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) nachgewiesen. Hier zeigten sowohl die S. aur-PCR, als auch die Staph-PCR und die MecA-PCR ein positives Ergebnis.

Eine weitere Probe (Nr. 824a), die kulturell ebenfalls MRSA-positiv war, wurde in allen drei PCR's zum Nachweis von *Staphylococcus aureus* negativ bewertet. Diese Probe wurde unter Antibiotika-Gabe abgenommen (siehe Tab. 13). Allerdings war der MRSA in vitro resistent gegen das Antibiotikum.

Bei der fünften *Staphylococcus aureus*-positiven Probe, die von einem Kind abgenommen wurde, wuchsen in der parallel entnommenen Blutkultur außer einem *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus parasanguinis* und Koagulase-negative Staphylokokken. Eine Kontamination dieser Blutkultur ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, da alle drei nachgewiesenen Keime zur typischen Hautflora zählen und im Zeitraum von 24 Stunden keine weitere Blutkultur entnommen wurde, die das Resultat hätte bestätigen können. Allerdings wurde die positive Blutkultur einem Hickman-Katheter entnommen, der aufgrund dieser

Infektion kurz darauf operativ entfernt werden musste. Deshalb ist davon auszugehen, dass der kulturelle Nachweis der genannten Keime klinische Bedeutung hatte. Die untersuchte Probe zeigte in der S. aur-PCR ein negatives, in der Staph-PCR ein positives Resultat. Die Mec-HP1/2-PCR war ebenfalls negativ und entsprach so dem kulturell nachgewiesenen Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus*.

Um den klinischen Nutzen einer früheren Feststellung von *Staphylococcus aureus* durch die PCR-Untersuchung herauszuarbeiten, wurden die klinischen und therapeutischen Ereignisse von Patient Nr. 104 vor und nach der Blutentnahme aufgearbeitet und in Abb. 9 schematisch dargestellt.

Die erste Blutkultur-Abnahme dieses Patienten erfolgte am 17.02.08 um 20 Uhr. Wenn man von einer Arbeitszeit für die DNA-Isolierung und anschließender PCR-Untersuchung von ungefähr vier Stunden ausgeht, wäre das PCR-Ergebnis somit am darauf folgenden Tag, am 18.02.08, zu erwarten gewesen. Damit hätte eine erregergerechte antibiotische Therapie bereits einen Tag früher stattfinden können, als es laut Aktenlage bei diesem Patienten der Fall war.

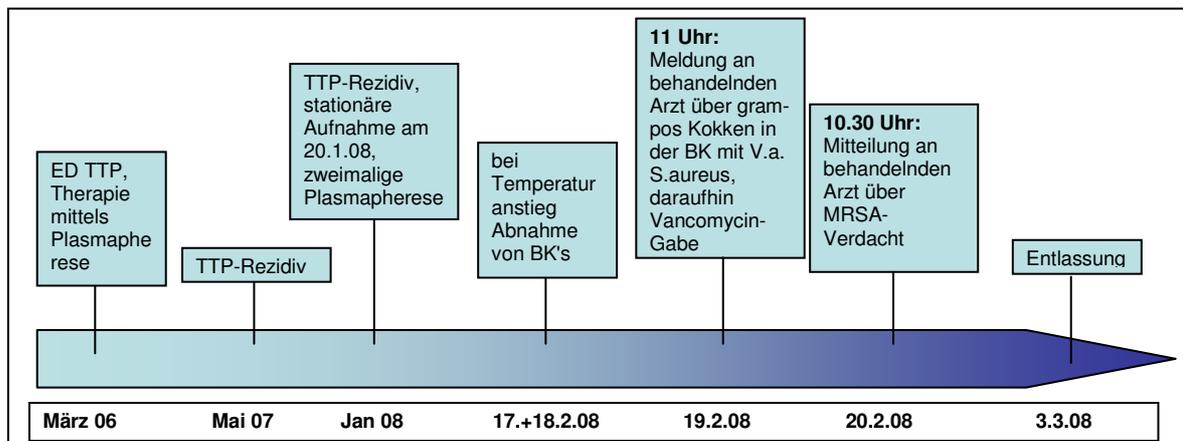


Abb. 9: Schematische Darstellung der klinisch-therapeutischen Ereignisse vor und nach der Blutentnahme von Patient 104

ED: Erstdiagnose; BK: Blutkultur; pos.: positiv; V.a.: Verdacht auf

TTP: thrombotisch-thrombozytopenische Purpura

MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*)

Tab. 14 zeigt alle Proben, die ein positives PCR-Ergebnis zeigten, aber in der Blutkultur negativ waren. Alle diese Proben wurden unter Antibiotika-Gabe abgenommen. In drei Fällen erfolgte diese Medikation in therapeutischer Zielsetzung, in zwei Fällen wurde das Antibiotikum als Prophylaxe verabreicht. Es

ist nicht auszuschließen, dass die antibiotische Behandlung potentiell wachstumshemmenden Einfluss auf eventuell vorhandene *Staphylococcus aureus*-Zellen hatte.

Für diese Patienten wurden alle mikrobiologischen Befunde in einem Zeitraum von zwei Wochen um die Blutentnahme gesichtet und auf Hinweise einer *Staphylococcus aureus*-Infektion kontrolliert. Bei keiner dieser fünf Proben konnte ein *Staphylococcus aureus* in anderen Materialien nachgewiesen werden.

Tab. 14: Proben mit negativem *Staphylococcus aureus* Blutkultur(BK)-Ergebnis, die in der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) positiv waren

Antibiotika vor BK-Abnahme wurden berücksichtigt, wenn sie mindestens in den letzten 48 Stunden vor der Blutentnahme verabreicht wurden; die Zahl in Klammern gibt an, wie viele Tage das Antibiotikum schon gegeben wurde ausgehend vom Abnahmedatum der BK; P steht für prophylaktische AB-Gabe

* eine Probe der untersuchten Infektionsepisode zeigte ein positives Staph-PCR Ergebnis, allerdings nicht die Probe, die in der S.aur-PCR positiv war

S.aur-PCR: *Staphylococcus aureus*-spezifische PCR

MecA-PCR = Mec-HP1/2-PCR= MecA-Gen-spezifische PCR

Staph-PCR: *Staphylococcus*-spezifische PCR

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie

CLL: chronisch lymphatische Leukämie; MM: Multiples Myelom

Proben-Nr.	Alter	Station	Erkrankung	AB vor BK-Abnahme	S.aur-PCR	mecA-PCR	Staph-PCR
10a	31	M3E	ALL	Levofloxacin und Cotrimoxazol regelmäßig (P)	+	negativ	negativ
123c	56	M4C	AML	Piperacillin/Tazobactam (2d), Amikacin	+	negativ	negativ
217b	55	M4C	CLL	Levofloxacin regelmäßig (P)	+	negativ	negativ
221b	60	M4C	MM	Piperacillin/Tazobactam	+	negativ	1/3 positiv*

Enterococcus/Streptococcus spp.-PCR Ent-FL/LC (Ent/Strep-PCR)

Wie bereits in Kapitel 2.2.4 erläutert, war zu Beginn der Studie eine Untersuchung aller Proben mit der Gramdiff-PCR im Rahmen des PCR-Algorithmus (siehe S. 29) vorgesehen. Alle Proben mit positivem Resultat der Gramdiff-PCR im Kanal F3 wären nach diesem Vorgehen mit der Ent/Strep-PCR untersucht worden. Wegen zu geringer Sensitivität der Gramdiff-PCR, wurde aber von dieser Vorgehensweise abgesehen. Daher wurde auch nicht das gesamte Probenkollektiv mit der Ent/Strep-PCR untersucht, sondern vorab die in Tab.15 aufgelisteten 19 Blutproben in deren paralleler Blutkultur *Enterococcus* spp. oder *Streptococcus*

spp. nachgewiesen worden war. Zusätzlich wurden 28 Blutproben mit negativer paralleler Blutkultur untersucht, um die Sensitivität der PCR in diesem Kontext zu bestimmen. Es kam zu Fluoreszenzanstiegen und damit falsch-positiven Signalen im F2-Kanal nach Zyklus 33 unter den Proben mit negativer paralleler Blutkultur. Daher wurden alle Proben mit einem Fluoreszenzanstieg nach Zyklus 33 als negativ bewertet. In Tab. 15 sind die Ergebnisse der Ent/Strep-PCR nach diesem Kriterium angegeben, inklusive der, anhand der Schmelzpunktpeak-Temperatur identifizierten Keime.

Tab. 15: Blutproben, in deren paralleler Blutkultur (BK) *Enterococcus* oder *Streptococcus* spp. nachgewiesen wurden mit Angabe der Inkubationsdauer der Blutkulturflasche bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät und dem Ent/Strep-PCR Ergebnis.

E.: *Enterococcus*; Strep.: *Streptococcus*; h: Stunden; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion
Ent/Strep-PCR: *Enterococcus*/*Streptococcus*-spezifische PCR

Proben-Nr.	Ergebnis der parallelen Blutkultur	Inkubationsdauer der BK-Flasche im Bactec™-Gerät	Ent/Strep-PCR Ergebnis
1a	<i>Strep. sanguinis</i>	14,1 h	negativ
49a	<i>E. faecium</i>	7,1 h	negativ
49b	<i>E. faecium</i>	10,1 h	negativ
76a	<i>E. faecium</i>	13,6 h	negativ
76b	<i>E. faecium</i>	12,7 h	negativ
156b	<i>E. faecium</i>	11,9 h	negativ
196a	<i>E. faecium</i>	10,4 h	negativ
199a	<i>E. faecium</i>	22,7 h	+ <i>E. faecium</i>
224a	<i>Strep. salivarius</i>	11,9 h	negativ
372b	<i>Strep. salivarius</i>	9,0 h	negativ
812a	<i>Strep. parasanguinis</i>	5,6 h	negativ
816a	<i>E. faecium</i>	10,5 h	negativ
829a	<i>Strep. anginosus</i>	10,8 h	negativ
832a	<i>Strep. mitis</i>	8,4 h	negativ
834a	<i>E. faecalis</i>	27,0 h	+ <i>E. faecalis</i>
837a	<i>E. faecium</i>	11,7 h	negativ
839a	<i>Strep. oralis</i>	11,8 h	Negativ
839b	<i>Strep. oralis</i>	18,0 h	Negativ
842a	<i>E. faecium</i>	n.v.	Negativ

Das Ergebnis der parallelen Blutkultur konnte in zwei von 19 Fällen bestätigt werden, das entspricht einer Sensitivität von 10,5 %. Nach diesem zu geringen Resultat wurde von einer Untersuchung aller Proben mit der Ent/Strep-PCR abgesehen.

Es bestand die Vermutung, dass ein positives PCR-Ergebnis mit der Zeit bis zur Positivmeldung der parallelen Blutkultur im Bactec™-Gerät korreliert, da bei einer kurzen Inkubationsdauer der Verdacht nahe liegt, dass bereits zum Zeitpunkt der Blutabnahme eine höhere Keimkonzentration im Patientenblut vorliegt und somit auch eine höhere Konzentration an DNA, die durch die PCR-Untersuchung nachweisbar wäre. Daher sind in Tab. 15 zusätzlich die Inkubationszeiten der parallelen Blutkulturen bis zur Positivmeldung mit aufgeführt. Der Verdacht konnte allerdings nicht bestätigt werden. So wurde beispielsweise die parallele Blutkultur von Probe 812a nach nur 5,6 h im Bactec™-Gerät positiv gemeldet, das PCR-Resultat fiel allerdings negativ aus. Bei Probe 199a wurde die PCR dagegen positiv bewertet, obwohl die parallele Blutkultur eine Inkubationsdauer von 22,7 h aufwies.

PCR-Untersuchungen zur Identifizierung gram-negativer Erreger

Enterobacteriaceae-spezifische PCR Entbac-TM

Enterobacteriaceae konnten in den parallelen Blutkulturen von 10 Proben identifiziert werden. Diese sind mit Angabe des Erregers in Tab. 16 aufgelistet. Alle aufgelisteten Proben wurden mit der Entbac-TM-PCR untersucht.

Tab. 16: Blutproben, in deren paralleler Blutkultur *Enterobacteriaceae* nachgewiesen wurden mit Angabe der Inkubationsdauer der Blutkulturflasche bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät und dem Entbac-TM-PCR Ergebnis

h: Stunden; spp.: Spezies; BK: Blutkultur; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Entbac-TM-PCR: *Enterobacteriaceae*-spezifische PCR

Proben-Nr.	Ergebnis der parallelen Blutkultur	Inkubationsdauer der BK-Flasche im Bactec™-Gerät	Entbac-TM-PCR Ergebnis
9a	<i>Enterobacter spp.</i>	15,0 h	Negativ
165a	<i>Escherichia coli</i>	10,2 h	Negativ
238b	<i>Escherichia coli</i>	9,8 h	Negativ
373a	<i>Escherichia coli</i>	4,3 h	Negativ
410a	<i>Morganella morganii</i>	24,2 h	Positiv
822a	<i>Escherichia coli</i>	7,4 h	Negativ
831a	<i>Escherichia coli</i>	2,9 h	Negativ
833a	<i>Escherichia coli</i>	16,2 h	Positiv
834a	<i>Escherichia coli</i>	27,0 h	Positiv
844a	<i>Escherichia coli</i>	10,9 h	Positiv

In vier der zehn Blutkultur-positiven Fälle zeigt die PCR ebenfalls ein positives Ergebnis. Die Sensitivität der Entbac-TM-PCR im Vergleich zu Blutkulturdiagnostik lag somit bei 40 %.

Wie bereits auf Seite 57 im Rahmen der Ergebnisse der Ent/Strep-PCR gezeigt wurde, korreliert auch hier die Inkubationsdauer der parallelen Blutkultur bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät nicht mit einem positiven PCR-Resultat der Entbac-PCR.

Pseudomonas aeruginosa-spezifische PCR Ps aeru-TM

Pseudomonas aeruginosa konnte in keiner der abgenommenen Blutkulturen von immunsupprimierten Patienten nachgewiesen werden. Daher wurde auf die Durchführung der Ps aeru-TM-PCR für dieses Patientenkollektiv verzichtet.

PCR-Untersuchungen zur Identifizierung von *Candida* spp.

Candida spp.-spezifische-PCR Can-FL/LC (Can-PCR)

Bei systemischen Infektionen stellen Hefen besonders bei immunsupprimierten Patienten eine, in den letzten Jahren zunehmende Ursache dar. Hinzu kommt, dass aus therapeutischer Sicht die Abgrenzung von Hefen zu bakteriellen Erregern von bedeutender Wichtigkeit ist. Wie bereits bei der Ausarbeitung des PCR-Algorithmus vorgesehen (siehe S. 29), wurden daher alle im Rahmen der *Blutkultur-PCR-Studie* gesammelten Proben von immunsupprimierten Patienten mit der *Candida* spp.-spezifischen Can-PCR untersucht. Die Ergebnisse sind in den Abb. 10, 10a und 10b schematisch dargestellt und erläutert.

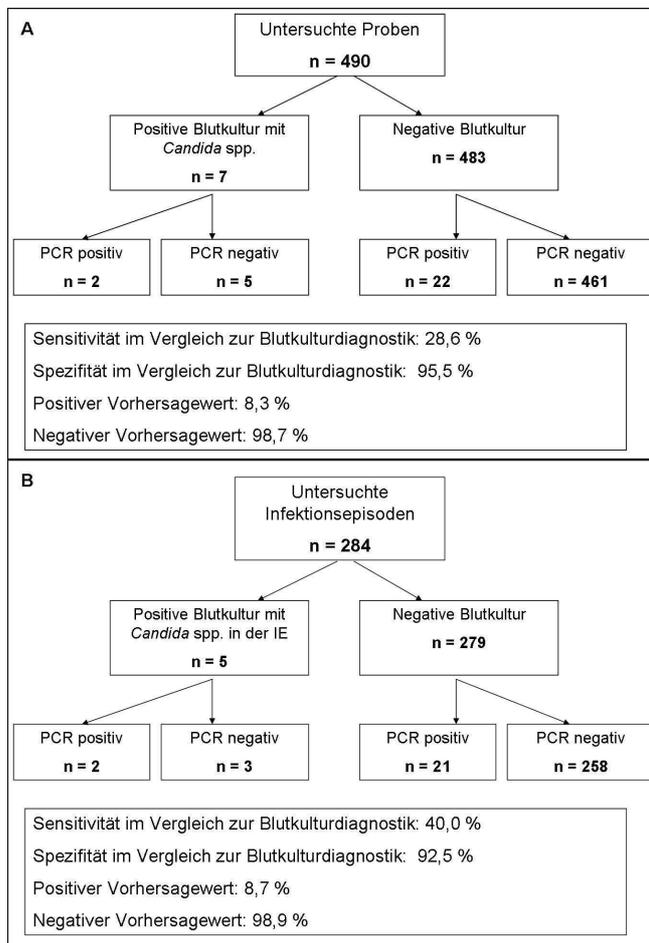


Abb. 10: Sensitivität und Spezifität der Can-PCR bei immunsupprimierten Patienten im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden

spp.: Spezies

IE: Infektionsepisode

Can-PCR: *Candida* spp.-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Abb. 10a: Sensitivität und Spezifität der Can-PCR bei immunsupprimierten Erwachsenen im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
spp.: Spezies

IE: Infektionsepisode

Can-PCR: *Candida* spp.-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

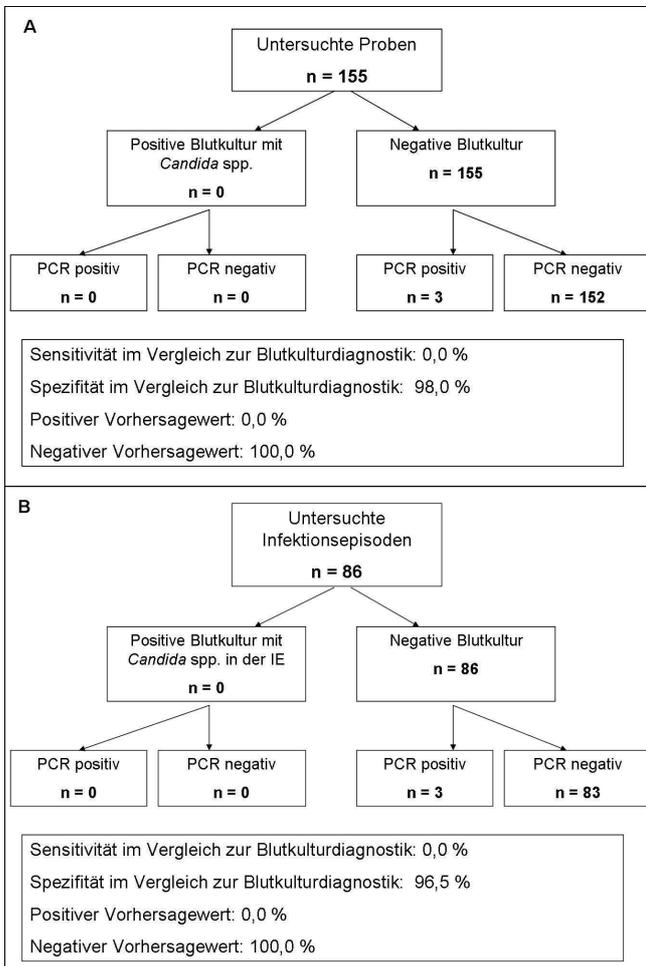
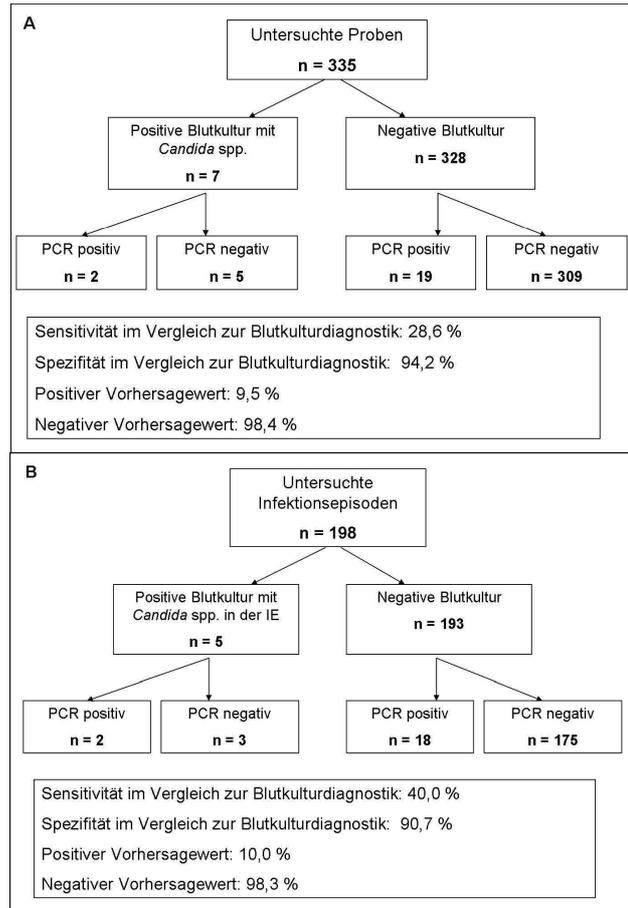


Abb. 10b: Sensitivität und Spezifität der Can-PCR bei immunsupprimierten Kindern im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik.

A: Untersuchte Proben

B: Untersuchte Infektionsepisoden
spp.: Spezies

IE: Infektionsepisode

Can-PCR: *Candida* spp.-spezifische PCR

PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

In der Patientengruppe der immunsupprimierten Kinder konnten während der gesamten Studie kulturell keine *Candida*-Spezies nachgewiesen werden. Es lässt sich daher keine Aussage über die Sensitivität im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik treffen. Die Can-PCR zeichnete sich hier vor allem durch eine hohe Spezifität im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik aus (98,0 % bzw. 96,5 %).

Tab. 17 zeigt alle Proben, die in der Blutkultur ein positives *Candida* spp.-Ergebnis zeigten. Zwei der insgesamt sieben Proben waren auch in der PCR positiv (in Tab. 17 fett markiert). Keine der Proben wurde unter antimykotischer Therapie abgenommen.

Tab. 17: Proben mit positivem *Candida* spp.-Ergebnis in der Blutkultur (BK)

AML: akute myeloische Leukämie; CUP: Carcinoma of unknown primary
CA: Carcinom; h: Stunden; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

Proben-Nr.	Alter	Station	Vorerkrankung	Antimykotika vor BK-Abnahme	Ergebnis BK	Zeit bis zur Positivmeldung	Candida PCR
137a	72	M4A	CUP	nein	<i>Candida albicans</i>	58,0 h	++
176c	59	M4C	Agranulozytose	nein	<i>Candida tropicalis</i>	18,5 h	negativ
176d	59	M4C	Agranulozytose	nein	<i>Candida tropicalis</i>	18,2 h	negativ
199a	65	M4A	Mamma-CA	nein	<i>Candida glabrata</i>	83,9 h	negativ
845a	42	M4A	AML	nein	<i>Candida tropicalis</i>	38,0 h	+
845b	42	M4A	AML	nein	<i>Candida tropicalis</i>	25,5 h	negativ
411a	48	M3E	AML	nein	<i>Candida albicans</i>	73,9 h	negativ

Um auch hier die klinischen Vorteile beurteilen zu können, die ein schnellerer *Candida*-Nachweis mittels DNA-Isolierung und anschließender PCR-Untersuchung mit sich bringen würde, wurden die klinischen und therapeutischen Ereignisse der Patienten Nr. 137 und Nr. 845 vor und nach der Blutentnahme gesondert begutachtet und in Abb. 11 und 12 schematisch dargestellt.

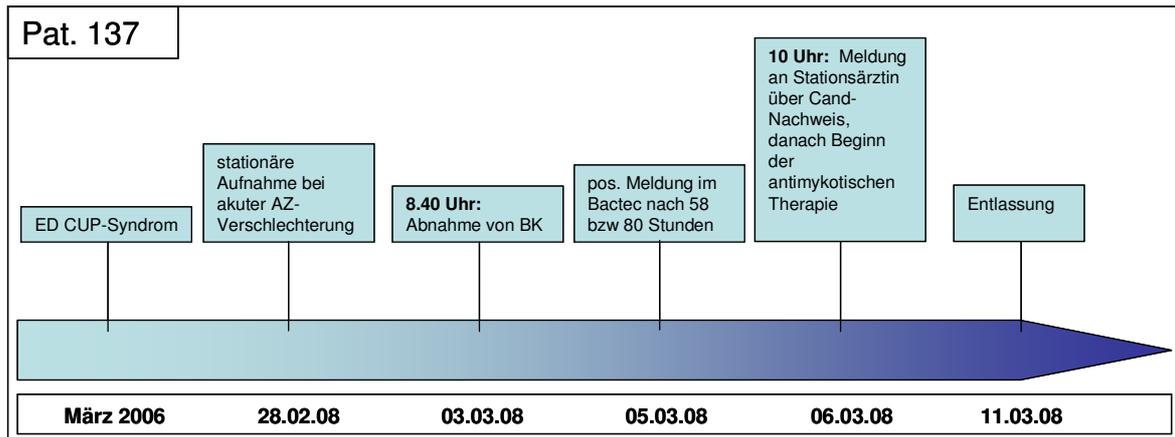


Abb. 11: Schematische Darstellung der klinisch-therapeutischen Ereignisse von Patient Nr. 137 vor und nach Blutentnahme

ED: Erstdiagnose; BK: Blutkultur(en); AZ: Allgemeinzustand; pos.: positiv
 CUP: Carcinoma of unknown primary
 Cand: *Candida*

Die Abnahme der ersten Blutkultur von Patient Nr. 137 erfolgte am 03.03.08 um 8.40 Uhr. Das Ergebnis der PCR-Untersuchungen wäre also noch am selben Tag verfügbar gewesen und es hätte bereits an diesem Tag mit der antimykotischen Therapie begonnen werden können. Im aktuellen Fall fand dies erst am 06.03.08, also drei Tage später, nach Positiv-Meldung der Blutkulturen im Bactec™-Gerät und dem Nachweis von *Candida* spp. statt.

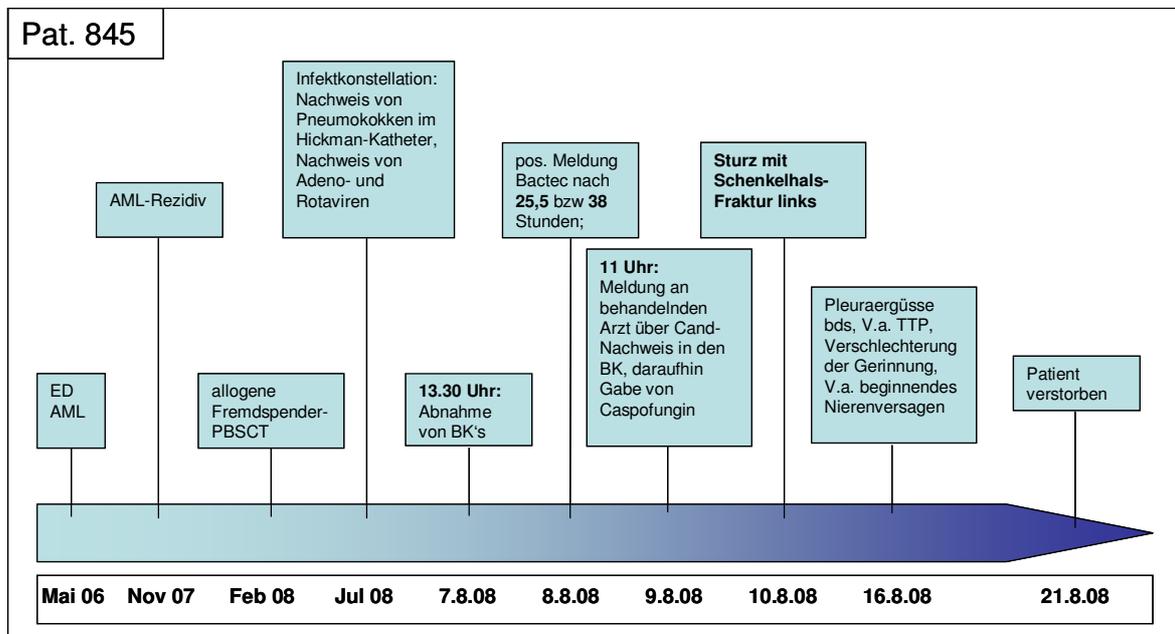


Abb. 12: Schematische Darstellung der klinisch-therapeutischen Ereignisse von Patient 845 vor und nach Blutentnahme

ED: Erstdiagnose; BK: Blutkultur(en); bds.: beidseits; V.a.: Verdacht auf; pos.: positiv
 PBSCT: periphere Blutstammzell-Transplantation
 AML: akute myeloische Leukämie; TTP: thrombotisch-thrombozytopenische Purpura
 Cand.: *Candida*

Bei Patient Nr. 845 wurden am 07.08.08 um 13.30 Uhr Blutkulturen abgenommen, die am 08.08.08 positiv gemeldet wurden. Am 09.08.08 erfolgte die Meldung an den behandelnden Arzt und es erfolgte die Gabe von Caspofungin, einem Antimykotikum. Auch hier hätte mit der DNA-Isolierung und anschließender PCR-Untersuchung eine frühere Einleitung der antimykotischen Therapie erfolgen können.

In Tab. 18 sind alle Proben aufgelistet, die ein positives Resultat in der Can-PCR aufwiesen, deren parallel abgenommene Blutkultur aber negativ war. 13 der 22 Proben wurden unter antimykotischer Therapie abgenommen. Dies kann das Wachstum der Hefen hemmen und somit zu falsch negativen Blutkulturergebnissen führen. Bei vier Proben fanden sich innerhalb einer Woche vor oder nach Blutkulturabnahme *Candida*-Spezies in anderen Materialien.

Tab. 18: Charakterisierung von Patientenproben mit positivem Can-PCR-Resultat bei negativem *Candida* spp.-Nachweis der parallel abgenommenen Blutkultur (BK)

Antimykotika vor Blutkulturabnahme wurden berücksichtigt, wenn sie bis mindestens 48 Stunden vor der Blutentnahme verabreicht wurden

Die Angabe „PCR-positive Proben“ bezieht sich auf die Anzahl Can-PCR-positiver Proben aller untersuchten Proben einer Infektionsepisode. Aufgeführt sind außerdem alle kulturellen Nachweise von *Candida* spp. +/- eine Woche um die Blutentnahme in anderen diagnostischen Materialien des Patienten. Tag 0 = Tag der Blutabnahme.

* kultureller *Candida*-Nachweis in anderen Proben derselben Infektionsepisode

Can-PCR: *Candida* spp.-spezifische PCR; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

CA: Carcinom; spp.: Spezies, ZVK: Zentral-Venöser-Katheter

CLL: chronisch lymphatische Leukämie; MDS: myelodysplastisches Syndrom

HIV: humanes Immundefizienz-Virus

Proben-Nr.	Alter	Station	Vorerkrankung	Antimykotika vor BK-Abnahme	PCR positive Proben	<i>Candida</i> spp. Kultur/ Lokalisation
8a	45	M3E	Akute myeloische Leukämie	Amphotericin	1/5	Stuhl +6d
29a	7	Kinder Tagesklinik	Akute lymphatische Leukämie	nein	1/2	
44a	23	M3E	Akute lymphatische Leukämie	Posaconazol	1/2	
65a	62	M3E	MDS	Posaconazol	1/2	
66a	43	M3E	Non-Hodkgin-Lymphom	Posaconazol	1/2	
76a	49	M1C	HIV	nein	2/2	Trachealsekret -4d/-2d, ZVK-Spitze +1d
76b	49	M1C	HIV	nein	2/2	
100b	51	M4C	Akute myeloische Leukämie	Amphotericin	1/3	
162a	72	M4C	Multiples Myelom	Fluconazol	1/1	
165a	59	M3E	Osteomyelo-Fibrom	Posaconazol	1/1	
170b	75	M4A	Non-Hodkgin-Lymphom	nein	1/3	
176a	59	M4C	Agranulozytose	nein	1/4*	
181a	39	M4C	Non-Hodkgin-Lymphom	Fluconazol	1/1	
199b	65	M4A	Mamma-CA	nein	2/2*	
221a	60	M4C	Multiples Myelom	nein	2/2	Stuhl+3d
293b	71	M4C	Akute myeloische Leukämie	Voriconazol	2/2	
302a	55	M4B	CLL	Posaconazol	1/1	
316a	5	Kinder 3	abdominales Burkitt-Lymphom	nein	1/2	

Ergebnisse

356b	0	Kinder 3	Nephroblastom	nein	1/2	
834a	65	M4A	Mamma-CA	Posaconazol	1/1	Sputum +1d
836a	70	M4C	Akute myeloische Leukämie	Voriconazol	1/1	
837c	28	M3E	Akute myeloische Leukämie	Posaconazol	1/3	

Bei Patient Nr. 176 und Nr. 199 fand sich in zwei bzw. einer anderen Probe derselben Infektionsepisode ein *Candida*-Spezies in der parallel abgenommenen Blutkultur (*).

Candida albicans-spezifische C. alb-FL/LC-PCR

Alle Can-PCR-positiven Proben wurden entsprechend dem PCR-Algorithmus (siehe S. 29) mit der C. alb-FL/LC-PCR untersucht. Bei einer Zyklenzahl von 35 zeigte die Probe mit *C. albicans*-Nachweis in der parallelen Blutkultur der eingeschlossenen Infektionsepisode von Patient 137 ein positives PCR-Resultat. Bei Probe 845a kam es zu einem korrekt-negativen PCR-Ergebnis, hier war in der parallelen Blutkultur *Candida tropicalis* identifiziert worden. Es kam zu keinen falsch-positiven PCR-Ergebnissen. Unter den Proben mit positivem Can-PCR Ergebnis bei negativer paralleler Blutkultur zeigte nur die Probe von Patient 65 ein positives Resultat. Alle anderen waren in der PCR negativ.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines sensitiveren und schnelleren Diagnostikverfahrens zum Nachweis von Blutstrominfektionen basierend auf mikrobieller DNA-Isolierung mittels *MoIYsis* aus Patientenblut und anschließender real-time-PCR-Untersuchung. Dieses Verfahren wurde in einer prospektiven klinischen Studie an immunsupprimierten Patienten der Uniklinik Ulm im Vergleich zur herkömmlichen Diagnostik, dem Nachweis der Erreger mittels Blutkultur, evaluiert.

4.1 Methodik

Der Goldstandard zum Nachweis einer Sepsis ist die Detektion der Erreger mittels Blutkulturen [7, 41, 45, 52]. Da dieses Verfahren aber oft mehrere Tage in Anspruch nimmt und es gleichzeitig von größter Bedeutung für die Prognose der Patienten ist, eine möglichst schnelle und gezielte antibiotische Therapie zu erhalten, wurden in den letzten Jahren vermehrt molekularbiologische Techniken zum Nachweis von Erreger-DNA im Blut evaluiert, die ein schnelleres Ergebnis erbringen könnten.

Mit Hilfe von Microarray-Analysen lässt sich beispielsweise in einem einzigen Reaktionsschritt ein breites Spektrum an Erreger-DNA nachweisen. Zusätzlich ist auch eine Detektion bestimmter Resistenzgene möglich. Diese Technik lieferte, auf bereits als positiv gemeldete Blutkulturen angewandt, viel versprechende Ergebnisse [11, 58]. Der Nachteil liegt in der direkten Anwendung der Methode auf Nativblutproben von Patienten. Hier muss auf Grund der geringen Ausgangskonzentration an mikrobieller DNA zuerst ein Amplifizierungsschritt durchgeführt werden, um die DNA-Konzentration zu erhöhen [53]. Damit hat das Verfahren allerdings im Vergleich zur Diagnostik mittels PCR-Analyse keinen zeitlichen Vorteil mehr.

Weitere Diagnostik-Methoden sind eubakterielle PCR-Analysen, die auf eine Amplifikation des 16S rRNA Gens, welches ubiquitär in Bakterien vorkommt, abzielen. Im Anschluss an die PCR-Untersuchung muss allerdings zur genauen Identifizierung der pathogenen Spezies eine Sequenzierung oder Hybridisierung

erfolgen, was einen weiteren Zeitaufwand bedeutet. Auch hier wurden positive Ergebnisse im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik erzielt [31, 33, 45].

In der vorliegenden Arbeit wurden speziesspezifische PCR-Assays verwendet, die zum einen eine direkte Untersuchung von Nativblutproben ohne vorherige Aufarbeitung zulassen und gleichzeitig ein Ergebnis der Erreger-Spezies ohne weitere Sequenzierungsschritte liefern. Somit ist eine maximale Zeitersparnis gegeben. Einzelne Erreger-spezifische PCR-Analysen wurden bereits in den vergangenen Jahren erfolgreich durchgeführt. Sowohl die Detektion von *Enterococcus faecalis* und *Staphylococcus aureus* [35, 46], als auch der Nachweis von *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* [12] und *Candida* spp. [14] gelang mittels real-time PCR aus nativen Blutproben.

Des Weiteren wurde in der durchgeführten Studie ein neues DNA-Isolierungsverfahren, *MolYsis*, angewandt. Diese Methode wurde von der Firma Molzym GmbH und Co. KG, Bremen, entwickelt und hat zum Ziel, die Menge an bakterieller DNA in den Blutproben zu erhöhen. Dazu wird in einem ersten Schritt die humane DNA aus der Blutprobe entfernt, was gleichzeitig Kreuzreaktionen verhindert. Außerdem wurde das Protokoll für die DNA-Isolierung an größere Blutvolumina von einem, zwei und fünf ml Blut angepasst. Dies soll letztlich zu einer verbesserten Sensitivität in der Diagnostik von Blutstrominfektionen führen. Die Studie von Gebert et al. zeigte, dass das *MolYsis*-Verfahren im Vergleich zu anderen DNA-Isolierungsmethoden die besten Ergebnisse für gespikete Blutkulturflaschen aufwies [21]. Auch kam es in keiner der von Gebert et al. untersuchten Proben zu PCR-Inhibition [21]. Allerdings kann es durch den frühen Einsatz der DNase, die eigentlich die humane DNA degradieren soll, auch zum Verlust von bakterieller DNA kommen, wenn die Bakterienzellen beschädigt oder zerstört sind und die bakterielle DNA somit ungeschützt vorliegt [21]. Dies stellt aber keinen Nachteil gegenüber der Blutkulturdiagnostik dar, da diese Methode ja auch nur lebende Organismen nachweisen kann.

Somit ist die DNA-Isolierung mittels *MolYsis* mit anschließender real-time PCR eine durchaus viel versprechende und erfolgreiche Methode zum Nachweis von Erreger-DNA im Blut und damit zur Detektion einer Blutstrominfektion, wie in der *Blutkultur-PCR-Studie*, geeignet.

4.2 Ergebnisse der *Blutkultur-PCR-Studie*

Die *Blutkultur-PCR-Studie* wurde insgesamt an 208 immunsupprimierten Patienten, davon 155 Erwachsene und 53 Kinder, durchgeführt. Auffallend war, dass bei den Kindern deutlich weniger positive Blutkulturen zu finden waren (10,3 % aller abgenommenen Blutkulturen), als bei den Erwachsenen (23,3 %). Unter Umständen liegt dies daran, dass es bei Kindern öfters zu Fieberepisoden kommt, ohne dass eine Infektion besteht, während bei Erwachsenen Fieber häufig als Zeichen einer systemischen Infektion zu werten ist. Außerdem werden bei Kindern kleinere Blutvolumina (3 ml) als bei Erwachsenen (10 ml) zur Blutkulturdiagnostik verwendet, so dass von einer geringeren Erregermenge in der Blutkultur ausgegangen werden muss. Dies könnte zu einer geringeren Sensitivität der Blutkultur-Diagnostik bei Kindern führen. Allerdings scheint bei Kindern, sofern eine Bakteriämie vorliegt, eine größere Anzahl an Kolonie-bildenden-Einheiten pro ml Blut (100 CFU/ml) aufzutreten als bei Erwachsenen (10 CFU/ml) [35], so dass dies das geringere Blutvolumen kompensieren könnte.

4.2.1 Eubakterielle Gramdifferenzierende PCR (Gramdiff-PCR)

Die Gramdiff-PCR hätte nach dem ursprünglich ausgearbeiteten PCR-Algorithmus die erste PCR-Untersuchung sein sollen, die mit allen Blutproben durchgeführt wird. Sie sollte den Nachweis über eventuell vorhandene bakterielle DNA erbringen und bereits eine erste Spezifizierung in grampositiv und gramnegativ ermöglichen. Auf Grund einer zu niedrigen Sensitivität, bereits in der ersten Zwischenauswertung, wurde die Gramdiff-PCR im Folgenden nur noch bei Blutkultur-positiven Proben durchgeführt. Leider wies die PCR auch hier eine zu geringe Sensitivität (< 20 %) und Spezifität (< 91 %) auf, sodass die Untersuchung der weiteren Proben der Studie mit dieser PCR nicht durchgeführt wurde.

Insgesamt wurden 197 Proben von immunsupprimierten Patienten mit der Gramdiff-PCR untersucht. In 48 der parallelen Blutkulturen wurde bakterielles Wachstum nachgewiesen. Die Gramdiff-PCR konnte dies in neun Fällen korrekt bestätigen, was einer Sensitivität von 18,8 % entspricht. In 149 Blutkulturen konnten keine Bakterien detektiert werden, die PCR lieferte 135 negative Ergebnisse (Spezifität 90,7 %). Von den 14 in der Gramdiff-PCR positiven, aber in

der Blutkultur negativen Proben, wurden neun unter antibiotischer Therapie abgenommen, was das falsch-positive Ergebnis erklären könnte.

Trotzdem ist die Gramdiff-PCR auf Grund der zu geringen Sensitivität in diesem Umfang als diagnostisches Mittel zum Nachweis einer Blutstrominfektion keinesfalls geeignet.

4.2.2 *Staphylococcus* spp.-spezifische Staph-FL/LC-PCR (Staph-PCR)

Staphylokokken sind die häufigsten Erreger von Blutstrominfektionen [55, 59]. Allerdings treten sie oft auch als Kontaminanten auf, da sie zur typischen Hautflora des Menschen gehören. Die klinische Relevanz des Erregernachweises muss somit immer kritisch beurteilt werden [18]. In der vorliegenden Arbeit wurde ein positives Blutkulturergebnis nur dann als klinisch relevant eingestuft, wenn innerhalb 24 Stunden mehrere Blutkulturen des Patienten positiv ausfielen.

Insgesamt wurden in 45 Blutkulturen, und damit in knapp der Hälfte aller positiven Blutkulturen der vorliegenden Studie an immunsupprimierten Patienten, Staphylokokken-Spezies nachgewiesen. In 27 dieser Fälle zeigte die Staph-PCR ebenfalls ein positives Ergebnis, was einer Sensitivität von 60,0 % entspricht. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit dem Resultat einer Studie von Makhoul et al., in der die Sensitivität einer *Staphylococcus* spp.-spezifischen PCR bei neonatalen Infektionen 69,2 % betrug [35]. In 18 Fällen kam es zu falsch-negativen Ergebnissen in der PCR. Allerdings wurde davon nur in vier Fällen das parallele Blutkultur-Ergebnis als klinisch relevant eingestuft. Betrachtet man nun nur die als klinisch relevant bewerteten Staphylokokken-Nachweise in der Blutkultur, so wurden von den 25 relevanten Fällen 21 mit der Staph-PCR erkannt, was einer Sensitivität von 84,0 % entspricht. Somit ist die Staph-PCR als Diagnostikmethode für eine Infektion mit *Staphylococcus* spp. deutlich weniger kontaminationsanfällig als die Blutkultur-Diagnostik. Dies könnte damit zusammenhängen, wie auch bereits Makhoul et al. vermuteten, dass eine sehr geringe Konzentration an Bakterien im Blut eher für eine Kontamination der Probe spricht, die in unserer Studie verwendete PCR aber erst bei höheren Bakterienkonzentrationen positiv ausfällt [35]. Eine geringere Kontaminationsanfälligkeit ist für den klinischen Alltag unter Umständen hilfreich, da so unnötige weitere diagnostische Schritte entfallen und der Patient auch nicht fälschlicherweise ein Antibiotikum erhält, was wiederum

zur Entstehung von Resistenzen beitragen kann. Letztendlich können so auch Kosten eingespart werden. Andererseits schränkt eine geringere Sensitivität aber auch die Nachweisrate von Blutstrominfektionen ein.

In 445 Blutkulturen wurden keine Staphylokokken-Spezies nachgewiesen. Davon lieferte die Staph-PCR in 426 Blutproben ebenfalls ein negatives Ergebnis (Spezifität 95,7 %). In 19 Fällen wurde die Staph-PCR positiv, obwohl das Ergebnis der parallelen Blutkultur negativ war. Zwölf dieser Blutproben (63,2 %) wurden abgenommen, während die Patienten Antibiotika erhielten. Hier liegt die Vermutung nahe, dass die Antibiotika einen wachstumshemmenden Einfluss auf die Bakterien ausüben und somit in der Blutkultur kein Wachstum nachgewiesen werden konnte. Dies wurde auch schon in früheren Studien vermutet [7, 33, 36, 45, 52, 60]. Da die PCR aber lediglich bakterielle DNA nachweist und diese auch von toten Organismen stammen kann, sind somit positive Resultate in der PCR durchaus möglich. In vier Fällen fanden sich Staphylokokken in anderen klinischen Materialien, in zwei davon hatte der Patient keine Antibiotika erhalten.

Die Staph-PCR zeichnet sich somit insgesamt durch eine hohe Sensitivität besonders bei klinisch relevanten Staphylokokken-Nachweisen aus. Allerdings war die Sensitivität zu gering, um die Blutkulturdiagnostik ersetzen zu können. Einen Vorteil hat die PCR bei antibiotisch vortherapierten Patienten, so dass sich speziell für immunsupprimierte Patienten bessere diagnostische Möglichkeiten erschließen.

4.2.3 *Staphylococcus aureus*-spezifische S.aur-PCR (Nuc-FL/LC)

Staphylococcus aureus stellt einen häufigen Erreger der Sepsis dar [55, 59]. Gleichzeitig geht eine Infektion mit dieser Bakterienspezies mit einer hohen Mortalität einher. Daher ist es von großer Bedeutung, diesen Erreger möglichst schnell und korrekt zu identifizieren.

Während des gesamten Studienzeitraumes wurde nur in fünf Fällen ein *Staphylococcus aureus*-Wachstum in der Blutkultur von immunsupprimierten Patienten detektiert, davon bei vier erwachsenen Patienten und einem Kind. Mit der PCR-Untersuchung wurden drei dieser fünf Fälle bestätigt. Die Sensitivität der S.aur-PCR lag mit 60,0 % im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik somit deutlich zu niedrig. Allerdings ist die Aussagekraft dieses Wertes auf Grund der geringen

Fallzahl von lediglich fünf positiven Blutkulturen für *Staphylococcus aureus* fraglich. Er liegt auch unter der Sensitivität von PCR-Untersuchungen zur Detektion von *Staphylococcus aureus* in früheren Studien [23, 24, 47, 60]. Dort wurde ein Blutvolumen von 200 µl verwendet, welches für die geringe Sensitivität unter anderem verantwortlich gemacht wurde. In der hier durchgeführten Studie wurden nun deutlich größere Blutvolumina von einem, zwei oder fünf ml Blut verwendet. Gleichzeitig wurde ein von der Firma Molzym entwickeltes neues DNA-Isolierungsverfahren angewandt, welches die DNA-Konzentration der Bakterien in den Blutproben erhöhen soll. Dass die Sensitivität dennoch so gering ausfällt, mag daran liegen, dass immer noch ein vergleichsweise geringes Blutvolumen für die DNA-Isolierung im Vergleich zur Blutkultur-Diagnostik (10 ml pro Kulturflasche) verwendet wird. Geht man außerdem von einer Staphylokokken-Konzentration im Blut der Patienten von 1-30 CFU/ml aus [35], kann man annehmen, dass diese geringe Konzentration zwar noch für ein Wachstum der Keime in der Blutkulturflasche ausreicht, aber unter der Nachweisgrenze für die PCR liegt.

In 485 Blutkulturen wurde kein *Staphylococcus aureus* nachgewiesen. Hier lieferte die S.aur-PCR in 481 Fällen ebenfalls ein negatives Ergebnis, was einer Spezifität von 99,2 % entspricht. Bei den vier Blutproben, die von der PCR fälschlicherweise als positiv gewertet wurden, fällt auf, dass alle vier Blutentnahmen unter antibiotischer Therapie stattfanden. Es ist also durchaus möglich, wie bereits oben erläutert, dass das Wachstum des Keimes in der Blutkultur durch die Antibiotika gehemmt wurde, die DNA der Bakterien aber mittels PCR noch nachweisbar war.

Bei dem Patientenkollektiv der immunsupprimierten Kinder wurde während des gesamten Studienzeitraums nur einmal ein *Staphylococcus aureus* in der Blutkultur nachgewiesen, das PCR-Ergebnis fiel negativ aus. Allerdings bestand bei dieser Probe der Verdacht auf eine Kontamination, da noch zwei weitere Keime, *Streptococcus parasanguinis* und KNS, in der Blutkultur gewachsen sind, die zur typischen Haut- und Schleimhautflora gehören.

Von den 154 Blutkultur-negativen Fällen bei den Kindern wurden alle korrekt in der PCR als negativ erkannt. Die Spezifität lag somit bei den Kindern bei 100 %.

Ein weiterer Vorteil der PCR-Diagnostik ist die Möglichkeit einer schnellen Bestimmung, ob ein Methicillin-resistenter (MRSA) oder Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* (MSSA) vorliegt. Dies ist besonders im Hinblick auf die Therapie entscheidend, da im Falle einer Infektion mit einem MRSA auf spezielle

Antibiotika zurückgegriffen werden muss. In der PCR gelingt dies über den Nachweis des *mecA*-Gens, bei dessen Expression die Bakterien eine Resistenz gegenüber Oxazillin und seinen Derivaten erhalten [10]. Allerdings ist dieses Gen nicht *Staphylococcus aureus*-spezifisch, sondern kommt auch in Koagulase-negativen Staphylokokken vor, so dass die Mec-HP1/2-PCR erst nach dem Nachweis einer Infektion mit *Staphylococcus aureus* durchgeführt werden sollte [23]. In der vorliegenden Studie wurden alle Proben, in deren paralleler Blutkultur *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden konnte, mit der Mec-HP1/2-PCR untersucht. Von fünf positiven Proben zeigten vier ein Wachstum von MRSA. Drei davon wurden mit der Mec-HP1/2-PCR korrekt identifiziert. Der MSSA wurde von der PCR korrekt als negativ erkannt.

In der falsch negativen Probe, die in der Blutkultur MRSA-positiv, in der Mec-HP1/2-PCR aber negativ war, fielen auch alle weiteren PCR's zum Nachweis von Staphylokokken (Staph-PCR, S.aur-PCR) negativ aus. Dies lässt vermuten, dass die DNA-Konzentration in dieser Blutprobe zu gering für einen Nachweis in der PCR war.

In den drei korrekt identifizierten Fällen, alle vom selben Patienten, hätte sich durch die schnellere Identifizierung des MRSA mittels PCR im Vergleich zur Blutkultur durchaus ein therapeutischer Vorteil für den Patienten ergeben. Die erste abgenommene Blutkultur dieses Patienten wurde nach knapp 10 Stunden im Bactec™-Gerät positiv gemeldet. Die PCR hätte somit, bei einer veranschlagten Bearbeitungszeit von vier Stunden, einen Zeitvorteil von sechs Stunden erbracht. Damit hätte eine MRSA-wirksame Therapie bereits früher erfolgen können.

Diese Erfolg versprechenden Ergebnisse zur Detektion von MRSA sind auch vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien [10, 23, 56].

Insgesamt sind die Resultate für die Identifizierung von *Staphylococcus aureus* mittels PCR durchaus viel versprechend. Die hohe Spezifität kann bei Risikopatienten mit Verdacht auf eine *Staphylococcus aureus*-Infektion zum Ausschluss einer solchen verwendet werden. An der momentan noch zu geringen Sensitivität muss allerdings noch weiter gearbeitet werden. Als Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Ergebnisse ist die zu geringe Fallzahl an *Staphylococcus aureus*-positiven Blutkulturen zu sehen. Hier sollten weitere, größer angelegte Studien durchgeführt werden.

4.2.4 *Candida* spp.-spezifische-PCR Can-FL/LC (Can-PCR)

In den letzten Jahren zeigte sich eine Zunahme an systemischen Infektionen mit Hefen [59]. So werden heute in 3 bis 17 % der positiven Blutkulturen *Candida*-Spezies nachgewiesen [44, 55, 59]. Da Hefen ein sehr langsames Wachstum aufweisen, dauert der kulturelle Nachweis oft lange oder gelingt gar nicht [4, 32]. In unserer Studie lag der Mittelwert bei 46, der Maximalwert bei 84 Stunden bis zum Wachstum des Erregers in der Kultur. Der Nachweis der Pilz-DNA mittels PCR könnte hier ein deutlich früheres Ergebnis liefern. Des Weiteren ist die Abgrenzung einer Infektion mit Hefen von einer Infektion mit Bakterien auch aus therapeutischer Sicht wichtig, da in diesem Fall keine Antibiotika, sondern Antimykotika zum Einsatz kommen müssen, um die Infektion suffizient behandeln zu können.

In der durchgeführten Studie wurde in sieben der untersuchten Blutkulturen das Wachstum von *Candida*-Spezies nachgewiesen. Bei den immunsupprimierten Kindern wurde keine Blutkultur positiv.

Zwei der sieben positiven Blutkulturen wurden mit der Can-PCR als positiv erkannt, was einer Sensitivität von 28,6 % entspricht. Sie liegt damit deutlich unter den Ergebnissen anderer Studien, die eine Sensitivität zwischen 76,9 und 100 % erreichten [4, 5, 14, 28, 34]. Allerdings ist dieser Wert auf Grund der geringen Anzahl an positiven *Candida*-Blutkulturen in der vorliegenden Studie nicht aussagekräftig. Eine Studie von Lehman et al. publizierte ebenfalls eine geringe Sensitivität für die Detektion von *Candida glabrata* mittels PCR [32]. Als möglicherweise zugrunde liegende Ursache wurde eine verminderte Effizienz der Amplifizierungsreaktion diskutiert, die auf eine größere Genom-Region zwischen den Primern in diesem spezifischen Organismus zurückgeführt wurde. Eine Inhibition der PCR wurde in unserer Studie in allen mit der Can-PCR-untersuchten Proben ausgeschlossen.

Es kam zu fünf falsch-negativen Ergebnissen in der PCR. In zwei dieser Fälle lag die Zeit bis zur Positivmeldung der parallelen Blutkulturen im Bactec™-Gerät bei 73,9 bzw. 83,9 Stunden. Auf Grund dieser langen Dauer, bis ein Wachstum detektiert werden konnte, kann man von einer sehr geringen Anfangskonzentration der Hefen in den abgenommenen Blutproben ausgehen. Diese Konzentration war möglicherweise für eine Detektion der DNA der Keime in der Can-PCR nicht ausreichend. Allerdings lag die Zeit bis zur Positivmeldung bei

den anderen drei PCR-negativen Fällen zwischen 18,2 und 25,5 Stunden und war damit deutlich niedriger als bei den anderen beiden Proben. Trotzdem fiel auch hier die PCR negativ aus.

Von den 483 in der Blutkultur negativen Blutproben waren 461 auch in der PCR negativ. Die Spezifität lag somit bei 95,5 %. In 22 Fällen zeigte die Can-PCR ein positives Ergebnis, obwohl in der parallelen Blutkultur kein Wachstum von Hefen nachgewiesen werden konnte. 13 dieser Blutproben (59,1 %) wurden unter Antimykotika-Gabe abgenommen, was das fehlende Wachstum in der Blutkultur erklären könnte. Bei drei weiteren Proben wurden *Candida*-Spezies in anderen Materialien im Zeitraum von -2 bis +6 Tagen um die Blutabnahme gefunden, sodass hier zumindest eine Besiedlung mit *Candida* wahrscheinlich ist. In zwei Fällen wurden in einer anderen Blutkultur derselben Infektionsepisode *Candida* nachgewiesen, was auch hier das positive PCR-Resultat erklären könnte. Insgesamt bleiben so vier Fälle, in denen das falsch-positive PCR-Resultat nicht erklärbar ist. Das Problem von falsch-positiven PCR-Resultaten bei der Detektion von *Candida*-Spezies wurde auch schon in früheren Studien diskutiert [4, 14, 28, 34]. Es stellt sich die Frage, ob die Sensitivität der Blutkulturdiagnostik bei *Candida*-Infektionen auf Grund des langsamen Wachstums der Hefen nicht ausreichend ist [28, 45, 54]. Dies könnte ein weiterer Grund für die relativ hohe Zahl an falsch-positiven PCR-Ergebnissen sein.

In den zwei Fällen, in denen die *Candida*-Spezies korrekt von der PCR identifiziert wurden, hätten sich bei beiden Patienten deutliche Therapievorteile mit der PCR-Diagnostik ergeben. Im ersten Fall wurde die Blutkultur nach 58 Stunden positiv gemeldet. Mit einer veranschlagten Zeit für die DNA-Isolierung und PCR-Untersuchung von vier Stunden hätte die antifungale Therapie bereits 52 Stunden, mehr als zwei Tage, vorher stattfinden können.

Im zweiten Fall meldete das Bactec™-Gerät die Blutkultur nach 25,5 Stunden positiv. Auch hier hätte die antimikrobielle Therapie unter Verwendung der PCR-Diagnostik 21 Stunden vorher eingeleitet werden können.

Die Can-PCR zeichnete sich beim Patientenkollektiv der immunsupprimierten Patienten vor allem durch eine hohe Spezifität, 95,5 % bei Erwachsenen und 98 % bei Kindern, aus. Damit ist sie als zusätzliche Methode zum Ausschluss einer Candidämie bei Patienten mit hohem Risiko für eine systemische *Candida*-

Infektion geeignet, besonders auch dann, wenn die Patienten unter Antimykotika-Prophylaxe oder -Therapie stehen.

Die Sensitivität der Can-PCR war in der vorliegenden Studie bei nur kleinen Fallzahlen zu gering. Eine erneute Evaluation dieser PCR sollte in größeren Studien untersucht werden, da in den positiven Fällen ein deutlicher Therapievorteil für die Patienten herausgearbeitet werden konnte.

4.2.5 Sonstige PCR-Assays

***Enterococcus/Streptococcus* spp.-PCR Ent-FL/LC (Ent/Strep-PCR)**

Enterokokken und Streptokokken sind weitere häufige Bakterien, die bei Blutstrominfektionen nachgewiesen werden [44, 55, 59].

In der vorliegenden Studie wurden in elf Blutkulturen *Enterococcus* spp. und in acht *Streptococcus* spp. nachgewiesen. Zwei der Enterokokkus-Spezies konnten mit der Ent/Strep-PCR detektiert werden. In den übrigen Fällen fiel die PCR negativ aus. Die Sensitivität lag somit nur bei 10,5 %.

Um dem Verdacht nachzugehen, dass ein positives PCR-Ergebnis eventuell mit der Zeit bis zur Positivmeldung der parallelen Blutkultur im Bactec™-Gerät korreliert, wurden die Inkubationszeiten der Blutkulturen verglichen. Eine kurze Inkubationsdauer spricht für eine hohe Ausgangskonzentration der Bakterien in der Blutprobe, was somit auch eher mit einem positiven PCR-Ergebnis korrelieren sollte. Umgekehrt müsste bei langer Inkubationsdauer das PCR-Ergebnis negativ ausfallen. Allerdings konnte sich diese Vermutung nicht bestätigen. Eine Blutkultur wurde bereits nach 5,6 Stunden positiv gemeldet, war aber PCR-negativ. In einem PCR-positiven Fall dauerte die Inkubation dagegen 22,7 Stunden.

Die Ent/Strep-PCR wies eine viel zu geringe Sensitivität auf. Sie kann in diesem Umfang keinesfalls in die klinische Routine übernommen werden.

***Enterobacteriaceae*-spezifische PCR Entbac-TM**

Enterobacteriaceae sind unter den gramnegativen Bakterien die häufigsten Erreger einer Sepsis [44, 55, 59].

In der durchgeführten Studie an immunsupprimierten Patienten wurden in zehn Blutkulturen *Enterobacteriaceae* identifiziert. Mit der Entbac-TM-PCR konnten vier davon ebenfalls detektiert werden. Es ergibt sich somit eine Sensitivität von 40 %. Auch hier ließ sich keine Korrelation zwischen der Inkubationsdauer der Blutkultur im Bactec™-Gerät und einem positiven PCR-Resultat herstellen. Eine Blutkultur mit einer Inkubationsdauer von lediglich 2,9 Stunden zeigte in der PCR ein negatives Ergebnis, während eine weitere mit einer Zeit bis zur Positivmeldung im Bactec™-Gerät von 27,0 Stunden ein positives PCR-Resultat lieferte.

Die Entbac-TM-PCR ist ebenfalls auf Grund der zu geringen Sensitivität zum Nachweis von Erregern im Blut nicht geeignet, allerdings sind auch hier die Fallzahlen für eine repräsentative Aussage zu gering.

***Pseudomonas aeruginosa*-spezifische PCR Ps aeru-TM**

Pseudomonas aeruginosa wurde während des gesamten Studienzeitraumes in keiner Blutkultur von immunsupprimierten Patienten nachgewiesen. Daher lässt sich für die Ps aeru-TM-PCR keine Aussage treffen.

***Candida albicans*-spezifische C.alb-FL/LC-PCR**

Candida albicans werden als häufigste *Candida*-Spezies als Verursacher für eine Sepsis gefunden [55]. Daher wurden alle Proben, die ein positives Can-PCR-Ergebnis aufwiesen, mit der C. alb-FL/LC-PCR untersucht.

Zwei Proben zeigten ein positives Can-PCR-Ergebnis. In einem Fall war kulturell *Candida albicans* identifiziert worden, hier wurde auch die C.alb-FL/LC-PCR positiv. Im anderen Fall war *Candida tropicalis* in der Kultur gewachsen, die PCR fiel korrekt negativ aus.

Die C.alb-FL/LC-PCR lieferte somit in 100 % ein korrektes Ergebnis, allerdings ist diese Fallzahl für eine aussagekräftige Feststellung zu gering. Diese PCR sollte deshalb in weiteren Studien untersucht werden.

4.3 Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine Detektion von Erregern im Blut mittels real-time PCR sowohl mit Vorteilen, als auch mit Nachteilen gegenüber der konventionellen Blutkultur-Diagnostik verbunden ist.

Im Vordergrund steht die immense Zeitersparnis durch die neue Methode, die durch eine frühere Identifikation des Erregers, eine raschere Erreger-spezifische antimikrobielle Therapie ermöglicht. Außerdem bietet sie bei immunsupprimierten Patienten mit Verdacht auf *Candida*- oder *Staphylococcus-aureus*-Infektion die Möglichkeit zur schnelleren Identifikation des Erregers, was speziell für diese Patientengruppe und diese beiden hoch pathogenen Keime von großem Vorteil ist. Dies kann dazu führen die Prognose von immunsupprimierten Patienten mit Blutstrominfektionen entscheidend zu verbessern. Des Weiteren bietet das neue Verfahren einen großen Vorteil bei antibiotisch vorbehandelten Patienten, sowie bei Infektionen mit Keimen, die in der Blutkultur nur sehr schwer oder unter langwierigen Bedingungen anzuzüchten sind.

Andererseits ist die Sensitivität der PCR-Diagnostik momentan noch zu gering, um die Blutkultur als Goldstandard ersetzen zu können. Sie kann jedoch, wenn sie als zusätzlicher Baustein in der Diagnostik von Blutstrominfektionen eingesetzt wird, diagnostische Vorteile bringen.

Die neue Methode kann ferner auf Grund ihrer hohen Spezifität zum Ausschluss einer Infektion eingesetzt werden.

Die weitere Verbesserung der bereits bestehenden PCR-Methodik sowie effizienter Methoden der DNA-Isolierung sollte das Ziel zukünftiger Studien sein.

5 Zusammenfassung

Das Krankheitsbild der Sepsis ist äußerst komplex und geht mit einer hohen Mortalität einher. Gerade immunsupprimierte Patienten haben ein hohes Risiko für eine Blutstrominfektion. Wichtigster prognostischer Faktor ist die möglichst schnelle Identifizierung des Erregers und die damit verbundene rasche und gezielte antimikrobielle Therapie. Gerade hier liegt allerdings der Nachteil des Goldstandards in der Diagnostik, der Anzuchtung des Keimes mittels Blutkultur. Deshalb sollten neue Untersuchungsmethoden entwickelt werden, die einen schnelleren Nachweis der Erreger ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit wurde ein real-time PCR-Verfahren mit vorheriger DNA-Isolierung mittels *MoLYsis* aus Nativblut von Patienten mit der Blutkulturdiagnostik verglichen. Zu diesem Zweck wurde eine große, prospektive klinische Studie an 208 immunsupprimierten Patienten der Universitätsklinik Ulm durchgeführt. Insgesamt wurden 490 Blutproben mit der PCR auf das Vorhandensein von *Staphylococcus*-Spezies-DNA, *Staphylococcus aureus*- und *Candida*-DNA untersucht und das Ergebnis mit der parallel abgenommenen Blutkultur verglichen. Es ergaben sich Sensitivitäten von 60,0 % (*Staphylococcus* spp. und *Staphylococcus aureus*) und 28,6 % (*Candida* spp.). Die Spezifität lag bei 95,7 % (*Staphylococcus*-Spezies), 99,2 % (*Staphylococcus aureus*) und 95,5 % (*Candida*-Spezies). Insgesamt lässt sich feststellen, dass das molekularbiologische Verfahren auf Grund der noch zu geringen Sensitivität die Blutkulturdiagnostik nicht ersetzen kann. Allerdings ist die Aussagekraft der Werte wegen zu geringer Fallzahlen an positiven Blutkulturen für *Staphylococcus aureus* (n=5) und *Candida*-Spezies (n=7) eingeschränkt. Trotzdem kann das neue Verfahren speziell bei immunsupprimierten Patienten mit Verdacht auf eine Infektion mit *Staphylococcus aureus* oder mit *Candida*-Spezies zur schnelleren Identifikation des Erregers eingesetzt werden. Die neue Diagnostikmethode zeigte ebenfalls Vorteile bei antibiotisch vortherapierten Patienten, so dass auch hier immundefiziente Patienten, die häufig eine antibiotische Prophylaxe erhalten, besonders profitieren, da durch die PCR-Diagnostik eine raschere erregerspezifische Therapie ermöglicht werden kann. Dies kann wesentlich zur Verbesserung der Prognose der Patienten beitragen. Die Verbesserung der Sensitivität sollte das Ziel weiterführender Studien sein.

6 Literaturverzeichnis

1. <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Leitlinien/Sepsis-Leitlinien?sid=rfAVo7spLecNAGVWAew15M&iid=1> (2009)
2. <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Was+ist+Sepsis%3F/Geschichte+der+Sepsis?sid=rfAVo7spLecNAGVWAew15M&iid=1> (2009)
3. <http://www.sepsis-gesellschaft.de/DSG/Deutsch/Was+ist+Sepsis%3F/Informationen+fuer+Mediziner/Definitionen?sid=rfAVo7spLecNAGVWAew15M&iid=1> (2009)
4. **Ahmad S, Khan Z, Mustafa AS.** Seminested PCR for diagnosis of candidemia: comparison with culture, antigen detection, and biochemical methods for species identification. *J Clin.Microbiol* **40**:2483-2489 (2002)
5. **Alam FF, Mustafa AS, Khan ZU.** Comparative evaluation of (1, 3)-beta-D-glucan, mannan and anti-mannan antibodies, and *Candida* species-specific snPCR in patients with candidemia. *BMC.Infect.Dis.* **7**:103 (2007)
6. **Andrade SS, Bispo PJ, Gales AC.** Advances in the microbiological diagnosis of sepsis. *Shock* **30 Suppl 1**:41-46 (2008)
7. **Annane D, Bellissant E, Cavillon JM.** Septic shock. *Lancet* **365**: 63-78 (2005)
8. **Bestmann LA.** Micromachined total nucleic acid analysis system with integrated DNA isolation, mix preparation, on-chip real-time PCR and melting curve analysis. Institut für Technologie, Universität Zürich. (2005)
9. **Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* **101**:1644-55 (1992)

- 10. Carroll KC, Leonard RB, Newcomb-Gayman PL and Hillyard DR.** Rapid detection of the Staphylococcal *mecA* Gene from BACTEC blood culture bottles by the polymerase chain reaction. *Am J Clin Pathol* **106**: 600-605 (1996)
- 11. Cleven BE, Palka-Santini M, Gielen J, Meembor S, Krönke M, Krut O.** Identification and characterization of bacterial pathogens causing bloodstream infections by DNA microarray. *J Clin Microbiol.* **44**:2389-97 (2006)
- 12. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Kaczmarek EB, Fox AJ.** Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1747–1752 (2000)
- 13. Costa AM, Kay I, Palladino S.** Rapid detection of *mecA* and *nuc* genes in staphylococci by real-time multiplex polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **51**:13-7 (2005)
- 14. Dunyach C, Bertout S, Phelipeau C, Drakulovski P, Reynes J, Mallie M.** Detection and identification of *Candida* spp. in human serum by LightCycler real-time polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol Infect. Dis.* **60**:263-271 (2008)
- 15. Einsele H, Hebart H, Roller G, Löffler J, Rothenhofer I, Müller CA, Bowden RA, van Burik J, Engelhard D, Kanz L, Schumacher U.** Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol.* **35**:1353-60 (1997)
- 16. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K.** Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med* **33**:606-618 (2007)

- 17. Erjavec Z, Verweij PE.** Recent progress in the diagnosis of fungal infections in the immunocompromised host. *Drug Resist Updat.* **5**: 3-10 (2002)
- 18. Favre B, Hugonnet S, Correa L, Sax H, Rohner P, Pittet D.** Nosocomial bacteremia: Clinical significance of a single blood culture positive for coagulase-negative Staphylococci. *Infect Control Hosp Epidemiol* **26**: 697-702 (2005)
- 19. Fredricks DN, Relman DA.** Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanethanesulfonate. *J Clin. Microbiol* **36**: 2810-2816 (1998)
- 20. Gebert S:** Molekulare Schnell Diagnostik bei Sepsispatienten. Biol. Dissertation, Universität Ulm (2009)
- 21. Gebert S, Siegel D, Wellinghausen N.** Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. *J Infect.* **57**:307-316 (2008)
- 22. Greisen K, Loeffelholz M, Purohit A, Leong D.** PCR primers and probes for the 16S rRNA gene of most species of pathogenic bacteria, including bacteria found in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* **32**:335-51 (1994)
- 23. Gröbner S, Kempf VAJ.** Rapid detection of methicillin-resistant staphylococci by real-time PCR directly from positive blood culture bottles. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **26**: 751-754 (2007)
- 24. Hogg GM, McKenna JP, Ong G.** Rapid detection of methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive BacT/Alert blood culture bottles using real-time polymerase chain reaction: evaluation and comparison of 4 DNA extraction methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* **61**: 446-452 (2008) (Abstract)

- 25. Jordan JA, Durso MB.** Comparison of 16S rRNA gene PCR and BACTEC 9240 for detection of neonatal bacteremia. *J. Clin. Microbiol.* **38**:2574-2578 (2000)
- 26. Kang CI, Kim SH, Park WB, Lee KD, Kim HB, Kim EC, Oh MD, Choe KW.** Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: Risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob agents chemother* **49**: 760-766 (2005)
- 27. Kempf VA, Trebesius K, Autenrieth IB.** Fluorescent In situ hybridization allows rapid identification of microorganisms in blood cultures. *J Clin Microbiol.* **38**:830-8 (2000)
- 28. Klingspor L, Jalal S.** Molecular detection and identification of *Candida* and *Aspergillus* spp. from clinical samples using real-time PCR. *Clin. Microbiol Infect.* **12**:745-753 (2006)
- 29. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ.** Inadequate antimicrobial treatment of infections. A risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* **115**: 462-474 (1999)
- 30. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M.** Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* **34**:1589-1596 (2006)
- 31. Laforgia N, Coppola B, Carbone R, Grassi A, Mautone A, Iolascon A.** Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr.* **86**:1097-1099 (1997)
- 32. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, Haberhausen G, Wissing H, Hoefft A, Stuber F.** A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Med Microbiol Immunol.* **197**:313-324 (2008)

- 33. Ley BE, Linton CJ, Bennett DM, Jalal H, Foot AB, Millar MR.** Detection of bacteraemia in patients with fever and neutropenia using 16S rRNA gene amplification by polymerase chain reaction. *Eur.J Clin.Microbiol Infect.Dis.* **17**:247-253 (1998)
- 34. Maaroufi Y, Heymans C, De Bruyne JM, Duchateau V, Rodriguez-Villalobos H, Aoun M, Crokaert F.** Rapid detection of *Candida albicans* in clinical blood samples by using a TaqMan-based PCR assay. *J Clin.Microbiol* **41**:3293-3298 (2003)
- 35. Makhoul IR, Smolkin T, Sujov P, Kassis I, Tamir A, Shalginov R, Sprecher H.** PCR-based diagnosis of neonatal staphylococcal bacteremias. *J Clin.Microbiol* **43**:4823-4825 (2005)
- 36. Mancini N, Clerici D, Diotti R, Perotti M, Ghidoli N, De Marco D, Pizzorno B, Emrich T, Burioni R, Ciceri F, Clementi M.** Molecular diagnosis of sepsis in neutropenic patients with haematological malignancies. *J Med Microbiol* **57**:601-604 (2008)
- 37. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M.** The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* **348**: 1546-1554 (2003)
- 38. Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG.** Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Microbiol.* **36**:618-23 (1998)
- 39. McDonald LC, Weinstein MP, Mirrett JFS, Reimer LG, Reller LB.** Controlled comparison of BacT/ALERT FAN aerobic medium and BACTEC fungal blood culture medium for detection of fungemia. *J Clin. Microbiol* **39**: 622-624 (2001)
- 40. Micek ST, Lloyd AE, Ritchie DJ, Reichley RM, Fraser VJ, Kollef MH.** *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: Importance of appropriate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob agents chemother* **49**: 1306-1311 (2005)

- 41. Millar BC, Jiru X, Moore JE, Earle JAP.** A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *Journal of microbiological methods* **42**: 139-147 (2000)
- 42. Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**:335-50 (1987)
- 43. Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV.** Detection and treatment of bloodstream infection: Laboratory reporting and antimicrobial management. *J Clin. Microbiol* **41**: 495-497 (2003)
- 44. Paul M, Gafter-Gvili A, Leibovici L, Bishara J, Levy I, Yaniv I, Shalit I, Samra Z, Pitlik S, Konigsberger H, Weinberger M.** The epidemiology of bacteremia with febrile neutropenia: Experience from a single center, 1988–2004. *Isr Med Assoc J.* **9**: 424–429 (2007)
- 45. Peters RPH, van Agtmael MA, Danner SA, Saevelkoul PHM, Vandenbroucke-Grauls CMJE.** New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect Dis* **4**: 751-760 (2004)
- 46. Peters RPH, van Agtmael MA, Simoons-Smit AM, Danner SA, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Saevelkoul PHM.** Rapid identification of pathogens in blood cultures with a modified fluorescence in situ hybridization assay. *J Clin. Microbiol* **44**: 4186-4188 (2006)
- 47. Peters RPH, van Agtmael MA, Gierveld S, Danner SA, Groeneveld AB, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Savelkoul PHM.** Quantitative detection of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis* DNA in blood to diagnose bacteremia in patients in the intensive care unit. *J Clin. Microbiol* **45**:3641-3646 (2007)

- 48. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N.** Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol.* **38**:2429-33 (2000)
- 49. Reischl U, Linde HJ, Leppmeier B, Lehn N:** Duplex LightCycler PCR assay for the rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation. In: Reischl U, Wittwer C, Cockerill F (Hrsg) *Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications*, Springer Press, Heidelberg, S. 93-108 (2001)
- 50. Scarsi KK, Feinglass JM, Scheetz MH, Postelnick MJ, Bolon MK, Noskin GA.** Impact of inactive empiric antimicrobial therapy on inpatient mortality and length of stay. *Antimicrob agents chemother* **50**: 3355-3360 (2006)
- 51. Serody JS, Berrey MM, Albritton K, O'Brien SM, Capel EP, Bigelow SH, Weber DJ, Gabriel DA, Wiley JM, Schell MJ, Gilligan PH, Shea TC.** Utility of obtaining blood cultures in febrile neutropenic patients undergoing bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* **26**: 533–538 (2000)
- 52. Shafazand S, Weinacker AB.** Blood cultures in the critical care unit. Improving utilization and yield. *Chest* **122**: 1721-1736 (2002)
- 53. Shang S, Chen G, Wu Y, DU L, Zhao Z.** Rapid diagnosis of bacterial sepsis with PCR amplification and microarray hybridization in 16S rRNA gene. *Pediatr Res.* **58**:143-8 (2005)
- 54. Verweij PE, Meis JF.** Microbiological diagnosis of invasive fungal infections in transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* **2**: 80-87 (2002)
- 55. Vincent JL, Abraham E.** The last 100 years of sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**:256-263 (2006)

- 56. Wellinghausen N, Wirths B, Franz AR, Karolyi L, Marre R, Reischl U.** Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn. Microbiol Infect. Dis.* **48**:229-241 (2004)
- 57. Welte T.** Antibiotikatherapie der Sepsis. *Dtsch Med Wochenschr* **129**: 2609-2613 (2004)
- 58. Wiesinger-Mayr H, Vierlinger K, Pichler R, Kriegner A, Hirschl AM, Presterl E, Bodrossy L, Noehammer C.** Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition. *BMC Microbiol.* **7**: 78 (2007)
- 59. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB.** Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**:309-317 (2004)
- 60. Wu YD, Chen LH, Wu XJ, Shang SQ, Lou JT, Du LZ, Zhao ZY.** Gram stain-specific-probe-based real-time PCR for diagnosis and discrimination of bacterial neonatal sepsis. *J Clin. Microbiol* **46**: 2613-2619 (2008)

7 Anhang

Tab. 19: Auflistung der Grunderkrankungen der immunsupprimierten Patienten der Blutkultur-PCR-Studie inklusive Subgruppen

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; CA: Carcinom;
 CLL: chronisch lymphatische Leukämie; CML: chronisch myeloische Leukämie
 HIV: humanes Immundefizienz-Virus; ITP: idiopathische thrombozytopenische Purpura;
 MM: Multiples Myelom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom; OMF: Osteomyelofribrom;
 SAA: schwere aplastische Anämie; SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disorder;
 CUP: Carcinoma of unknown primary; IgE: Immunglobulin E;
 MGUS: Monoklonale Gammopathie unbestimmter Signifikanz
 PNH: paroxysmale nächtliche Hämoglobinurie; MDS: myelodysplastisches Syndrom
 MHC: Major Histocompatibility Complex

Grunderkrankung	Subgruppen	Anzahl an Patienten	prozentualer Anteil an Subgruppe	prozentualer Anteil an Grunderkrankungen
Leukämien	ALL	29	28,4%	
	AML	57	55,9%	
	CML	2	2,0%	
	CLL	12	11,8%	
	prolymphozytäre Leukämie	2	2,0%	
	gesamt	102	100,0%	49,0%
Lymphome	Morbus Hodgkin	7	22,6%	
	NHL	19	61,3%	
	Burkitt-Lymphom	5	16,1%	
	gesamt	31	100,0%	14,9%
Erworbene Immundefekte	chronische Osteomyelitis	1	16,7%	
	Agranulozytose	2	33,3%	
	HIV	2	33,3%	
	M Bechterew, infektiöse Arthritis	1	16,7%	
	gesamt	6	100,0%	2,9%

Anhang

Grunderkrankung	Subgruppen	Anzahl an Patienten	prozentualer Anteil an Subgruppe	prozentualer Anteil an Grunderkrankungen
Hereditäre Immundefekte	SCID	6	54,6%	5,3%
	Hyper-IgE-Syndrom	1	9,1%	
	MHC-II-Defekt	1	9,1%	
	Osteopetrose	2	18,2%	
	septische Granulomatose	1	9,1%	
	gesamt	11	100,0%	
Gehirntumore	Ependynom	1	25,0%	1,9%
	Glioblastom	1	25,0%	
	Medulloblastom	2	50,0%	
	gesamt	4	100,0%	
Sonstige hämatologische Neoplasien	MDS	6	16,7%	17,3%
	aplastische Anämie	2	5,6%	
	dyserythropoet. Anämie	1	2,8%	
	PNH	1	2,8%	
	essentielle Thrombozytopenie	3	8,3%	
	MM	18	50,0%	
	LCH (Langerhanszell-Histiozytose)	1	2,8%	
	MGUS, M.Waldenström	1	2,8%	
	multifokale Leukenzephalopathie, klonale B-Zell-Erkrankung	1	2,8%	
	OMF	1	2,8%	
	Hämophagozytose-Syndrom	1	2,8%	
	gesamt	36	100,0%	

Anhang

Grunderkrankung	Subgruppen	Anzahl an Patienten	prozentualer Anteil an Subgruppe	prozentualer Anteil an Grunderkrankungen
Sonstige Tumoren	Ewing Sarkom	3	16,7%	
	Nephroblastom	3	16,7%	
	Neuroblastom	2	11,1%	
	Rhabdomyosarkom	3	16,7%	
	CUP	1	5,6%	
	Hodentumor (Dottersacktumor)	1	5,6%	
	maligner Keimzelltumor	1	5,6%	
	Mamma-CA	2	11,1%	
	papilläres Schilddrüsen-CA	1	5,6%	
	Osteomyosarkom	1	5,6%	
	gesamt	18	100,0%	8,7%

Tab. 20: Darstellung aller mit der Gramdiff-PCR untersuchten Proben, die entweder ein positives PCR- oder ein positives Blutkultur(BK)-Ergebnis aufwiesen

Gelb unterlegt sind alle Proben mit positivem PCR-, aber negativem BK-Ergebnis.

Grün unterlegt sind alle Proben, die bei positiver BK ein korrekt positives PCR-Ergebnis aufwiesen.

Rot unterlegt sind alle Proben, die bei positiver BK ein negatives/nicht korrektes PCR-Ergebnis aufwiesen.

Antibiotika vor BK-Abnahme wurden berücksichtigt, wenn sie mindestens in den letzten 48 Stunden (h) vor der Blutentnahme verabreicht wurden; die Zahl in Klammern gibt an, wie viele Tage das Antibiotikum schon gegeben wurde ausgehend vom Abnahmedatum der BK; P: prophylaktische Antibiotika-Gabe. –: keine AB-Gabe. tägl.: täglich; Mo: Montag; Mi: Mittwoch; Fr: Freitag; PCR: Polymerase-Ketten-Reaktion

KNS: Koagulase-negative Staphylokokken; MRSA: Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*; *Strep.*: *Streptococcus*

Gramdiff-PCR: Gramdifferenzierende PCR-Reaktion; n.v.: nicht vorhanden; Z.n.: Zustand nach; M.: Morbus

ALL: akute lymphatische Leukämie; AML: akute myeloische Leukämie; CA: Carcinom; CLL: chronisch lymphatische Leukämie;

HIV: humanes Immundefizienz-Virus; ITP: idiopathische thrombozytopenische Purpura; MM: Multiples Myelom; NHL: Non-Hodgkin-Lymphom;

OMF: Osteomyelofibrom; SAA: schwere aplastische Anämie; SCID: Severe Combined Immunodeficiency Disorder

Proben-Nr.	Station	Vorerkrankung	Antibiotika vor BK-Abnahme	Ergebnis BK	Inkubationsdauer in h	Gram-Diff-PCR gram-positiv	Gram-Diff-PCR gram-negativ	Klinisch relevant
1a	Kinder 7	Osteopetrose	-	<i>Strep. sanguinis</i>	14,1	negativ	negativ	Ja
8b	M3E	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	11,6	+	negativ	Ja
8a	M3E	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5,8	+	negativ	Ja
8c	M3E	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10,5	+	negativ	Ja
8d	M3E	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15,5	+	negativ	Ja
8e	M3E	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	28,5	negativ	negativ	Ja
9a	Kinder 3	AML	-	<i>Enterobacter spp.</i>	15,0	negativ	negativ	Ja

Anhang

Proben-Nr.	Station	Vor-erkrankung	Antibiotika vor BK-Abnahme	Ergebnis BK	Inkubations-dauer in h	Gram-Diff-PCR gram-positiv	Gram-Diff-PCR gram-negativ	Klinisch relevant
20a	Kinder 3	ALL	Ceftazidim (5d)	negativ	-	+	(+)	n.v.
40a	M3G Intensiv	Multiples Myelom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24,9	negativ	negativ	Nein
49a	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P), Piperacillin+Tazobactam (9d)	<i>Enterococcus faecium</i>	7,1	negativ	negativ	Ja
49b	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P), Piperacillin+Tazobactam (9d)	<i>Enterococcus faecium</i>	10,1	negativ	negativ	Ja
52a	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Fusobacterium</i> sp.	47,6	negativ	negativ	Ja
52b	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Fusobacterium</i> sp.	57,7	negativ	negativ	Ja
55a	M4C	Multiples Myelom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	negativ	-	negativ	+	n.v.
64a	M3G Intensiv	Z.n M.Hodgkin	-	KNS	47,6	negativ	negativ	Nicht beurteilbar
69b	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	negativ	-	(+)	negativ	n.v.
73c	M3G Intensiv	B-NHL	Cotrimoxazol (P), Piperacillin/Tazobactam (3d)	negativ	-	negativ	+	n.v.
76a	M1C	HIV	Cotrimoxazol (P), Sulfadiazin (11d)	<i>Enterococcus faecium</i>	13,6	negativ	+	Ja
76b	M1C	HIV	Cotrimoxazol (P), Sulfadiazin (11d)	<i>Enterococcus faecium</i>	12,7	negativ	+	Ja
77a	M1B	AML	Levofloxacin tägl. (P)	negativ	-	(+)	negativ	n.v.
78a	Kinder 6	SCID	-	negativ	-	(+)	(+)	n.v.

Anhang

Proben-Nr.	Station	Vor- erkrankung	Antibiotika vor BK- Abnahme	Ergebnis BK	Inkubations- dauer in h	Gram-Diff- PCR gram- positiv	Gram-Diff- PCR gram- negativ	Klinisch relevant
84b	M1C	prolymphozytäre Leukämie	-	negativ	-	+	negativ	n.v.
85c	M4B	Chronische Osteomyelitis	-	<i>Staphylococcus epidermidis + Acinetobacter baumannii</i>	20,9	negativ	negativ	Ja
86a	Kinder 6	ITP	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	negativ	-	negativ	+	n.v.
97a	Kinder TK	Nephroblastom	-	<i>Micrococcus luteus</i>	54,5	negativ	negativ	Nein
100a	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	19,5	negativ	negativ	Ja
100b	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	35,7	negativ	negativ	Ja
100c	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15,2	negativ	negativ	Ja
104a	M4B	TTP	-	MRSA	9,8	negativ	negativ	Ja
104c	M4B	TTP	-	MRSA	8,1	+	negativ	Ja
104b	M4B	TTP	-	MRSA	11,4	+	negativ	Ja
110a	M4C	MM	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	negativ	-	negativ	(+)	n.v.
119b	M1C	Burkitt- Lymphom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P), Fluconazol (6d), Piperacillin+Tazobactam (6d)	negativ	-	negativ	(+)	n.v.
119c	M1C	Burkitt- Lymphom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P), Fluconazol, Piperacillin +Tazobactam (6d)	negativ	-	negativ	(+)	n.v.

Anhang

Proben-Nr.	Station	Vor-erkrankung	Antibiotika vor BK-Abnahme	Ergebnis BK	Inkubations-dauer in h	Gram-Diff-PCR gram-positiv	Gram-Diff-PCR gram-negativ	Klinisch relevant
124b	M4A	AML	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,5	negativ	negativ	Nein
139a	M3G Intensiv	AML	-	negativ	-	(+)	negativ	n.v.
145e	M4C	B-ALL	Fluconazol (8d), Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P), Levofloxacin tägl. (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	22,9	negativ	negativ	Nein
147a	M3E	AML	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	20,5	negativ	negativ	Nicht beurteilbar
147b	M3E	AML	Vancomycin (0d), Imipenem/Cilastin (2d)	<i>Corynebacterium</i> sp.	87,9	negativ	negativ	Nein
155a	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	8,4	+	negativ	Nein
156b	M4C	ALL	-	<i>Enterococcus faecium</i>	11,9	negativ	negativ	Ja
161a	M4A	CLL	-	KNS	14,1	negativ	negativ	Nein
165a	M3E	OMF	Levofloxacin tägl. (P)	<i>Escherichia coli</i>	10,2	negativ	negativ	Ja
196a	M4C	AML	Fluconazol (8d)	<i>Enterococcus faecium</i>	10,4	negativ	negativ	Ja
197c	M4C	B-NHL	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	15,7	negativ	negativ	Nein
199a	M4A	Mamma-CA	Levofloxacin tägl. (P), Vancomycin (0d), Imipenem/Cilastin (1d)	<i>Enterococcus faecium</i>	22,7	negativ	negativ	Ja
803a	Kinder 7	ALL	Cotrimoxazol alle 14d (P)	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	22,1	negativ	negativ	Ja
803b	Kinder 7	ALL	Cotrimoxazol alle 14d (P)	<i>Micrococcus luteus</i>	63,3	negativ	+	Nein

Anhang

Proben-Nr.	Station	Vor- erkrankung	Antibiotika vor BK- Abnahme	Ergebnis BK	Inkubations- dauer in h	Gram-Diff- PCR gram- positiv	Gram-Diff- PCR gram- negativ	Klinisch relevant
808a	Kinder 3	Ewing-Sarkom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3,9	negativ	negativ	Nein
810a	Kinder 3	SAA	Ceftazidim regelm. (P)	<i>Bacillus pumilus</i>	19,7	negativ	negativ	Ja
810b	Kinder 3	SAA	Ceftazidim regelm. (P)	<i>Bacillus pumilus</i>	13,0	negativ	negativ	Ja
816a	M4C	AML	Levofloxacin tägl. (P), Piperacillin+Tazobactam (1d)	<i>Enterococcus faecium</i>	10,5	negativ	negativ	Ja
824a	M4C	AML	Piperacillin+Tazobactam (0d)	MRSA	13,5	negativ	negativ	Ja
827a	M1C	Prolympho- zytäre Leukämie	Vancomycin (8d)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	45,9	(+)	negativ	Nicht beurteilbar
828a	M1C	Burkitt- Lymphom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P), Fluconazol, Tobramycin	<i>Lactococcus lactis</i>	20,5	negativ	negativ	Ja
828b	M1C	Burkitt- Lymphom	Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P), Fluconazol, Tobramycin	<i>Lactococcus lactis + Staphylococcus epidermidis</i>	19,5	negativ	negativ	Ja
829a	M4C	AML	Levofloxacin tägl.+Cotrimoxazol Mo/Mi/Fr (P)	<i>Strep. anginosus</i>	10,8	negativ	negativ	Ja
831a	M4C	AML	-	<i>Escherichia coli</i>	2,9	negativ	negativ	Ja
849a	M1C	HIV	Sulfadiazin (16d)	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	24,2	negativ	negativ	Ja
849b	M1C	HIV	Sulfadiazin (20d)	<i>Staphylococcus epidermidis + KNS</i>	15,0	(+)	negativ	Nein

8 Eigene Publikationen

Wellinghausen N, Siegel D, Gebert S, **Winter J**: Rapid detection of *Staphylococcus aureus* bacteremia and methicillin resistance by real-time PCR, Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2009, im Druck

Wellinghausen N, Siegel S, Disqué C, Lorenz M, **Winter J**, Gebert S: Rapid diagnosis of candidemia by real-time PCR detection of *Candida* DNA in blood samples. J Med Microbiol, 2009, im Druck

Wellinghausen N, Kochem AJ, Disqué C, Mühl H, Gebert S, **Winter J**, Matten J, Sakka SG: Diagnosis of bacteremia in whole blood samples by a commercial universal 16S rDNA-based PCR test and sequencing analysis, J Clin Microbiol, in Revision

9 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Nele Wellinghausen für die sehr gute Betreuung und Unterstützung während der Studie und Ausarbeitung der Dissertation.

Des Weiteren bedanke ich mich ganz herzlich bei Dipl. biol. Susanne Gebert und Dunja Siegel, sowie bei allen Mitarbeitern der mikrobiologischen Abteilung für die Einarbeitung in die Studie und die Laborarbeit. Sie haben mich stets bei allen Fragen und Schwierigkeiten unterstützt.

Außerdem danke ich Dr. Martin Bommer, Prof. Dr. Donald Bunjes, Prof. Dr. Hartmut Döhner, Dr. Manfred Hönig, Prof. Dr. Peter Kern, Dr. Wolfgang Lindner, Prof. Dr. Nikolaus Marx, PD Dr. Ansgar Schulz, Prof. Dr. Stephan Stilgenbauer und Prof. Dr. Heidemarie Suger-Wiedeck für die exzellente Kooperation im Rahmen unserer Studie.

Ein weiteres Dankeschön an dieser Stelle auch an alle Pflegekräfte der teilnehmenden Stationen der Medizinischen Klinik der Universität Ulm, der anästhesiologischen Intensivstation am Safranberg, sowie der Kinderklinik. Sie alle waren mir eine große Hilfe bei der Einsicht der Patientenakten und der Durchführung der Studie.

Zum Schluss bedanke ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichen und mich stets unterstützt haben.

Außerdem auch ein Dankeschön an alle meine Freunde, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen.