

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einsatz von PCR, Massenspektrometrie und konventionellen
Verfahren zur direkten Identifizierung und Resistenzbestimmung
von Mikroorganismen aus Blutkulturen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sophie Cathérine Krysewski
aus Göttingen

Datum der Promotion: 07.12.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
Zusammenfassung	8
Abstract	10
1 Einleitung	12
1.1 Definition der Sepsis	12
1.2 Inzidenz, Epidemiologie und Letalität der Sepsis	14
1.3 Pathogenese der Sepsis	16
1.4 Erregerspektrum der Sepsis	17
1.5 Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis und deren klinische Relevanz	18
1.6 Standards zur Identifizierung	19
1.7 Standards zur Resistenztestung	21
1.8 Mikrobiologie und Pathogenität des <i>Staphylococcus aureus</i>	22
1.8.1 Prävalenz und Folgen des MRSA-Anstiegs	23
2 Herleitung	25
3 Methodik	26
3.1 Probenauswahl, Studiendesign und Ausschlusskriterien	26
3.2 Probenvorbereitung	27
3.3 Messprinzip der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)	29
3.3.1 Direkte Identifizierung von Mikroorganismen mit dem Bruker microflex™ LT	31
3.3.2 Identifizierung von Mikroorganismen von der Subkultur mit dem Bruker microflex™ LT	33
3.3.3 Identifizierung von Kontrollstämmen zur Qualitätskontrolle	33
3.4 Messprinzip des BD GeneOhm™ StaphSR Tests	34
3.5 Messprinzip des BD Phoenix™ Systems	38
3.5.1 Bewertung der Resistenzergebnisse	38
3.5.2 Resistenztestung mit dem BD Phoenix 100 Instrument	39
3.6 Epsilon-Test (E-Test)	42
3.7 Mikrodilutionstest zum Nachweis von Betalaktamasen	42
3.8 Statistische Auswertung	43

4 Ergebnisbeschreibung	45
4.1 Ergebnisse der Identifizierung	45
4.1.1 Vergleich der Methoden	47
4.1.2 Analyse der Blutkulturflaschen mit 1 000 µl Probenvolumen	49
4.1.3 Analyse der Blutkulturflaschen mit 200 µl Probenvolumen	53
4.1.4 Ergebnisse der Identifizierung der Kontrollstämme	56
4.1.5 Abhängigkeit der Ergebnisse von der durchführenden Person	58
4.2 Ergebnisse der PCR	58
4.3 Ergebnisse der Resistenztestung	59
4.3.1 Analyse innerhalb der Keimgruppen	61
4.3.2 Analyse nach Spezies und Antibiotikum	64
4.3.3 Ergebnisse der Mikrobouillonverdünnungstests bei Verdacht auf Bildung von Breitspektrumbetalaktamasen	66
4.3.4 Zeit bis zum Analyseergebnis relevanter Antibiotika	67
5 Diskussion	74
5.1 Diskussion der Methoden	74
5.2 Diskussion der Ergebnisse der Identifizierung	76
5.3 Diskussion der Ergebnisse der PCR	81
5.4 Diskussion der Ergebnisse der Resistenztestung	83
5.5 Zeitanalyse	87
6 Zusammenfassung	90
Literaturverzeichnis	92
Lebenslauf	108
Eidesstattliche Versicherung	110
Danksagung	111

Abkürzungsverzeichnis

ACCP _____	American College of Chest Physicians
ACL _____	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ANOVA _____	<i>analysis of variance</i>
API _____	<i>Analytical-Profile-Index</i>
ARDS _____	<i>acute respiratory distress syndrome</i>
AST _____	<i>antimicrobial susceptibility testing</i>
ATCC _____	American Type Culture Collection
BORSA _____	Borderline Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
BSBL _____	Breitspektrumbetalaktamase
CA _____	<i>category agreement</i>
CA-MRSA _____	<i>community aquired-MRSA</i>
CAZ _____	Ceftazidim
CLA _____	Clavulansäure
CLSI _____	Clinical and Laboratory Standards Institute
COX _____	Cefoxitin
CPO _____	Cefpodoxim
DIC _____	<i>disseminated intravascular coagulation</i>
DIN _____	Deutsches Institut für Normung
ESBL _____	<i>extended spectrum betalactamase</i>
EARS _____	European Antimicrobial Resistance Surveillance
EK _____	Enterokokken
EN _____	Enterobakteriazeen
EUCAST _____	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAM _____	Carboxyfluorescein
FiO ₂ _____	Fraktion des inhalierten Sauerstoffs
FISH _____	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
h _____	<i>hora</i>
HCA-MRSA _____	<i>healthcare-associated community-MRSA</i>
H-MRSA _____	<i>hospital aquired-MRSA</i>
IC _____	interne Kontrolle
ID _____	Identifizierung
IL _____	Interleukin
ISO _____	International Organisation for Standardization

KbE _____	Kolonie bildende Einheit
KISS _____	Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System
KNS _____	koagulasenegative Staphylokokken
LPS _____	Lipopolysaccharid
LBP _____	Lipopolysaccharid-bindendes Protein
majE _____	<i>major error</i>
MALDI-TOF _____	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight</i>
MDT _____	Magen-Darm-Trakt
MHK _____	minimale Hemmkonzentration
MS _____	Massenspektrometrie
min _____	Minute
minE _____	<i>minor error</i>
MSSA _____	Methicillin-sensibler <i>Staphylococcus aureus</i>
MREJ _____	<i>mec right extremity junction</i>
MRSA _____	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
MW _____	arithmetischer Mittelwert
NaCl _____	Natriumchlorid
NNIS _____	National Nosocomial Infection Surveillance
P _a CO ₂ _____	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAMPs _____	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
P _a O ₂ _____	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PCR _____	<i>polymerase chain reaction</i>
PYO _____	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
qSOFA _____	quick-SOFA
rpm _____	<i>revolutions per minute</i>
s _____	Sekunde
SCCM _____	Society of Critical Care Medicine
SD _____	Standardabweichung
SDS _____	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SIRS _____	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA _____	<i>Sequential [Sepsis-related] Organ Failure Assessment</i>
spa-Gen _____	<i>staphylococcal protein A gene</i>
SSCmec _____	<i>staphylococcal cassette chromosomal mec</i>
SST _____	Serum Separator Tube
STAU _____	<i>Staphylococcus aureus</i>

TET _____	Tetrachlorfluorescein
TNF- α _____	Tumornekrose-Faktor- α
TTP _____	<i>time-to-positivity</i>
TTR _____	<i>time-to-result</i>
vmE _____	<i>very major error</i>
v. d. S. _____	von der Subkultur
vgl. _____	verglichen

Zusammenfassung

Einleitung: Die mikrobiologische Sepsisdiagnostik ist essenziell für eine adäquate Antibiotikatherapie und dient der Vermeidung von Resistenzentwicklungen. Mit konventionellen Verfahren ist in der Regel frühestens 48 h nach positivem Signal des Blutkulturflaschensystems ein vollständiges Ergebnis der Identifizierung und der Empfindlichkeitsprüfung des Isolates zu erwarten. Ziel dieser Studie war deshalb die Beschleunigung der Erregerbestimmung und der Antibiogrammerstellung aus positiven Blutkulturflaschen ohne Subkultivierung.

Methodik: Es wurde eine Präparation von Bakterienlysaten aus positiven Blutkulturflaschen mittels MALDI Sepsityper[®] Kit und eine schnelle Identifizierung des Keimes durch Analyse charakteristischer bakterieller Moleküle mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (MS) (Bruker microflex[™] LT/Biotyper[™]-Software) durchgeführt. Als Referenzmethode diente die Identifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS nach vorangegangener Subkultivierung. Zur Resistenztestung wurden BD Phoenix[™] Panels direkt aus resuspendierten Bakterien-Pellets inokuliert. Diese Ergebnisse der direkten Resistenzbestimmung sind mit den Resultaten der Routinediagnostik von der Subkultur im VITEK[®] 2 System verglichen worden. Die mittels MALDI-TOF MS als *Staphylococcus aureus* identifizierten Bakterien wurden mit einer real-time PCR (BD GeneOhm[™] StaphSR Test) direkt auf MRSA untersucht.

Ergebnisse: Es sind 1 033 Isolate aus positiven Blutkulturflaschen untersucht worden. Die erfolgreiche Erregeridentifizierung der untersuchten Mikroorganismen direkt aus Blutkulturflaschen gelang bei 61,8% mit einem Probenvolumen von 1 000 µl und bei 75,4% mit einem Probenvolumen von 200 µl. Alle 13 MRSA aus Einzelinfektionen wurden mit der real-time PCR innerhalb von 90 min identifiziert. Die Antibiogrammerstellung ohne Subkultivierung mit dem BD Phoenix[™] System wurde anhand von 3 337 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen nach EUCAST-Kriterien untersucht. Die Übereinstimmung mit der Referenzmethode betrug 92,3%. Es traten 4,2% *minor errors*, 1% *major errors* und 2,5% *very major errors* auf. Die Dauer der Resistenzbestimmung relevanter Antibiotika betrug im Mittel für Enterokokken 7 bis 8,7 h, für koagulasenegative Staphylokokken 10,7 bis 13,6 h, für *S. aureus* 7,7 bis 8,9 h, für Enterobakteriazeen 6,4 bis 6,9 h und für Nonfermenter 11,7 bis 12,6 h.

Schlussfolgerung: Die direkte Identifizierung von Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS in Kombination mit der direkten Antibiogrammerstellung mit dem BD Phoenix™ System aus positiven Blutkulturflaschen und einem MRSA-Nachweis durch PCR ermöglicht einen Zeitgewinn von mindestens 24 h gegenüber der konventionellen mikrobiologischen Diagnostik.

Schlagworte: Sepsis, Bakteriämie, Blutkultur, Massenspektrometrie, MALDI-TOF, Resistenztestung (AST), MRSA

Abstract

Introduction: In septicaemia, microbiological diagnostics of sepsis is essential for adequate antibiotic treatment and should limit the selection of resistant strains. Using conventional techniques, the final results of identification and antimicrobial susceptibility testing are to be expected not earlier than 48 h after detection of the positive blood culture bottles. The aim of this study was to accelerate both the identification of the pathogen and antimicrobial susceptibility testing from positive blood culture bottles without subculture.

Methods: A preparation of bacterial lysates from positive blood culture bottles using MALDI Sepsityper[®] Kit and a fast identification of the pathogen was performed by analysing characteristic bacterial molecules using MALDI-TOF mass spectrometry (MS) (Bruker microflex[™] LT/Biotyper[™] software). The reference method included the identification of microorganisms using MALDI-TOF MS after previous culturing. For direct antimicrobial susceptibility testing, BD Phoenix[™] panels were inoculated directly from resuspended bacterial pellets. These results from direct testing of antimicrobial susceptibilities were compared with the results of routine diagnostics from subcultures using the VITEK[®] 2 system. In addition, the microorganisms identified by MALDI-TOF MS as *Staphylococcus aureus* were tested directly for MRSA using a real-time PCR (BD GeneOhm[™] StaphSR test).

Results: 1 033 clinical samples from positive blood culture fluids were analysed. Direct identification of all tested microorganisms from blood cultures was successful in 61.8% using 1 000 µl of sample volume and in 75.4% using 200 µl of sample volume. All 13 MRSA from monomicrobial positive blood cultures were correctly identified by real-time PCR within 90 min. Antimicrobial susceptibility testing without subcultivation using the BD Phoenix[™] system was evaluated by testing 3 337 bacteria-antibiotic-combinations according to EUCAST criteria. A 92.3% category agreement with the reference method was obtained with 4.2% minor errors, 1% major errors and 2.5% very major errors. The average time of antimicrobial susceptibility testing for relevant antibiotics was 7 to 8.7 h for enterococci, 10.7 to 13.6 h for coagulase-negative staphylococci, 7.7 to 8.9 h for *S. aureus*, 6.4 to 6.9 h for enterobacteriaceae and 11.7 to 12.6 h for nonfermenting bacteria.

Conclusion: The rapid identification of microorganisms from positive blood cultures using MALDI-TOF MS in combination with direct antimicrobial susceptibility testing from blood culture fluids using the BD Phoenix™ system and a MRSA detection by real-time PCR resulted in an acceleration of at least 24 h compared to conventional microbiological techniques.

Keywords: sepsis, septicaemia, blood cultures, mass spectrometry, MALDI-TOF, antimicrobial susceptibility testing (AST), MRSA

1 Einleitung

1.1 Definition der Sepsis

Der Begriff „Sepsis“ ist ein Wort griechischen Ursprungs und bedeutet „Fäulnis“. Er wurde ca. 400 Jahre v. Chr. von Hippokrates eingeführt. Robert Koch erkannte im 19. Jahrhundert Bakterien als Krankheitserreger. Durch Hugo Schottmüller wurde die Sepsis im Jahr 1914 wie folgt definiert: „Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem aus kontinuierlich oder intermittierend Bakterien in die Blutbahn gestreut werden, und zwar derart, dass durch die Invasion subjektive oder objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden“ [17]. Diese Definition prägte das moderne Verständnis der Sepsis. Mit einer geschätzten jährlichen Sterblichkeit zwischen 30 bis 50 Todesfällen pro 100 000 Einwohner, befindet sich die Sepsis unter den zehn häufigsten Todesursachen und betrifft dabei alle Altersstufen [99]. Vor allem in der Intensivmedizin tritt das Krankheitsbild der Sepsis sehr häufig auf und führt zu lebensbedrohlichen Komplikationen. Da in der Vergangenheit oft Begriffe wie Sepsis, septischer Schock, Bakteriämie und „septisches Syndrom“ synonym verwendet wurden und es dadurch zu Irritationen kam, wurde nach einer neuen, allgemeingültigen Definition der Sepsis gesucht [114]. Eine moderne Definition lieferte Bone im Jahr 1989, in dem er die Sepsis als „eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ beschrieb [15].

Bei einer Konsensuskonferenz des American College of Chest Physicians und der Society of Critical Care Medicine im Jahr 1991 wurde die Definition der Sepsis in Bezug auf ihre Pathogenese festgelegt und bildete die Grundlage der 2005 veröffentlichten Sepsisleitlinie 2, in der die Sepsis als „eine komplexe inflammatorische Wirtsreaktion auf eine Infektion“ beschrieben wird. Es erfolgte eine Einteilung der Sepsis je nach Schweregrad in Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock, die seit 2011 weltweit verwendet wurde [62]. Die im Jahr 1991 eingeführten SIRS-Kriterien erwiesen sich in der Vergangenheit jedoch häufig als unspezifisch. Auf der 3. internationalen Konsensuskonferenz SEPSIS-3 wurde das Krankheitsbild der Sepsis von einem Expertenteam neu definiert und im Februar 2016 publiziert. Die Sepsis wurde als „lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf

eine Infektion“ neu definiert. Die Organdysfunktion wird mit einem SOFA-Wert ≥ 2 beschrieben (s. Tab. 1, S. 13) [139].

Score	0	1	2	3	4
P_aO_2/F_iO_2 [mmHg]	≥ 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Thrombozytenzahl x $10^3/\mu\text{l}$	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Bilirubin [mg/dl ($\mu\text{mol/l}$)]	$< 1,2$ (< 20)	1,2–1,9 (20–32)	2,0–5,9 (33–101)	6,0–11,9 (102–204)	$> 12,0$ (> 204)
Mittlerer arterieller Druck [mmHg]	≥ 70	< 70	Dopamin mit < 5 oder Dobutamin ^a	Dopamin 5,1–15 oder Adrenalin $\leq 0,1$ oder Noradrenalin $\leq 0,1^a$	Dopamin > 15 oder Adrenalin $> 0,1$ oder Noradrenalin $> 0,1^a$
Glasgow Coma Skala	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Creatinin [mg/dl ($\mu\text{mol/l}$)]	$< 1,2$ (< 110)	1,2–1,9 (110–170)	2,0–3,4 (171–299)	3,5–4,9 (300–440)	> 5 (> 440)
Urinausscheidung [mg/dl]				< 500	< 200
^a Katecholamindosen in $\mu\text{g/kg/min}$ für mind. 1 h					

Tab. 1: Kriterien und Grenzwerte des SOFA-Scores zur objektiven Beschreibung der Organfunktion (aus [139], nach [156])

Der septische Schock wird als Untergruppe einer Sepsis bezeichnet, bei der das Herzkreislaufsystem und die zellulären und metabolischen Funktionen so beeinträchtigt sind, dass das Mortalitätsrisiko deutlich erhöht ist. Als klinische Parameter werden eine persistierende Hypotension, bei der Vasopressoren eingesetzt werden müssen, um einen mittleren arteriellen Blutdruck ≥ 65 mmHg aufrecht zu erhalten und ein Serum-Laktat Spiegel > 2 mmol/l trotz Volumentherapie genannt. Es wurde der qSOFA als diagnostisches Instrument zum Nachweis einer potentiellen Sepsis eingeführt, da er eine Prognose ohne Laborwerte ermöglicht. Die klinischen Parameter sind Bewusstseinsveränderung, systolischer Blutdruck ≤ 100 mmHg und eine Atemfrequenz von $\geq 22/\text{min}$. Sind ≥ 2 Parameter positiv, ist das Risiko eines längeren Krankenhausaufenthalts und das Mortalitätsrisiko erhöht. Die Erkrankung erfordert somit eine dringende Behandlung. Es bestehen Leitlinien, um in geringer Zeit prädisponierende Faktoren zu identifizieren und einen klinischen Verdacht zu verifizieren. Dazu werden mikrobielle Tests benötigt, die eine hohe Spezifität und Sensitivität aufweisen und schnell zu einer Identifizierung des auslösenden Erregers

führen, da die Überlebensrate einer Sepsiserkrankung stündlich um 7,6% abnimmt [93]. Bemerkenswert ist, dass sich eine Bakteriämie nur in 10–30% der Fälle mit schwerer Sepsis oder septischem Schock vorfindet und trotz klinischer Symptomatik kein mikrobiologischer Infektionsnachweis erbracht werden kann [2; 53; 127]. Im Rahmen des im Jahr 1998 gegründeten EARS-Netzwerkes wird die Anzahl abgenommener Blutkulturen gesammelt. Dessen Ziel ist die Erhebung valider Daten für bestimmte Erreger, um die zeitlichen Entwicklungen und Unterschiede zwischen den Staaten Europas darzustellen. Es fällt auf, dass in Deutschland im Vergleich mit anderen Ländern verhältnismäßig wenige Blutkulturen abgenommen werden [48; 50]. Mögliche Ursachen niedriger Abnahmefrequenzen könnten die relativ niedrigen Positivraten von Blutkulturen, die Bestrebungen zur Budgeteinhaltung in den Kliniken, fehlende Standardisierung, schwierige Transportmodalitäten oder fehlende Routine sein [49; 125].

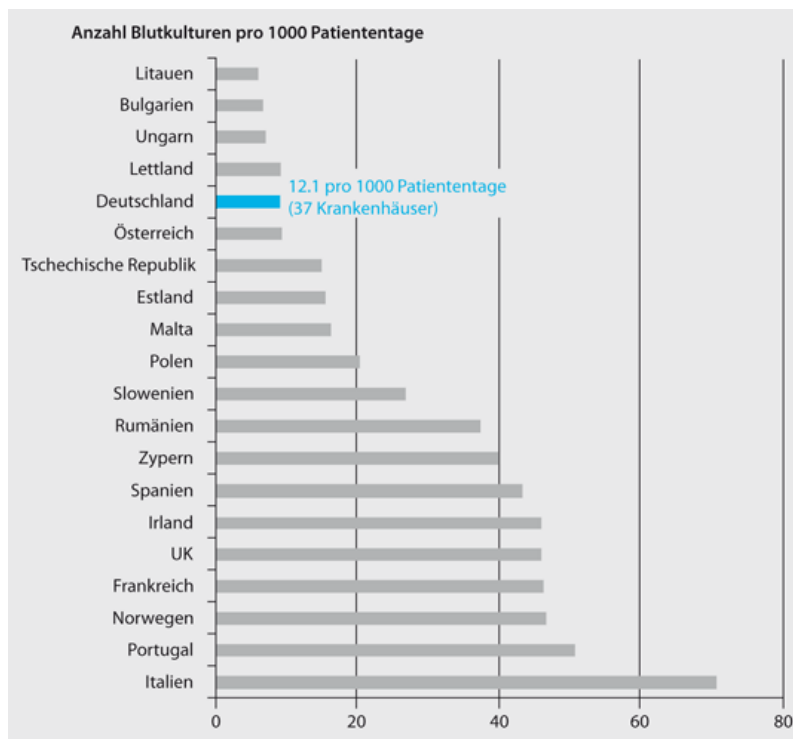


Abb. 1: Anzahl der in einzelnen europäischen Ländern abgenommenen Blutkulturen pro 1 000 Patiententage nach den Daten des European Antimicrobial Resistance Surveillance Network 2010 [48]

1.2 Inzidenz, Epidemiologie und Letalität der Sepsis

Die Sepsis ist nach wie vor ein häufiges, schweres Krankheitsbild in der Intensivmedizin. Patienten, die intensivmedizinisch betreut werden, sind aufgrund ihrer

verschiedenen Erkrankungen besonders gefährdet, an einer Sepsis zu erkranken. In Deutschland ist die Anzahl der Sepsisfälle trotz großer Bemühungen in dem Zeitraum von 2007–2013 jährlich um 5,7% angestiegen [45]. In einer Studie auf 454 deutschen Intensivstationen wurde eine Prävalenz der schweren Sepsis und des septischen Schocks von 11% und eine 90-Tage-Mortalität von 54% beobachtet [62]. So sterben etwa 162 Menschen pro Tag in Deutschland an einer Sepsis, die nach Erkrankungen des Kreislaufsystems und Krebserkrankungen die dritthäufigste Todesursache in Deutschland ist [38]. Auf nichtkardiologischen Intensivstationen in Deutschland ist die Sepsis die häufigste Todesursache [10].

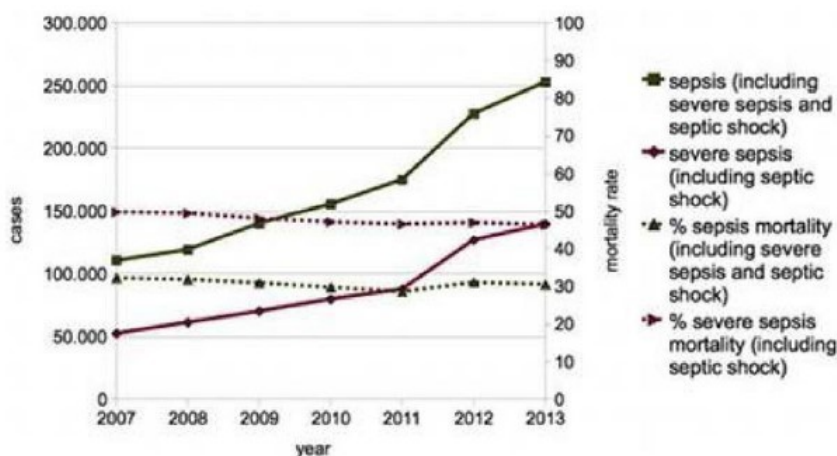


Abb. 2: Fallzahlen und Letalitätsrate der Sepsis in Deutschland in dem Zeitraum von 2007–2013 [44]

In Deutschland beliefen sich die Kosten der Sepsistherapie im Jahr 2012 im Durchschnitt auf 36.126 Euro pro Patient. Im selben Jahr wurden 8,2 Mrd. Euro für dieses Krankheitsbild aufgewendet, wodurch der Sepsis eine große klinische und auch sozioökonomische Bedeutung zukommt [44]. Insgesamt werden ca. 30% des Budgets der Intensivmedizin zur Behandlung der Sepsis benötigt [62]. Trotz aller Fortschritte in der Medizintechnik und in der mikrobiologischen Diagnostik in den letzten Jahrzehnten konnte festgestellt werden, dass die Zahl der an schwerer Sepsis erkrankten Patienten über die Jahre zunimmt. Im Jahr 1979 wurden in Deutschland 83 Fälle pro 100 000 Einwohner registriert. Dagegen lag die Zahl der an schwerer Sepsis erkrankten Personen im Jahr 2010 bei 110 Erkrankungen pro 100 000 Einwohner [62; 158]. Somit erkrankten in Deutschland pro Jahr 76 000 Patienten an dieser schweren Komplikation einer Infektion. In der Öffentlichkeit ist dieses lebensbedrohliche Krankheitsbild im Gegensatz zu anderen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt nahezu unbekannt [116].

Patienten mit sekundären nosokomialen Infektionen erfahren eine höhere Mortalität als diejenigen mit Katheter-assoziiertes Infektion oder primärer Bakteriämie [100]. Die Letalität der Sepsis hängt entscheidend von ihrem Schweregrad ab [3]. Im Jahr 2013 lag die Letalität der Patienten mit dem Krankheitsbild der schweren Sepsis oder des septischen Schocks in deutschen Krankenhäusern bei 43,6% bzw. 58,8% [45]. Zu den Risikofaktoren gehören kardiovaskuläre und hepatische Vorerkrankungen, Alter, akutes Nierenversagen, ARDS, niedriger Blut-pH-Wert ($< 7,33$), Hypothermie und Thrombopenie. Der Sepsis wird eine hohe Bedeutung zugeschrieben, da sie einen signifikanten Einfluss auf die Mortalität der Patienten während der ersten 48 Stunden in intensivmedizinischer Behandlung hat [16; 31]. Die Variabilität bei den publizierten Daten erklärt sich im Wesentlichen durch unterschiedlich zusammengesetzte Patientenkollektive und/oder Vergleichspopulationen.

1.3 Pathogenese der Sepsis

Der menschliche Körper besitzt drei verschiedene Abwehrmechanismen:

- natürliche Barrieren wie die Haut, Schleimhäute, usw.
- „Innate Immunity“ (Komplementsystem, Mastzellen, Phagozyten, Interferone, Lysozyme, usw.)
- adaptive Immunantwort (Lymphozyten, Antigen-präsentierende Zellen, usw.) [155; 160]

Eine überschießende, systemische Entzündungsreaktion auf pathogene Mikroorganismen und deren Toxine ist ein wichtiger Bestandteil der Pathogenese der Sepsis [160]. Diese ist abhängig von prädisponierenden Faktoren wie Virulenz, Alter, Immunstatus, Zeit bis zum Beginn der antiinfektiven Therapie, etc. Die angeborene Immunabwehr („Innate Immunity“) kann typische Pathogene und deren Stoffwechselprodukte wie Exotoxine, bakterielle Membranbestandteile, bakterielle DNA oder virale RNA (PAMPs) erkennen, ohne jedoch deren Informationen zu speichern [83]. Die adaptive Immunantwort beginnt nach drei bis acht Tagen. Dieses System ist in der Lage die PAMPs bei einem Zweitkontakt wiederzuerkennen. Durch angeborene Erkennungssysteme (*pattern recognition receptors*) werden die pathogenassoziierten Muster erkannt und die Abwehrreaktion des Organismus eingeleitet [165]. Die Sepsis tritt ein, wenn die mikrobiellen Komponenten von löslichen und zellgebundenen

Rezeptoren wie dem CD14-Rezeptor erkannt werden. Dabei binden Endotoxin (LPS)-LBP-Komplexe an den CD14-Rezeptor. Die Lipopolysaccharide sind bakterielle Zellwandbestandteile, die von den LBPs gebunden zum CD14-Rezeptor auf Monozyten transportiert werden. Des Weiteren können durch Bindung von Superantigenen an einen T-Zell-Rezeptor oder durch Stimulierung humaner Homologe von Toll-like-Rezeptoren immunkompetente Zellen aktiviert werden. Durch deren Konformitätsänderung wird die Freisetzung von Zytokinen vermittelt [10; 158; 165]. TNF- α und Zytokine wie IL-1 sind Schlüsselmediatoren bei der Entstehung einer Sepsis, da sie eine unkontrollierte Hyperinflammation auslösen können. Häufig folgt der Phase der Hyperinflammation eine Phase der Hypoinflammation. Diese „Immunparalyse“ ist durch eine funktionelle monozytäre Deaktivierung gekennzeichnet, die mit einer Deaktivierung der gesamten angeborenen zellulären Immunabwehr einhergeht [160; 161]. Es resultiert eine Fehlregulation schützender Defensivsysteme, da es zu einer Gerinnungsaktivierung und zur endothelialen Dysfunktion kommt. Auch abakterielle Insulte wie Polytraumata oder Pankreatitiden kommen neben bakteriellen Toxinen als Auslöser eines solchen Vorgangs in Frage [9; 157]. Durch metabolische Effekte, Gewebhypoxie und verschiedene Zytokine wird die mitochondriale Aktivität herabgesetzt. Aufgrund von Proteinschädigung, Enzyminhibition und DNA-Schädigung kann die Sepsis schließlich zu einer Organdysfunktion führen [165].

1.4 Erregerspektrum der Sepsis

Meist handelt es sich um nosokomiale oder typische ambulant erworbene Infektionen bakteriellen Ursprungs. Den Schweregrad bestimmen pathogenspezifische Faktoren wie z. B. die Toxinproduktion, aber auch patientenbezogene Faktoren wie die vorliegenden Grunderkrankungen und der Zustand des Immunsystems [86]. Es finden sich mehr grampositive als gramnegative Bakterien als ätiologisches Agens einer Sepsis [34; 118]. *S. aureus* und *E. coli* sind die häufigsten Erreger von Bakteriämie und Sepsis mit etwa 20% bzw. 25% [85]. In einer Studie aus den Vereinigten Staaten von Amerika wurden über eine Zeitspanne von sieben Jahren 24 179 Blutkulturen von Patienten mit nosokomialen Infektionen aus 49 verschiedenen Krankenhäusern untersucht. Gelang ein eindeutiger Infektionsnachweis, wurden 65% grampositive Bakterien, 25% gramnegative Bakterien und 9,5% Sprosspilze als Erreger identifiziert. In 87% der Fälle handelte es sich um monomikrobielle Infektionen. Die häufigsten

Mikroorganismen, die im Zusammenhang mit der Sepsis identifiziert wurden, waren KNS (31%), *S. aureus* (20%), Enterokokken (9%) und Candida-Spezies (9%) [169]. Allerdings gelingt bei ca. 10–30% der Patienten mit allen klinischen Kriterien einer Sepsis kein Erregernachweis, was immer noch ein großes Problem bei der adäquaten Behandlung darstellt [2; 53; 127; 159].

1.5 Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis und deren klinische Relevanz

Es wird empfohlen, bei jedem klinischen Verdacht auf eine Sepsiserkrankung vor Beginn der antibiotischen Therapie zwei bis drei Blutkulturen von verschiedenen Entnahmeorten abzunehmen [127]. Die Blutkultur gilt nach wie vor als labordiagnostischer Goldstandard zum Nachweis einer Bakteriämie [70]. Die ersten Richtlinien zur korrekten Blutabnahme bei Vorliegen einer Sepsis beruhen auf der Veröffentlichung eines Internisten aus New York um 1906 [101]. Trotz der langjährigen Erfahrung mit dieser Methode ist bei optimalen Bedingungen nur in 15 bis 30% der Fälle mit einem positiven Ergebnis zu rechnen [70; 127]. Die Empfehlung für die Abnahme von Blutkulturen zum Nachweis der Infektion und der Erregerresistenz gilt auch bei Vorliegen entsprechender klinischer Befunde wie Schüttelfrost, Fieber, Hypothermie, Neutropenie, Linksverschiebung im Blutbild und Leukozytose [62]. Die durch die Sepsis hervorgerufene Reaktion hat eine hohe Sensitivität, jedoch eine niedrige Spezifität. Dadurch ist die Diagnosestellung erschwert [39]. Es kommt hinzu, dass die klinischen Symptome der Sepsis sehr vielfältig sind. Verschiedene Marker werden verwendet, um erkrankte Patienten zu identifizieren, wobei die Bestimmung des Procalcitoninspiegels im Plasma als Diagnoseparameter eine hohe Spezifität für eine Sepsiserkrankung besitzt [99]. Es gibt eine Vielzahl von in der Routine eingesetzten biochemischen und immunologischen Biomarkern, deren Einsatz zu einer frühzeitigeren Diagnose führen kann [62]. So wird z. B. die Bestimmung des Granularity Index zur Bestätigung einer Sepsis beschrieben, da die neutrophilen Granulozyten häufig eine toxische Granulation zeigen [178]. Weitere Veröffentlichungen beschreiben die Leukozyten- und Neutrophilenzahl, die Bestimmung der Quantität unreifer Granulozyten und den Nachweis von IL-6 mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie im Blut als sehr gute Indikatoren für eine Entzündung [119; 163].

Nach Abnahme der Blutkulturen wird eine sofortige (innerhalb 1 h) hoch dosierte, breite, antiinfektive Therapie empfohlen [147]. Die Sensitivität der Blutkultur ist nach vorangegangener Antibiotikatherapie eingeschränkt. Die Mortalität nimmt mit jeder Stunde einer verzögerten Antibiotikatherapie um ca. 7,6% zu, weshalb mikrobiologische Befunde nicht abgewartet werden sollten. Die Therapiedauer sollte sieben bis zehn Tage nicht überschreiten und in regelmäßigen Abständen reevaluiert werden. Eine Erregerbestimmung wird nach der Blutentnahme eingeleitet und ein Antibiogramm erstellt, um so früh wie möglich die Resistenzsituation der Mikroorganismen zu ermitteln [55; 62; 127]. Da bei ca. 20% der Patienten die initiale antibiotische Therapie nicht erfolgreich ist, sollte die weiterführende Diagnostik so schnell wie möglich zu einer Keimbestimmung mit Antibiogramm führen [94]. Um mit der Identifizierung beginnen zu können, muss ein ausreichendes Wachstum der Mikroorganismen in den Blutkulturflaschen nachgewiesen worden sein. Dadurch wird ein positives Blutkultursignal übermittelt. Die *time-to-positivity* (TTP) beschreibt das Zeitintervall zwischen dem Einbringen der Blutkulturflasche in den Automaten und dem positiven Blutkultursignal. Sie wird von der Inokulumgröße, der antibiotischen Vorbehandlung und den klinischen Befunden des Patienten beeinflusst [112]. Gramnegative Bakterien wachsen in der Regel schneller als grampositive. Innerhalb der grampositiven Gruppe wachsen Streptokokken am schnellsten (TTP < 11 h); für einige gramnegative Mikroorganismen (*E. coli*, *Enterobacter* spp., usw.) ist eine TTP von weniger als 10 h angegeben [112]. Die mikrobiologische Bestimmung wichtiger therapierelevanter Parameter mit klassischen Verfahren (Identifizierung auf Speziesebene, Antibigrammerstellung) kann weiterhin bis zu 48 h oder länger dauern [70].

1.6 Standards zur Identifizierung

Je nach Spezies sind unterschiedlich lange Bebrütungszeiten notwendig, um klinisch relevante Informationen zu generieren [145]. Es kann oft erst nach 24 h mit der Identifizierung des Erregers begonnen werden, da das Wachstum von seinen phänotypischen Stoffwechseleigenschaften abhängt [99]. Der Phänotyp eines Mikroorganismus ergibt sich „aus der Gesamtheit der von ihm ausgeprägten Eigenschaften“ [176]. Die klassische Identifizierung von Mikroorganismen verwendet folgende phänotypische Merkmale:

- Bedarf an Nährstoffen zum Wachstum
- Sauerstofftoleranz
- Wachstum bei verschiedenen Bebrütungstemperaturen
- Morphologie der Kolonie (makroskopisch)
- Hämolyseverhalten
- Mikromorphologie einschließlich Lagerungsverhalten
- Färbeverhalten in verschiedenen Färbeverfahren (mikroskopisch)
- Beweglichkeit
- Oberflächenantigene
- Metabolisierungsleistungen
- Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen antimikrobiellen Substanzen
(aus [176])

Im Jahr 1968 legten Buissière und Nadon den Grundstein für die heute routinemäßig angewendeten miniaturisierten Systeme, in dem sie die „single substrate multi-test“ Methode revolutionierten und das API-System entwickelten, mit dem sich der Erregernachweis zuverlässiger und einfacher durchführen ließ [18]. Die kommerziell zu erwerbenden Tests arbeiten heute mit einem numerischen Handbuch oder einem EDV-gestützten System, welche auf numerischer Taxonomie basieren [73]. Es werden bestimmte Stoffwechselprodukte der Bakterien durch Farbumschläge angezeigt und das Wachstum der Bakterien durch die Fähigkeit zur Assimilation der angebotenen Substrate belegt. Wurden die Ergebnisse früher noch manuell abgelesen, erlauben moderne Verfahren heute eine computergestützte Auswertung mit dem Analytischen Profil-Index zur Bestimmung von Gattung und Stamm der untersuchten Spezies [6]. So liefern z. B. das VITEK® 2 System (Fa. bioMérieux) oder das BBL Minitek™ System (Fa. BBL) eine indirekte, automatisierte und computergestützte Identifizierung von Mikroorganismen innerhalb weniger Stunden [66; 143]. Die phänotypische Identifikation, die auf biochemischen, physiologischen und morphologischen Eigenschaften beruht, ist oft mühsam, zeitaufwändig, erfordert viele Reagenzien und erfahrene Mitarbeiter [151]. Die Entwicklungen der letzten Jahre haben auf dem Gebiet der molekularbiologischen Diagnostik zu verlässlicheren, besser reproduzierbaren Ergebnissen geführt. Die molekularbiologische Identifikation kann direkt aus dem Blut des Patienten oder aus einer positiven Blutkulturflasche erfolgen [4; 70]. Die Analyse kann zeitverkürzend wirken oder bei schwer anzüchtbaren Spezies einen

Keimnachweis erst möglich machen. Die gängigsten Methoden zur Identifizierung aus Blutkulturflaschen mit positivem Erregerwachstum sind neben PCR-Verfahren vor allem Hybridisierungsassays. Bei der Analyse direkt aus dem Patientenblut entfällt die erregerspezifische Bebrütungszeit bis zum positiven Signal des Blutkultursystems [70]. Die modernen real-time PCR-Verfahren ermöglichen einen schnelleren Reaktionsablauf sowie qualitative und quantitative Analysen [25]. So erlaubt beispielsweise das kommerzielle PCR-Verfahren LightCycler® SeptiFast Test (Fa. Roche Diagnostics GmbH) eine schnelle Identifizierung von 25 Pathogenen (Sprosspilze, grampositive und gramnegative Bakterien) aus 1,5 ml Vollblut innerhalb von 6 Stunden. Die detektierbaren Mikroorganismen sind für 90% der Sepsisfälle auf Intensivstationen verantwortlich [64; 98].

1.7 Standards zur Resistenztestung

Die wesentlichen Aufgaben der mikrobiologischen Diagnostik bestehen in der Identifizierung des ätiologischen Agens sowie in der Erstellung des Antibiogramms. Aus beiden Informationen lassen sich in der Regel eindeutige Therapieempfehlungen ableiten. Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, ist es notwendig, standardisierte Verfahren zu verwenden [129]. Da in vielen europäischen Ländern eigene Normen zur standardisierten antimikrobiellen Empfindlichkeitstestung bestehen, wurde im Jahr 1997 das European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) von der European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases gegründet [79]. Dieses Komitee definiert die mit der Empfindlichkeitsprüfung im Zusammenhang stehende Terminologie, bestimmt minimale Hemmkonzentrationen und einheitliche europäische Grenzwerte für deren Interpretation in sensibel, intermediär und resistent [41; 42]. Für die Empfindlichkeitsprüfung werden in der Regel 4 bis 5 KBE von der beimpften, nach EUCAST-Norm hergestellten Agarplatte entnommen und eine Suspension mit einer Trübung von 0,5 bis 0,6 McFarland-Standard eingestellt. Dieser McFarland-Standard wird zur Herstellung von Inokula bei der Durchführung von Empfindlichkeitstests herangezogen und entspricht einer Suspension mit ca. $1,5 \times 10^8$ Zellen pro ml [30; 115; 152]. Die Testplatten mit den verschiedenen Antibiotikakonzentrationen müssen innerhalb von 30 min mit 1 µl Suspension pro Vertiefung beschickt werden. Die Trocknung findet bei Raumtemperatur statt, bevor die Platten für 18 Stunden bei einer Temperatur von 35 bis 37 °C inkubiert werden. Die

Konzentration des Antibiotikums, bei der mit bloßem Auge kein sichtbares Wachstum (keine Trübung) detektierbar ist, gilt als minimale Hemmkonzentration (MHK) [42]. Das amerikanische Clinical and Laboratory Standards Institute besteht seit über 40 Jahren und bestimmt seitdem Standards zur Empfindlichkeitstestung in den Vereinigten Staaten von Amerika und weltweit. Diese Richtlinien zur Empfindlichkeitsprüfung wurden 2010 und 2011 aktualisiert [23; 24].

1.8 Mikrobiologie und Pathogenität des *Staphylococcus aureus*

Über das Auftreten der ersten MRSA-Stämme wurde im Jahr 1961 von M. Patricia Jevons berichtet [76]. Die Behandlung von multiresistenten *S. aureus*-Stämmen ist von großer Bedeutung. In den letzten Jahrzehnten entwickelte sich der MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) zum relevantesten multiresistenten Erreger weltweit. Er führt am häufigsten zu nosokomialen Infektionen. *S. aureus* gehört zu der Gruppe der Staphylokokken. Staphylokokken sind grampositive, nicht bewegliche Kugelbakterien, die sich sowohl aerob als auch anaerob vermehren können. Sie werden in koagulasenegative und koagulasepositive Staphylokokkenspezies unterteilt. Aufgrund der Bildung von freien Koagulasen wird der *S. aureus* von den übrigen Staphylokokken getrennt. Die durch ihn hervorgerufenen Krankheitsbilder unterscheiden sich in der Klinik, Diagnostik und Therapie [51].

Der *S. aureus* ist sowohl ein weit verbreiteter kommensaler Mikroorganismus sowie ein Pathogen. Ungefähr 20% der Individuen sind permanent und 30% transient besiedelt [56]. Eine permanente Besiedelung bedeutet, dass der Keim Bestandteil der physiologischen Hautflora ist. Eine transiente Besiedelung beschreibt ein temporäres Vorkommen von Infektionserregern, die nicht zur physiologischen Flora zählen [80]. Er besiedelt bevorzugt die Nasenschleimhäute, aber auch die Axillae und den Gastrointestinaltrakt. Die zahlreichen Oberflächenproteine und sezernierten Proteine bestimmen unter anderem seine hohe Virulenz und Pathogenität. Des Weiteren ist der Mikroorganismus in der Lage, einen Biofilm zu bilden und in Endothelzellen des Wirts einzudringen und dort zu überleben. Diese Fähigkeiten sind wichtig für die Pathogenese der Endokarditis [56].

In Deutschland sind MRSA-Stämme spätestens seit 1976 bekannt. Die Bakterien sind in der Lage ein Penicillinbindeprotein PBP2a zu bilden. Dadurch wird die Wirkung des Antibiotikums gehemmt und die Zellwandsynthese verläuft fast ungestört. Das Protein

wird in einem Abschnitt des *mecA*-Gens kodiert, auf dem sich auch Resistenzen gegen andere Antibiotika befinden können [65]. Seit Mitte der 1990er-Jahre fließt die unterschiedliche Verbreitung der Keime in die Definition mit ein. Man unterscheidet die Verbreitung im Krankenhaus (H-MRSA), in Einrichtungen des Gesundheitswesens (HCA-MRSA) und außerhalb des Krankenhauses (C(A)-MRSA). Die Einteilung beschreibt zudem die unterschiedlichen Virulenzeigenschaften [56; 65].

1.8.1 Prävalenz und Folgen des MRSA-Anstiegs

Im Krankenhaus-Infektions-Surveillance-System (KISS) des Nationalen Referenzzentrums für nosokomiale Infektionen (NRZ) werden seit dem Jahr 1997 Daten zu nosokomialen Infektionen auf Intensivstationen gesammelt und analysiert [53]. Dieses Zentrum ist nach dem amerikanischen NNIS Modell zur Datenerhebung entstanden [37]. Im Jahr 1976 lag der Anteil von MRSA-Isolaten in Deutschland bei 1,4%. Es folgte ein Anstieg der MRSA-Rate über 8,7% im Jahr 1995 auf 17,9% im Jahr 2001. Nach einem leichten Anstieg 2007 lag der Anteil der MRSA an allen untersuchten *S. aureus* drei Jahre später wieder bei 16,7% [96]. Auch in den folgenden Jahren sank die MRSA-Rate in Deutschland kontinuierlich auf 10% im Jahr 2015 [162].

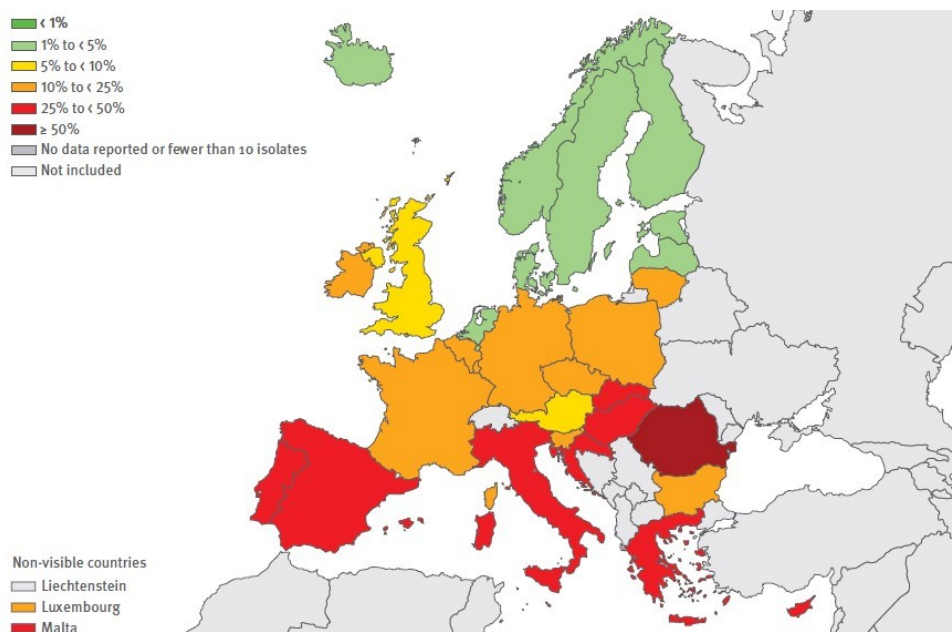


Abb. 3: MRSA-Anteil der *S. aureus*-Isolate in den Mitgliedsländern der Europäischen Union im Jahr 2016 [40]

Dieser rückläufige Trend ist auch im europäischen Vergleich zu beobachten [97]. In Europa werden in Einrichtungen des Gesundheitssystems jährlich ca. 170 000 MRSA-Infektionen registriert, welche Mehrkosten von 380 Millionen Euro verursachen [89]. Trotz verschiedener Ansätze zur Prävention der Infektionen in Deutschland bleibt der MRSA der häufigste Auslöser von nosokomialen Infektionen [90]. Von 2008 bis 2010 wurden 70 935 *S. aureus*-Stämme registriert und in die RKI-Datenbank aufgenommen. Davon stammten 39 655 Isolate von Patienten auf Intensivstationen. Ein MRSA-Nachweis erfolgte bei 19,2%. 31 280 Isolate stammten von Patienten mit ambulanter Betreuung. Der Anteil der MRSA-Infektionen lag hier bei 10,6%. Die Erregerraten wurden ohne *copy strains* ermittelt [137]. Die im KISS-Report beschriebene Inzidenzdichte von auf Intensivstationen erworbenen MRSA-Infektionen lag in den Jahren 2008 und 2009 konstant bei 0,8 pro 1 000 Patiententage [52]. Zur Kontrolle der Ausbreitung von MRSA-Stämmen sollten die infizierten Patienten identifiziert und isoliert behandelt werden. Neben Barrieremaßnahmen (Isolierung, Handschuhe, Kittelpflege, etc.) zählen die strikte Einhaltung der anerkannten Händedesinfektion der Beschäftigten im Gesundheitsdienst und die restriktive Anwendung von Antibiotika zu den wichtigsten Maßnahmen zur Verhinderung von nosokomialen MRSA-Infektionen [65]. Durch die notwendige Isolation entsteht ein erhöhter Pflegebedarf mit steigendem Zeitaufwand. In den verschiedenen medizinischen Einrichtungen wie Praxen, Krankenhäusern und Pflegestationen wird der Keim direkt durch Schmierinfektionen, indirekt durch kontaminierte Materialien oder endogen durch Autoinokulation durch Infektionen aus dem Nasenrachenraum übertragen [177]. Die Infektion von MRSA gilt als schwerwiegende Komplikation, da sie mit einer schlechteren Prognose und einem verlängerten Krankenhausaufenthalt einhergeht [26; 166]. Die Behandlung der Infektion ist mit einer erhöhten Nebenwirkungsrate verbunden und bei einer Bakteriämie steigt das Mortalitätsrisiko, wenn der MRSA nicht mit der kalkulierten Primärtherapie erfasst wird. Als Konsequenz für die Praxis ergibt sich häufig der Einsatz von schlechter wirkenden und/oder teureren Antibiotika [103].

2 Herleitung

Ziel dieser Arbeit war es, die Zeit zwischen der Blutabnahme am Patienten bzw. der Entnahme von Punktaten aus anderen primär sterilen Kompartimenten und der Identifizierung von pathogenen Mikroorganismen mit der Erstellung eines Antibiogramms zu verkürzen. Dazu wurden im Rahmen der vorliegenden Studie die Erregerbestimmung und die Resistenztestung aus Blutkulturflaschen ohne Subkultivierung unter Routinebedingungen durchgeführt. Da die Sterblichkeit bei Patienten mit Sepsisverdacht mit jeder Stunde einer verspäteten Antibiotikatherapie zunimmt, sollten diagnostische Maßnahmen eine schnelle, adäquate Behandlung nicht verzögern [95]. Die initiale, ein breites Erregerspektrum berücksichtigende, kalkulierte Antibiotikatherapie sollte baldmöglichst deeskaliert werden auf die Behandlung des in Blutkulturflaschen nachgewiesenen Erregers. Die dafür erforderliche mikrobiologische Diagnostik sollte möglichst einfach, reproduzierbar, schnell und kostengünstig durchzuführen sein. Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik wurde in der vorliegenden Studie durch die Identifizierung aus der positiven Blutkulturflasche mittels MALDI-TOF MS, die direkte Inokulierung der AST-Systeme und die Durchführung einer real-time PCR bei MRSA-Verdacht beschleunigt. Es wurde ein Arbeitsablauf mit einer hohen Durchsatzrate simuliert, sodass in dieser wissenschaftlichen Studie bewusst auf ein Nachmessen der Ergebnisse mittels MALDI-TOF MS verzichtet wurde. Die Zuverlässigkeit der Studienmethoden wurde überprüft, in dem alle Ergebnisse mit einer Referenzmethode verglichen wurden. Als Referenzmethode diente die Identifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS nach vorangegangener Subkultivierung. Die MHK-Werte der direkten Resistenztestung wurden mit den Ergebnissen des VITEK® 2 Systems von der Subkultur aus der Routinediagnostik verglichen.

3 Methodik

3.1 Probenauswahl, Studiendesign und Ausschlusskriterien

Zur Durchführung der experimentellen Studie wurden mit Blut beimpfte Blutkulturflaschen von Patienten mit Sepsisverdacht und mit Punktaten aus anderen primär sterilen Kompartimenten inokulierte Blutkulturflaschen aus dem Routinebetrieb des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin untersucht (s. Abb. 4, S. 26). Haupteinsender der Abteilung waren die drei Charité Campi Virchow, Mitte und Benjamin Franklin. Als weitere Einsender sind das Evangelische Geriatriezentrum Berlin und die Klinik Medical Park Humboldtmühle in Berlin zu nennen. Für die Identifizierung wurden alle positiven Blutkulturflaschen verwendet, deren Anzahl pro Tag zwischen 12 und 32 lag. Eine Resistenztestung wurde bei Proben mit Einzelinfektionen durchgeführt. Proben, die Sprosspilze oder Streptokokken enthielten, wurden von der Resistenztestung ausgeschlossen. Die Autorin hat die experimentelle Studie im Zeitraum vom 8. Februar bis zum 14. Mai 2010 am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin eigenhändig durchgeführt.

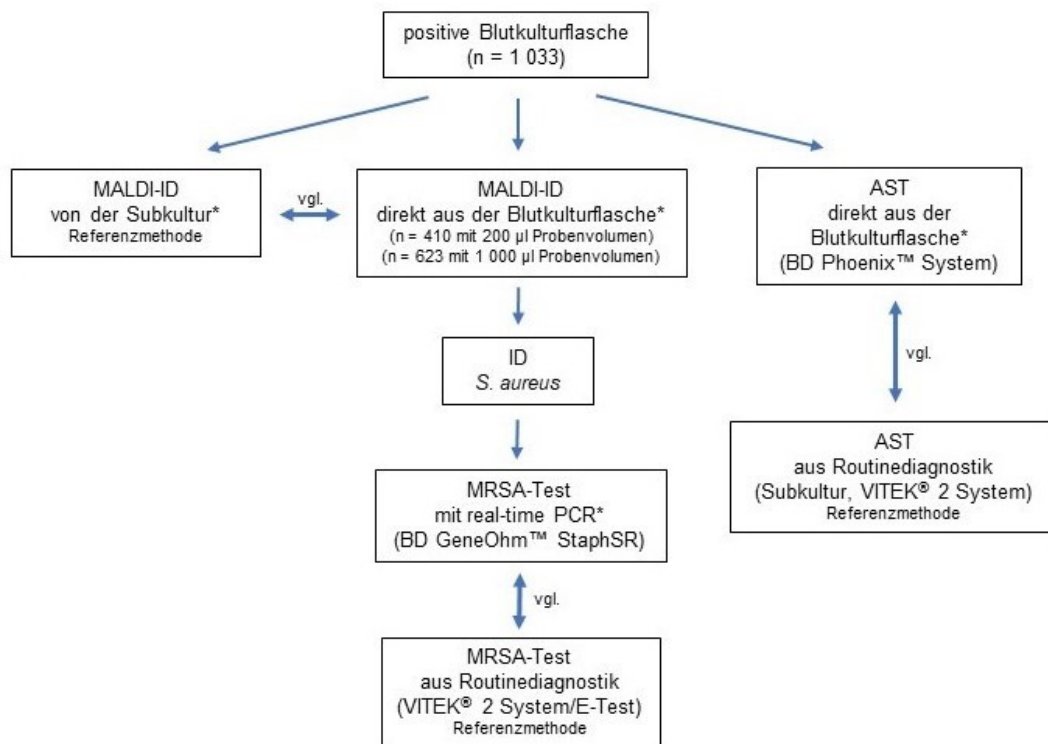


Abb. 4: Konzept der experimentellen Studie (* von der Doktorandin durchgeführte Experimente)

3.2 Probenvorbereitung

Bei Patienten mit den klinischen Symptomen einer Sepsis erfolgte die Abnahme einer Blutkultur. Es wurden drei verschiedene Flaschensysteme verwendet. Die Blutkulturflaschen wurden im Blutkultursystem bei 36 °C inkubiert. Enthielten die Blutkulturflaschen Mikroorganismen, wurde beim Abbau der in der Flasche enthaltenen Substrate (s. Tab. 2, S. 28) Kohlenstoffdioxid erzeugt. Jede Flasche war mit einem chemischen Sensor ausgestattet, der einen Fluoreszenzanstieg bei Wachstum der Bakterien anzeigte, welcher proportional zum CO₂-Gehalt war. Das Blutkultursystem überprüfte alle 10 min den Fluoreszenzanstieg. Durch die Analyse der CO₂-Anstiegsrate wurde ermittelt, ob die Probe lebensfähige Mikroorganismen enthielt. Bei ausreichendem Wachstum wurde ein positives Signal vom Blutkultursystem übermittelt. Die Blutkulturflaschen enthielten eine Casein-Soja-Pepton-Bouillon. Ein Kunstharzzusatz sollte durch Bindung der Antibiotika die Isolierungsraten der Mikroorganismen verbessern.

Liste der Bestandteile der Blutkulturflaschen	BD BACTEC™ Plus Aerobic/F	BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F	BD BACTEC™ PEDS Plus/F
Demineralisiertes Wasser	30 ml	25 ml	40 ml
Casein-Soja-Pepton-Bouillon	3%	3%	2,75%
Hefeextrakt	0,25%	0,4%	0,25%
Aufgeschlossenes Tiergewebe		0,05%	0,1%
Aminosäuren	0,05%	0,25%	
Zucker		0,25%	
Natriumcitrat		0,02%	
Natriumpolyanetholsulfonat	0,05%	0,05%	0,02%
Vitamine	0,025%	0,0006%	
Antioxidantien/Reduktionsmittel	0,005%	0,16%	
Nichtionische Adsorptionsharze	16%	16%	10%
Kationenaustauschharz	1%	1%	0,6%
Natriumpyruvat			0,1%
Menadion			0,00005%
Pyridoxal HCl			0,001%
Dextrose			0,06%

Liste der Bestandteile der Blutkulturflaschen	BD BACTEC™ Plus Aerobic/F	BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F	BD BACTEC™ PEDS Plus/F
Saccharose			0,08%
Hämin			0,0005%

Tab. 2: Bestandteile der BD BACTEC™ Blutkulturflaschen (in Gewichtsprozent)

Alle BD BACTEC™ Blutkulturflaschen waren mit einem CO₂-Zusatz abgefüllt, um das Wachstum kapnophiler Bakterien zu ermöglichen. Die anaeroben Medien waren vorreduziert und zusätzlich mit Stickstoff versetzt. Als Ausgangsmaterial für das Protokoll diente eine positiv gemeldete Blutkulturflasche, bei der ein Wachstum nachgewiesen wurde. Anhand von mikroskopischen Präparaten wurde das Gramverhalten der Mikroorganismen untersucht. Dadurch konnte die passende Testkarte für die Resistenztestung bestimmt werden (s. Tab. 3, S. 28).

Keimspektrum	VITEK® 2 System (bioMérieux)	BD Phoenix™ System
Grampositive Kokken	AST-P592	PMIC-58
Gramnegative Stäbchen	AST-N116	NMIC-64
Pneumokokken	AST-P576	
Pseudomonaden	AST-N110	

Tab. 3: Bezeichnung der verwendeten Testkarten zur Resistenzbestimmung mit dem VITEK® 2 System (Routinediagnostik) und dem BD Phoenix™ System (experimentelle Studie)

Zur direkten Identifizierung und Messung der minimalen Hemmkonzentration wurden 8,5 ml Blut aus der positiven Flasche entnommen und in ein BD Vacutainer SST II Röhrchen überführt. Davon wurden 1 000 µl bzw. 200 µl für die direkte Identifizierung abgenommen und in ein Eppendorf-Tube pipettiert. Bei 212 Proben wurde das Volumen von 200 µl und 1 000 µl der gleichen Blutkulturflasche entnommen, um 106 verbundene Stichproben zu erhalten. Parallel dazu wurde für jede Probe eine Subkultur auf Columbiablut-Platten hergestellt. Die Bebrütung der Kultur erfolgte ohne Anwesenheit von CO₂ über Nacht bei 37 °C im Brutschrank (s. Tab. 4, S. 29).

Geräte und Materialien	Hersteller
BD BACTEC™ Plus Aerobic/F	BD
BD BACTEC™ Plus Anaerobic/F	BD
BD BACTEC™ PEDS Plus/F (Blutprobenvolumen < 3 ml)	BD
Blutkultursystem BACTEC™ FX 200	BD

Geräte und Materialien	Hersteller
Begasungsbrutschrank BB16	Heraeus Instruments
Columbia-Agar mit 5% Schafsblut	Oxoid (Bestellnr.: PB5039A)
BD Vacutainer® SST™ II Advance Röhrchen	BD
Safe-Lock Tube	Eppendorf
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf

Tab. 4: Verwendete Geräte und Materialien mit Herstellerangaben zur Vorbereitung der Proben für die direkte Identifizierung und Resistenztestung

3.3 Messprinzip der Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS)

Die Identifizierung von Mikroorganismen mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie hat mittlerweile eine vergleichbare Validität wie konventionelle Verfahren erreicht. Dabei ist sie jedoch wesentlich schneller und kostengünstiger. Diese Untersuchungsmethode beruht auf der Analyse von Molekülen in einem Massenbereich von 2 000 bis 12 000 Dalton. Die lange Inkubationszeit von 6 bis 24 h für die Subkultivierung der herkömmlichen biochemischen Verfahren entfällt bei dem Verfahren der direkten Identifizierung [92]. Die Massenspektrometrie hat das Potenzial, die klassischen biochemischen Identifizierungsverfahren in der mikrobiologischen Diagnostik abzulösen, da es sich um ein schnelles Verfahren mit einfacher Bedienung und hoher Sensitivität handelt [20]. Mit der MALDI-TOF Massenspektrometrie können Proteine, Peptide und auch Nukleinsäuren charakterisiert werden. Dabei werden die Verfahren der Matrix-unterstützten Laserdesorption/-ionisation und der Flugzeitanalyse miteinander verknüpft (s. Abb. 5, S. 30).

Erste Versuche zur massenspektrometrischen Bestimmung von Mikroorganismen wurden bereits 1975 vorgenommen [5]. Im Jahr 1985 entwickelten F. Hillenkamp und M. Karas eine Technik zur Auftrennung von Makromolekülen, bei der durch schonende Ionisierung die analysierten Moleküle nicht zerstört wurden [81]. Einige Jahre später entwickelten Tanaka *et al.* ein MALDI-TOF Massenspektrometer, mit dem sich die charakteristischen Spektren von Proteinen und Polymeren mit einem Molekulargewicht von bis zu 25 kDa darstellen ließen [149]. Für die Untersuchung von Mikroorganismen werden ca. 10^4 bis 10^6 KBE benötigt. Diese werden auf eine MALDI-Probenplatte

(Stahltarget) aufgebracht und mit 1 μl Matrix überschichtet, wodurch es zur Kokristallisation der Matrix mit dem Erreger kommt. Als Matrix können verschiedene niedermolekulare, organische aromatische Säuren (z. B. α -Cyano-Hydroxycimtsäure) verwendet werden, die die Energie des eingesetzten Lasers absorbieren können. Nach Einbringen in die Hochvakuumkammer des Gerätes werden Teile der Probe durch Laserimpulse verdampft und ionisiert. Durch Anlegen einer Hochspannung werden die Ionen im elektrischen Feld beschleunigt. Die Zeit bis zum Auftreffen auf dem Detektor wird während des Vorgangs gemessen.

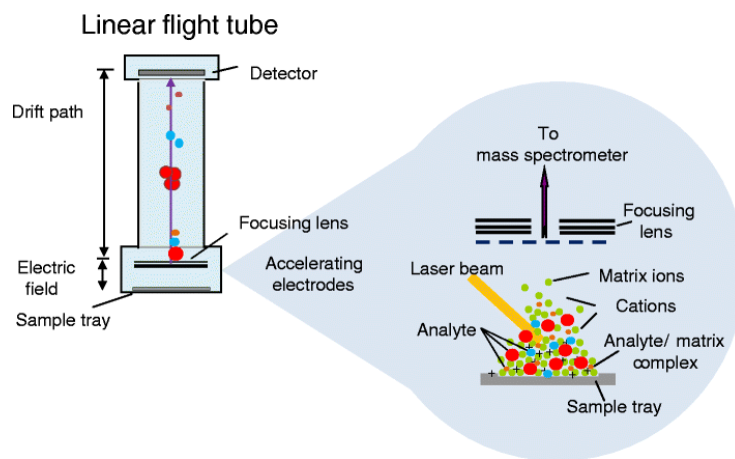


Abb. 5: Schematische Darstellung des MALDI-TOF-Prinzips [167]

Die Masse und der Ionisierungsgrad der Proteine bestimmen das charakteristische Spektrum, welches vollautomatisch mit den hinterlegten Referenzspektren verglichen wird. Die Software erzeugt einen Zahlenwert (Index), der die Validität des Identifizierungsergebnisses bestimmt [136].

Die vorliegende Studie wurde mit einem Gerät und der Software der Firma Bruker durchgeführt, welches eine Einteilung der Indices in vier verschiedene Kategorien vorgenommen hatte (s. Abb. 6, S. 31). Dabei ergab ein Zahlenwert größer als 1,699, dass die Identifizierung erfolgreich war. Lag der Wert bei der Identifizierung des Mikroorganismus unter 1,700, wurde das Ergebnis als nicht verifiziert und somit als ungültig angesehen.

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	no reliable identification	(-)	red

Abb. 6: Einteilung der scores zur Beurteilung der Validität der Keimidentifizierung mit dem Massenspektrometer Bruker microflex™ LT [67]

3.3.1 Direkte Identifizierung von Mikroorganismen mit dem Bruker microflex™ LT

Zur direkten Identifizierung von Mikroorganismen aus Blutkulturflaschen mit detektiertem Erregerwachstum war es notwendig, das biologische Material mit dem MALDI Sepsityper® Kit zu extrahieren. Für alle Präparationsschritte wurden Eppendorf-Gefäße und -Pipettenspitzen verwendet, da insbesondere von Kunststoffen freigesetzte Substanzen (Weichmacher, etc.) die Messung stören könnten. Außerdem wurden Chemikalien höchster Reinheit verarbeitet (s. Tab. 5, S. 32). In der Studie wurde mit dem Ausgangsvolumen von 1 ml Blut begonnen, welches in ein Eppendorf-Tube pipettiert wurde. Nach einiger Zeit fiel jedoch eine erhöhte Viskosität der Zellsuspension nach Zugabe der modifizierten Lösung 1 auf. Die Viskosität wurde durch eine 2-Phasenbildung beurteilt. Der viskose Anteil war nicht verzögerungsfrei zu pipettieren und musste homogenisiert werden. Daraufhin wurde bei einigen Proben das Probenvolumen auf 200 µl reduziert und das Volumen mit Aqua dest. auf 1 ml ergänzt.

Die Zentrifugationsdauer für alle Präparationsschritte betrug 2 min bei einer Beschleunigung von 13 000 g. Dem Material wurden 200 µl der modifizierten Lösung 1 zur Lyse der Zellen hinzugefügt, sorgfältig gemischt, zentrifugiert und der Überstand entfernt. Mit 1 ml der Lösung 2 wurde das Pellet resuspendiert und der Überstand abzentrifugiert. War dieser nicht klar, wurde das Waschen mit der Lösung 2 wiederholt. Anschließend wurden 300 µl destilliertes Wasser und 900 µl reines Ethanol hinzugefügt, um das Pellet erneut aufzulösen. Nach zweimaligem Zentrifugieren und Entfernung des Überstandes, wurden zur Lyse der Bakterien eine an die Größe des Pellets angepasste variable Menge (1 bis 50 µl möglich) 70%ige Ameisensäure und die gleiche Menge 100%iges Acetonitril hinzugefügt. Nach erneuter Zentrifugation wurde vom klaren Überstand 1 µl auf ein Stahltarget pipettiert. Das verwendete Target hatte

96 Positionen. Direkt (< 10 min) nach dem Trocknen der Probe bei Raumtemperatur wurde mit 1 µl Matrix-Lösung überschichtet, um Oxidationsreaktionen zu vermeiden. Diese hätten zu Massenverschiebungen im Spektrum führen können. Die Matrix wurde hergestellt, indem 250 µl des Basis-Lösungsmittels in ein Röhrchen mit portionierter Matrix gegeben wurden. Sie wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln gelagert und bis zu zwei Wochen verwendet. Nach erneuter Trocknung bei Raumtemperatur wurde das Target in das Massenspektrometer eingebracht und die Speziesidentifizierung durchgeführt. Durch Analyse charakteristischer bakterieller Massenspektren wurden die Mikroorganismen identifiziert. Die *score*-Ergebnisse wurden nicht durch Nachmessungen korrigiert, da ein Arbeitsablauf mit einer hohen Durchsatzrate simuliert werden sollte. Die Messungen wurden mit dem microflex™ LT Massenspektrometer, dem MALDI Biotyper Automation Control Version 2.0.4.3.3 (Fa. Bruker Daltonik GmbH) und dem Software-Programm flexControl-microflex Version 2.0 (Fa. Bruker Daltonik GmbH), welches das Spektrometer steuerte, durchgeführt.

Lösung	Inhaltsstoffe	Hersteller	Bestellnummer
Matrix HCCA portioned	α-Cyano-4-Hydroxymethylsäure	Bruker Daltonik GmbH	255344
	250 µl Basis-Lösungsmittel		
Basis-Lösungsmittel	50% Acetonitril		
	47,5% Aqua dest.		
	2,5% Trifluoressigsäure		
Aqua dest.		Fluka Analytical	39253
Lösung 1 (mod.)	k. A. laut Hersteller	Bruker Daltonik GmbH	
Lösung 2	k. A. laut Hersteller	Bruker Daltonik GmbH	
Acetonitril		Fluka Analytical	34967
Ameisensäure		Fluka Analytical	6440
Trifluoressigsäure		Sigma-Aldrich	2009293
Ethanol absolut		Sigma-Aldrich	24202

Tab. 5: Verwendete Reagenzien für die direkte Erregeridentifizierung mit dem Extraktionsprotokoll für die massenspektrometrische Analyse (MALDI-TOF)

3.3.2 Identifizierung von Mikroorganismen von der Subkultur mit dem Bruker microflex™ LT

Die Identifizierung von einer Subkultur wurde als Referenzmethode der experimentellen Studie ausgewählt. Alle Ergebnisse der direkten Messungen sowie deren Validität wurden mit den Befunden der Referenzmethode verglichen. Dazu wurden Subkulturen der Mikroorganismen auf Blutplatten angelegt und 24 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Zur Präparation wurde eine Einzelkolonie auf ein Stahltarget aufgebracht und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur mit 1 µl Matrix überschichtet. Nach der Trocknung der Matrix bei Raumtemperatur, wurde die Messung mit dem Massenspektrometer durchgeführt (s. Tab. 6, S. 33). Die direkte Identifizierung als *S. pneumoniae*, *S. mitis* oder *S. oralis* wurde als technisch erfolgreiche Erregerbestimmung gewertet, da die Spezies phylogenetisch sehr nah verwandt sind und deshalb zum Zeitpunkt der Studie eine Differenzierung nicht zuverlässig möglich war. Bei fehlender Identifizierung von der Subkultur wurden die Ergebnisse der Erregerbestimmung aus der Routinediagnostik als Referenz herangezogen.

Geräte und Materialien	Hersteller
microflex™ LT Massenspektrometer	Bruker Daltonik GmbH
MALDI Sepsityper® Kit	Bruker Daltonik GmbH
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph
Eppendorf Centrifuge C	Eppendorf
microScout Target (MSP 96 target polished steel)	Bruker Daltonik GmbH
Begasungsbrutschrank BB16	Heraeus Instruments
Columbia-Agar mit 5% Schafsblut	Oxoid
Safe-Lock Tube	Eppendorf
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf

Tab. 6: Verwendete Geräte und Materialien mit Herstellerangaben zur Identifizierung der Mikroorganismen mit dem Massenspektrometer

3.3.3 Identifizierung von Kontrollstämmen zur Qualitätskontrolle

Als Qualitätskontrolle wurden mit verschiedenen Kontrollstämmen inokulierte positive Blutkulturen analysiert. Erythrozytenkonzentrat wurde in aerobe BD BACTEC™ Blutkulturflaschen gefüllt und mit verschiedenen Spezies versetzt (s. Tab. 7, S. 34). Es wurden zwei verschiedene Verdünnungen mit ≤ 50 und ≤ 500 KbE hergestellt. Nach

Inkubation der Blutkulturflaschen im BD BACTEC™ FX 200 Gerätesystem wurde nach dem oben genannten Protokoll zur Identifizierung verfahren (s. 3.3.1, S. 31). Die Isolate wurden an zwei verschiedenen Tagen von Herrn Dr. Thomas Adam und der Doktorandin jeweils im Doppelsatz getestet.

Spezies	ATCC	DSM
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	30007
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	
<i>Escherichia coli</i>	25922	
<i>Escherichia coli</i>	35218	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp. <i>pneumoniae</i>	700603	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	
<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	1897
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	700328	
<i>Streptococcus anginosus</i>	20563	12395
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	

Tab. 7: Spezies und Stammsammlungsnummern der Kontrollstämme für die Analyse mit dem Massenspektrometer

3.4 Messprinzip des BD GeneOhm™ StaphSR Tests

Der BD GeneOhm™ StaphSR Test (REF 441252) kann für den Nachweis Methicillinempfindlicher (MSSA) und Methicillin-resistenter (MRSA) *S. aureus*-DNA grampositiver Kokken eingesetzt werden. Das Probenmaterial wird in einen Probenpuffer überführt, lysiert und zu einer Mischung von PCR-Reagenzien gegeben, welche die für *S. aureus*- und MRSA-spezifischen Primer enthält. Sind DNA-Zielsequenzen vorhanden, werden sie mithilfe der Primer vervielfältigt. Der assay enthält außerdem eine interne Kontrolle, um PCR-hemmende Stoffe nachzuweisen und die Funktionalität der Reagenzien zu verifizieren. Amplifizierung, Detektion und Ergebnisinterpretation werden automatisch mithilfe der Cepheid SmartCycler® Software durchgeführt. Im Anschluss an die Lyse der Probe erfolgt bei Anwesenheit einer oder beider Bakterien die Vervielfältigung der Zielsequenzen (MRSA: Sequenz nahe der Insertionsstelle des SCCmec; *S. aureus*:

eine separate *S. aureus*-spezifische Sequenz, die nicht an die SCCmec-Kassette gebunden ist, sondern auf dem orfX Gen lokalisiert ist). Die Vervielfältigung der internen Kontrolle findet ebenfalls statt, sofern keine PCR-inhibierenden Substanzen anwesend sind. Der Nachweis der amplifizierten DNA-Zielsequenzen erfolgt mit Molecular-Beacon-Hybridisierungssonden (einzelsträngige, haarnadelförmige Oligonukleotide), die an einem Ende mit einem Emissionsunterdrücker (Quencher) und am anderen mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (Fluorophor) gekennzeichnet sind. Die Fluoreszenz wird unterdrückt, wenn keine DNA-Zielsequenz vorhanden ist. Dagegen öffnet sich in Anwesenheit einer DNA-Zielsequenz nach der Beacon-Zielsequenz-Hybridisierung die Haarnadelstruktur. Dieser Prozess führt zur Fluoreszenz-Emission. Zur Detektion des MRSA-Amplifikats enthält die Molecular-Beacon-Sonde das Fluorophor FAM am 5'-Ende und den nicht fluoreszierenden Quencher-Anteil DABCYL am entgegengesetzten 3'-Ende des Oligonukleotids. Zum Nachweis des *S. aureus*-Amplifikats ist eine zweite Molecular-Beacon-Sonde mit dem Fluorophor TexasRed am 5'-Ende sowie dem Quencher DABCYL am 3'-Ende markiert. Um das IC-Amplifikat nachweisen zu können, enthält die Molecular-Beacon-Sonde das Fluorophor TET am 5'-Ende und den Quencher DABCYL am 3'-Ende. Jedes Beacon-Zielsequenz-Hybrid fluoresziert bei einer Wellenlänge, die für das in der jeweiligen Molecular-Beacon-Sonde verwendete Fluorophor charakteristisch ist. Die Stärke der Fluoreszenz innerhalb eines PCR-Zyklus oder nach Abschluss der Vervielfältigung hängt von der Menge des spezifischen Amplifikats zu dem jeweiligen Zeitpunkt ab. Die SmartCycler®-Software kontrolliert gleichzeitig die von jeder Molecular-Beacon-Sonde emittierte Fluoreszenz, interpretiert alle Daten und liefert nach Durchlaufen des Zyklusprogramms ein Endergebnis (s. Tab. 8, S. 35). Der gesamte Ablauf dauert etwa 60 bis 75 min [141].

Ergebnis	Interpretation
NEG	Keine <i>S. aureus</i> -DNA detektiert
POS	MRSA-DNA detektiert
Reactive	<i>S. aureus</i> -DNA detektiert (kein MRSA)
Unresolved	Unbestimmbare, hemmende Probe oder Reagenzversagen
ND	Nicht bestimmbar aufgrund eines defekten i-CORE-Moduls

Tab. 8: Interpretationen der Ergebnisse des BD GeneOhm™ StaphSR Tests zum Nachweis von Methicillin-empfindlichen und Methicillin-resistenten *S. aureus*-Isolaten

Mittels MALDI-TOF-Analyse wurde die Identifizierung der Mikroorganismen vorgenommen. Ergab diese als Resultat *Staphylococcus aureus*, wurde dieses Isolat

mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test auf Methicillin-Resistenz untersucht. Das Kit enthielt den Master Mix, die Kontroll-DNA, den Probenpuffer, den Verdünnungspuffer, Lyseröhrchen und die SmartCycler-Reaktionsröhrchen (s. Tab. 9, S. 37, Tab. 10, S. 37). Zuerst wurden 225 µl Verdünnungspuffer in das Master Mix Röhrchen gegeben und für 10 bis 15 s gemischt. Danach wurden 225 µl Probenpuffer dem Röhrchen mit der positiven Kontroll-DNA hinzugefügt und für 5 bis 10 s geschüttelt. 25 µl des Master Mix wurden in jedes SmartCycler-Röhrchen gegeben.

Es wurden mindestens drei Röhrchen benötigt, da in jedem Lauf eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitliefen. Für die Negativkontrolle wurden 3 µl Probenpuffer hinzugefügt. Dasselbe Volumen Kontroll-DNA wurde in ein anderes SmartCycler-Röhrchen für die Positivkontrolle eingebracht. Diese Qualitätsprozeduren dienten der Überprüfung der Leistungen des Protokolls. Die Positivkontrolle sollte Reagenziendefekte anzeigen. Im Gegensatz dazu diente die Negativkontrolle zur Erkennung einer Verunreinigung der Umgebung oder der Reagenzien durch *S. aureus*-DNA, MRSA-DNA oder deren Amplifikate. Ergab sich bei der Untersuchung der assay-Kontrollen eine Fehlermeldung, wurde der Testlauf für ungültig erklärt. Jeder Reaktionsmischung war außerdem eine interne Kontrolle hinzugefügt, die jede Probe auf PCR-Hemmung und Reagenzienintegrität untersuchte.

Zur Präparation der DNA wurden 2 µl Blut in ein Tube mit Probenpuffer pipettiert, das anschließend 15 s bei höchster Geschwindigkeit gevortext wurde. Danach wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und dem Lysepuffer hinzugefügt. Dieses Röhrchen wurde 5 min auf höchster Stufe gemischt, kurz zentrifugiert und dann in einem Heizblock für 2 min bei 95 °C erhitzt. Nun wurden 3 µl dieser Suspension entnommen und in ein SmartCycler-Tube mit 25 µl Master Mix gegeben. Alle Tubes wurden 5 bis 10 s zentrifugiert und in einem Kälteblock mit einer Temperatur von 2 bis 8 °C gelagert. Der Cepheid SmartCycler® DX wurde programmiert, die Tubes eingesetzt und der Lauf gestartet. Nach 1 bis 1,5 h konnte das Ergebnis abgelesen werden. Die Studienergebnisse wurden mit den Ergebnissen der Routinediagnostik verglichen. Dort wurde das Antibiogramm mit dem VITEK® 2 System erstellt und bei Nachweis eines MRSA mit einer unabhängigen Methode (Mikrodilution [22]) bestätigt. Des Weiteren wurde im Institut eine Ampicillin/Sulbactam-Bouillon zum Ausschluss eines BORSA beimpft.

Geräte und Materialien	Hersteller
BD GeneOhm™ StaphSR Test	BD
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph
SmartCycler® DX	Cepheid
SmartCycler® PCR-Tube-Kühlblock	Cepheid
SmartCycler® Minizentrifuge	Cepheid
Heizblock Dri-Block, DB-2A	Techne
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf

Tab. 9: Verwendete Geräte und Materialien für die Durchführung der real-time PCR mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test

Bezeichnung	Inhaltsstoffe	Menge
Probenpuffer	Tris-EDTA	
Lysistube	Glasperlen	
Master Mix	DNA-Polymerasekomplex	< 0,0005%
	Noninfektiöse DNA mit MRSA-Primer, der Sequenzen bindet und einer einzigartigen Sequenz für die Probenhybridisierung	< 0,001%
	Primer	< 0,002%
	Molekulare Signalproben	< 0,002%
	dATP, dCTP, dGTP, dTTP	< 0,05%
	Bovines Serumalbumin	
	Kohlenhydrate	
	Magnesiumchlorid	
	Noninfektiöse <i>S. epidermidis</i> -DNA	< 0,001%
Kontroll-DNA	Tris-EDTA Puffer	
	Kohlenhydrate	
	Noninfektiöse MRSA-DNA	< 0,001%
Diluent (Verdünnungspuffer)	Tris-HCl Puffer	
	Magnesiumchlorid	
	Ammoniumsulfat	
	Kaliumchlorid	

Tab. 10: Reagenzien des Herstellers BD für die Durchführung der real-time PCR mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test

3.5 Messprinzip des BD Phoenix™ Systems

Im BD Phoenix™/EpiCenter System wurden Phoenix-ID und AST-Kombinationspanels verwendet. Das System erlaubt gleichzeitig 100 Identifizierungstests und antimikrobielle Empfindlichkeitsbestimmungen durchzuführen. Die BD Phoenix™ Panels enthalten Vertiefungen mit getrockneten Reagenzien zur Antibiotika-, Wachstums- und Fluoreszenzkontrolle. Zur Messung der minimalen Hemmkonzentrationen wird laut Gerätemanual ein optimierter kolorimetrischer Redox-Indikator angewandt, der Bakterienwachstum in Anwesenheit eines Antibiotikums nachweist. Die mit einer Zielorganismen-Dichte von 0,5 McFarland-Standard (s. 1.7, S. 21) beimpften Resistenztestkarten wurden in das Instrument eingesetzt und bei 35 °C kontinuierlich inkubiert. Das Instrument misst die Resistenztestkarten alle 20 min, beginnend zur vollen Stunde der aktuellen Uhrzeit für eine Dauer von bis zu 16 h (falls notwendig). Die BD Phoenix™ AST-Methode ist ein Mikrobouillondilutionstest. Das Bakterienwachstum wird durch Messung von Indikatoränderungen und der Bakterientrübung bestimmt. Jedes AST-Panel enthält verschiedene Antibiotika in einer Reihe geometrischer Verdünnungsstufen (Faktor 2). Die Organismenidentität wurde zur Auswertung der MHK-Werte jedes Antibiotikums verwendet.

3.5.1 Bewertung der Resistenzergebnisse

In den letzten Jahren wurden verschiedene Normen erarbeitet, um die Analyse der bakteriziden Wirkung eines Antibiotikums in Anwesenheit eines nachgewiesenen Erregers zu optimieren. Die International Organization for Standardization verabschiedete 2006 eine Norm ISO 20776-1 [104]. Sie beschreibt als Referenzmethode einen Mikrobouillondilutionstest zur Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration. Der Vergleich der Resistenzdaten wurde anhand der weltweit gültigen ISO 20776-2 vorgenommen [170]. Diese Norm legt die Qualitätskriterien für abgeleitete Testverfahren fest. Die drei Kategorien sind wie folgt definiert:

- Sensibel (S): „Als sensibel gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist“.
- Intermediär (I): „Als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses

Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis assoziiert ist“.

- Resistent (R): „Als resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er in vitro von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens assoziiert ist“ [129].

Die Werte, die für jeden Keim und für jedes Antibiotikum von dem BD Phoenix™ System und dem VITEK® 2 System generiert wurden, sind nach dem S-I-R Schema sofort verglichen worden. Anschließend fand eine Gegenüberstellung nach EUCAST-Kriterien statt, wobei die Werte des VITEK® 2 Systems als Referenzwerte herangezogen wurden. Dabei wurden Übereinstimmungen und Unterschiede gemäß den Standards des CLSI wie folgt bewertet:

- keine Diskrepanz: Die Bewertung ist gleich.
- *minor error*: Eine Bewertungsstufe als Abweichung zwischen der Referenzmethode und der direkten Testung.
- *major error*: Das Ergebnis der Referenzmethode wurde als sensibel und das Ergebnis der direkten Methode als resistent bewertet.
- *very major error*: Das Ergebnis der Referenzmethode wurde als resistent und das Ergebnis der direkten Testung als sensibel bewertet [7].

3.5.2 Resistenztestung mit dem BD Phoenix 100 Instrument

Die Vacutainer-Röhrchen mit 8,5 ml Probenmaterial aus den Blutkulturflaschen wurden bei 3 000 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dabei entstand ein Überstand, welcher mittels einer sterilen Pasteurpipette entnommen und verworfen wurde. Der Rand des Vacutainer-Röhrchens wurde mit einem mit Desinfektionsmittel durchtränkten Tuch vorsichtig abgetupft. Das Pellet aus Mikroorganismen und Leukozyten, das sich über dem enthaltenen Trenngel ablagerte, wurde in 1 ml BD Phoenix™ Inoculum Broth 30 s mit einem Vortexgerät resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Röhrchen mit BD Phoenix™ Inoculum Broth überführt und mit dem BD PhoenixSpec-Nephelometer auf die optische Dichte von 0,5 bis 0,6 nach McFarland-Standard eingestellt. Das entsprach einer Keimzahl von $1,5 \times 10^8$ KbE/ml [30; 115; 152]. In ein Glasröhrchen mit 8,8 ml BD Phoenix™ AST Broth wurde ein Tropfen BD Phoenix™ AST Indicator Solution gegeben, wobei der erste Tropfen zuvor verworfen

wurde. Dazu wurden 25 µl aus dem beimpften Inokulum-Röhrchen in die AST-Bouillon gegeben und einmal geschwenkt. Die Lösung wurde nun in ein Panel gegeben, welches entsprechend dem Gramverhalten ausgewählt wurde. Es wurden zwei verschiedene Panels des Herstellers BD verwendet (s. Tab. 3, S. 28). Die inokulierten Panels wurden bei 35 °C im BD Phoenix 100 Instrument inkubiert (s. Tab. 11, Tab. 12, S. 40). Bei einigen Proben wurde ein Volumen von 250 µl in die AST-Bouillon gegeben.

Geräte und Materialien	Hersteller
Phoenix 100 Instrument	BD
BD Vacutainer® SST™ II Advance Röhrchen	BD
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph
Sterile Pasteurpipette 3,5 ml	Sarstedt
PhoenixSpec-Nephelometer	BD
Megafuge 1.0	Thermo Scientific
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf

Tab. 11: Verwendete Geräte und Materialien für die direkte Resistenztestung mit dem BD Phoenix 100 Instrument

Bezeichnung	Substanz pro Liter gereinigtes Wasser	Menge	Bestellnummer
BD Phoenix™ Inoculum Broth (2,2 ml)	Kaliumchlorid	7,5 g	246005
	Calciumchlorid	0,5 g	
	Triglyzerin	0,895 g	
	Polysorbat 80	0,03%	
BD Phoenix™ AST Broth (8 ml)	Müller-Hinton Lösung	22 g	246003
	- Säurehydrolysat von Casein	17,5 g	
	- Rindfleischextrakt	3 g	
	- Stärke	1,5 g	
	Polysorbat 80	0,01%	
BD Phoenix™ AST Indicator Solution (6 ml)	Redoxindikator	< 3 g	264004
	Redoxstabilisator	< 20 g	

Tab. 12: Verwendete Reagenzien des Herstellers BD für die direkte Resistenztestung mit dem BD Phoenix 100 Instrument

Die ermittelten minimalen Hemmkonzentrationen wurden mit den Ergebnissen des VITEK® 2 Systems aus der Routinediagnostik des Instituts verglichen. Da die Testkarten der beiden Systeme mit unterschiedlichen Antibiotika bestückt waren, wurde nur eine Auswertung für übereinstimmende Antibiotika vorgenommen (s. Tab. 13, S. 41). Die Befunde beider Systeme wurden anhand des klassischen S-I-R Schemas am Tag der durchgeführten Analyse verglichen. Traten Diskrepanzen in Form von *very major errors* auf, wurden die dazugehörigen Proben für weitergehende Analysen asserviert. Für die verschiedenen Keimgruppen der Enterobakteriazeen, Nonfermenter, Enterokokken, koagulasenegative Staphylokokken und *S. aureus* wurden Indexantibiotika bestimmt, deren Testdauern bis zum Ergebnis der minimalen Hemmkonzentration über einen Zeitraum von einem Monat ausgewertet wurden. Die TTR bezeichnete den Zeitpunkt, zu dem der Messwert für eine bestimmte Bakterien-Antibiotika-Kombination abzulesen war. *Time-to-test result* gab die Bearbeitungszeit bis zum vollständigen Antibiogramm mit den dargestellten Antibiotika der einzelnen Proben wieder.

Grampositive Kokken	Gramnegative Stäbchen	Pseudomonaden
Penicillin	Ampicillin	Ampicillin/Sulbactam
Oxacillin	Ampicillin/Sulbactam	Aztreonam
Gentamicin	Piperacillin	Piperacillin
Ciprofloxacin	Piperacillin/Tazobactam	Piperacillin/Tazobactam
Moxifloxacin	Imipenem	Imipenem
Erythromycin	Meropenem	Meropenem
Clindamycin	Cefazolin	Cefotaxim
Vancomycin	Cefuroxim	Ceftazidim
Teicoplanin	Cefotaxim	Cefepim
Rifampicin	Ceftazidim	Gentamicin
Fosfomycin	Cefepim	Tobramycin
Tetracyclin	Gentamicin	Amikacin
Linezolid	Tobramycin	Ciprofloxacin
Fusidinsäure	Ciprofloxacin	Moxifloxacin
	Levofloxacin	Fosfomycin

Tab. 13: Vergleichene Antibiotika bei der Resistenztestung

3.6 Epsilon-Test (E-Test)

Zur Verifizierung einiger Ergebnisse wurden von der Doktorandin Oxacillin-E-Tests durchgeführt. Der Epsilon-Test (E-Test) ist eine Kombination aus Agardiffusionstest und MHK-Wertbestimmung. Im Jahr 1988 beschrieben Blomström *et al.* als erste den E-Test als neue Methode zur direkten Bestimmung minimaler Hemmkonzentrationen von Antibiotika bei Mikroorganismen, die auf festen Nährmedien kultiviert werden konnten [14]. Die Wirkstoffträger aus Kunststoffstreifen enthalten einen Gradienten von Chemotherapeutikakonzentrationen. Von der gewachsenen Kultur wurde eine Verdünnung mit einem McFarland-Standard von 0,5 in physiologischer Kochsalzlösung hergestellt (s. 1.7, S. 21). Diese Lösung wurde mit einem Tupfer auf eine Müller-Hinton-Agarplatte (38g Müller-Hinton-Agar II (Fa. BD, Bestellnr. 211438) mit 1 000 ml a. d.) aufgetragen und mit zwei E-Teststreifen der Firma bioMérieux bestückt. Nach einer Inkubationsdauer von 24 h im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB16, Fa. Heraeus Instruments) bei 37 °C wurde das Ergebnis abgelesen. Nach Ausbildung eines Hemmhofes bei sensiblen Keimen, wurde am Schnittpunkt des ellipsoiden Hemmhofes mit dem Streifen anhand einer integrierten Maßeinteilung der MHK-Wert abgelesen.

3.7 Mikrodilutionstest zum Nachweis von Betalaktamasen

E. coli, *Klebsiella* spp. und *Proteus* spp. sind in der Lage, Breitspektrumbetalaktamasen zu bilden, die Cephalosporine der 1., 2. und 3. Generation spalten können. Sie sind durch Plasmide kodiert und daher leicht von einem Bakterienstamm zum anderen übertragbar, woraus sich spezielle Hygienemaßnahmen ableiten. Bei einigen Proben traten bei der Analyse von Betalaktamasen bildenden Mikroorganismen durch das BD Phoenix™ System und die Routineuntersuchung mit dem VITEK® 2 System diskrepante Ergebnisse auf. Diese Proben wurden von der Doktorandin erneut mit dem Mikrobouillondilutionstest untersucht. Der Test mit der ESBL-Platte diente zum Nachweis von ESBL bei Enterobakteriazeen (außer *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. und *Serratia* spp.) und wurde nach den Standards des CLSI durchgeführt [171].

Dazu wurden eine 0,85%ige Kochsalzlösung mit Tween 80 (Polysorbat 80, [82]) der Firma OXOID und vom Personal des Instituts hergestellte MHK-Platten (s. Abb. 7, S. 43) verwendet. Es wurden als Vertreter der Cephalosporine der 2. und 3. Generation Cefoxitin, Ceftazidim und Cefpodoxim getestet. Zusätzlich wurde in Kombination mit

Ceftazidim und Cefpodoxim die Clavulansäureresistenz ermittelt. Dadurch wurde geprüft, ob die MHK des Isolates in Gegenwart von Clavulansäure um mehr als drei Verdünnungsstufen gesenkt werden konnte. War der Stamm gegenüber Cefoxitin empfindlich (MHK < 8mg/l) und der MHK-Wert konnte von Ceftazidim und/oder Cefpodoxim mit Clavulansäure verringert werden, wurde das Isolat als ESBL-Bildner bewertet. Mehrere Kolonien wurden in 5 ml einer 0,85%igen NaCl-Lösung suspendiert. Die Lösung wurde auf McFarland-Trübung 0,5 eingestellt (s. 1.7, S. 21). Davon wurden 200 µl entnommen und in das Röhrchen mit 20 ml der 0,85%igen NaCl-Lösung mit Tween 80 pipettiert. Die bei 4 °C gelagerte ESBL-Platte wurde bei Zimmertemperatur aufgetaut und mithilfe des Multipointinokulators MIC-2000 der Firma Dynatech inokuliert. Dabei wurden 5 µl der vorbereiteten Lösung in jede Vertiefung eingebracht und eine Inokulumkontrolle auf einer Blutplatte (Columbia-Agar mit 5% Schafblut, Oxoid) ausgestrichen. Über Nacht wurde die MHK-Platte im Brutschrank (Begasungsbrutschrank BB16, Heraeus Instruments) bei 37 °C inkubiert, sodass das Ergebnis am nächsten Tag auf dem ESBL-Testplatten-Protokoll abgelesen werden konnte.

zum Nachweis von BSBL bei Enterobakteriaceen (außer Enterobacter, Citrobacter, Serratia)											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
COX 32	COX 16	COX 8	COX 4	COX 2	COX 1	COX 0.5	COX 0.25	COX 0.125	COX 0.06	COX 0.03	Kontrolle
CAZ 32	CAZ 16	CAZ 8	CAZ 4	CAZ 2	CAZ 1	CAZ 0.5	CAZ 0.25	CAZ 0.125	CAZ 0.06	CAZ 0.03	Kontrolle
CAZ+CLA 32+2	CAZ+CLA 16+2	CAZ+CLA 8+2	CAZ+CLA 4+2	CAZ+CLA 2+2	CAZ+CLA 1+2	CAZ+CLA 0.5+2	CAZ+CLA 0.25+2	CAZ+CLA 0.125+2	CAZ+CLA 0.06+2	CAZ+CLA 0.03+2	Kontrolle CLA
CPO 16	CPO 8	CPO 4	CPO 2	CPO 1	CPO 0.5	CPO 0.25	CPO .125	CPO 0.06	CPO 0.03	CPO 0.015	Kontrolle
CPO+CLA 16+2	CPO+CLA 8+2	CPO+CLA 4+2	CPO+CLA 2+2	CPO+CLA 1+2	CPO+CLA 0.5+2	CPO+CLA 0.25+2	CPO+CLA .125+2	CPO+CLA 0.06+2	CPO+CLA 0.03+2	CPO+CLA .015+2	Kontrolle CLA

Abb. 7: Antibiotikakonzentrationen der ESBL-Testplatte in mg/l

3.8 Statistische Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software IBM SPSS Statistics Version 23 durchgeführt. Zur Auswertung der Ergebnisse der Erregeridentifizierung und der Resistenztestung wurden neben der beschreibenden Statistik verschiedene nichtparametrische statistische Testverfahren angewandt. Aufgrund der hohen Fallzahlen wären auch parametrische Testverfahren möglich gewesen. Für die Betrachtung der Viskosität lagen jedoch in einer Gruppe kleine Fallzahlen vor, sodass

die Auswertung mit nichtparametrischen Tests erfolgte. Für die statistische Analyse der Identifizierungsergebnisse bei direkter Identifizierung aus Blutkulturflaschen im Vergleich zu den Ergebnissen nach Subkultur (v. d. S.) wurden der Wilcoxon-Test und der McNemar-Test für abhängige Stichproben verwendet. Als Maß der Übereinstimmung der Identifizierungsraten der direkten Identifizierung im Vergleich mit der Identifizierung von der Subkultur wurde der Kappa-Koeffizient nach Cohen gewählt. Der Einfluss der Viskosität und der Einfluss des Probenvolumens auf die direkte Identifizierung wurden mit dem Chi-Quadrat-Test ausgewertet. Zur Prüfung der Wirkung der Viskosität auf die Messwertdifferenzen wurde der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Proben verwendet. Zur statistischen Berechnung von Unterschieden der direkten Identifizierung zwischen grampositiven Bakterien, gramnegative Bakterien und Sprosspilzen wurde der Chi-Quadrat-Test angewandt [60; 75]. Die statistische Prüfung auf Unterschiede der Empfindlichkeitsprüfung relevanter Antibiotika einer Keimgruppe bezüglich der Zeit bis zum Testergebnis erfolgte auf Basis einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und des t-Tests. Im Fall von zwei Gruppen wurde die Signifikanz der Gruppenmittelwerte mit Hilfe des t-Tests geprüft. Bei mehr als zwei Gruppen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse angewandt. Bei signifikanten Unterschieden der Varianzanalyse wurden die paarweisen Gruppenunterschiede mit Hilfe des Post-Hoc-Tests nach Tukey geprüft. Die grafische Darstellung der Dauer der Empfindlichkeitsprüfung erfolgte mit der Analyse nach Kaplan-Meier. Es wurde die Zeit bis zum Eintritt des Testergebnisses berücksichtigt. Da bei allen Proben das Testergebnis eintrat, wurden zensierte Fälle nicht berücksichtigt [74; 164]. Als Signifikanzniveau wurde die Variable p angegeben. Ein signifikanter Unterschied war nachweisbar, wenn ein p -Wert $\leq 0,05$ ermittelt wurde. Ein Signifikanzwert $> 0,05$ bedeutete, dass ein statistisch signifikanter Unterschied nicht nachgewiesen werden konnte. Die lineare Trendlinie wurde zur Darstellung der gleichmäßigen Zunahme der Werte der direkten Identifizierung mit dem Massenspektrometer ausgewählt. Die Berechnung der Trendlinie erfolgte auf Basis der Gleichung $y = mx + b$ wobei b den y Schnittpunkt und m die Steigung ($m = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$) beschrieb.

4 Ergebnisbeschreibung

4.1 Ergebnisse der Identifizierung

Im Rahmen der Studie wurden 1 033 Proben untersucht und eine Erregeridentifizierung mittels MALDI-TOF MS durchgeführt. Bei 94,5% handelte es sich um Blutproben in Blutkulturflaschen von Patienten mit Verdacht auf Sepsis. Jedoch wurden auch Blutkulturflaschen untersucht, die mit Punktaten aus anderen primär sterilen Kompartimenten (z. B. Liquores) beimpft waren (s. Tab. 14, S. 45). Die Bezeichnung des Probenmaterials wurde dem Laborauftrag entnommen.

Probenmaterial	Anzahl der Proben
	(n = 1 033)
Blut	976
Pleurapunktat	16
Liquor	8
Aszitespunktat	5
Gallensekret	4
Leberabszesspunktat	4
Abszessgewebe	2
Pankreaspunktat	2
Punktat re. Knie	2
Punktat subcutan Rücken	2
Unterbauchsekret	2
Sekret vaginale Fistel	2
Wundabstrich	2
CT-Drain-Neuanlage	1
Muskelloge	1
Punktat	1
Punktat-EF-Sekret	1
Perikardpunktat	1
Pseudozystenpunktat	1

Tab. 14: Entnahmeort und Anzahl der untersuchten Proben

Die Analyse ergab bei 873 Isolaten eine Monoinfektion. Bei 160 Isolaten wurden mehrere Erreger nachgewiesen. Somit wurde bei 15,5% der untersuchten Proben eine Mehrfachinfektion diagnostiziert. Lag eine Mehrfachinfektion vor, wurden die verschiedenen Mikroorganismen nach Subkultivierung identifiziert. Es war bei Durchführung der wissenschaftlichen Untersuchung nicht möglich, mehrere Keime direkt aus der Blutkulturflasche mittels MALDI-TOF MS zu identifizieren. Jedoch wurde bei 80% der Mischinfektionen eine von mehreren Spezies erkannt und direkt aus den Blutkulturflaschen identifiziert. Bei den Mehrfachinfektionen lag der Anteil an Blutproben bei 88,8% (s. Tab. 15, S. 46). Das bedeutet, dass die Punktate aus anderen sterilen Kompartimenten bei den Mischinfektionen überrepräsentiert waren.

Probenmaterial mit Mehrfachinfektionen	Probenanzahl
	(n = 160)
Blut	142
Gallensekret	4
Leberabszesspunktat	4
Aszitespunktat	2
Sekret vaginale Fistel	2
Abszessgewebe	1
CT-Drain-Neuanlage	1
Muskelloge	1
Pleurapunktat	1
Punktat-EF-Sekret	1
Unterbauchsekret	1

Tab. 15: Entnahmeort und Anzahl der untersuchten Proben mit Mehrfachinfektionen

Wurden nur die Proben mit Monoinfektionen betrachtet, so bildeten die grampositiven Mikroorganismen mit 71,2% (n = 622) den größten Anteil, gefolgt von gramnegativen Mikroorganismen mit 24,4% (n = 213) und Sprosspilzen mit 4,4% (n = 38).

Als Referenz diente die Identifizierung v. d. S. am darauf folgenden Tag. Von 873 Proben konnten 96,4% der Keime von einer Subkultur identifiziert werden. Mit diesem Verfahren wurden 97,7% der grampositiven, 98,1% der gramnegativen Mikroorganismen und 65,8% der Sprosspilze richtig identifiziert (s. Tab. 16, 47). 31 Mikroorganismen konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden

Keimgruppe	Probenanteil der ID v. d. S. (n)
gesamt	96,4% (842)
grampositiv	97,7% (608)
gramnegativ	98,1% (209)
Sprosspilze	65,8% (25)

Tab. 16: Probenanteil und -anzahl der erfolgreichen Identifizierung von der Subkultur (v. d. S.) unterteilt nach grampositiven Bakterien, gramnegativen Bakterien und Sprosspilzen

4.1.1 Vergleich der Methoden

Von 873 monomikrobiellen Isolaten erfolgte von 519 Proben mit 1 000 µl Probenvolumen und von 354 Proben mit 200 µl Probenvolumen eine direkte Erregeridentifizierung (s. Tab. 17, S. 47, Tab. 18, S. 47). Die erfolgreiche Erregeridentifizierung der untersuchten Mikroorganismen direkt aus Blutkulturflaschen gelang bei 61,8% mit einem Probenvolumen von 1 000 µl und bei 75,4% mit einem Probenvolumen von 200 µl. Mit dem McNemar-Test wurde für beide Volumina ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich mit der Referenzmethode der Erregeridentifizierung nach vorangegangener Subkultivierung nachgewiesen ($p \leq 0,001$).

Identifizierung	Probenanteil der direkten ID (n)	Probenanteil der ID v. d. S. (n)
	Probenvolumen 1 000 µl	
ja	61,8% (321)	94,6% (491)
nein	38,2% (198)	5,4% (28)

Tab. 17: Vergleich der Identifizierungsraten von 519 positiven Blutkulturflaschen der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 1 000 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

Identifizierung	Probenanteil der direkten ID (n)	Probenanteil der ID v. d. S. (n)
	Probenvolumen 200 µl	
ja	75,4% (267)	99,2% (351)
nein	24,6% (87)	0,8% (3)

Tab. 18: Vergleich der Identifizierungsraten von 354 positiven Blutkulturflaschen der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 200 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

Das Maß der Übereinstimmung der direkten Identifizierung der Proben mit einem Volumen von 1 000 µl war größer als das der Proben mit einem Volumen von 200 µl im Vergleich mit der Referenzmethode (s. Tab. 19, S. 48, Tab. 20, S. 48).

Kappa-Koeffizient 0,101		ja/nein Methode Identifizierung v. d. S.		Gesamtanzahl
		nein	ja	
ja/nein Methode direkte Identifizierung	nein	21 (4%)	177 (34,1%)	198
	ja	7 (1,3%)	314 (60,5%)	321
Gesamtanzahl		28	491	519

Tab. 19: Maß der Übereinstimmung im Vergleich der Identifizierungsraten von 519 positiven Blutkulturflaschen der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 1 000 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

Kappa-Koeffizient 0,029		ja/nein Methode Identifizierung v. d. S.		Gesamtanzahl
		nein	ja	
ja/nein Methode direkte Identifizierung	nein	2 (0,6%)	85 (24%)	87
	ja	1 (0,3%)	266 (75,1%)	267
Gesamtanzahl		3	351	354

Tab. 20: Maß der Übereinstimmung im Vergleich der Identifizierungsraten von 354 positiven Blutkulturflaschen der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 200 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

Die Validität der Identifizierung wurde mit dem *score value* angegeben. Analysen mit einem Wert von 3,000 hatten die größtmögliche Validität (s. Abb. 6, S. 31). Die Identifikationen, die direkt aus Blutkulturflaschen bestimmt wurden, haben im Durchschnitt einen Wert von 1,794 bei einem Probenvolumen von 1 000 µl und einen Wert von 1,955 bei einem Probenvolumen von 200 µl erreicht. Die Messwerte der Identifizierung von der Subkultur unterschieden sich signifikant von den Ergebnissen der direkten Erregerbestimmung aus Blutkulturflaschen (Wilcoxon-Test, $p \leq 0,001$).

	score values der direkten ID	score values der ID v. d. S.
	Probenvolumen 1 000 µl	
MW	1,794	2,101
SD	0,416	0,264
Median	1,821	2,136

Tab. 21: Vergleich der *score values* der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 1 000 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.) von 519 Blutkulturflaschen

	score values der direkten ID	score values der ID v. d. S.
	Probenvolumen 200 µl	
MW	1,955	2,094
SD	0,360	0,204
Median	1,989	2,110

Tab. 22: Vergleich der *score values* der direkten Erregeridentifizierung (Probenvolumen 200 µl) und der Erregeridentifizierung von der Subkultur (v. d. S.) von 354 Blutkulturflaschen

Das Volumen von 200 µl und 1 000 µl wurde in 106 Fällen jeweils der gleichen Blutkulturflasche entnommen. Von diesen 212 verbundenen Stichproben wurden aus 22 Blutkulturflaschen jeweils mehrere Erreger nachgewiesen. Aus 95 Blutkulturflaschen wurde nur eine Spezies isoliert. Es wurden 81 grampositive Bakterien, 10 gramnegative Bakterien und 4 Sprosspilze identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass durch Verminderung des Probenvolumens auf 200 µl bei grampositiven Bakterien signifikant bessere Ergebnisse erzielt wurden (s. Tab. 23, S. 49). Für gramnegative Bakterien und Sprosspilze war kein Einfluss des Probenvolumens auf die Identifizierung nachweisbar (s. Tab. 24, S. 49, Tab. 25, S. 49).

Identifizierung Chi-Quadrat-Test, p = 0,023	Probenvolumen	
	200 µl (n)	1 000 µl (n)
ja	71,6% (58)	53,1% (43)
nein	28,4% (23)	46,9% (38)

Tab. 23: Vergleich der Ergebnisse der direkten Identifizierungen von grampositiven Bakterien mit einem Probenvolumen von 200 µl und 1 000 µl von 81 verbundenen Stichproben, aus denen nur eine Spezies isoliert wurde

Identifizierung Chi-Quadrat-Test, p = 1,000	Probenvolumen	
	200 µl (n)	1 000 µl (n)
ja	90% (9)	90% (9)
nein	10% (1)	10% (1)

Tab. 24: Vergleich der Ergebnisse der direkten Identifizierungen von gramnegativen Bakterien mit einem Probenvolumen von 200 µl und 1 000 µl von 10 verbundenen Stichproben, aus denen nur eine Spezies isoliert wurde

Identifizierung Chi-Quadrat-Test, p = 0,429	Probenvolumen	
	200 µl	1 000 µl
ja		50% (2)
nein	100% (4)	50% (2)

Tab. 25: Vergleich der Ergebnisse der direkten Identifizierungen von Sprosspilzen mit einem Probenvolumen von 200 µl und 1 000 µl von 4 verbundenen Stichproben, aus denen nur eine Spezies isoliert wurde

4.1.2 Analyse der Blutkulturflaschen mit 1 000 µl Probenvolumen

Direkt aus Blutkulturflaschen wurden bei einem Probenvolumen von 1 000 µl 61,8% der Mikroorganismen identifiziert. Die Ergebnisse der direkten Identifizierung der Gruppen der grampositiven Bakterien, der gramnegativen Bakterien und der Sprosspilze unterschieden sich signifikant voneinander (Chi-Quadrat-Test, $p \leq 0,001$) (s. Tab. 26, S. 50).

Identifizierung	Keimgruppe		
	Grampositive Bakterien (n)	Gramnegative Bakterien (n)	Sprosspilze (n)
ja	60,5% (228)	72% (85)	33,3% (8)
nein	39,5% (149)	28% (33)	66,7% (16)

Tab. 26: Ergebnisse der direkten Identifizierung mit einem Probenvolumen von 1 000 µl unterteilt nach Keimgruppe

In der Studie wurden 377 Isolate untersucht, die grampositive Erreger enthielten. Die größte Fraktion bildeten die Staphylokokken mit 260 Proben. Es wurden 167 Isolate direkt als Staphylokokken identifiziert, welches einer Identifizierungsrate von 64,2% entsprach. Von 152 *S. epidermidis*-Isolaten wurden 54,6% direkt aus der Blutkulturflasche identifiziert. Die Spezies *S. aureus* erreichte mit einem Wert von 81,3% die höchste direkte Identifizierungsrate innerhalb der Gruppe der Staphylokokken. Es wurden alle 57 Enterokokken von der Subkultur und 33 direkt aus Blutkulturflaschen identifiziert. Die direkte Identifizierungsrate betrug 57,9%. Die direkte Erregerbestimmung von *E. faecalis* gelang mit 66,7% besser als die von *E. faecium* mit 52,8%. Verglichen mit den Staphylokokken und den Enterokokken gelang die Identifizierung der Streptokokken weniger gut. Die Anzahl der *Streptococcus* spp. lag bei 31. Dabei gelang bei 14 Isolaten die direkte Identifizierung aus Blutkulturflaschen. Außerdem sind Abweichungen bezüglich der Spezies aufgetreten. Bei der Identifizierung des Erregers aus der Blutkulturflasche wurde mittels der MALDI-TOF Massenspektrometrie die Spezies in vier Fällen mit *Streptococcus pneumoniae* angegeben. Die Analyse von der Subkultur ergab eine Identifikation als *Streptococcus oralis*. Direkt aus Blutkulturflaschen wurden 78,3% der Enterobakteriazeen identifiziert. Die direkte Identifizierungsrate von *Escherichia coli* lag bei 87,5%. Der Gruppe der Nonfermenter wurden *Acinetobacter* spp., *Burkholderia* spp., *Pseudomonas* spp. und *Stenotrophomonas* spp. zugeordnet. Weitere Spezies dieser Gruppe wurden aus Einzelinfektionen nicht identifiziert. Insgesamt waren 19 Isolate dieser Gruppe zugehörig, von denen 63,2% direkt identifiziert worden sind. Die direkte Identifikation von *Pseudomonas* spp. erreichte einen Wert von 69,2%. Die verschiedenen Spezies, die von der Subkultur und direkt aus der Blutkulturflasche identifiziert worden sind, werden in den nachfolgenden Tabellen aufgezeigt (Tab. 27, S. 51–Tab. 29, S. 52).

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 377)		
<i>Aerococcus viridans</i>	1	0	1
<i>Bacillus</i> spp.	2	1	1
<i>Clostridium</i> spp.	1	0	0
<i>Clostridium paraputrificum</i>	1	0	0
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	3	1	1
<i>Corynebacterium</i> spp.	1	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	21	21	14
<i>Enterococcus faecium</i>	36	36	19
<i>Micrococcus luteus</i>	6	6	6
<i>Propionibacterium acnes</i>	14	12	5
<i>Staphylococcus aureus</i>	75	75	61
<i>Staphylococcus auricularis</i>	1	0	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	10	10	5
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	152	151	83
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	8	8	6
<i>Staphylococcus hominis</i>	10	10	8
<i>Staphylococcus pasteurii</i>	2	2	2
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	2	2	2
<i>Streptococcus agalacticae</i>	2	2	2
<i>Streptococcus anginosus</i>	2	2	0
<i>Streptococcus constellatus</i>	3	2	0
<i>Streptococcus mutans</i>	1	1	0
<i>Streptococcus oralis</i>	4	4	4
<i>Streptococcus parasanguinis</i>	1	0	1
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	16	16	5
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	1	1
<i>Streptococcus sanguinis</i>	1	1	1
nicht identifiziert		13	149

Tab. 27: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 1 000 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten grampositiven Bakterien aus positiven Blutkulturflaschen

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 118)		
<i>Achromobacter insolitus</i>	1	1	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	2	2	2
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	2	2	0
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	0	0
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	2	2	1
<i>Citrobacter brakii</i>	1	1	1
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	4	2
<i>Escherichia coli</i>	56	55	49
<i>Haemophilus influenza</i>	2	2	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	4	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	14	11
<i>Morganella morganii</i>	1	1	0
<i>Pantoea</i> sp.	2	0	0
<i>Proteus mirabilis</i>	4	4	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	12	8
<i>Pseudomonas</i> spp.	1	1	1
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	1	1	1
<i>Salmonella</i> sp.	2	2	2
<i>Serratia marcescens</i>	3	3	2
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	1	1	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	2	2	0
nicht identifiziert		4	33

Tab. 28: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 1 000 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten gramnegativen Bakterien aus positiven Blutkulturflaschen

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 24)		
<i>Candida albicans</i>	13	9	3
<i>Candida glabrata</i>	5	0	3
<i>Candida parapsilosis</i>	3	2	1
<i>Candida tropicalis</i>	2	2	1
<i>Fusarium</i> spp.	1	0	0
nicht identifiziert		11	16

Tab. 29: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 1 000 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten Sprosspilze aus positiven Blutkulturflaschen

Manche Proben zeigten bei der Aufarbeitung eine erhöhte Viskosität. Deshalb wurde zusätzlich die direkte Erregeridentifizierung in Abhängigkeit von der Viskosität der Probe analysiert (s. Tab. 30, S. 53, Tab. 31, S. 53). Die Identifizierungsrate von nicht viskosen Proben lag bei 66,4%. In dem Untersuchungszeitraum wurde bei 106 Proben eine erhöhte Viskosität beobachtet. Bei 56,6% der viskosen Proben gelang die direkte

Identifizierung des Erregers. Die Differenz von 9,8% wurde als nicht signifikant eingestuft (Chi-Quadrat-Test, $p = 0,138$). Auch bei Analyse der Differenz der Werte von der Subkultur und der direkten Identifizierung von viskosen und nicht viskosen Proben wurde kein signifikanter Unterschied mit dem Kruskal-Wallis-Test festgestellt ($p = 0,062$).

Identifizierung	Viskosität	
	nicht viskos (n)	viskos (n)
ja	66,4% (85)	56,6% (60)
nein	33,6% (43)	43,4% (46)

Tab. 30: Vergleich der direkten Erregeridentifizierung mit einem Probenvolumen von 1 000 μ l von viskosen und nicht viskosen Proben

	Messwertdifferenz (v. d. S. – direkt)	
	nicht viskos	viskos
Gesamtanzahl n	128	106
MW	0,229	0,318
SD	0,375	0,412
Median	0,201	0,296

Tab. 31: Differenz der Messwerte (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) der direkten Erregeridentifizierung mit einem Probenvolumen von 1 000 μ l von viskosen und nicht viskosen Proben und der Identifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

4.1.3 Analyse der Blutkulturflaschen mit 200 μ l Probenvolumen

Die Ergebnisse von 354 monomikrobiellen Isolaten mit einem Probenvolumen von 200 μ l wurden analysiert. Die Identifizierungsrate betrug 75,4%. Die Testergebnisse für grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien und Sprosspilze unterschieden sich signifikant voneinander (s. Tab. 32, S. 53). Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde ein Signifikanzniveau mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ ermittelt.

Identifizierung	Keimgruppe		
	Grampositive Bakterien (n)	Gramnegative Bakterien (n)	Sprosspilze (n)
ja	72,2% (177)	92,6% (88)	14,3% (2)
nein	27,8% (68)	7,4% (7)	85,7% (12)

Tab. 32: Ergebnisse der direkten Identifizierung mit einem Probenvolumen von 200 μ l unterteilt nach Keimgruppe

Die Mehrzahl der grampositiven Bakterien konnte den Staphylokokken zugeordnet werden ($n = 175$), deren direkte Identifizierungsrate 70,9% betrug. Es wurden 93% der *S. aureus*-Isolate und 55% der *S. epidermidis*-Isolate direkt aus der Blutkulturflasche

identifiziert. Die Erregerbestimmung der Enterokokken mit der Referenz- und der Studienmethode erfolgte zu 100%. Innerhalb der Gruppe der Streptokokken wurden 10 von 15 Isolaten direkt identifiziert. Die Identifizierungsrate der Enterobakteriazen betrug 98,8% (s. Tab. 33, S. 54–Tab. 35, S. 55).

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 245)		
<i>Bacillus cereus</i>	1	1	1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1	1	0
<i>Corynebacterium jeikeium</i>	1	1	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	11	11	11
<i>Enterococcus faecium</i>	15	15	15
<i>Granulicatella elegans</i>	6	6	0
<i>Lactobacillus paracasei</i>	1	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	3	2
<i>Micrococcus luteus</i>	3	3	3
<i>Propionibacterium acnes</i>	13	13	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	57	57	53
<i>Staphylococcus capitis</i>	3	3	3
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	100	99	55
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	7	7	6
<i>Staphylococcus hominis</i>	7	7	6
<i>Staphylococcus pettenkoferi</i>	1	1	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	2	2	1
<i>Streptococcus equinus</i>	2	2	2
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	11	11	7
nicht identifiziert		1	68

Tab. 33: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 200 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten grampositiven Bakterien aus positiven Blutkulturflaschen

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 95)		
<i>Bacteroides fragilis</i>	1	1	0
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	1	1	0
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	1	1	1
<i>Clostridium clostridioforme</i>	1	1	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	7	7
<i>Enterobacter kobei</i>	3	3	3
<i>Escherichia coli</i>	52	52	51
<i>Haemophilus influenza</i>	1	1	0
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	1	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	9	9	9
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	1	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	2	2
<i>Serratia marcescens</i>	14	14	14
<i>Sphingomonas adhaesiva</i>	1	1	0
nicht identifiziert		0	7

Tab. 34: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 200 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten gramnegativen Bakterien aus positiven Blutkulturflaschen

Spezies	Gesamtanzahl	ID v. d. S.	direkte ID
	(n = 14)		
<i>Candida albicans</i>	7	7	1
<i>Candida glabrata</i>	3	3	1
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	0
<i>Fusarium spp.</i>	1	0	0
<i>Geotrichum klebahnii</i>	1	0	0
<i>Issatchenkia orientalis</i>	1	1	0
nicht identifiziert		2	12

Tab. 35: Anzahl der direkt identifizierten (Probenvolumen 200 µl) und nach Subkultivierung (v. d. S.) identifizierten Sprosspilze aus positiven Blutkulturflaschen

Die Identifizierungsraten von viskosen und nicht viskosen Proben mit einem Probenvolumen von 200 µl zeigten keine signifikanten Unterschiede (Chi-Quadrat-Test, $p = 1,000$). Die Mittelwerte der Differenzen der *score values* der direkten Identifizierung und der Identifizierung v. d. S. waren für viskose Proben größer als die der nicht viskosen Proben. Die Analyse der Werte mit dem Kruskal-Wallis-Test ergab jedoch keine signifikante Abweichung der Werte ($p = 0,603$). Von 354 Proben wurde bei 45 Isolaten eine erhöhte Viskosität festgestellt (s. Tab. 36, S. 56, Tab. 37, S. 56).

Identifizierung	Viskosität	
	nicht viskos (n)	viskos (n)
ja	75,4% (233)	75,6% (34)
nein	24,6% (76)	24,4% (11)

Tab. 36: Vergleich der direkten Erregeridentifizierung mit einem Probenvolumen von 200 µl von viskosen und nicht viskosen Proben

	Messwertdifferenz (v. d. S. – direkt)	
	nicht viskos	viskos
Gesamtanzahl n	309	45
MW	0,132	0,184
SD	0,324	0,400
Median	0,098	0,139

Tab. 37: Differenz der Messwerte (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) der direkten Erregeridentifizierung mit einem Probenvolumen von 200 µl von viskosen und nicht viskosen Proben und der Identifizierung von der Subkultur (v. d. S.)

4.1.4 Ergebnisse der Identifizierung der Kontrollstämme

Zur Methodvalidierung wurden Blutkulturflaschen mit Erythrozytenkonzentrat beimpft und mit verschiedenen Kontrollstämmen inokuliert. Es wurden zwei verschiedene Verdünnungen mit ≤ 50 und ≤ 500 KbE hergestellt. Nach Inkubation der Flaschen wurde eine Identifizierung nach Studienprotokoll durchgeführt (s. 3.3.1, S. 31). Die Isolate wurden an zwei verschiedenen Tagen von Herrn Dr. Thomas Adam und der Doktorandin jeweils im Doppelsatz getestet. In der nachfolgenden Tabelle wurden die Ergebnisse der Messungen zusammengefasst (s. Tab. 38, S. 57, Tab. 39, S. 58).

Spezies	ATCC-Stamm	KbE	score value (MW)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	≤ 50	2,118
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	≤ 500	2,091
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	≤ 50	2,299
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	≤ 500	2,339
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	≤ 50	2,363
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	≤ 500	2,254
<i>Escherichia coli</i>	25922	≤ 50	2,412
<i>Escherichia coli</i>	25922	≤ 500	2,415
<i>Escherichia coli</i>	35218	≤ 50	2,348
<i>Escherichia coli</i>	35218	≤ 500	2,392
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	≤ 50	2,371

Spezies	ATCC-Stamm	KbE	score value (MW)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	≤ 500	2,318
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	≤ 50	2,042
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	≤ 500	2,031
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	≤ 50	2,271
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	≤ 500	2,230
<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	≤ 50	1,899
<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	≤ 500	1,872
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	≤ 50	2,283
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	≤ 500	2,264
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	≤ 50	1,992
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	≤ 500	1,858
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	700328	≤ 50	2,309
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	700328	≤ 500	2,268
<i>Streptococcus anginosus</i>	20563	≤ 50	2,102
<i>Streptococcus anginosus</i>	20563	≤ 500	2,092
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	≤ 50	2,267
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	≤ 500	2,206

Tab. 38: Ergebnisse (arithmetischer Mittelwert) der direkten Identifizierung der Kontrollstämme mit deren Stammsammlungsnummern und der Angabe der enthaltenen Keimzahl (KbE)

Die 14 verschiedenen Stämme wurden außerdem auf Blutagarplatten ausgestrichen und am darauf folgenden Tag mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie identifiziert.

Spezies	ATCC-Stamm	score value (MW)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	19606	2,463
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	2,238
<i>Enterococcus faecalis</i>	51299	2,318
<i>Escherichia coli</i>	25922	2,371
<i>Escherichia coli</i>	35218	2,413
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	700603	2,434
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	2,135
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27853	2,436
<i>Propionibacterium acnes</i>	6919	1,893
<i>Staphylococcus aureus</i>	29213	2,254
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	12228	1,955
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	700328	2,092

Spezies	ATCC-Stamm	score value (MW)
<i>Streptococcus anginosus</i>	20563	2,287
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	49619	2,281

Tab. 39: Ergebnisse (arithmetischer Mittelwert) der nach Subkultivierung identifizierten Kontrollstämme und deren Stammsammlungsnummern

4.1.5 Abhängigkeit der Ergebnisse von der durchführenden Person

In der Abb. 8 (S. 58) wurden die *score values* der direkten Identifizierung aus Blutkulturflaschen aufgetragen. Sie wurden nummeriert und die Streuungen dargestellt. Nach Analyse der Trendlinie wurde festgestellt, dass die direkte Identifizierung stetig bessere *score values* erzielte (s. 3.8, S. 43). Um die Proteine zu extrahieren, waren einige Bearbeitungsschritte nötig (s. 3.3.1, S. 31). Diese waren von dem Geschick und der Erfahrung des Laboranten abhängig. Die Trendlinie stellt insofern eine Lernkurve dar.

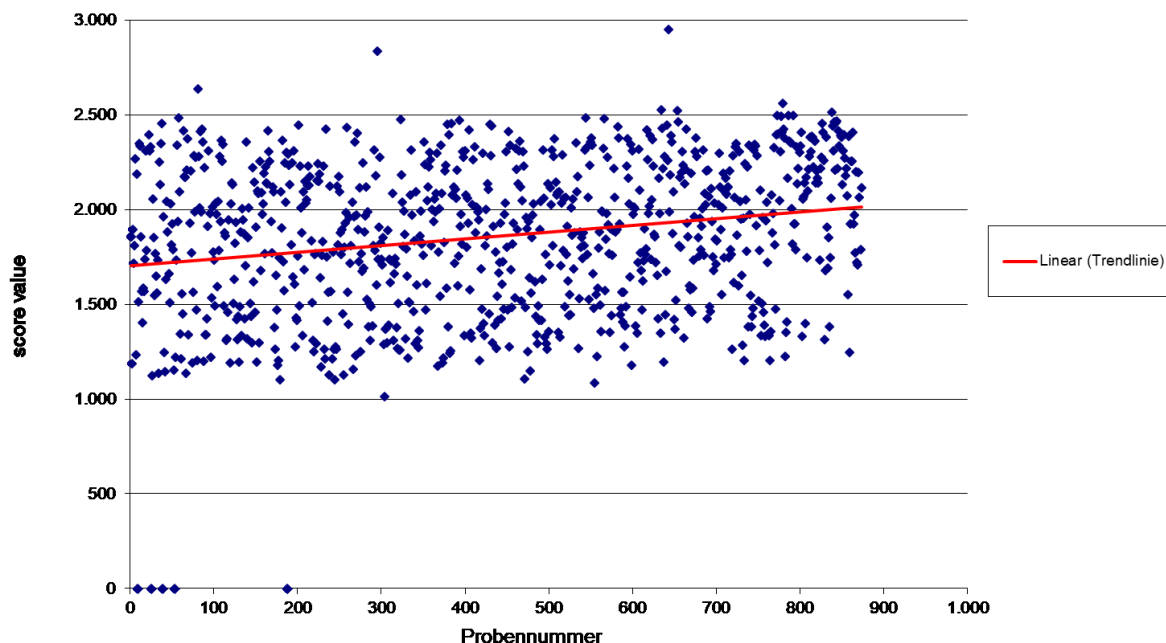


Abb. 8: *score values* der direkten Identifizierungen aus Blutkulturflaschen aller untersuchten Proben in dem Zeitraum vom 8.2.2010–14.5.2010

4.2 Ergebnisse der PCR

In dieser experimentellen Arbeit erfolgte die Erregeridentifizierung mittels MALDI-TOF-Analyse. Ist ein *Staphylococcus aureus* identifiziert worden, wurde das Isolat mit dem

BD GeneOhm™ StaphSR Test direkt auf MRSA untersucht. Als Referenz dienten die Befunde der Routinediagnostik des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Es wurden insgesamt 82 *S. aureus*-Isolate aus Blutkulturflaschen in 30 Testläufen untersucht, unabhängig davon ob es sich um eine Einzel- oder Mehrfachinfektion handelte. Die Präparation der Proben nahm ca. 20 bis 30 min in Anspruch. Im Durchschnitt brauchte der SmartCycler® DX 59 min und 32 s, um ein Ergebnis zu generieren.

Der BD GeneOhm™ StaphSR Test identifizierte 69 Erreger als MSSA und 13 Keime als MRSA. Die Referenzanalyse ergab ein abweichendes Ergebnis mit 15 MRSA und 67 MSSA. Demnach wurden 86,7% (Sensitivität) richtig als MRSA identifiziert. Die Spezifität betrug 100%. Aus den beiden Blutkulturflaschen mit dem abweichenden Ergebnis wurden jeweils zwei verschiedene Spezies identifiziert, ein MRSA und ein *P. aeruginosa*. Die Probenmaterialien mit diskrepanten Ergebnissen wurden einer aeroben und einer anaeroben Blutkulturflasche des gleichen Patienten entnommen. Als erweiterte Analyse wurde von den Proben, die für die experimentelle Studie verwendet wurden, und der Probe, die im Routinebetrieb analysiert wurde, eine Oxacillin-Resistenzbestimmung mittels E-Test durchgeführt. Im Routinebetrieb wurde bei zusammengehörenden Proben nur ein Isolat getestet. Für diese drei Isolate ergab sich ein Ergebnis von einer MHK > 256 mg/ml. Damit handelte es sich jeweils tatsächlich um MRSA. Wurden nur die Ergebnisse der untersuchten Einzelinfektionen betrachtet, stimmten sie zu 100% mit denen der Routinediagnostik überein. Aus 80 monomikrobiellen Isolaten aus Blutkulturflaschen wurden 13 MRSA und 67 MSSA identifiziert. Der Anteil an MRSA aus Einzelinfektionen lag bei 16,3%.

4.3 Ergebnisse der Resistenztestung

Die qualitativen Ergebnisse der Empfindlichkeitstests der Mikrodilutionsmethode des BD Phoenix™ Systems und des VITEK® 2 Systems wurden gegenübergestellt. Die Messergebnisse des in der Routinediagnostik verwendeten VITEK® 2 Systems stellten die Referenzwerte dar. Die verglichenen Antibiotika sind in Tab. 13 (S. 41) zu finden. Ein Vergleich der beiden Messwerte erfolgte nur, wenn beide Systeme einen Messwert detektierten. Mögliche Ursachen für fehlende Messwerte der mit dem BD Phoenix™ System getesteten Isolate waren fehlendes Wachstum in der Wachstumskontrolle, fehlende Inokulierung des AST-Panels, unzureichendes Wachstum der

Wachstumskontrolle, registrierte Füllfehler, unzureichende Indikatormenge im Panel und registrierte inkonsistente Werte für das Antibiotikum. Eine weitere Voraussetzung für die Analyse war die Übereinstimmung der Antibiotikakonzentrationen in den verwendeten Panels, um einen Vergleich nach EUCAST-Kriterien durchführen zu können.

Bei der Analyse der beiden Methoden fanden sich bei 3 081 von 3 337 verglichenen Messwerten der Resistenztestung Übereinstimmungen (92,3%). Bei 4,2% zeigte die Analyse eine geringe Abweichung der Messwerte (*minor error*) auf, sodass die Messwerte der Referenz- oder Studienmethode als intermediär und die der anderen Methode als resistent oder sensibel beurteilt wurden. Als *major errors* wurden Ergebnisse bewertet, die mit der Referenzmethode sensibel und mit der Studienmethode resistent bewertet wurden. Erzeugte die Referenzmethode resistente und die Studienmethode sensible Ergebnisse, so wurden die Fehler als *very major error* bezeichnet. Große Fehler (1%) und sehr große Fehler (2,5%) traten zusammen in weniger als 5% auf (s. Tab. 40, S. 61). Eine detaillierte Analyse ergab sich durch die Betrachtung der einzelnen Antibiotika und der verschiedenen Keimgruppen. Eine vollständige Übereinstimmung der Ergebnisse wurde für die Antibiotika Ampicillin, Aztreonam, Cefepim, Meropenem und Vancomycin ermittelt. Die meisten *very major errors* traten bei Fosfomycin (n = 24) und Teicoplanin (n = 31) auf.

Antibiotikum	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
Ampicillin	48	100%							48
Aztreonam	8	100%							8
Cefepim	8	100%							8
Cefuroxim	88	92,6%			5	5,3%	2	2,1%	95
Ciprofloxacin	323	98,2%	3	0,9%			3	0,9%	329
Erythromycin	219	97,4%	1	0,4%	4	1,8%	1	0,4%	225
Fosfomycin	199	88,4%			2	0,9%	24	10,7%	225
Gentamicin	103	97,2%	3	2,8%					106
Imipenem	102	96,2%	4	3,8%					106
Levofloxacin	92	94,9%	4	4,1%			1	1%	97
Linezolid	271	98,5%			3	1,1%	1	0,4%	275
Meropenem	106	100%							106
Moxifloxacin	172	77,1%	46	20,6%			5	2,2%	223
Oxacillin	221	97,8%			3	1,3%	2	0,9%	226

Antibiotikum	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
Penicillin	184	94,9%			3	1,5%	7	3,6%	194
Piperacillin	101	97,1%	3	2,9%					104
Piperacillin/ Tazobactam	90	87,4%	11	10,7%	1	1%	1	1%	103
Teicoplanin	223	84,5%			10	3,8%	31	11,7%	264
Tetracyclin	159	71%	59	26,3%	2	0,9%	4	1,8%	224
Tobramycin	91	92,9%	5	5,1%	2	2%			98
Vancomycin	273	100%							273
Gesamtergebnis	3 081	92,3%	139	4,2%	35	1%	82	2,5%	3 337

Tab. 40: Übereinstimmung der Ergebnisse der direkten Resistenztestung und der Resistenztestung mit dem VITEK® 2 System für jedes Antibiotikum (Anteil am Gesamtergebnis des einzelnen Antibiotikums in Prozent) unterteilt nach *category agreement* (CA), *minor error* (minE), *major error* (majE) und *very major error* (vmE)

Das ursprüngliche Protokoll für die Resistenztestung mit dem BD Phoenix™ System sah ein Probenvolumen von 25 µl vor. Bei 483 Proben wurde das 10-fache Probenvolumen verwendet und mit den 25 µl-Proben verglichen. Bei Teicoplanin und Linezolid zeigten sich bei *S. epidermidis* und *E. faecium* Abweichungen zwischen den Ergebnissen. Wurde ein erhöhtes Probenvolumen verwendet, wurden die Ergebnisse nach EUCAST häufiger als resistent anstatt als sensibel bewertet. Für Linezolid wurden 37 Isolate verglichen. Davon wurden die Ergebnisse von 17 Proben mit 250 µl Probenvolumen als resistent anstatt als sensibel bewertet.

4.3.1 Analyse innerhalb der Keimgruppen

Die analysierten Spezies wurden sechs Gruppen zugeordnet. Die grampositiven Erreger wurden in Enterokokken (EK), koagulasenegative Staphylokokken (KNS) und *Staphylococcus aureus* (STAU) eingeteilt (s. Tab. 41, S. 62). Die gramnegativen Mikroorganismen wurden *Acinetobacter baumannii* (ACL), Enterobakteriazeen (EN) und *Pseudomonas aeruginosa* (PYO) zugeordnet. Die Ergebnisse von *A. baumannii* und der Gruppe der Enterokokken zeigten mit 100% und 99,5% die höchsten Übereinstimmungsraten mit der Referenzmethode. Es folgten in abnehmender Reihenfolge *P. aeruginosa* (98,4%), *S. aureus* (97,6%), die Gruppe der Enterobakteriazeen (94,9%) und KNS (87,7%). Der Gruppe der KNS konnten 89% der *very major errors*, 71,4% der *major errors* und 69,8% *minor errors* zugeordnet werden. Weitere *very major errors* traten bei den Enterobakteriazeen (4,9%), *Staphylococcus*

aureus (4,9%) und den Enterokokken (1,2%) auf. Beim Vergleich der Resultate für *A. baumannii* und *P. aeruginosa* resultierten keine sehr großen Fehler.

Kategorie	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
ACL	6	0,2%							6
KNS	1 394	45,2%	97	69,8%	25	71,4%	73	89%	1 589
EK	193	6,3%					1	1,2%	194
EN	820	26,6%	32	23%	8	22,9%	4	4,9%	864
PYO	63	2%	1	0,7%					64
STAU	605	19,6%	9	6,5%	2	5,7%	4	4,9%	620
Gesamtergebnis	3 081	100%	139	100%	35	100%	82	100%	3 337

Tab. 41: Übereinstimmung der Ergebnisse der direkten Resistenztestung und der Resistenztestung mit dem VITEK® 2 System für die Keimgruppen *Acinetobacter baumannii* (ACL), koagulasenegative Staphylokokken (KNS), Enterokokken (EK), Enterobakteriazeen (EN), *Pseudomonas aeruginosa* (PYO) und *S. aureus* (STAU) unterteilt nach *category agreement* (CA), *minor error* (minE), *major error* (majE) und *very major error* (vmE)

Es wurden 3 337 verschiedene Hemmkonzentrationen verglichen. Davon konnten 1 301 Ergebnisse dem *S. epidermidis* und 620 Ergebnisse dem *S. aureus* zugeordnet werden. Für die Spezies *E. coli* wurden 495 Resultate verglichen. Die größte Anzahl von *very major errors* trat bei der Analyse der Hemmkonzentrationen von *S. epidermidis* (n = 47), *S. haemolyticus* (n = 12) und *S. hominis* (n = 12) auf. Eine vollständige Übereinstimmung der Resultate lagen für *S. auricularis*, *S. capitis*, *E. faecium*, *A. baumannii*, *R. ornithinolytica* und *Salmonella* spp. vor. Grampositive Mikroorganismen wurden in 2 403 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen untersucht und es fand sich eine Übereinstimmung bei 2 192 Isolaten (91,2%). Gramnegative Mikroorganismen wurden in 934 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen untersucht, wobei sich eine Übereinstimmung bei 889 Isolaten (95,2%) ermitteln ließ. Es traten in dieser Gruppe 4 *very major errors* (0,4%) auf, wohingegen in der vorher genannten Gruppe die Anzahl 78 (3,2%) betrug (s. Tab. 42, S. 63).

Grampositive Keime	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
<i>Staphylococcus auricularis</i>	9	100%							9
<i>Staphylococcus capitis</i>	72	100%							72
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1 146	88,1%	86	6,6%	22	1,7%	47	3,6%	1 301

Grampositive Keime	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	79	79,8%	6	6,1%	2	2%	12	12,1%	99
<i>Staphylococcus hominis</i>	63	77,8%	5	6,2%	1	1,2%	12	14,8%	81
<i>Staphylococcus warneri</i>	25	92,6%					2	7,4%	27
<i>Enterococcus faecalis</i>	91	98,9%					1	1,1%	92
<i>Enterococcus faecium</i>	102	100%							102
<i>Staphylococcus aureus</i>	605	97,6%	9	1,5%	2	0,3%	4	0,6%	620
	2 192	91,2%	106	4,4%	27	1,1%	78	3,2%	2 403
Gramnegative Keime									
Gramnegative Keime	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6	100%							6
<i>Enterobacter cloacae</i>	60	95,2%	1	1,6%	1	1,6%	1	1,6%	63
<i>Escherichia coli</i>	477	96,4%	12	2,4%	4	0,8%	2	0,4%	495
<i>Klebsiella oxytoca</i>	15	71,4%	5	23,8%			1	4,8%	21
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	119	94,4%	5	4%	2	1,6%			126
<i>Proteus mirabilis</i>	14	77,8%	4	22,2%					18
<i>Proteus vulgaris</i>	8	88,9%	1	11,1%					9
<i>Raoultella ornithinolytica</i>	8	100%							8
<i>Salmonella</i> spp.	16	100%							16
<i>Serratia marcescens</i>	103	95,4%	4	3,7%	1	0,9%			108
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63	98,4%	1	1,6%					64
	889	95,2%	33	3,5%	8	0,9%	4	0,4%	934

Tab. 42: Übereinstimmung der Ergebnisse der direkten Resistenztestung und der Resistenztestung mit dem VITEK® 2 System für grampositive und gramnegative Bakterien unterteilt nach *category agreement* (CA), *minor error* (minE), *major error* (majE) und *very major error* (vmE)

4.3.2 Analyse nach Spezies und Antibiotikum

Der Gruppe der KNS wurden 1 589 verglichene Antibiotika zugeordnet. Die meisten *very major errors* traten bei den Antibiotika Teicoplanin (20,3%) und Fosfomycin (14,7%) auf. Auf diese beiden Antibiotika fielen somit mehr als 75% aller *very major errors* innerhalb dieser Gruppe. Bei Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Oxacillin, Penicillin und Tetracyclin traten *very major errors* in weniger als 5% der Fälle auf. Eine hohe Anzahl von *minor errors* wurde für Tetracyclin (n = 59) und Moxifloxacin (n = 38) ermittelt. *Very major errors* bei Penicillin wurden für *S. epidermidis* (n = 6) und *S. aureus* (n = 1) ermittelt. Für Teicoplanin traten *very major errors* bei *S. epidermidis* (n = 27), *S. haemolyticus* (n = 1) und *S. hominis* (n = 3) auf. Die *very major errors* für Fosfomycin wurden den Keimen *S. epidermidis* (n = 9), *S. haemolyticus* (n = 8) und *S. hominis* (n = 7) zugeordnet.

In der Gruppe der Enterokokken wurden vier Antibiotika verglichen. Daraus resultierten 194 Vergleiche und 193 Übereinstimmungen mit der Referenzmethode. Ein *very major error* trat bei Linezolid für *E. faecalis* auf. Bei Ampicillin, Teicoplanin und Vancomycin stimmten die Ergebnisse mit der Referenzmethode überein.

Für *P. aeruginosa* konnten 64 Antibiotika-Konzentrationen verglichen werden. Bei 63 getesteten Bakterien-Antibiotika-Kombinationen konnte eine Übereinstimmung ermittelt werden. Bei Ciprofloxacin trat 1 *minor error* auf.

Die Gruppe der Enterobakteriazeen zeigte 864 Resultate. Es traten 4 *very major errors* auf, die den Antibiotika Piperacillin/Tazobactam (n = 1), Cefuroxim (n = 2) und Levofloxacin (n = 1) zugeordnet werden konnten. Es traten 32 *minor errors* auf, die bei allen getesteten Antibiotika auftraten. Bei der Analyse innerhalb der Spezies ergab sich ein *very major errors* bei Piperacillin/Tazobactam für *E. cloacae*. Die beiden *very major errors* für Cefuroxim ließen sich *E. coli* (n = 2) und für Levofloxacin dem Keim *K. oxytoca* (n = 1) zuordnen.

Für die Spezies *S. aureus* wurden 620 Messwerte verglichen, von denen 605 übereinstimmende Resultate zeigten. Außerdem zeigten die Ergebnisse 4 *very major errors*, 2 *major errors* und 9 *minor errors*. Bei der Analyse von Penicillin, Ciprofloxacin, Erythromycin und Moxifloxacin trat jeweils 1 *very major error* auf. Jeweils 1 *major error* wurde für Penicillin und Oxacillin ermittelt (s. Tab. 43, S. 66).

Kategorie	Antibiotikum	CA	minE	majE	vmE	Gesamtergebnis
-----------	--------------	----	------	------	-----	----------------

Kategorie	Antibiotikum	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
ACL	Ciprofloxacin	1	100%							1
	Gentamicin	1	100%							1
	Imipenem	1	100%							1
	Levofloxacin	1	100%							1
	Meropenem	1	100%							1
	Tobramycin	1	100%							1
ACL Summe		6	100%							6
KNS	Ciprofloxacin	162	98,8%					2	1,2%	164
	Erythromycin	159	97,5%			4	2,5%			163
	Fosfomycin	137	84%			2	1,2%	24	14,7%	163
	Linezolid	161	98,2%			3	1,8%			164
	Moxifloxacin	119	73,9%	38	23,6%			4	2,5%	161
	Oxacillin	160	97,6%			2	1,2%	2	1,2%	164
	Penicillin	124	93,9%			2	1,5%	6	4,5%	132
	Teicoplanin	112	73,2%			10	6,5%	31	20,3%	153
	Tetracyclin	97	59,9%	59	36,4%	2	1,2%	4	2,5%	162
	Vancomycin	163	100%							163
KNS Summe		1 394	87,7%	97	6,1%	25	1,6%	73	4,6%	1 589
EK	Ampicillin	48	100%							48
	Linezolid	48	98%					1	2%	49
	Teicoplanin	49	100%							49
	Vancomycin	48	100%							48
EK Summe		193	99,5%					1	0,5%	194
EN	Cefuroxim	88	92,6%			5	5,3%	2	2,1%	95
	Ciprofloxacin	92	97,9%	2	2,1%					94
	Gentamicin	94	96,9%	3	3,1%					97
	Imipenem	93	95,9%	4	4,1%					97
	Levofloxacin	91	94,8%	4	4,2%			1	1%	96
	Meropenem	97	100%							97
	Piperacillin	93	96,9%	3	3,1%					96
	Piperacillin/ Tazobactam	82	86,3%	11	11,6%	1	1,1%	1	1,1%	95
	Tobramycin	90	92,8%	5	5,2%	2	2,1%			97
EN Summe		820	94,9%	32	3,7%	8	0,9%	4	0,5%	864

Kategorie	Antibiotikum	CA		minE		majE		vmE		Gesamtergebnis
PYO	Aztreonam	8	100%							8
	Cefepim	8	100%							8
	Ciprofloxacin	7	87,5%	1	12,5%					8
	Gentamicin	8	100%							8
	Imipenem	8	100%							8
	Meropenem	8	100%							8
	Piperacillin	8	100%							8
	Piperacillin/ Tazobactam	8	100%							8
PYO Summe		63	98,4%	1	1,6%					64
STAU	Ciprofloxacin	61	98,4%					1	1,6%	62
	Erythromycin	60	96,8%	1	1,6%			1	1,6%	62
	Fosfomycin	62	100%							62
	Linezolid	62	100%							62
	Moxifloxacin	53	85,5%	8	12,9%			1	1,6%	62
	Oxacillin	61	98,4%			1	1,6%			62
	Penicillin	60	96,8%			1	1,6%	1	1,6%	62
	Teicoplanin	62	100%							62
	Tetracyclin	62	100%							62
	Vancomycin	62	100%							62
STAU Summe		605	97,6%	9	1,5%	2	0,3%	4	0,6%	620
Gesamtergebnis		3 081	92,3%	139	4,2%	35	1%	82	2,5%	3 337

Tab. 43: Übereinstimmung der Ergebnisse der direkten Resistenztestung und der Resistenztestung mit dem VITEK® 2 System für die Keimgruppen *Acinetobacter baumannii* (ACL), koagulasenegative Staphylokokken (KNS), Enterokokken (EK), Enterobakteriazeen (EN), *Pseudomonas aeruginosa* (PYO) und *S. aureus* (STAU) unterteilt nach *category agreement* (CA), *minor error* (minE), *major error* (majE) und *very major error* (vmE) aufgelistet nach Antibiotikum

4.3.3 Ergebnisse der Mikrobouillonverdünnungstests bei Verdacht auf Bildung von Breitspektrumbetalaktamasen

Bei einer Probe trat eine unterschiedliche Bewertung bezüglich der Betalaktamasebildung auf. Mittels des BD Phoenix™ Systems wurde in der aeroben und in der anaeroben Blutkulturflasche ein ESBL bildender Stamm nachgewiesen. In der Routinediagnostik wurde ein Isolat aus der aeroben Blutkulturflasche analysiert und kein ESBL-Bildner nachgewiesen. Von diesen drei analysierten Proben wurden Mikrodilutionsplatten zum Nachweis von ESBL inokuliert und gemäß der

Arbeitsanweisung inkubiert (s. 3.7, S. 42). Für das Isolat aus der anaeroben Blutkulturflasche und das Isolat, welches in der Routinediagnostik verwendet wurde, wurden mit dem Mikrobouillonverdünnungstest keine ESBL nachgewiesen. Das Ergebnis des Tests der dritten Probe zeigte einen Verdacht auf ESBL-Bildung. Die Diskrepanz erklärt sich am ehesten durch eine Mischinfektion mit einem ESBL positiven und einem ESBL negativem Isolat derselben Spezies, die makroskopisch nicht unterscheidbar waren.

4.3.4 Zeit bis zum Analyseergebnis relevanter Antibiotika

Über einen ausgewählten Zeitraum von vier Wochen wurde die Zeit bis zum Analyseergebnis für einige Indexantibiotika ermittelt. Die relevanten Antibiotika wurden den einzelnen Keimgruppen Enterobakteriazeen, Nonfermenter, Enterokokken, KNS und *S. aureus* zugeordnet (s. Tab. 44, S. 67).

EN	NF	EK	KNS	STAU
Cefotaxim	Ceftazidim	Ampicillin	Oxacillin	Oxacillin
Ciprofloxacin	Ciprofloxacin	Vancomycin	Vancomycin	Vancomycin
Meropenem	Meropenem			
	Tobramycin			

Tab. 44: Indexantibiotika der verschiedenen Keimgruppen Enterobakteriazeen (EN), Nonfermenter (NF), Enterokokken (EK), koagulasenegative Staphylokokken (KNS) und *S. aureus* (STAU)

Für die Gruppe der Enterobakteriazeen konnten alle MHK-Werte für Cefotaxim und Ciprofloxacin nach 9 h abgelesen werden. Nach 10 h lagen alle Ergebnisse für Meropenem vor (s. Abb. 9, S. 68).

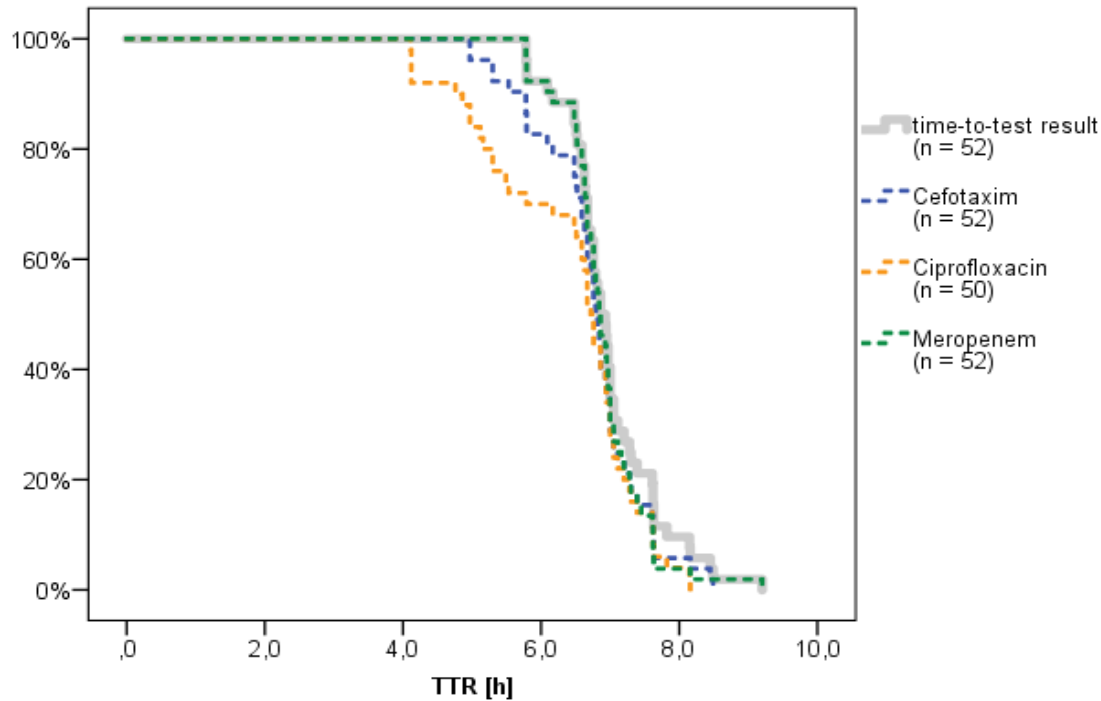


Abb. 9: Dauer der Empfindlichkeitsprüfung der Indexantibiotika bei Enterobakteriazeen und deren Anteil der noch in Bearbeitung befindlichen Empfindlichkeitsprüfungen in Abhängigkeit von der Bearbeitungszeit (TTR = *time-to-result*)

Für die Messergebnisse der Gruppe der Enterobakteriazeen wurde anhand der Varianzanalyse ein signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$) zwischen den Analysezeiten der Indexantibiotika ermittelt (Tab. 45, S. 68). Der Post-Hoc-Test nach Tukey zeigte, dass sich die Zeiten bis zum Testergebnis von Ciprofloxacin und Meropenem signifikant voneinander unterschieden (Tab. 46, S. 69).

ANOVA, $p = 0,012$		Antibiotikum		
		Cefotaxim (n = 52)	Ciprofloxacin (n = 50)	Meropenem (n = 52)
Zeit [h]	MW	6,7	6,4	6,9
	SD	0,8	1,1	0,6
	Median	6,8	6,7	6,9

Tab. 45: Ergebnisse der Varianzanalyse (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) für die Indexantibiotika Cefotaxim, Meropenem und Ciprofloxacin der Gruppe der Enterobakteriazeen

Antibiotikum		Mittlere Differenz	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
Cefotaxim (n = 52)	Cefotaxim (n = 52)					
	Ciprofloxacin (n = 50)	0,34	0,168	0,109	-0,057	0,736
	Meropenem (n = 52)	-0,154	0,166	0,623	-0,547	0,239
Ciprofloxacin (n = 50)	Cefotaxim (n = 52)	-0,34	0,168	0,109	-0,736	0,057
	Ciprofloxacin (n = 50)					
	Meropenem (n = 52)	-0,494	0,168	0,01	-0,89	-0,097
Meropenem (n = 52)	Cefotaxim (n = 52)	0,154	0,166	0,623	-0,239	0,547
	Ciprofloxacin (n = 50)	0,494	0,168	0,01	0,097	0,89
	Meropenem (n = 52)					

Tab. 46: Ergebnisse des Post-Hoc-Tests nach Tukey für die Indexantibiotika Cefotaxim, Meropenem und Ciprofloxacin der Gruppe der Enterobakteriaeen

Für die Gruppe der Nonfermenter wurden die Antibiotika Ceftazidim, Ciprofloxacin, Meropenem und Tobramycin für die Analyse herangezogen (s. Abb. 10, S. 69).

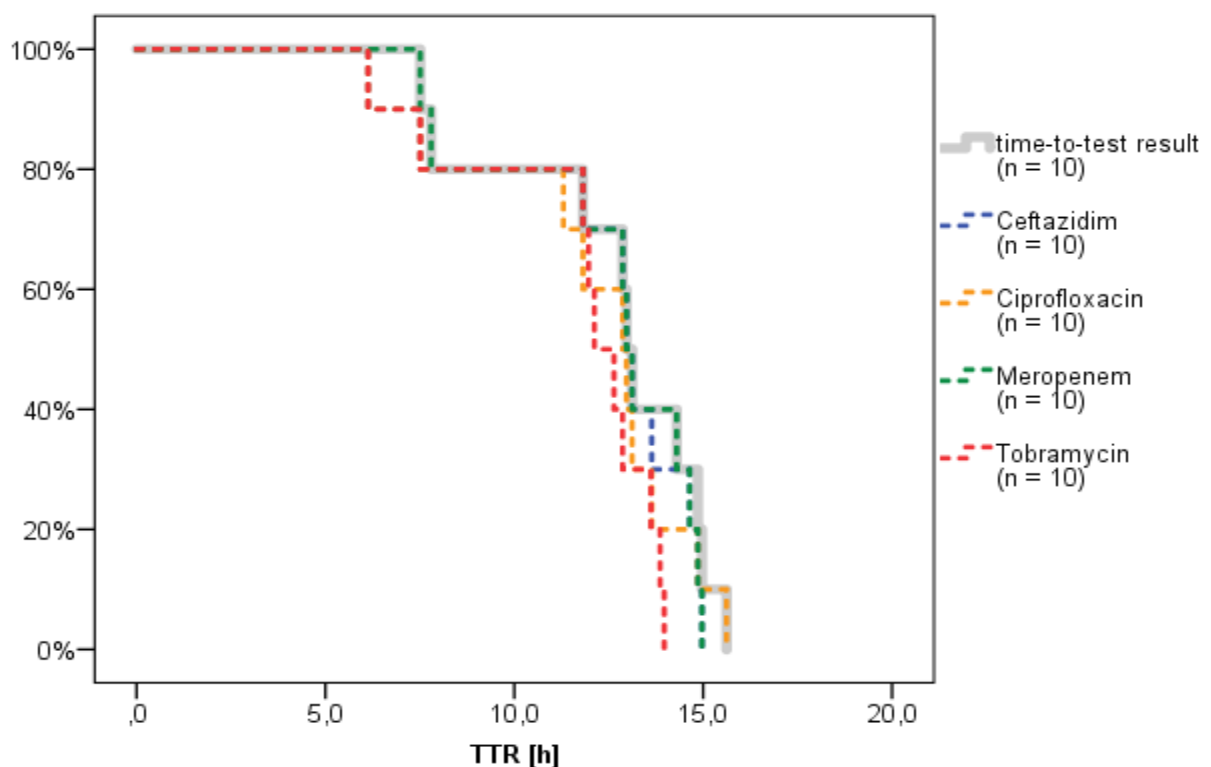


Abb. 10: Dauer der Empfindlichkeitsprüfung der Indexantibiotika bei Nonfermentern und deren Anteil der noch in Bearbeitung befindlichen Empfindlichkeitsprüfungen in Abhängigkeit von der Bearbeitungszeit (TTR = *time-to-result*)

Die Varianzanalyse der Messwerte der Indexantibiotika für die Gruppe der Nonfermenter ergab keine signifikanten Unterschiede. Die schnellste Analysezeit bis zum Testergebnis wurde für Tobramycin ermittelt. Die Werte konnten im Mittel nach 11,7 h abgelesen werden (s. Tab. 47, S. 70).

ANOVA, $p = 0,925$		Antibiotikum			
		Ceftazidim (n = 10)	Ciprofloxacin (n = 10)	Meropenem (n = 10)	Tobramycin (n = 10)
Zeit [h]	MW	12,6	12	12,5	11,7
	SD	3,1	3	2,7	2,7
	Median	13,1	12,9	13,1	12,4

Tab. 47: Ergebnisse der Varianzanalyse (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) für die Indexantibiotika Ceftazidim, Ciprofloxacin, Meropenem und Tobramycin der Gruppe der Nonfermenter

Für die Gruppe der Enterokokken wurden die Antibiotika Ampicillin und Vancomycin betrachtet. Innerhalb von 11 h konnten alle Ergebnisse für Ampicillin abgelesen werden. Nach 13 h lagen alle Resultate für das Antibiotikum Vancomycin vor (s. Abb. 11, S. 70).

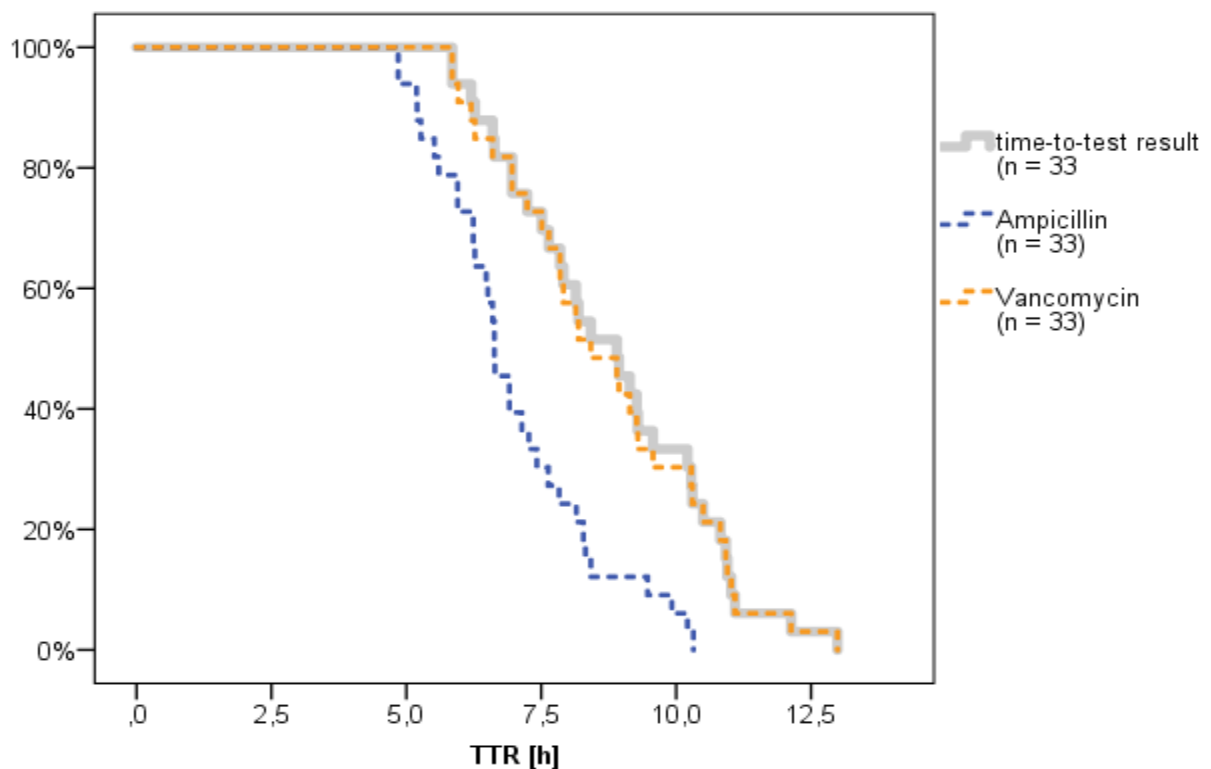


Abb. 11: Dauer der Empfindlichkeitsprüfung der Indexantibiotika bei Enterokokken und deren Anteil der noch in Bearbeitung befindlichen Empfindlichkeitsprüfungen in Abhängigkeit von der Bearbeitungszeit ($TTR = \text{time-to-result}$)

Die Analysezeiten für Ampicillin und Vancomycin unterschieden sich in der Gruppe der Enterokokken signifikant voneinander ($p \leq 0,001$). Der Mittelwert lag für Ampicillin bei 7 h und für Vancomycin bei 8,7 h (Tab. 48, 71).

t-Test, $p < 0,001$		Antibiotikum	
		Ampicillin (n = 33)	Vancomycin (n = 33)
Zeit [h]	MW	7	8,7
	SD	1,5	1,9
	Median	6,6	8,4

Tab. 48: Ergebnisse der Varianzanalyse (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) für die Indexantibiotika Ampicillin und Meropenem der Gruppe der Enterokokken

In der Gruppe der KNS wurde die TTR von 62 Bakterien-Antibiotika-Konzentrationen verglichen. Nach maximal 16 h lagen alle Ergebnisse für Vancomycin und Oxacillin vor (s. Abb. 12, S. 71).

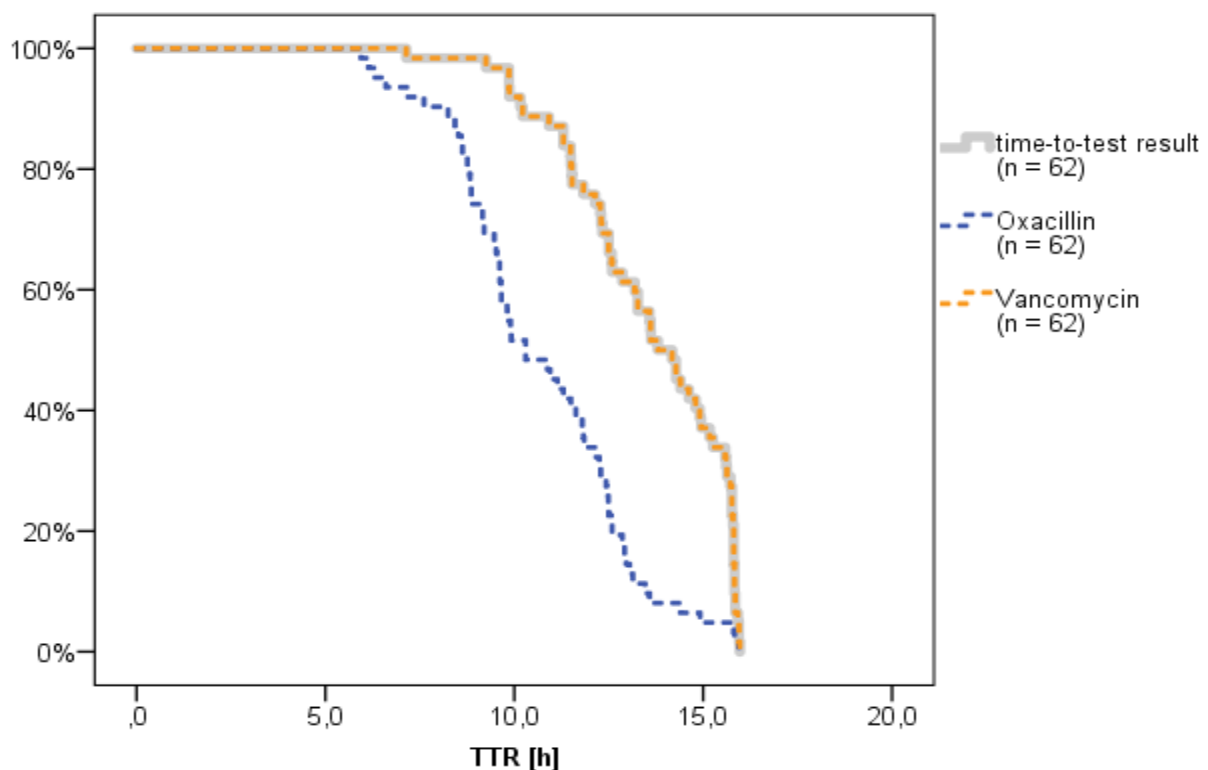


Abb. 12: Dauer der Empfindlichkeitsprüfung der Indexantibiotika bei koagulase-negativen Staphylokokken und deren Anteil der noch in Bearbeitung befindlichen Empfindlichkeitsprüfungen in Abhängigkeit von der Bearbeitungszeit (TTR = *time-to-result*)

Die Zeit bis Ergebnis der MHK unterschied sich für Oxacillin und Vancomycin signifikant ($p \leq 0,001$). Im Mittel lagen die Werte für Oxacillin nach 10,7 h und für Vancomycin nach 13,6 h vor (s. Tab. 49, S. 72).

t-Test, $p < 0,001$		Antibiotikum	
		Oxacillin (n = 62)	Vancomycin (n = 62)
Zeit [h]	MW	10,7	13,6
	SD	2,4	2,2
	Median	10,3	14

Tab. 49: Ergebnisse des t-Tests (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) für die Indexantibiotika Oxacillin und Vancomycin der Gruppe der koagulasenegativen Staphylokokken

Nach 12 h konnten 97,4% der Ergebnisse für Vancomycin und Oxacillin für die analysierten *S. aureus*-Isolate abgelesen werden (s. Abb. 13, S. 72). Es wurden im gewählten Untersuchungszeitraum 33 MSSA und 6 MRSA identifiziert. Der Vergleich der beiden Varietäten ergab keinen Unterschied zwischen den Zeiten bis zum Ergebnis.

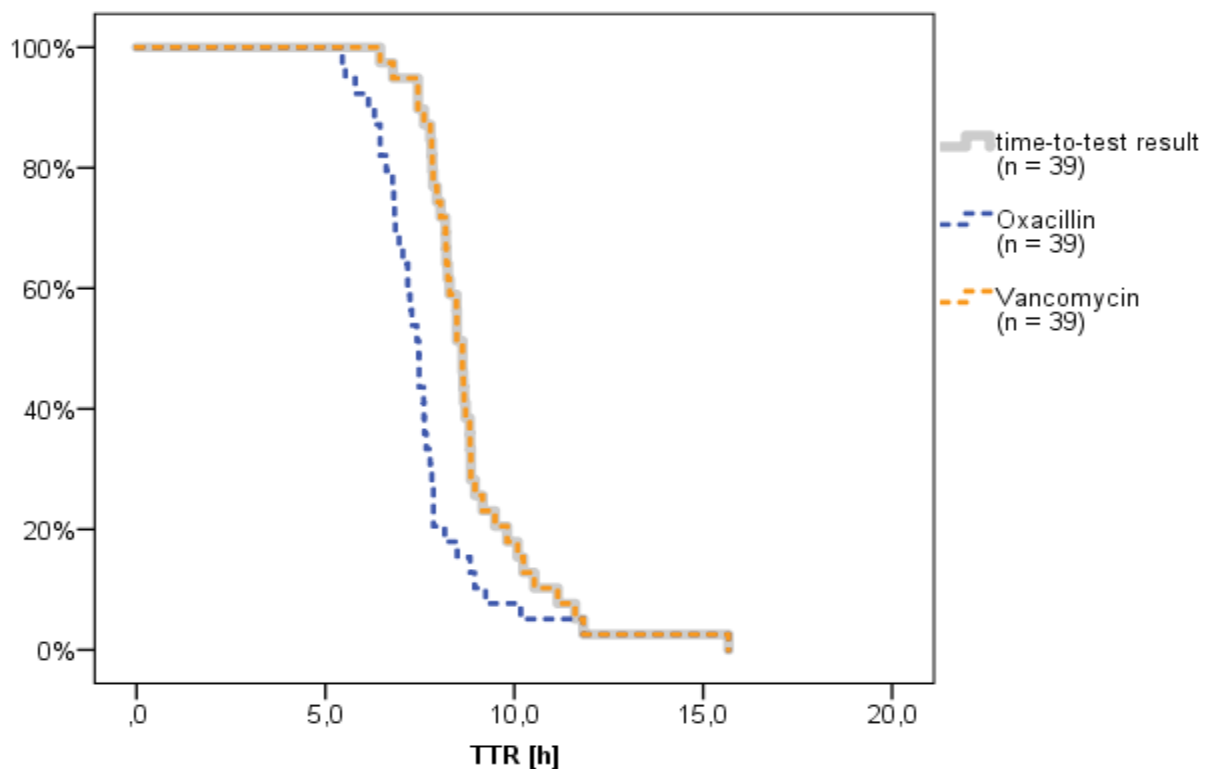


Abb. 13: Dauer der Empfindlichkeitsprüfung der Indexantibiotika bei *S. aureus* und deren Anteil der noch in Bearbeitung befindlichen Empfindlichkeitsprüfungen in Abhängigkeit von der Bearbeitungszeit (TTR = *time-to-result*)

Die Mittelwerte für Oxacillin und Vancomycin lagen bei 7,7 h bzw. 8,9 h (s. Tab. 50, S. 73). Anhand des t-Tests wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Testdauern nachgewiesen ($p \leq 0,05$).

t-Test, p = 0,002		Antibiotikum	
		Oxacillin (n = 39)	Vancomycin (n = 39)
Zeit [h]	MW	7,7	8,9
	SD	1,8	1,6
	Median	7,5	8,6

Tab. 50: Ergebnisse des t-Tests (arithmetischer Mittelwert, Standardabweichung und Median) für die Indexantibiotika Oxacillin und Vancomycin der *S. aureus*-Isolate

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Studie waren die Beschleunigung der Erregeridentifizierung und der Antibiotigrammerstellung aus positiven Blutkulturflaschen ohne Subkultivierung. Neben konventionellen Verfahren wurden die Massenspektrometrie, ein Mikrobouillondilutionstest und eine PCR zur Identifizierung bzw. Resistenzbestimmung von Mikroorganismen aus Blutkulturflaschen evaluiert. Sämtliche Ergebnisse wurden mit mindestens einer Referenzmethode verglichen. Die konventionelle mikrobiologische Diagnostik wurde durch die in der experimentellen Studie durchgeführte Identifizierung aus der positiven Blutkulturflasche mittels MALDI-TOF MS, die direkte Inokulierung der AST-Systeme und die Durchführung einer real-time PCR bei MRSA-Verdacht beschleunigt. Die Vor- und Nachteile sowie der klinische Nutzen der einzelnen Verfahren werden im Folgenden erläutert.

5.1 Diskussion der Methoden

Die Blutkulturdiagnostik ist nach wie vor die wichtigste mikrobiologische Untersuchung bei Sepsisverdacht. In deutschen Krankenhäusern werden Blutkulturen im europäischen Vergleich eher selten abgenommen [48]. Die Positivraten der Blutkulturen schwanken enorm und häufig kommt es durch unzureichende Hygienemaßnahmen bei der Blutabnahme zur Kontamination der Blutkulturen. Jedoch ist nach erfolgter Identifizierung und Resistenztestung ein gezielter Antibiotikaeinsatz möglich, welcher der Entstehung bzw. Selektion resistenter Erreger entgegenwirkt [63; 134]. Kalkulierte Antibiotikagaben, die über einen zu langen Zeitraum verordnet werden, können zu einer Zunahme der Resistenzentwicklung verschiedener Mikroorganismen und zur Verdrängung der natürlichen bakteriellen Flora führen [123]. Ein zeitsparendes, kostengünstiges Verfahren zur Diagnostik ist essenziell, um eine zielgerichtete Therapie rasch einleiten zu können und damit die gezielte Antibiotikatherapie zu deeskalieren. In der durchgeführten Studie wurde die Identifizierung von Mikroorganismen direkt aus positiven Blutkulturflaschen mittels Massenspektrometrie durchgeführt, wodurch sich die Zeit bis zum Nachweis des Erregers um einen Arbeitstag verkürzen ließ. Die Verwendung eines Massenspektrometers erlaubt eine Keimbestimmung innerhalb weniger Minuten [88].

Als Referenzmethoden wurden die Identifizierung mittels MALDI-TOF MS von der Subkultur und die Resistenzbestimmung mit dem VITEK® 2 System der Routinediagnostik gewählt. Die Identifizierung mittels MALDI-TOF MS von der Subkultur wird in der Literatur mit einer Genauigkeit von 84,1% bis 95,4% beschrieben [13; 35; 61; 138]. Die Zuverlässigkeit der Resistenzbestimmung mittels VITEK® 2 System wurde in verschiedenen Publikationen für grampositive Kokken mit 96% und für gramnegative Spezies mit 84,2% bis 95,6% Übereinstimmung angegeben. Diese Empfindlichkeitstestung wurde von den Autoren als schnelle und verlässliche Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen bezeichnet, weshalb sie als Referenzmethode ausgewählt wurde [57; 102; 105].

In der vorgestellten wissenschaftlichen Arbeit wurden 1 033 Proben untersucht, von denen bei 160 eine Mischinfektion vorlag. Somit konnte bei einer hohen Fallzahl von 873 Isolaten die Identifizierung direkt aus Blutkulturflaschen mittels MALDI-TOF MS untersucht werden. Aktuell ist eine Identifizierung von zwei verschiedenen Mikroorganismen aus einer Blutkulturflasche nach Extraktion mit dem MALDI Sepsityper® Kit und anschließender Massenspektrometrie nicht sicher möglich. Hier sind dieser Methode Grenzen gesetzt. Es werden verschiedene Methoden zur Lyse der Zellen diskutiert; beispielsweise mit Saponin oder Ammoniumchlorid [117]. Im Jahr 2017 veröffentlichten die Autoren Tanner *et al.* die Ergebnisse einer Studie, in der Saponin, SDS und das Sepsityper® Kit als Reagenzien zur Zelllyse miteinander verglichen wurden. Es wurde kein signifikanter Unterschied der Methoden zur direkten Identifizierung mit einem *score value* $\geq 1,700$ festgestellt. Die Identifizierungsraten betragen 69% (Saponin), 72% (SDS) und 74% (Sepsityper® Kit) [150]. Des Weiteren kann das untersuchte Blutkulturvolumen variiert werden, welches einen Einfluss auf die Größe des Pellets hat [117]. Eine Beeinflussung der Ergebnisse ist zudem durch die Zentrifugationsdauer zu erreichen. So führt eine übermäßige Zentrifugation zu einer verminderten Vitalität der Keime. Eine ausreichende Zentrifugationsdauer ist jedoch nötig, um Verunreinigungen mit sich ablösenden Pellets zu minimieren.

Bei einigen Isolaten trat eine erhöhte Viskosität während der Verarbeitung auf, die die exakte und ausreichende Entnahme der Überstände erschwerte. Die Ursache dieses Phänomens war unklar. Man kann spekulieren, dass DNA aus humanen Zellen – etwa Leukozyten – hierfür ursächlich war. Da allerdings keine hämatologischen Daten zu den hier untersuchten Proben vorlagen, konnte diese Vermutung nicht geprüft werden. Um

ein reproduzierbares Ergebnis zu erhalten, ist eine einfache, mit wenigen Einzelschritten durchzuführende Aufbereitung der Proben notwendig. In der vorliegenden Studie ist zu erkennen, dass mit deren fortschreitender Dauer die Qualität der Identifizierung stieg. Diese Beobachtung lässt sich am ehesten als Lerneffekt bei der Durchführung des Protokolls deuten. Für die Zukunft wäre eine automatisierte Aufbereitung der Proben denkbar und wünschenswert, um möglichst standardisierte Bedingungen zu schaffen.

Der direkte Mikrodilutionstest aus positiven Blutkulturflaschen mit dem BD Phoenix™ System ist eine einfache, kostengünstige Methode zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration. In der durchgeführten Studie wurden 3 337 Kombinationen aus Antibiotikum und Mikroorganismus analysiert. Die genaue Einhaltung des Versuchsprotokolls war essenziell, um mögliche Fehlerquellen zu minimieren. Bei der Verarbeitung der Proben sind einige Fehlerquellen aufgefallen. Die Zentrifugationsdauer sollte ausreichend sein, um eine Sedimentierung der Blutzellen in das Gel des SST-Röhrchens zu ermöglichen. Eine unsachgemäße Resuspendierung des Pellets im SST-Röhrchen nach der Zentrifugation war zu vermeiden, um eine Kontamination des Überstandes möglichst auszuschließen. Die Suspension wurde in ein Röhrchen mit ID Inokulum überführt und auf die optische Dichte von 0,5 bis 0,6 nach McFarland eingestellt (s. 1.7, S. 21). Diese optische Dichte sollte einer Keimzahl von $1,5 \times 10^8$ KbE/ml im Inokulum entsprechen, welche jedoch in der hier vorgestellten Studie nicht überprüft worden ist. In einer Publikation von anderen Autoren konnte gezeigt werden, dass die geforderte Inokulumgröße von grampositiven Kokken mit einem 0,5 McFarland Standard häufig unterschritten wurde. Die Autoren vermuteten, dass möglicherweise andere in den Proben enthaltene Blutbestandteile die Trübung beeinflusst hatten [11]. Im BD Phoenix™ System wurden daraufhin Fehler wie z. B. fehlendes Wachstum in der Wachstumskontrolle, fehlende Inokulierung des AST-Panels oder unzureichendes Wachstum der Wachstumskontrolle gemeldet.

5.2 Diskussion der Ergebnisse der Identifizierung

In der durchgeführten Untersuchung wurden die Identifizierungen von Mikroorganismen direkt aus positiven Blutkulturflaschen und von Subkulturen mit einem Massenspektrometer miteinander verglichen. Die herkömmlichen Tests zur Identifizierung beruhen auf der Analyse phänotypischer Eigenschaften nach

Subkultivierung der Mikroorganismen auf unterschiedlichen Nährmedien. Durch die direkte Entnahme des Versuchsmaterials aus der Blutkulturflasche entfiel in der vorliegenden Untersuchung die Inkubationszeit der Subkultur. Die direkte Identifizierung mit dem Massenspektrometer ist mit einem relativ geringen Arbeitsaufwand verbunden, ermöglicht kurze Analysezeiten und erfordert nur wenige Verbrauchsmaterialien [13].

Es sind in der vorliegenden wissenschaftlichen Studie 1 033 Isolate untersucht worden. Bei 5,5% der Proben wurden verschiedene Punktate anstatt Vollblut in Blutkulturflaschen bebrütet. Mischinfektionen wurden bei 160 Proben ermittelt. Eine Identifizierung aller vorliegenden Pathogene in Blutkulturflaschen ist zurzeit mit dem MALDI Sepsityper[®] Kit nicht zuverlässig. Wurden zwei oder mehr verschiedene Spezies aus einer Blutkulturflasche isoliert, konnte in 80% der Fälle eine der Spezies direkt identifiziert werden. Andere Autoren beschrieben bei ähnlicher Fragestellung, dass bei 56,7% (97/171) und 64,52% (20/31) die Identifizierung eines der enthaltenen Keime gelang [43; 91]. Eine weitere Untersuchung von 26 polymikrobiellen Blutkulturen zeigte, dass sich die *scores* von denen der monomikrobiellen Blutkulturen nicht unterschieden. In dieser Studie gelang bei 96,2% der polymikrobiellen Proben der Nachweis einer der enthaltenen Spezies [58]. Die Kontrolle durch eine Subkultur bleibt somit obligat, um Mehrfachinfektionen sicher zu erkennen. Mit der Referenzmethode konnten 96,4% der Keime von einer Subkultur identifiziert werden. 31 Erreger konnten mit dieser Methode nicht identifiziert werden. In einer Publikation von Seng *et al.* wurden 1 660 Isolate untersucht, von denen 95,4% mittels MALDI-TOF MS von der Subkultur richtig identifiziert wurden. Die unzureichende Identifizierung einiger Spezies wurde durch fehlende Einträge in der Datenbank erklärt [138]. Diese Ergebnisse entsprechen denen einer weiteren Veröffentlichung von Cherkaoui *et al.*, in der 680 von 720 Isolaten nach Kultivierung identifiziert wurden. Die Ergebnisse stimmten mit mehr als 99% mit den Ergebnissen der Referenzmethode überein [19].

In der hier vorliegenden Arbeit wurden 97,7% von 622 grampositiven Isolaten nach Kultivierung identifiziert. Laut einer anderen publizierten Studie, in der retrospektiv 327 und prospektiv 980 Isolate untersucht wurden, lagen die Werte für Staphylokokken bei 94,3% und für Streptokokken bei 84,8%. Außerdem wurde demonstriert, dass das Kulturmedium, die Inkubationstemperatur und die Inkubationsdauer der Proben keinen Einfluss auf das Ergebnis der Identifizierung hatten [154]. Sind die Ergebnisse von der Subkultur unzureichend, ist eine Extraktion von 1 bis 2 KbE möglich. Bei der

Extraktionsmethode wird durch Zugabe von Chemikalien oder Enzymen die Lyse der Zellen hervorgerufen, sodass eine Freisetzung der Proteine stattfindet. Durch Anwendung dieses Protokolls konnten die Identifizierungsraten signifikant verbessert werden [1]. Zum Teil war eine Steigerung um 37% zu erkennen [154]. Eine weitere Publikation von Dupont *et al.* konnte demonstrieren, dass die Identifizierung von KNS mittels MALDI-TOF MS den Resultaten des BD Phoenix™ Systems und des VITEK® 2 Systems überlegen war [33]. In dieser durchgeführten Untersuchung wurden 98,1% der gramnegativen Mikroorganismen von der Subkultur identifiziert. Bei 4 von 213 Isolaten erfolgte keine Erregerbestimmung. Dass der Anteil an korrekten Identifizierungen von gramnegativen Bakterien höher ist als von grampositiven, wurde auch in anderen Veröffentlichungen bestätigt [133; 154]. In der Gruppe der Sprosspilze wurden 65,8% von 38 Isolaten von der Subkultur richtig identifiziert. Bei ähnlicher Fragestellung wurde in einer Studie von Bizzini *et al.* für lediglich 4% von 24 untersuchten Isolaten durch direkte Applikation der Kolonien auf das Target eine korrekte Bezeichnung ermittelt. Durch Extraktion und Lyse der Zellwände wurde das Ergebnis auf 100% verbessert [12]. Die Extraktionsmethode scheint ein sinnvolles Verfahren zu sein, um die Identifizierungsraten von Sprosspilzen mittels MALDI-TOF MS zu verbessern [29; 111].

Das Verfahren der Extraktion direkt aus Blutkulturflaschen wurde in der hier vorgestellten Untersuchung mit der Identifizierung von der Subkultur verglichen. Die Ergebnisse der Referenz- und der Studienmethode unterschieden sich signifikant voneinander. Wurde die Extraktionsmethode mit 1 000 µl Probenvolumen angewendet, lag der Anteil der identifizierten, grampositiven Mikroorganismen bei 60,5%. Von den gramnegativen Erregern konnten 72% aus Blutkulturflaschen direkt identifiziert werden. Der Wert für die Sprosspilze lag bei 33,3%. Bei Betrachtung der Proben mit 200 µl Probenvolumen wurden 72,2% der grampositiven, 92,6% der gramnegativen Bakterien und 14,3% der Sprosspilze identifiziert. Szabados *et al.* berichteten im Jahr 2011 über eine geringe Sensitivität der Identifizierung direkt aus der positiven Blutkultur (30%), in dem sie 268 positive Blutkulturen aus 11 verschiedenen Krankenhäusern untersuchten. Sie stellten außerdem fest, dass eine Identifizierung von mehr als einem Keim nicht gelang [146]. Im Gegensatz dazu wird in einem Review von 21 Publikationen die Identifizierungsrate mittels MALDI Sepsityper® Kit von 3 320 positiven monomikrobiellen Blutkulturen mit 79,8% angegeben. Die Bestimmung von gramnegativen Mikroorganismen zeigte, wie auch in der vorliegenden Studie, bessere Ergebnisse

(89,6%) als die von grampositiven Mikroorganismen (76,1%) und Sprosspilzen (65,9%) [117]. Eine andere Autorengruppe analysierte die Daten von 32 Studien. Die direkten Identifizierungsraten lagen für grampositive Bakterien im Durchschnitt bei 72% und für gramnegative Bakterien durchschnittlich bei 92% [132]. In einer weiteren Studie war bei 83,94% der Mikroorganismen die direkte Erregeridentifizierung mittels MALDFI-TOF aus der Blutkultur (n = 460) erfolgreich. Für gramnegative Bakterien wurde eine höhere Identifizierungsrate als für grampositive Bakterien ermittelt [8]. Aktuellere Studien zeigen bessere Ergebnisse, die wahrscheinlich durch die Verbesserung der Datenbank und der Software begründet sind. Auch war unsere Studie explizit nicht auf maximale Identifizierungen, sondern auf Praxistauglichkeit mit geringem Personalaufwand ausgelegt (kein Nachmessen, etc.).

Die Aktualität der Datenbank der verwendeten Software ist von essenzieller Bedeutung. Es können nur Mikroorganismen identifiziert werden, deren Spektrum in der Software hinterlegt ist. Die Biotyper™-Software analysiert und vergleicht im Wesentlichen Spektren ribosomaler Proteine. Wenn für einige Spezies erst wenige Spektren hinterlegt sind und/oder die ribosomalen Proteine der verschiedenen Spezies sich ähneln, kann daraus eine falsche Bestimmung auf Speziesebene resultieren; wie z. B. innerhalb der *Streptococcus mitis*-Gruppe [138; 167; 175]. *S. sanguis*, *S. pneumoniae*, *S. oralis* und *S. parasanguis* werden dieser Gruppe zugeordnet und weisen eine sehr enge phylogenetische Verwandtschaft auf [84].

Die in der durchgeführten Untersuchung ermittelten Ergebnisse weichen von den im Review beschriebenen Daten ab. Eine mögliche Ursache dafür ist die Patientenselektion. Die verwendeten Proben stammten von intensivmedizinisch betreuten Patienten. Auch eine vorangegangene Antibiotikatherapie beeinflusste möglicherweise die Ergebnisse der direkten Erregeridentifizierung aus Blutkulturflaschen. Bei vielen Proben wurde eine erhöhte Viskosität festgestellt, die eine sachgerechte Verarbeitung erschwerte. Es konnte gezeigt werden, dass durch Verminderung des Probenvolumens bei grampositiven Bakterien bessere Ergebnisse erzielt wurden (s. Tab. 23, S. 49). Für gramnegative Bakterien und Sprosspilze konnte kein Einfluss auf die Identifizierungsrate nachgewiesen werden. In späteren Untersuchungen wurde gefunden, dass es für die Identifizierung von Pilzen wichtig ist, das Pellet vor der Proteinextraktion zu trocknen. Die Autoren ergänzten deshalb das hier verwendete Protokoll um einen Trocknungsschritt von 6 [120] oder 10 Minuten. Die

Trocknungszeit scheint kritisch zu sein, weil längere Trocknungszeiten als 10 Minuten bei Pilzen zu schlechteren Ergebnissen führen [71]. Zur Erhöhung der Identifizierungsraten wurden in anderen Publikationen auch niedrigere scores als Identifizierung akzeptiert [71], während andere Autoren bei kritischeren Bewertungen der scores zu erheblich niedrigeren Identifizierungsergebnissen gelangten [130]. Auch dürfte die Verwendung gespikter Proben [120] zu anderen Ergebnissen führen als tatsächliche Patientenproben, weil mit normalem Blut von Gesunden beimpfte Blutkulturflaschen andere Granulozytenzahlen enthalten als dies bei Patienten mit Blutstrominfektionen meist der Fall ist. Insofern sind die publizierten Identifizierungsraten nicht ohne Weiteres miteinander vergleichbar.

Die Verwendung des MALDI Sepsityper[®] Kits wurde in der vorliegenden Studie unter Routinebedingungen getestet. Es wurden alle an einem Tag positiv gemeldeten Blutkulturflaschen untersucht, um explizit einen Arbeitsablauf mit hoher Durchsatzrate zu simulieren. Deshalb wurde in dieser Studie bewusst auf das zeitaufwändige manuelle Nachmessen der Isolate mittels MALDI-TOF MS verzichtet. Auch wäre bei Hinzuzufügen eines zusätzlichen Trocknungsschritts bei der Zahl der zu bearbeitenden Proben (12–32) nicht mehr alle Proben von einer Person taggleich zu bearbeiten gewesen, zumal eine parallele Bearbeitung von Proben wegen der im Protokoll enthaltenen Zentrifugationsschritte nur sehr begrenzt möglich gewesen wäre. Daher ist es nicht überraschend, dass die direkten Identifizierungsergebnisse aus Blutkulturflaschen etwas schlechter sind als die in der Literatur beschriebenen unter experimentellen Laborbedingungen maximal erreichbaren Ergebnisse.

Durch eine molekularbiologische Diagnostik lässt sich häufig ein Zeitgewinn gegenüber der konventionellen, phänotypischen Diagnostik erreichen. Aktuell gibt es verschiedene Methoden zur Identifizierung von Sepsiserregern, die auf der Analyse von Nukleinsäuren basieren. So werden neben den klassischen PCR-Verfahren auch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen angeboten. Der Nachweis erfolgt dabei direkt aus dem Patientenblut oder aus der positiven Blutkultur. Es sollten 20 bis 25 Spezies sicher erfasst werden können, um ca. 90% der wichtigsten Sepsiserreger abdecken zu können [70].

In einer Studie von Schreiber *et al.* wurde das Blut von an Sepsis erkrankter Patienten mittels dreier verschiedener PCR-Verfahren untersucht und mit der konventionellen Blutkulturdiagnostik verglichen. Mit der PCR waren 12% (SepsiTest[®]), 10% (VYOO[®])

und 14% (LightCycler® SeptiFast) der Blutproben positiv, wohingegen mit der konventionellen Blutkulturdiagnostik 26% der Blutproben einen positiven Erregernachweis zeigten. Die Detektionsrate der PCR-Methoden war somit geringer als die der konventionellen Blutkulturdiagnostik [135]. Mit der LightCycler® SeptiFast Methode können 25 Sepsiserreger identifiziert werden, indem drei real-time PCR-Amplifikationsreaktionen parallel laufen. Josefson *et al.* ermittelten für diese Methode eine hohe Spezifität und einen hohen negativen Vorhersagewert (> 97%). Aufgrund der niedrigen Sensitivität und des suboptimalen positiven Vorhersagewerts wurde jedoch von den Autoren keine Empfehlung für die Routinediagnostik ausgesprochen [78]. Ein Vorteil der LightCycler® SeptiFast Methode ist die Analyse aus dem Vollblut, da die Zeit bis zur Positivmeldung der Blutkulturflasche entfällt. Die Zeit von der Blutabnahme am Patienten bis zum Vorliegen der Erregeridentität wurde von einer Autorengruppe mit 15,9 h angegeben [148]. Ein weiteres kommerziell erhältliches System zur Keimbestimmung aus Blutkulturen ist das Prove-it™ Sepsis System (Mobidiag, Esbo, Finnland). Mittels dieser auf Microarrays basierenden Analyse ist es möglich, 60 verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien und 13 Spross- und Fadenpilze zu identifizieren. Es findet außerdem ein *mecA*-Gen-Nachweis statt, um eine Infektion mit MRSA auszuschließen. Bis zum Ergebnis vergehen 3,5 h und der Zeitgewinn gegenüber der konventionellen Blutkulturdiagnostik liegt bei ca. 18 h [47]. Die klinische Sensitivität und die Spezifität werden mit 94,7% und 98,8%, beziehungsweise mit 100% für MRSA-Infektionen, angegeben [153].

5.3 Diskussion der Ergebnisse der PCR

Zur Bestimmung Methicillin-resistenter *S. aureus* wurde bei allen Bakterien dieser Spezies eine real-time PCR durchgeführt. Es wurden 82 Erreger direkt aus positiven Blutkulturflaschen untersucht, von denen 13 als MRSA und 69 als MSSA identifiziert wurden. Wurden nur die Monoinfektionen betrachtet, stimmten die Ergebnisse mit der Routinediagnostik überein. Bei zwei Isolaten lag eine Mehrfachinfektion mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* vor. Es gelang kein Nachweis eines MRSA mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test, wohingegen die Referenzmethode mit dem E-Test von der Subkultur einen MRSA nachgewiesen hatte. Beide Proben stammten von demselben Patienten, sodass davon ausgegangen wird, dass es sich um dasselbe Phänomen handelte. Möglicherweise lag beim MRSA dieses Patienten ein seltener MRSA-Typ vor, der vom

BD GeneOhm™ StaphSR Test nicht erfasst wurde. Zhang *et al.* untersuchten 484 MRSA-Stämme mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test. 11 Isolate wurden nicht als MRSA erkannt. Die Autoren erklärten diese Fehlinterpretation unter anderem durch das Vorhandensein von SSCmec-Elementen an einer neuen linken Insertionsstelle [174]. In einer Studie mit 59 nach Subkultivierung getesteten Isolaten aus der positiven Blutkultur wurden 8,3% der MRSA als MSSA identifiziert und 4,3% der MSSA negativ für *S. aureus* getestet. Die MRSA-spezifische Zielsequenz liegt in der Nähe der rechten Insertionsstelle des SSCmec und wird *mec right extremity junction* (MREJ) genannt. Der in der zitierten Arbeit verwendete assay beschreibt 7 verschiedene MREJ Typen, doch sind aktuell mindestens 13 weitere bekannt [140]. Huletsky *et al.* beschrieben im Jahr 2004 eine PCR-Methode, mit der sie 1 657 MRSA-Isolate testeten. Diese enthielten eine Mischung verschiedener Staphylokokken. Der verwendete assay kombinierte 5 für die SCCmec-Sequenz spezifische Primer mit einem Primer und 3 Molecular-Beacon-Sonden, die spezifisch für das chromosomale *S. aureus* orfX Gen waren. Für diese Untersuchung wurden Referenzstämme verwendet und 98,7% der MRSA wurden nachgewiesen. Die Amplifikation von MRSA wurde durch das Vorhandensein anderer Spezies nicht beeinflusst [69]. Eine amerikanische Autorengruppe untersuchte in einer klinischen Studie 95 *S. aureus*-Isolate aus positiven Blutkulturen. Mit dem BD GeneOhm™ StaphSR Test wurden 54 Isolate als MRSA bestimmt. Die Referenzmethode ermittelte 50 MRSA-Nachweise. So wurden mit der real-time PCR zwei MSSA und zwei Isolate einer anderen Gattung als MRSA ausgewiesen. Daraus ergab sich eine Sensitivität von 100% und eine Spezifität von 98,4% [144].

Wie auch in der hier vorgestellten Studie, wurde in einer anderen Untersuchung die Identifizierung von Mikroorganismen mit MALDI-TOF MS mit einer real-time PCR kombiniert. Es wurden 91 *S. aureus*-Spezies mittels MALDI-TOF MS identifiziert. Mit dem Xpert® MRSA/SA BC assay (Fa. Cepheid) wurden alle 66 MSSA-Isolate und 24 von 25 MRSA-Isolaten bestimmt. Bei dieser Methode wurde die Identifizierung des *S. aureus* anhand des Nachweises des spa-Gens vorgenommen. Die MRSA-Bestimmung fand durch die Detektion von *mecA*, SCCmec und *orfX* statt. Die Genauigkeit der beiden Testmethoden MALDI-TOF MS und der real-time PCR lag somit bei 98,9%. Laut Autoren lag die Zeit bis zum Ergebnis nach Positivmeldung der Blutkultur bei ca. 4 h [131]. Bei ähnlicher Fragestellung ermittelten Clerc *et al.* in 57

Zyklen einen Mittelwert von 201 min bis zum Ergebniszeitpunkt [21]. Zurzeit wird die Möglichkeit der MRSA-Bestimmung mittels MALDI-TOF MS untersucht. Es wird angenommen, dass sich durch das Vorhandensein von *mec*-Elementen bei resistenten *S. aureus*-Stämmen ein charakteristisches Spektrum mit Peaks in anderen Bereichen als bei MSSA zeigt. Es zeigte sich auch, dass verschiedene Faktoren wie z. B. die Matrixkonzentration, die Inkubationszeit und die Trocknung der Matrix die Ergebnisse beeinflusst hatten. Jedoch sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig, um die Genauigkeit der Methode zu verifizieren [72; 109; 172].

5.4 Diskussion der Ergebnisse der Resistenztestung

Die Referenzmethode der vorliegenden Studie beinhaltete die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration mit dem VITEK® 2 System von der Subkultur. Als Studienmethode wurde direkt eine Resistenztestung aus Blutkulturflaschen mit dem BD Phoenix™ System durchgeführt. Es wurden 3 337 verschiedene Messwerte verglichen. Bei 92,3% wurde eine Übereinstimmung mit der Referenzmethode ermittelt. Es traten 4,2% *minor errors*, 1% *major errors* und 2,5% *very major errors* auf. Somit lag die Rate von *major* und *very major errors* zusammen unter 5%. Laut einer Veröffentlichung von Jorgensen *et al.* sollte bei einer zuverlässigen Resistenztestung im Vergleich mit der Referenzmethode die Übereinstimmungsrate mehr als 90% und die *major* und *very major errors* weniger als 5% betragen, um als zuverlässig zu gelten [77]. Maelegheer *et al.* untersuchten 101 Isolate mit grampositiven und gramnegativen Bakterien. Die Resistenztestung erfolgte mit dem Phoenix Instrument direkt aus positiven Blutkulturflaschen. Nach verschiedenen Zentrifugations- und Waschvorgängen wurde aus dem Pellet eine Suspension mit einer Trübung von 0,5 McFarland hergestellt und die Messung durchgeführt. Die Ergebnisse der untersuchten Methode stimmten zu 98,9% mit der Referenzmethode überein. Es traten keine *very major errors*, 4 *major errors* und 8 *minor errors* auf [108].

Eine andere Studiengruppe untersuchte die direkte Antibiogrammerstellung von 309 positiven Blutkulturen mit gramnegativen Bakterien mit dem BD Phoenix™ System. Daraus ergab sich ein Vergleich von 6 180 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen. Als Referenzmethode wurde die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration mit dem VITEK® 1 System von der Subkultur gewählt. Die Übereinstimmung der Studienmethode mit der Referenzmethode lag bei 99%. Es traten *minor* (0,8%), *major*

(0,1%) und *very major errors* (0,1%) auf. *Very major errors* wurden für Ampicillin (n = 3) und Cefuroxim (n = 2) ermittelt. Jeweils einer trat bei Cefotaxim, Piperacillin und Piperacillin/Tazobactam auf. *Minor errors* zeigten sich vorwiegend bei Gentamicin (n = 15), Cefuroxim (n = 9), Amoxicillin/Clavulansäure (n = 9) und Piperacillin (n = 8) [46]. In einer weiteren Publikation von Wimmer *et al.* wurden 1 895 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen von 50 beimpften Blutkulturen und 60 Patientenblutkulturen analysiert. Es wurden nur gramnegative Spezies untersucht und als Referenzmethode wurde die Resistenztestung von der Subkultur mit dem BD Phoenix™ System gewählt. Nach dem Vergleich der beiden Methoden wurden 1,37% *minor errors*, 0,32% *major errors* und 0,26% *very major errors* ermittelt, welches einer Übereinstimmungsrate von 98,05% entsprach. Es wurden insgesamt 5 *very major errors* für Tetracyclin, Cefuroxim, Aztreonam und Cefazolin (n = 2) ermittelt [168]. In der vorliegenden Studie ergab die Betrachtung der gramnegativen Mikroorganismen eine Übereinstimmung von 95,2%. Große und sehr große Fehler traten in 0,9% und 0,4% der Fälle auf. Bei der Analyse von 934 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen wurden *very major errors* für Cefuroxim (n = 2), Levofloxacin (n = 1) und Piperacillin/Tazobactam (n = 1) ermittelt. Die Fehlerrate in der hier vorgestellten Untersuchung war für gramnegative Bakterien etwas höher als in der Vergleichsliteratur angegeben.

Für grampositive Bakterien wurde eine Übereinstimmung mit der Referenzmethode von 91,2% ermittelt. Im Vergleich mit den gramnegativen Spezies traten mehr *major errors* (1,1%) und *very major errors* (3,2%) auf. In einer Veröffentlichung aus dem Jahr 2011 wurden die Ergebnisse der direkten Resistenztestung aus Blutkulturen mit dem BD Phoenix™ System von 84 grampositiven Isolaten mit einer Referenzmethode verglichen. Als Referenzmethode wurde die Resistenztestung von der Subkultur auf Blutagarplatten gewählt. Sie wurden bei 35 °C in Anwesenheit von 5% CO₂ inkubiert. Das Probenvolumen laut Standardprotokoll wurde verzehnfacht und betrug 250 µl. Es wurde ein Vergleich zwischen der Messung direkt aus der Blutkultur und nach Subkultivierung durchgeführt. Bei 735 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen wurde eine Übereinstimmung von 93,1% ermittelt. Es traten 1,7% *minor errors*, 4,2% *major errors* und 0,9% *very major errors* auf. Trat eine Diskrepanz zwischen den Werten auf, wurden für die Antibiotika Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefuroxim, Ciprofloxacin, Clindamycin, Levofloxacin, Moxifloxacin, Linezolid, Penicillin, Piperacillin, Piperacillin/Tazobactam und Tobramycin ein E-Test und für Amoxicillin, Amoxicillin/Clavulansäure,

Erythromycin, Gentamicin, Oxacillin, Rifampicin, Tetracyclin und Trimethoprin/Sulfamethoxazol eine Bouillon-Mikrodilution nach CLSI-Standard als Referenzmethode gewählt. Die Übereinstimmung dieser Referenzmethode mit der Studienmethode betrug hier 95,4%. Die Raten für *minor*, *major* und *very major errors* betrugen 1,1%, 3,1% und 0,4% [11].

Eine weitere Autorengruppe wählte, wie in der vorliegenden Studie, die Messung von der Subkultur mit dem VITEK® 2 System als Referenzmethode. Es wurden 778 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen von 68 Patienten untersucht. Dabei wurden nur grampositive Bakterien berücksichtigt. Den Blutproben wurde vor der Analyse Saponin beigefügt, um die Freisetzung der Bakterien durch Lyse der Leukozyten zu verbessern. Dazu wurde einer 0,45%igen Natriumchloridlösung Saponin hinzugefügt, um eine 1%ige Lösung herzustellen. Diese wurde bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach 15 min wurde mit der Verarbeitung laut Herstellerprotokoll begonnen. Es resultierte eine hohe Übereinstimmungsrate von 98,1%. Zusätzlich wurde die Inokulumgröße der Proben untersucht. In 1 von 68 Isolaten wurde eine ungenügende Konzentration von Bakterien gemessen [106; 107]. Eine vorgeschaltete Lyse der humanen Blutzellen scheint die Freisetzung der Bakterien zu verbessern und somit die Konzentration der Bakterien zu erhöhen. Die geringe Inokulumgröße stellt ein Problem bei der direkten Resistenzmessung dar. Eine Autorengruppe ermittelte, dass 8,3% der Proben eine unzureichende Bakterienkonzentration enthielten [54]. Die hier vorgestellte Analyse der Messwerte zeigte für gramnegative bessere Ergebnisse als für grampositive Erreger. Diese Beobachtung wurde in den oben genannten Publikationen ebenfalls gemacht, wobei der Grund dafür unbekannt ist [173]. Bei Betrachtung der ermittelten Fehler fiel bei unserer Studie auf, dass 76,2% der Fehler den KNS zugeordnet werden konnten. *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis* und *S. warneri* verursachten 89% der sehr großen Fehler (vmE). Ohne die KNS lag die *very major error*-Rate bei 1 748 getesteten Bakterien-Antibiotika-Kombinationen bei 0,5%. Es ist davon auszugehen, dass zwischen 10% und 30% der nachgewiesenen KNS aus Blutkulturflaschen tatsächlich für eine Bakteriämie verantwortlich waren. In den anderen Fällen stammten die nachgewiesenen Mikroorganismen wahrscheinlich aus Kontaminationen und verursachten so eine Pseudobakteriämie [36]. In einer Publikation wurde die Häufigkeit einer schweren Sepsis nach Nachweis von KNS in der Blutkultur von 73 Patienten mit 4% angegeben [128].

Zur Behandlung einer Sepsis mit den eben genannten Erregern werden häufig Vancomycin oder Linezolid, seltener Teicoplanin eingesetzt [106]. In der vorliegenden Studie traten innerhalb dieser Keimgruppe keine Abweichungen für Linezolid (n = 161) und Vancomycin (n = 163) auf. Für Teicoplanin (n = 112) hingegen wurden 31 *very major errors* und 10 *major errors* ermittelt. In der Gruppe der Enterokokken stimmten die Ergebnisse für Teicoplanin (n = 49) mit der Referenzmethode überein. Dieses Ergebnis der direkten Resistenztestung von Teicoplanin mit dem BD Phoenix™ System konnte durch andere Studien nicht bestätigt werden [11; 106]. In verschiedenen Untersuchungen wurde ermittelt, dass bei Staphylokokken und Enterokokken die Messung der minimalen Hemmkonzentration für Teicoplanin mit dem VITEK® 2 System zu unterschiedlichen Ergebnissen führt [27; 87; 102]. Es werden insbesondere bei *S. epidermidis*-Stämmen höhere Teicoplanin-MHKs beobachtet, die häufig mit einer Oxacillin-Resistenz korrelieren [28; 110]. Möglicherweise gab es hier erst später erkannte Limitationen bei der Resistenztestung durch VITEK® 2 System. So wird derzeit die Teicoplanin-Testung mit dem VITEK® 2 System laut Herstellerangaben bei häufigen KNS ohne Zusatztests nicht akzeptiert (Kundenmitteilung, Fa. bioMérieux).

In dieser durchgeführten Studie wurden für KNS 164 Oxacillin-Messwerte verglichen. Bei 160 Isolaten fand sich eine Übereinstimmung mit der Referenzmethode, von denen 80% eine Resistenz gegenüber Oxacillin zeigten. Es traten 2 *very major errors* auf. Zwei Oxacillin-resistente *S. warneri*-Isolate wurden von dem BD Phoenix™ System nicht als solche erkannt. Somit wurden anhand der Studienmethode 98,5% der Oxacillin-resistenten Stämme ermittelt. In einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit ist die Anzahl von Oxacillin-resistenten KNS mit 45% angegeben [36]. Aufgrund der Häufigkeit von Multiresistenzen wird bei einem Nachweis von KNS häufig eine antiinfektive Therapie mit Vancomycin begonnen [142]. Vancomycin (n = 273) zeigte in der hier vorgestellten Studie eine Übereinstimmung mit der Referenzmethode von 100%. Für Moxifloxacin (23,6%) und Tetracyclin (36,4%) traten in der Gruppe der KNS relativ häufig *minor errors* auf. Die Rate für *minor errors* der Bakterien-Antibiotika-Kombination von *S. aureus* und *S. epidermidis* und Moxifloxacin lag bei 12,3% bzw. 28,7%. Ungefähr 50 bis 70% der Katheter-assoziierten Infektionen werden von *S. epidermidis* verursacht und innerhalb der Gruppe der KNS verursachen *S. epidermidis*-Stämme die meisten Infektionen. Bei einer Monotherapie mit Fluorchinolonen ist eine schnelle Resistenzentwicklung zu beobachten. Liegt die

Indikation für eine Therapie mit einem Antibiotikum dieser Gruppe vor, wird eine Kombinationstherapie mit einem β -Lactam-Antibiotikum zur Behandlung der Sepsis empfohlen. Eine alleinige Gabe von Moxifloxacin ist zur Therapie nicht ausreichend [68; 124]. Für Fosfomycin wurden innerhalb dieser Gruppe 24 *very major errors* (14,7%) ermittelt. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration für Fosfomycin ist abhängig von der Anwesenheit von Glucose-6-Phosphat. Ohne Glucose-6-Phosphat findet kein Transport des Antibiotikums in die bakteriellen Zellen statt [126]. Möglicherweise wurden bei der direkten Resistenztestung aus Blutkulturflaschen die KNS durch die vorhandenen Blutbestandteile in Kombination mit dem Antibiotikum stärker inhibiert, sodass daraus ein falsch sensibles Ergebnis resultierte. In der vorliegenden Arbeit wurde von 62 *S. aureus*-Isolaten die minimale Hemmkonzentration von Fosfomycin ermittelt. Hier stimmten die Ergebnisse der Studienmethode mit der Referenzmethode überein.

Insgesamt liegen die Ergebnisse dieser Studie mit einer Kongruenz von 92,3% mit der Referenzmethode im Bereich der in der Literatur beschriebenen Übereinstimmungsraten. Zusammenfassend ist festzustellen, dass die wesentlichen Abweichungen im Vergleich zur Referenzmethode bei den Empfindlichkeitstestungen von Fosfomycin, Moxifloxacin und Teicoplanin bei KNS auftraten. Während die Abweichungen bei Teicoplanin am ehesten durch mögliche Probleme bei der Referenzmethode zu erklären sind, spielen Fosfomycin und Moxifloxacin klinisch bei der Therapie von Blutstrominfektionen mit KNS keine Rolle. Insofern könnte ggf. auf die taggleiche Übermittlung dieser Ergebnisse aus direkter Testung aus klinisch-therapeutischer Sicht verzichtet werden. Ohne die genannten wenig relevanten Testungen bei KNS ergibt sich eine sehr gute Übereinstimmung der direkten Resistenztestung von 94,9% (0,8% vmE) mit der Referenzmethode.

5.5 Zeitanalyse

In Deutschland vergehen von der Blutabnahme am Patienten bis zur Inkubation ca. 2 bis 20 h, da die mikrobiologische Diagnostik häufig in ausgelagerten Laboratorien durchgeführt wird. In anderen europäischen Ländern wie Großbritannien, Italien oder Frankreich vergehen 2 bis 4 h bis zur Inkubation der Blutkulturen [134]. Um möglichst zeitnah mit der Diagnostik beginnen zu können, sollten lange Transportzeiten vermieden und der Transportablauf so optimiert werden, dass zwischen Blutabnahme

und Bebrütung im Automaten möglichst wenig Zeit vergeht. Es wird empfohlen, zwei bis drei Blutkultursets (aerob und anaerob) zu entnehmen, da die Abnahme eines höheren Blutvolumens die Sensitivität erhöht [62; 121]. Die Blutkulturflaschen werden in einem Automaten für einen Zeitraum von maximal sieben Tagen inkubiert. Die Zeit bis zur Positivdetektion der Blutkulturflasche (TTP) variiert erheblich. Bei *S. pneumoniae* und β -hämolyisierenden Streptokokken liegt die TTP im Median unter 11 h, wohingegen bei einigen gramnegativen Bakterien und anaeroben Mikroorganismen der Wert im Median über 15 h liegt [112]. Nach ausreichendem Erregerwachstum in der Blutkulturflasche wird die mikrobiologische Diagnostik begonnen. Werden konventionelle Verfahren zur Identifikation und Antibiogrammherstellung verwendet, ist frühestens nach 24 h ein vorläufiges und erst 48 h nach Materialeingang ein endgültiges Ergebnis zu erwarten. Eine adäquate Antibiotikatherapie ist jedoch essenziell, da die Sterblichkeit mit jeder vergehenden Stunde um 7% zunimmt [95].

Neue technische Entwicklungen sollten die Analysezeit verkürzen. Mittels MALDI-TOF MS ist es aktuell möglich, die Identifizierung von Sepsiserregern innerhalb von 5 bis 7 min durchzuführen. Werden 96 Proben gleichzeitig analysiert, liegen die Ergebnisse nach einer Stunde vor [167]. In der vorliegenden Studie wurde eine Bearbeitungszeit von der Positivmeldung der Blutkulturflasche bis zur Identifizierung des Erregers von ca. 10 min pro Isolat ermittelt. Da pro Tag 12 bis 32 Isolate untersucht wurden, lag die Zeit bis zum Ergebnis entsprechend höher. So dauerte die Analyse von 24 Blutkulturflaschen ungefähr 3 h. Gray *et al.* ermittelten eine Zeit von 25 min von der Positivmeldung der Blutkulturflasche bis zum Ergebnis mit der Extraktionsmethode und einer *hands on time* von weniger als 5 min [58; 59]. Weitere Studiengruppen analysierten die Identifizierung von Mikroorganismen aus Blutkulturen durch MALDI-TOF MS und ermittelten eine signifikante Verkürzung der Zeit bis zur Erregeridentifizierung gegenüber der konventionellen Blutkulturdiagnostik nach Subkultivierung von durchschnittlich 22–25,9 h [43; 122].

Die schnellere Speziesbestimmung hat häufig eine klinische Relevanz. Von September 2011 bis März 2012 wurde in zwei belgischen Krankenhäusern der Einfluss der schnellen Identifizierung von Mikroorganismen aus 277 Blutkulturen auf die Patientenbehandlung untersucht. Bei 13,38% der erwachsenen Patienten führte die schnelle Erregeridentifizierung im Vergleich zur konventionellen Blutkulturdiagnostik zu einer Veränderung der kalkulierten Antibiotikatherapie, z. B. durch Wahl eines anderen

oder zusätzlichen Antibiotikums. In der Gruppe der pädiatrischen Patienten war die verkürzte Analysezeit in 37,5% der Fälle hilfreich, um Kontaminationen der Blutkulturen zu bestätigen. Die Differenz zwischen der schnellen Erregerdiagnostik und der konventionellen betrug im Durchschnitt 24 h und 8 min [113].

Die Aufbereitung einer Probe für die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration mit dem BD Phoenix™ System nahm ca. 20 min in Anspruch. Demgegenüber berichteten Beuving *et al.* von 30 min Vorbereitungszeit für die Messung [11]. So konnten im Rahmen der hier vorgestellten wissenschaftlichen Arbeit innerhalb von 2 bis 2,5 h 24 Isolate für die Messung vorbereitet werden. Die Zeit bis zum Ergebnis der MHK-Werte relevanter Antibiotika unterschied sich innerhalb der Keimgruppen. Die Dauer der Resistenzbestimmung relevanter Antibiotika betrug im Mittel für Enterokokken 7 bis 8,7 h, für koagulasenegative Staphylokokken 10,7 bis 13,6 h, für *S. aureus* 7,7 bis 8,9 h, für Enterobakteriazeen 6,4 bis 6,9 h und für Nonfermenter 11,7 bis 12,6 h. (s. 4.3.4, S. 67). Die Ergebnisse entsprechen Publikationen, in denen Testdauern im Median von 12,88 h und 13,4 h für grampositive Kokken und von 10,86 h und 12,9 h für gramnegative Bakterien ermittelt wurden [32; 173]. Bei ähnlicher Fragestellung wurde von Gherardi *et al.* die Zeit bis zum Ergebnis der direkten Identifizierung und der Resistenzmessung für grampositive und gramnegative Mikroorganismen mit $13,16 \pm 2,11$ h und $11,76 \pm 2,72$ h angegeben. Dafür wurden 139 monomikrobielle Blutkulturen im BD BACTEC™ 9120 Instrument inkubiert. Nach Detektion von ausreichendem Wachstum in der Blutkulturflasche, wurden die Testkarten laut Herstellerprotokoll direkt inokuliert und die Messung mit dem BD Phoenix™ System durchgeführt. Für die indirekten Referenzmessungen wurden die Proben auf Blutagar- und Kochblutagarplatten ausgestrichen und bei 35 °C in Anwesenheit von 5% CO₂ über Nacht bebrütet. Es wurde kein Unterschied bezüglich der Dauer der Messungen zwischen der direkten Analyse und der Analyse von der Subkultur festgestellt, welches in der Veröffentlichung nicht genauer erläutert wurde [54]. Wird in den Laboren mit der Analyse der in der Nacht positiv gemeldeten Blutkulturflaschen morgens begonnen, sind somit eine Identifizierung und die Empfindlichkeitsprüfung durch direkte Diagnostik aus Patientenblut am selben Tag möglich. Daraus resultiert ein Zeitgewinn von mindestens 24 h gegenüber der Routinediagnostik, da die Inokulation einer Subkultur entfällt [11; 106; 168]. Die Beschleunigung der mikrobiologischen Diagnostik in dieser Größenordnung wurde in dieser Studie bestätigt.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, die Erregeridentifizierung und die Ermittlung der minimalen Hemmkonzentration aus Blutkulturflaschen ohne Subkultivierung unter Routinebedingungen mit einer hohen Durchsatzrate durchzuführen, um die mikrobiologische Diagnostik zu verkürzen. Im Zeitraum von Februar 2010 bis Mai 2010 wurden im Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin 1 033 Isolate aus positiven Blutkulturflaschen untersucht. Die schnelle Identifizierung aus Blutkulturflaschen nach Aufbereitung mit dem MALDI Sepsityper[®] Kit wurde mit der Identifizierung nach Subkultivierung verglichen und anhand der Analyse bakterieller Moleküle mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie (Bruker microflex[™] LT/Biotyper[™]-Software) durchgeführt. Die Antibiogrammerstellung erfolgte durch die direkte Inokulation von BD Phoenix[™] Panels aus Pellets und wurde mit den Resistenztestungen der Routinediagnostik von Bakterienkolonien mit dem VITEK[®] 2 System verglichen. Ergab die Erregerbestimmung als Resultat *Staphylococcus aureus*, wurden diese Isolate mit einer Echtzeit-PCR (BD GeneOhm[™] StaphSR Test) auf Methicillin-Resistenz untersucht.

Der Anteil an polymikrobiellen Infektionen lag bei 15,5%. Eine direkte Identifizierung der Mikroorganismen aus Blutkulturflaschen mit Monoinfektionen auf Speziesebene gelang bei 61,8% mit einem Probenvolumen von 1 000 µl und bei 75,4% mit einem Probenvolumen von 200 µl. Bei 80% der Blutkulturflaschen, die verschiedene Mikroorganismen enthielten, gelang die Identifizierung einer der enthaltenen Spezies. Mit der Referenzmethode wurden nach Subkultivierung 96,4% der Erreger identifiziert. Bei Anwendung des MALDI Sepsityper[®] Protokolls trat bei einigen Proben eine erhöhte Viskosität auf, die die Entnahme des Überstandes erschwerte. Durch Reduzierung des Probenvolumens von 1 000 µl auf 200 µl wurde die Handhabung erleichtert und die Rate der Identifizierungen von grampositiven Bakterien signifikant erhöht. Der MRSA-Nachweis mittels real-time PCR aus Einzelinfektionen gelang zu 100% im Vergleich mit der Referenzmethode. Es wurden alle 13 MRSA- und 67 MSSA-Isolate innerhalb von 90 min richtig erkannt. Die Zuverlässigkeit der Antibiogrammerstellung ohne Subkultivierung mit dem BD Phoenix[™] System wurde anhand von 3 337 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen nach EUCAST-Kriterien untersucht. Es wurde eine Übereinstimmung mit der Referenzmethode von 92,3% ermittelt. Es traten 4,2% *minor errors*, 1% *major errors* und 2,5% *very major errors* auf. Durch die Kombination der

direkten Bestimmung der Mikroorganismen mit einer Antibiogrammerstellung aus Blutkulturflaschen und eines MRSA-Nachweises mit einer real-time PCR ist ein Zeitgewinn gegenüber der konventionellen Blutkulturdiagnostik von mindestens 24 h ermittelt worden. Dadurch ist eine frühere gezielte antiinfektive Therapie der Sepsis möglich. Durch eine beschleunigte mikrobiologische Diagnostik können der Krankheitsverlauf positiv beeinflusst und die Behandlungskosten gesenkt werden. Die schnelle Erregeridentifizierung aus Blutkulturflaschen zeigte für gramnegative Bakterien gute Ergebnisse. Für grampositive Bakterien und Sprosspilze ist eine Optimierung der Methode erforderlich, um verlässliche Ergebnisse zu erzielen. Die direkte Resistenztestung aus positiven Blutkulturflaschen hat sich in dieser Studie als zuverlässig erwiesen. Im Hinblick auf die Standardisierung und die Effizienz der mikrobiologischen Laborprozesse, wäre eine weitere Automatisierung der einzelnen Arbeitsschritte wünschenswert. Aus der Weiterentwicklung der in dieser Studie gewählten Methoden der mikrobiologischen Diagnostik ergibt sich die Chance, früher auf das Krankheitsbild der Sepsis reagieren zu können, welches in Deutschland und weltweit mit einer hohen Letalitätsrate verbunden ist.

Literaturverzeichnis

- 1 Alatoon, A. A., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., Mandrekar, J. und Patel, R. (2011): Comparison of direct colony method versus extraction method for identification of gram-positive cocci by use of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry, *J Clin Microbiol* (vol. 49), No. 8, pp. 2868-2873.
- 2 Alberti, C., Brun-Buisson, C., Burchardi, H., Martin, C., Goodman, S., Artigas, A., Sicignano, A., Palazzo, M., Moreno, R., Boulme, R., Lepage, E. und Le Gall, R. (2002): Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study, *Intensive Care Med* (vol. 28), No. 2, pp. 108-121.
- 3 Alberti, C., Brun-Buisson, C., Goodman, S. V., Guidici, D., Granton, J., Moreno, R., Smithies, M., Thomas, O., Artigas, A. und Le Gall, J. R. (2003): Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill infected patients, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 168), No. 1, pp. 77-84.
- 4 Ammor, M. (2007): Recent Advances in the Use of Intrinsic Fluorescence for Bacterial Identification and Characterization, *J Fluoresc* (vol. 17), No. 5, pp. 455-459.
- 5 Anhalt, J. P. und Fenselau, C. (1975): Identification of bacteria using mass spectrometry, *Anal Chem* (vol. 47), No. 2, pp. 219-225.
- 6 Arzese, A., Minisini, R. und Botta, G. A. (1994): Evaluation of an automated system for identification of anaerobic bacteria, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 13), No. 2, pp. 135-141.
- 7 Avdic, E., Cushinotto, L. A., Hughes, A. H., Hansen, A. R., Efird, L. E., Bartlett, J. G. und Cosgrove, S. E. (2012): Impact of an antimicrobial stewardship intervention on shortening the duration of therapy for community-acquired pneumonia, *Clin Infect Dis* (vol. 54), No. 11, pp. 1581-1587.
- 8 Barberino, M. G., Silva, M. O., Arraes, A. C. P., Correia, L. C. und Mendes, A. V. (2017): Direct identification from positive blood broth culture by matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), *Braz J Infect Dis* (vol. 21), No. 3, pp. 339-342.
- 9 Bauer, M. (1996): Pathophysiologie der Sepsis Aktuelle Konzepte, *Anaesthesist* (vol. 45), No. 4, pp. 312-322.
- 10 Bauer, M. und Reinhart, K. (2004): Ätiologie und Diagnostik des septischen Organversagens, *Intensivmed* (vol. 41), No. 7, pp. 465-475.
- 11 Beuving, J., van der Donk, C. F., Linssen, C. F., Wolffs, P. F. und Verbon, A. (2011): Evaluation of direct inoculation of the BD PHOENIX system from positive BACTEC blood cultures for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods, *BMC Microbiol* (vol. 11), p. 156.

- 12 Bizzini, A., Durussel, C., Bille, J., Greub, G. und Prod'hom, G. (2010): Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory, *J Clin Microbiol* (vol. 48), No. 5, pp. 1549-1554.
- 13 Bizzini, A. und Greub, G. (2010): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, a revolution in clinical microbial identification, *Clin Microbiol Infect* (vol. 16), No. 11, pp. 1614-1619.
- 14 Bolmström, A., Arvidson, S., Ericsson, M. und Karlsson, A. (1988): A novel technique for direct quantification of antimicrobial susceptibility of microorganisms [abst 1209], Program and Abstracts of the 28th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Los Angeles, CA, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- 15 Bone, R. C., Fisher, C. J., Jr., Clemmer, T. P., Slotman, G. J., Metz, C. A. und Balk, R. A. (1989): Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group, *Crit Care Med* (vol. 17), No. 5, pp. 389-393.
- 16 Brun-Buisson, C., Doyon, F., Carlet, J., Dellamonica, P., Guin, F., Lepoutre, A., Mercier, J. C., Offenstadt, G. und Regnier, B. (1995): Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis, *JAMA* (vol. 274), No. 12, pp. 968-974.
- 17 Budelmann, G. (1969): [Hugo Schottmüller, 1867-1936. The problem of sepsis], *Internist* (vol. 10), No. 3, pp. 92-101.
- 18 Buissiere, J. und Nardon, P. (1968): [Micromethod of identifying bacteria. I. Value of the quantification of biochemical characteristics], *Ann Inst Pasteur* (vol. 115), No. 2, pp. 218-231.
- 19 Cherkaoui, A., Hibbs, J., Emonet, S., Tangomo, M., Girard, M., Francois, P. und Schrenzel, J. (2010): Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level, *J Clin Microbiol* (vol. 48), No. 4, pp. 1169-1175.
- 20 Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V. und Gordon, D. B. (1996): The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry, *Nat Biotechnol* (vol. 14), No. 11, pp. 1584-1586.
- 21 Clerc, O., Prod'hom, G., Senn, L., Jaton, K., Zanetti, G., Calandra, T. und Greub, G. (2014): Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry and PCR-based rapid diagnosis of *Staphylococcus aureus* bacteraemia, *Clin Microbiol Infect* (vol. 20), No. 4, pp. 355-360.
- 22 Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M 100-S16. Vol 26. No. 3. Replaces M100-S 15. Vol. 25 No. 1; 2006.

- 23 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20. Wayne, PA, USA: CLSI; 2010.
- 24 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement M100-S21. Wayne, PA, USA: CLSI; 2011.
- 25 Cockerill, F. R. (2003): Application of Rapid-Cycle Real-Time Polymerase Chain Reaction for Diagnostic Testing in the Clinical Microbiology Laboratory, *Arch Pathol* (vol. 127), No. 9, pp. 1112-1120.
- 26 Cosgrove, S. E., Sakoulas, G., Perencevich, E. N., Schwaber, M. J., Karchmer, A. W. und Carmeli, Y. (2003): Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis, *Clin Infect Dis* (vol. 36), No. 1, pp. 53-59.
- 27 de Cueto, M., Ceballos, E., Martinez-Martinez, L., Perea, E. J. und Pascual, A. (2004): Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system, *J Clin Microbiol* (vol. 42), No. 8, pp. 3734-3738.
- 28 Del' Alamo, L., Cereda, R. F., Tosin, I., Miranda, E. A. und Sader, H. S. (1999): Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci and characterization of isolates with reduced susceptibility to glycopeptides, *Diagn Microbiol Infect Dis* (vol. 34), No. 3, pp. 185-191.
- 29 Dhiman, N., Hall, L., Wohlfiel, S. L., Buckwalter, S. P. und Wengenack, N. L. (2011): Performance and cost analysis of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for routine identification of yeast, *J Clin Microbiol* (vol. 49), No. 4, pp. 1614-1616.
- 30 Donay, J. L., Fernandes, P., Lagrange, P. H. und Herrmann, J. L. (2007): Evaluation of the inoculation procedure using a 0.25 McFarland standard for the BD Phoenix automated microbiology system, *J Clin Microbiol* (vol. 45), No. 12, pp. 4088-4089.
- 31 Dragsted, L., Qvist, J. und Madsen, M. (1989): Outcome from intensive care. II. A 5-year study of 1308 patients: short-term outcome, *Eur J Anaesthesiol* (vol. 6), No. 2, pp. 131-144.
- 32 Duggal, S., Jesaiwal, S. K., Tandon, N. und Chugh, T. D. (2011): Direct inoculation on Phoenix panels for identification and antimicrobial susceptibility from positive BACTEC cultures: first study from India, *Indian J Med Microbiol* (vol. 29), No. 3, pp. 283-287.
- 33 Dupont, C., Sivadon-Tardy, V., Bille, E., Dauphin, B., Beretti, J. L., Alvarez, A. S., Degand, N., Ferroni, A., Rottman, M., Herrmann, J. L., Nassif, X., Ronco, E. und Carbonnelle, E. (2010): Identification of clinical coagulase-negative staphylococci, isolated in microbiology laboratories, by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry and two automated systems, *Clin Microbiol Infect* (vol. 16), No. 7, pp. 998-1004.

- 34 Edmond, M. B., Wallace, S. E., McClish, D. K., Pfaller, M. A., Jones, R. N. und Wenzel, R. P. (1999): Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis, *Clin Infect Dis* (vol. 29), No. 2, pp. 239-244.
- 35 Eigner, U., Holfelder, M., Oberdorfer, K., Betz-Wild, U., Bertsch, D. und Fahr, A. M. (2009): Performance of a matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry system for the identification of bacterial isolates in the clinical routine laboratory, *Clin Lab* (vol. 55), No. 7-8, pp. 289-296.
- 36 Elzi, L., Babouee, B., Vogeli, N., Laffer, R., Dangel, M., Frei, R., Battegay, M. und Widmer, A. F. (2012): How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients, *Clin Microbiol Infect* (vol. 18), No. 9, pp. 355-361.
- 37 Emori, T. G., Culver, D. H., Horan, T. C., Jarvis, W. R., White, J. W., Olson, D. R., Banerjee, S., Edwards, J. R., Martone, W. J., Gaynes, R. P. und et al. (1991): National nosocomial infections surveillance system (NNIS): description of surveillance methods, *Am J Infect Control* (vol. 19), No. 1, pp. 19-35.
- 38 Engel, C., Brunkhorst, F. M., Bone, H. G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruending, 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. und Reinhart, K. (2007): Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study, *Intensive Care Med* (vol. 33), No. 4, pp. 606-618.
- 39 Engelmann, L. (2006): Die Diagnose der Sepsis, *Intensivmed* (vol. 43), No. 8, pp. 607-618.
- 40 European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2017.
- 41 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical, Microbiology und Infectious, Diseases (2000): Determination of antimicrobial susceptibility test breakpoints, *Clin microbiol infect* (vol. 6), No. 10, pp. 570-572.
- 42 European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing of the European Society of Clinical, Microbiology und Infectious, Diseases (2000): Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by agar dilution, *Clin microbiol infect* (vol. 6), No. 9, pp. 509-515.
- 43 Fiori, B., D'Inzeo, T., Giaquinto, A., Menchinelli, G., Liotti, F. M., de Maio, F., De Angelis, G., Quaranta, G., Nagel, D., Tumbarello, M., Posteraro, B., Sanguinetti, M. und Spanu, T. (2016): Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures, *J Clin Microbiol* (vol. 54), No. 3, pp. 576-584.

- 44 Fleischmann, C., Hartmann, M., Hartog, C. S., Welte, T., Heublein, S., Thomas-Rueddel, D., Dennler, U. und Reinhart, K. (2015): Epidemiology of Sepsis in Germany: Incidence, Mortality And Associated Costs of Care 2007-2013, *Intensive Care Med Exp* (vol. 3), No. Suppl 1, p. A50.
- 45 Fleischmann, C., Thomas-Rueddel, D. O., Hartmann, M., Hartog, C. S., Welte, T., Heublein, S., Dennler, U. und Reinhart, K. (2016): Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus, *Dtsch Arztebl International* (vol. 113), No. 10, pp. 159-166.
- 46 Funke, G. und Funke-Kissling, P. (2004): Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for direct identification and susceptibility testing of gram-negative rods from positive blood cultures in a three-phase trial, *J Clin Microbiol* (vol. 42), No. 4, pp. 1466-1470.
- 47 Gaibani, P., Rossini, G., Ambretti, S., Gelsomino, F., Pierro, A. M., Varani, S., Paolucci, M., Landini, M. P. und Sambri, V. (2009): Blood culture systems: rapid detection – how and why?, *Int J Antimicrob Agents* (vol. 34, Supplement 4), pp. S13-S15.
- 48 Gastmeier, P., Behnke, M., Breier, A. C., Piening, B., Schwab, F., Dettenkofer, M. und Geffers, C. (2012): Nosokomiale Infektionsraten: Messen und Vergleichen, *Bundesgesundheitsbl* (vol. 55), No. 11-12, pp. 1363-1369.
- 49 Gastmeier, P., Schwab, F., Behnke, M. und Geffers, C. (2011): Wenige Blutkulturproben – wenige Infektionen?, *Anaesthesist* (vol. 60), No. 10, pp. 902-907.
- 50 Gastmeier, P., Stamm-Balderjahn, S., Hansen, S., Nitzschke-Tiemann, F., Zuschneid, I., Groneberg, K. und Ruden, H. (2005): How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1,022 outbreaks, *Infect Control Hosp Epidemiol* (vol. 26), No. 4, pp. 357-361.
- 51 Gatermann, S. und Miksits, K. (2009): *Staphylokokken, 25, Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* pp. 191-202, Springer Berlin Heidelberg.
- 52 Geffers, C. und Gastmeier, P. (2011): Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System), *Dtsch Arztebl Int* (vol. 108), No. 6, pp. 87-93.
- 53 Geffers, C., Zuschneid, I., Sohr, D., Rüdén, H. und Gastmeier, P. (2004): Erreger nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen: Daten des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS) aus 274 Intensivstationen, *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* (vol. 40), No. 01, pp. 15-19.
- 54 Gherardi, G., Angeletti, S., Panitti, M., Pompilio, A., Di Bonaventura, G., Crea, F., Avola, A., Fico, L., Palazzo, C., Sapia, G. F., Visaggio, D. und Dicuonzo, G. (2012): Comparative evaluation of the Vitek-2 Compact and Phoenix systems for rapid identification and antibiotic susceptibility testing directly from blood cultures of Gram-negative and Gram-positive isolates, *Diagn Microbiol Infect Dis* (vol. 72), No. 1, pp. 20-31.

- 55 Glerant, J. C., Hellmuth, D., Schmit, J. L., Ducroix, J. P. und Jounieaux, V. (1999): Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission, *Respir Med* (vol. 93), No. 3, pp. 208-212.
- 56 Gordon, R. J. und Lowy, F. D. (2008): Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection, *Clin Infect Dis* (vol. 46 Suppl 5), pp. S350-359.
- 57 Graf, B., Adam, T., Zill, E. und Gobel, U. B. (2000): Evaluation of the VITEK 2 system for rapid identification of yeasts and yeast-like organisms, *J Clin Microbiol* (vol. 38), No. 5, pp. 1782-1785.
- 58 Gray, T. J., Thomas, L., Olma, T., Iredell, J. R. und Chen, S. C. (2013): Rapid identification of Gram-negative organisms from blood culture bottles using a modified extraction method and MALDI-TOF mass spectrometry, *Diagn Microbiol Infect Dis* (vol. 77), No. 2, pp. 110-112.
- 59 Gray, T. J., Thomas, L., Olma, T., Mitchell, D. H., Iredell, J. R. und Chen, S. C. (2014): Rapid identification of gram negative bacteria from blood culture broth using MALDI-TOF mass spectrometry, *J Vis Exp*, No. 87.
- 60 Grouven, U., Bender, R., Ziegler, A. und Lange, S. (2007): Der Kappa-Koeffizient, *Dtsch med Wochenschr* (vol. 132), No. S 01, pp. e65-e68.
- 61 Guo, L., Ye, L., Zhao, Q., Ma, Y., Yang, J. und Luo, Y. (2014): Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification, *J Thorac Dis* (vol. 6), No. 5, pp. 534-538.
- 62 Hagel, S. und Brunkhorst, F. M. (2011): Sepsis, *Intensivmed* (vol. 48), pp. 57-73.
- 63 Hagel, S., Pletz, M. W., Brunkhorst, F. M., Seifert, H. und Kern, W. V. (2013): Bakteriämie und Sepsis, *Internist* (vol. 54), No. 4, pp. 399-407.
- 64 Hardy, J. A., Bateman, D. E., Kidd, A. M., Edwardson, J. A., Singh, G. B. und Dodd, P. R. (1984): Amino acid transport by synaptosomes isolated from post mortem human brain, *J Neural Transm* (vol. 60), No. 1, pp. 57-62.
- 65 Heizmann, P., Heizmann, W. R. und Hetzer, R. (2005): MRSA: Resistenzmechanismen, Epidemiologie, Risikofaktoren, Prophylaxe, Therapie, *Z Herz-Thorax- Gefäßschir* (vol. 19), No. 2, pp. 78-88.
- 66 Hinnebusch, C. J., Nikolai, D. M. und Bruckner, D. A. (1991): Comparison of API Rapid Strep, Baxter MicroScan Rapid Pos ID Panel, BBL Minitek Differential Identification System, IDS RapID STR System, and Vitek GPI to conventional biochemical tests for identification of viridans streptococci, *Am J Clin Pathol* (vol. 96), No. 4, pp. 459-463.
- 67 <http://www.bdal.de/ru/products/software/maldi-biotyper/images.html>, 17.08.2012.

- 68 Huebner, J. und Goldmann, D. A. (1999): Coagulase-negative staphylococci: role as pathogens, *Annu Rev Med* (vol. 50), pp. 223-236.
- 69 Huletsky, A., Giroux, R., Rossbach, V., Gagnon, M., Vaillancourt, M., Bernier, M., Gagnon, F., Truchon, K., Bastien, M., Picard, F. J., van Belkum, A., Ouellette, M., Roy, P. H. und Bergeron, M. G. (2004): New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci, *J Clin Microbiol* (vol. 42), No. 5, pp. 1875-1884.
- 70 Hunfeld, K. P., Bingold, T., Brade, V. und Wissing, H. (2008): Molekularbiologischer Erregernachweis bei Patienten mit Sepsis, *Anaesthesist* (vol. 57), No. 4, pp. 326-337.
- 71 Idelevich, E. A., Grunewald, C. M., Wullenweber, J. und Becker, K. (2014): Rapid identification and susceptibility testing of *Candida* spp. from positive blood cultures by combination of direct MALDI-TOF mass spectrometry and direct inoculation of Vitek 2, *PLoS One* (vol. 9), No. 12, p. e114834.
- 72 Jackson, K. A., Edwards-Jones, V., Sutton, C. W. und Fox, A. J. (2005): Optimisation of intact cell MALDI method for fingerprinting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *J Microbiol Methods* (vol. 62), No. 3, pp. 273-284.
- 73 Janda, J. M. und Abbott, S. L. (2002): Bacterial Identification for Publication: When Is Enough Enough?, *J Clin Microbiol* (vol. 40), No. 6, pp. 1887-1891.
- 74 Janssen, J. und Laatz, W. (2007): *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows* pp. 333-376, Springer Berlin Heidelberg.
- 75 Janssen, J. und Laatz, W. (2007): *Statistische Datenanalyse mit SPSS für Windows* pp. 559-595, Springer Berlin Heidelberg.
- 76 Jevons, M. P. (1961): "Celbenin" - resistant Staphylococci, *BMJ* (vol. 1), No. 5219, pp. 124-125.
- 77 Jorgensen, J. H. (1993): Selection criteria for an antimicrobial susceptibility testing system, *J Clin Microbiol* (vol. 31), No. 11, pp. 2841-2844.
- 78 Josefson, P., Strålin, K., Ohlin, A., Ennefors, T., Dragsten, B., Andersson, L., Fredlund, H., Mölling, P. und Olcén, P. (2011): Evaluation of a commercial multiplex PCR test (SeptiFast) in the etiological diagnosis of community-onset bloodstream infections, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 30), No. 9, pp. 1127-1134.
- 79 Kahlmeter, G., Brown, D. F. J., Goldstein, F. W., MacGowan, A. P., Mouton, J. W., Österlund, A., Rodloff, A., Steinbakk, M., Urbaskova, P. und Vatopoulos, A. (2003): European harmonization of MIC breakpoints for antimicrobial susceptibility testing of bacteria, *J Antimicrob Chemother* (vol. 52), No. 2, pp. 145-148.
- 80 Kampf, G. und Kramer, A. (2004): Epidemiologic background of hand hygiene and evaluation of the most important agents for scrubs and rubs, *Clin Microbiol Rev* (vol. 17), No. 4, pp. 863-893.

- 81 Karas, M., Bachmann, D. und Hillenkamp, F. (1985): Influence of the wavelength in high-irradiance ultraviolet laser desorption mass spectrometry of organic molecules, *Anal Chem* (vol. 57), No. 14, pp. 2935-2939.
- 82 Kaur, G. und Mehta, S. K. (2017): Developments of Polysorbate (Tween) based microemulsions: Preclinical drug delivery, toxicity and antimicrobial applications, *Int J Pharm* (vol. 529), No. 1-2, pp. 134-160.
- 83 Kawai, T. und Akira, S. (2010): The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors, *Nat Immunol* (vol. 11), No. 5, pp. 373-384.
- 84 Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H. und Ezaki, T. (1995): Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*, *Int J Syst Bacteriol* (vol. 45), No. 2, pp. 406-408.
- 85 Kern, W. V. (2011): Bakteriämie und Sepsis, *Dtsch Med Wochenschr* (vol. 136), No. 05, pp. 182-185.
- 86 Kern, W. V., Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G., Kaufmann, S. H. E. und Schulz, T. F. (2012): *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, Sepsis*, pp. 783-788, Springer Berlin Heidelberg.
- 87 Kobayashi, I., Muraoka, H., Iyoda, T., Nishida, M., Hasegawa, M. und Yamaguchi, K. (2004): Antimicrobial susceptibility testing of vancomycin-resistant *Enterococcus* by the VITEK 2 system, and comparison with two NCCLS reference methods, *J Med Microbiol* (vol. 53), No. Pt 12, pp. 1229-1232.
- 88 Kochanek, M., Michels, G. und Seifert, H. (2014): Mikrobiologische Infektionsdiagnostik auf der Intensivstation, *Intensivmed.up2date* (vol. 10), No. 03, pp. 233-248.
- 89 Kock, R., Becker, K., Cookson, B., van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Mielke, M., Peters, G., Skov, R. L., Struelens, M. J., Tacconelli, E., Navarro Torne, A., Witte, W. und Friedrich, A. W. (2010): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe, *Euro Surveill* (vol. 15), No. 41, p. 19688.
- 90 Kock, R., Mellmann, A., Schaumburg, F., Friedrich, A. W., Kipp, F. und Becker, K. (2011): The epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany, *Dtsch Arztebl Int* (vol. 108), No. 45, pp. 761-767.
- 91 Kok, J., Thomas, L. C., Olma, T., Chen, S. C. und Iredell, J. R. (2011): Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper and time of flight mass spectrometry, *PLoS One* (vol. 6), No. 8, p. e23285.

- 92 Konrad, R., Berger, A., Huber, I., Boschert, V., Hormansdorfer, S., Busch, U., Hogardt, M., Schubert, S. und Sing, A. (2010): Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry as a tool for rapid diagnosis of potentially toxigenic *Corynebacterium* species in the laboratory management of diphtheria-associated bacteria, *Euro Surveill* (vol. 15), No. 43.
- 93 Kumar, A. (2010): Early antimicrobial therapy in severe sepsis and septic shock, *Curr Infect Dis Rep* (vol. 12), No. 5, pp. 336-344.
- 94 Kumar, A., Ellis, P., Arabi, Y., Roberts, D., Light, B., Parrillo, J. E., Dodek, P., Wood, G., Simon, D., Peters, C., Ahsan, M. und Chateau, D. (2009): Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock, *Chest* (vol. 136), No. 5, pp. 1237-1248.
- 95 Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D. und Cheang, M. (2006): Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock, *Crit Care Med* (vol. 34), No. 6, pp. 1589-1596.
- 96 Layer, F., Cuny, C., Strommenger, B., Werner, G. und Witte, W. (2012): Aktuelle Daten und Trends zu Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Bundesgesundheitsbl* (vol. 55), No. 11-12, pp. 1377-1386.
- 97 Layer, F., Strommenger, B., Cuny, C., Werner, G., Noll, I., Abu Sin, M. und Eckmanns, T. (2018): Eigenschaften, Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland - Update 2015/2016, *Epidemiol Bull* (vol. 5), pp. 57-62.
- 98 Lehmann, L. E., Hunfeld, K. P., Emrich, T., Haberhausen, G., Wissing, H., Hoefl, A. und Stuber, F. (2008): A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples, *Med Microbiol Immunol* (vol. 197), No. 3, pp. 313-324.
- 99 Lever, A. und Mackenzie, I. (2007): Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis, *BMJ* (vol. 335), No. 7625, pp. 879-883.
- 100 Levy, M. M., Fink, M. P., Marshall, J. C., Abraham, E., Angus, D., Cook, D., Cohen, J., Opal, S. M., Vincent, J. L. und Ramsay, G. (2003): 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Intensive Care Med* (vol. 29), No. 4, pp. 530-538.
- 101 Libman, E. (1906): On some experiences with blood-cultures in the study of bacterial infections, *Johns Hopkins Hosp Bull* 17:, pp. 215-228.
- 102 Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J. und Fontana, R. (2002): Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci, *J Clin Microbiol* (vol. 40), No. 5, pp. 1681-1686.
- 103 Linde, H. und Lehn, N. (2005): [Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) -- therapy and hygienic measures], *Dtsch Med Wochenschr* (vol. 130), No. 11, pp. 586-588.

- 104 Linde, H., Wagenlehner, F., Strommenger, B., Drubel, I., Tanzer, J., Reischl, U., Raab, U., Holler, C., Naber, K. G., Witte, W., Hanses, F., Salzberger, B. und Lehn, N. (2005): Healthcare-associated outbreaks and community-acquired infections due to MRSA carrying the Panton-Valentine leucocidin gene in southeastern Germany, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 24), No. 6, pp. 419-422.
- 105 Ling, T. K., Tam, P. C., Liu, Z. K. und Cheng, A. F. (2001): Evaluation of VITEK 2 rapid identification and susceptibility testing system against gram-negative clinical isolates, *J Clin Microbiol* (vol. 39), No. 8, pp. 2964-2966.
- 106 Lupetti, A., Barnini, S., Castagna, B., Nibbering, P. H. und Campa, M. (2010): Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-positive cocci in blood cultures by direct inoculation into the BD Phoenix system, *Clin Microbiol Infect* (vol. 16), No. 7, pp. 986-991.
- 107 Lupetti, A., Barnini, S., Morici, P., Ghelardi, E., Nibbering, P. H. und Campa, M. (2013): Saponin promotes rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive and Gram-negative bacteria in blood cultures with the Vitek 2 system, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 32), No. 4, pp. 493-502.
- 108 Maelegheer, K. und Nulens, E. (2017): Same-day identification and antibiotic susceptibility testing on positive blood cultures: a simple and inexpensive procedure, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 36), No. 4, pp. 681-687.
- 109 Majcherczyk, P. A., McKenna, T., Moreillon, P. und Vaudaux, P. (2006): The discriminatory power of MALDI-TOF mass spectrometry to differentiate between isogenic teicoplanin-susceptible and teicoplanin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *FEMS Microbiol Lett* (vol. 255), No. 2, pp. 233-239.
- 110 Maniati, M., Petinaki, E., Kontos, Maniatis, A. N., Spiliopoulou, I., Petropoulou-Mylona, D., Malamou-Lada, H., Spaliara, L. und Koutsia-Carouzou, Ch (2005): Rapid increase in numbers of *Staphylococcus epidermidis* strains with reduced susceptibility to teicoplanin in Greece, *Int J Antimicrob Agents* (vol. 25), No. 4, pp. 346-348.
- 111 Marklein, G., Josten, M., Klanke, U., Muller, E., Horre, R., Maier, T., Wenzel, T., Kostrzewa, M., Bierbaum, G., Hoerauf, A. und Sahl, H. G. (2009): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates, *J Clin Microbiol* (vol. 47), No. 9, pp. 2912-2917.
- 112 Martinez, J. A., Pozo, L., Almela, M., Marco, F., Soriano, A., Lopez, F., Balasso, V., Aguilar, J. und Mensa, J. (2007): Microbial and clinical determinants of time-to-positivity in patients with bacteraemia, *Clin Microbiol Infect* (vol. 13), No. 7, pp. 709-716.
- 113 Martiny, D., Debaugnies, F., Gateff, D., Gerard, M., Aoun, M., Martin, C., Konopnicki, D., Loizidou, A., Georgala, A., Hainaut, M., Chantrenne, M., Dediste, A., Vandenberg, O. und Van Praet, S. (2013): Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management, *Clin Microbiol Infect* (vol. 19), No. 12, pp. E568-E581.

- 114 Matot, I. und Sprung, C. L. (2001): Definition of sepsis, *Intensive Care Med* (vol. 27 Suppl 1), pp. S3-9.
- 115 McFarland, J. (1907): The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines, *JAMA* (vol. XLIX), No. 14, pp. 1176-1178.
- 116 Moerer, O. und Quintel, M. (2009): Definition, Epidemiologie und ökonomische Aspekte der Sepsis bei Erwachsenen, *Internist* (vol. 50), No. 7, pp. 788-798.
- 117 Morgenthaler, N. G. und Kostrzewa, M. (2015): Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit, *Int J Microbiol* (vol. 2015), p. 827416.
- 118 Munson, E. L., Diekema, D. J., Beekmann, S. E., Chapin, K. C. und Doern, G. V. (2003): Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management, *J Clin Microbiol* (vol. 41), No. 1, pp. 495-497.
- 119 Nierhaus, A., Klätte, S., Linssen, J., Eismann, N. M., Wichmann, D., Hedke, J., Braune, S. A. und Kluge, S. (2013): Revisiting the white blood cell count: immature granulocytes count as a diagnostic marker to discriminate between SIRS and sepsis--a prospective, observational study, *BMC Immunol* (vol. 14), p. 8.
- 120 Nonnemann, B., Tvede, M. und Bjarnsholt, T. (2013): Identification of pathogenic microorganisms directly from positive blood vials by matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, *APMIS* (vol. 121), No. 9, pp. 871-877.
- 121 Opota, O., Croxatto, A., Prod'hom, G. und Greub, G. (2015): Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art, *Clin Microbiol Infect* (vol. 21), No. 4, pp. 313-322.
- 122 Osthoff, M., Gurtler, N., Bassetti, S., Balestra, G., Marsch, S., Pargger, H., Weisser, M. und Egli, A. (2017): Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial, *Clin Microbiol Infect* (vol. 23), No. 2, pp. 78-85.
- 123 Panknin, H.-T. (2015): Multiresistente Infektionserreger, *ProCare* (vol. 20), No. 3, pp. 28-32.
- 124 Pletz, M. W., Bloos, F., Burkhardt, O., Brunkhorst, F. M., Bode-Boger, S. M., Martens-Lobenhoffer, J., Greer, M. W., Stass, H. und Welte, T. (2010): Pharmacokinetics of moxifloxacin in patients with severe sepsis or septic shock, *Intensive Care Med* (vol. 36), No. 6, pp. 979-983.
- 125 Raupach-Rosin, H., Duddeck, A., Gehrlich, M., Helmke, C., Huebner, J., Pletz, M. W., Mikolajczyk, R. und Karch, A. (2017): Deficits in knowledge, attitude, and practice towards blood culture sampling: results of a nationwide mixed-methods study among inpatient care physicians in Germany, *Infection* (vol. 45), No. 4, pp. 433-441.

- 126 Raz, R. (2012): Fosfomycin: an old--new antibiotic, *Clin Microbiol Infect* (vol. 18), No. 1, pp. 4-7.
- 127 Reinhart, K., Brunkhorst, F., Bone, H., Gerlach, H., Grundling, M., Kreymann, G., Kujath, P., Marggraf, G., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Peckelsen, C., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T. und Werdan, K. (2006): [Diagnosis and therapy of sepsis: guidelines of the German Sepsis Society Inc. and the German Interdisciplinary Society for Intensive and Emergency Medicine], *Anaesthesist* (vol. 55 Suppl 1), pp. 43-56.
- 128 Ringberg, H., Thoren, A. und Bredberg, A. (1991): Evaluation of coagulase-negative staphylococci in blood cultures. A prospective clinical and microbiological study, *Scand J Infect Dis* (vol. 23), No. 3, pp. 315-323.
- 129 Rodloff, A., Bauer, T., Ewig, S., Kujath, P. und Muller, E. (2008): Susceptible, intermediate, and resistant - the intensity of antibiotic action, *Dtsch Arztebl Int* (vol. 105), No. 39, pp. 657-662.
- 130 Rodriguez-Sanchez, B., Sanchez-Carrillo, C., Ruiz, A., Marin, M., Cercenado, E., Rodriguez-Creixems, M. und Bouza, E. (2014): Direct identification of pathogens from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin Microbiol Infect* (vol. 20), No. 7, pp. O421-O427.
- 131 Romero-Gomez, M. P., Munoz-Velez, M., Gomez-Gil, R. und Mingorance, J. (2013): Evaluation of combined use of MALDI-TOF and Xpert((R)) MRSA/SA BC assay for the direct detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* from positive blood culture bottles, *J Infect* (vol. 67), No. 1, pp. 91-92.
- 132 Ruiz-Aragon, J., Ballesterro-Tellez, M., Gutierrez-Gutierrez, B., de Cueto, M., Rodriguez-Bano, J. und Pascual, A. (2017): Direct bacterial identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry: A systematic review and meta-analysis, *Enferm Infecc Microbiol Clin*.
- 133 Saffert, R. T., Cunningham, S. A., Ihde, S. M., Jobe, K. E., Mandrekar, J. und Patel, R. (2011): Comparison of Bruker Biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometer to BD Phoenix automated microbiology system for identification of gram-negative bacilli, *J Clin Microbiol* (vol. 49), No. 3, pp. 887-892.
- 134 Schmitz, R. P., Keller, P. M., Baier, M., Hagel, S., Pletz, M. W. und Brunkhorst, F. M. (2013): Quality of blood culture testing - a survey in intensive care units and microbiological laboratories across four European countries, *Crit Care* (vol. 17), No. 5, p. R248.
- 135 Schreiber, J., Nierhaus, A., Braune, S. A., Heer, G. und Kluge, S. (2013): Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients, *Med Klin Intensivmed Notfmed* (vol. 108), No. 4, pp. 311-318.

- 136 Schubert, S. und Wieser, A. (2011): Einsatz der Matrix-Assisted Laser Desorption/ionisation-Time of Flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) in der mikrobiologischen Routinediagnostik/Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) in clinical microbiological routine diagnostics, *J Lab Med* (vol. 35), No. 4, pp. 195-203.
- 137 Schweickert, B., Noll, I., Feig, M., Claus, H., Krause, G., Velasco, E. und Eckmanns, T. (2012): MRSA-surveillance in Germany: data from the Antibiotic Resistance Surveillance System (ARS) and the mandatory surveillance of MRSA in blood, *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* (vol. 31), No. 8, pp. 1855-1865.
- 138 Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P. E., Rolain, J. M. und Raoult, D. (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, *Clin Infect Dis* (vol. 49), No. 4, pp. 543-551.
- 139 Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. und et al. (2016): The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3), *JAMA* (vol. 315), No. 8, pp. 801-810.
- 140 Snyder, J. W., Munier, G. K., Heckman, S. A., Camp, P. und Overman, T. L. (2009): Failure of the BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* isolates in positive blood cultures collected in the United States, *J Clin Microbiol* (vol. 47), No. 11, pp. 3747-3748.
- 141 Soerensen, K. E., Nielsen, O. L., Birck, M. M., Soerensen, D. B., Leifsson, P. S., Jensen, H. E., Aalbaek, B., Kristensen, A. T., Wiinberg, B., Kjølgaard-Hansen, M., Heegaard, P. M. und Iburg, T. M. (2012): The use of sequential organ failure assessment parameters in an awake porcine model of severe *Staphylococcus aureus* sepsis, *APMIS* (vol. 120), No. 11, pp. 909-921.
- 142 Souvenir, D., Anderson, D. E., Jr., Palpant, S., Mroch, H., Askin, S., Anderson, J., Claridge, J., Eiland, J., Malone, C., Garrison, M. W., Watson, P. und Campbell, D. M. (1998): Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antisepsis, pseudobacteremia, and therapy of patients, *J Clin Microbiol* (vol. 36), No. 7, pp. 1923-1926.
- 143 Stager, C. E. und Davis, J. R. (1992): Automated systems for identification of microorganisms, *Clin Microbiol Rev* (vol. 5), No. 3, pp. 302-327.
- 144 Stamper, P. D., Cai, M., Howard, T., Speser, S. und Carroll, K. C. (2007): Clinical validation of the molecular BD GeneOhm StaphSR assay for direct detection of *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in positive blood cultures, *J Clin Microbiol* (vol. 45), No. 7, pp. 2191-2196.
- 145 Struelens, M. J. und de Mendonca, R. (2001): The emerging power of molecular diagnostics: towards improved management of life-threatening infection, *Intensive Care Med* (vol. 27), No. 11, pp. 1696-1698.

- 146 Szabados, F., Michels, M., Kaase, M. und Gatermann, S. (2011): The sensitivity of direct identification from positive BacT/ALERT (bioMerieux) blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry is low, *Clin Microbiol Infect* (vol. 17), No. 2, pp. 192-195.
- 147 Taeb, A. M., Hooper, M. H. und Marik, P. E. (2017): Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management, *Nutr Clin Pract* (vol. 32), No. 3, pp. 296-308.
- 148 Tafelski, S., Nachtigall, I., Adam, T., Bereswill, S., Faust, J., Tamarkin, A., Trefzer, T., Deja, M., Idelevich, E. A., Wernecke, K. D., Becker, K., Spies, C. und Molecular Diagnostics of Sepsis Study, Group (2015): Randomized controlled clinical trial evaluating multiplex polymerase chain reaction for pathogen identification and therapy adaptation in critical care patients with pulmonary or abdominal sepsis, *J Int Med Res* (vol. 43), No. 3, pp. 364-377.
- 149 Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., Yoshida, T. und Matsuo, T. (1988): Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry, *Rapid Commun Mass Spectrom* (vol. 2), No. 8, pp. 151-153.
- 150 Tanner, H., Evans, J. T., Gossain, S. und Hussain, A. (2017): Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF, *BMC Res Notes* (vol. 10), No. 1, p. 48.
- 151 Tannock, G. W. (1999): Identification of lactobacilli and bifidobacteria, *Curr Issues Mol Biol* (vol. 1), No. 1-2, pp. 53-64.
- 152 Tille, P. M. (2016): *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 14th Edn, pp. 179-197, Mosby St. Louis.
- 153 Tissari, P., Zumla, A., Tarkka, E., Mero, S., Savolainen, L., Vaara, M., Aittakorpi, A., Laakso, S., Lindfors, M., Piiparinen, H., Maki, M., Carder, C., Huggett, J. und Gant, V. (2010): Accurate and rapid identification of bacterial species from positive blood cultures with a DNA-based microarray platform: an observational study, *Lancet* (vol. 375), No. 9710, pp. 224-230.
- 154 van Veen, S. Q., Claas, E. C. und Kuijper, E. J. (2010): High-throughput identification of bacteria and yeast by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in conventional medical microbiology laboratories, *J Clin Microbiol* (vol. 48), No. 3, pp. 900-907.
- 155 Victorino, F. und Alper, S. (2013): Identifying novel spatiotemporal regulators of innate immunity, *Immunol Res* (vol. 55), No. 1-3, pp. 3-9.
- 156 Vincent, J. -L., Moreno, R., Takala, J., Willatts, S., De Mendonça, A., Bruining, H., Reinhart, C. K., Suter, P. M. und Thijs, L. G. (1996): The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure, *Intensive Care Med* (vol. 22), No. 7, pp. 707-710.
- 157 Vincent, J. L. (2000): Update on sepsis: pathophysiology and treatment, *Acta Clin Belg* (vol. 55), No. 2, pp. 79-87.

- 158 Vincent, J. L. und Abraham, E. (2006): The last 100 years of sepsis, *Am J Respir Crit Care Med* (vol. 173), No. 3, pp. 256-263.
- 159 Vincent, J. L., Bihari, D. J., Suter, P. M., Bruining, H. A., White, J., Nicolas-Chanoin, M. H., Wolff, M., Spencer, R. C. und Hemmer, M. (1995): The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee, *JAMA* (vol. 274), No. 8, pp. 639-644.
- 160 Volk, H. D., Reinke, P. und Docke, W. D. (2000): Clinical aspects: from systemic inflammation to 'immunoparalysis', *Chem Immunol* (vol. 74), pp. 162-177.
- 161 Volk, H. D., Reinke, P., Krausch, D., Zuckermann, H., Asadullah, K., Muller, J. M., Docke, W. D. und Kox, W. J. (1996): Monocyte deactivation--rationale for a new therapeutic strategy in sepsis, *Intensive Care Med* (vol. 22 Suppl 4), pp. S474-S481.
- 162 Walter, J., Noll, I., Feig, M., Weiss, B., Claus, H., Werner, G., Eckmanns, T., Hermes, J. und Abu Sin, M. (2017): Decline in the proportion of methicillin resistance among *Staphylococcus aureus* isolates from non-invasive samples and in outpatient settings, and changes in the co-resistance profiles: an analysis of data collected within the Antimicrobial Resistance Surveillance Network, Germany 2010 to 2015, *BMC Infect Dis* (vol. 17), No. 1, p. 169.
- 163 Weimann, A., Lun, A., Lun, S., Zimmermann, M., Borges Adrian, C., Ziebig, R., Gonzalez Jose, B., Munoz Saravia Silvia, G., Knebel, F., Schroeckh, S. und Schimke, I. (2010): Leukocyte, neutrophil, immature granulocyte counts and interleukin-6 are superior to procalcitonin, C-reactive protein and delta-He for detection of mild inflammation: data from marathon runners producing mild systemic inflammation visible immediately after the run, *J Lab Med* (vol. 34), No. 1, pp. 53-59.
- 164 Weiß, C. (2010): *Basiswissen Medizinische Statistik* pp. 314-320, Springer Berlin Heidelberg.
- 165 Wendel, M., Heller, A. R. und Koch, T. (2009): Pathomechanismen des Organversagens, *Anaesthesist* (vol. 58), No. 4, pp. 343-352.
- 166 Wernitz, M. H., Keck, S., Swidsinski, S., Schulz, S. und Veit, S. K. (2005): Cost analysis of a hospital-wide selective screening programme for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriers in the context of diagnosis related groups (DRG) payment, *Clin Microbiol Infect* (vol. 11), No. 6, pp. 466-471.
- 167 Wieser, A., Schneider, L. B., Jung, J. und Schubert, S. (2012): MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review), *Appl Microbiol Biotechnol* (vol. 93), No. 3, pp. 965-974.
- 168 Wimmer, J. L., Long, S. W., Cernoch, P., Land, G. A., Davis, J. R., Musser, J. M. und Olsen, R. J. (2012): Strategy for rapid identification and antibiotic susceptibility testing of gram-negative bacteria directly recovered from positive blood cultures using the Bruker MALDI Biotyper and the BD Phoenix system, *J Clin Microbiol* (vol. 50), No. 7, pp. 2452-2454.

- 169 Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. und Edmond, M. B. (2004): Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study, *Clin Infect Dis* (vol. 39), No. 3, pp. 309-317.
- 170 Witte, W., Cuny, C., Strommenger, B., Bräulke, C. und Heuck, D. (2004): Emergence of a new community acquired MRSA strain in Germany, *Euro Surveill* (vol. 9), No. 1, pp. 16-18.
- 171 Wolkewitz, M., Beyersmann, J., Gastmeier, P. und Schumacher, M. (2009): Modeling the effect of time-dependent exposure on intensive care unit mortality, *Intensive Care Med* (vol. 35), No. 5, pp. 826-832.
- 172 Wolters, M., Rohde, H., Maier, T., Belmar-Campos, C., Franke, G., Scherpe, S., Aepfelbacher, M. und Christner, M. (2011): MALDI-TOF MS fingerprinting allows for discrimination of major methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* lineages, *Int J Med Microbiol* (vol. 301), No. 1, pp. 64-68.
- 173 Yonetani, S., Okazaki, M., Araki, K., Makino, H., Fukugawa, Y., Okuyama, T., Ohnishi, H. und Watanabe, T. (2012): Direct inoculation method using BacT/ALERT 3D and BD Phoenix System allows rapid and accurate identification and susceptibility testing for both Gram-positive cocci and Gram-negative rods in aerobic blood cultures, *Diagn Microbiol Infect Dis* (vol. 73), No. 2, pp. 129-134.
- 174 Zhang, M., Ito, T., Li, S., Misawa, S., Kondo, S., Miida, T., Ohsaka, A. und Hiramatsu, K. (2013): Analysis of Staphylococcal cassette chromosome mec in BD GeneOhm MRSA assay-negative strains, *Antimicrob Agents Chemother* (vol. 57), No. 6, pp. 2890-2891.
- 175 Zhou, M., Yang, Q., Kudinha, T., Sun, L., Zhang, R., Liu, C., Yu, S., Xiao, M., Kong, F., Zhao, Y. und Xu, Y. C. (2017): An Improved In-house MALDI-TOF MS Protocol for Direct Cost-Effective Identification of Pathogens from Blood Cultures, *Front Microbiol* (vol. 8), p. 1824.
- 176 Ziesing, S., Heim, A. und Vonberg, R.-P. (2009): Methoden der mikrobiologischen Diagnostik, *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie* pp. 131-150, Springer Berlin Heidelberg.
- 177 Zimmerli, M., Widmer, A. F., Dangel, M., Filippi, A., Frei, R. und Meyer, J. (2009): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among dental patients: a problem for infection control in dentistry?, *Clin Oral Investig* (vol. 13), No. 4, pp. 369-373.
- 178 Zimmermann, M., Cremer, M., Hoffmann, C., Weimann, K. und Weimann, A. (2011): Granularity Index of the SYSMEX XE-5000 hematology analyzer as a replacement for manual microscopy of toxic granulation neutrophils in patients with inflammatory diseases, *Clin Chem Lab Med* (vol. 49), No. 7, pp. 1193-1198.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophie Cathérine Krysewski, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einsatz von PCR, Massenspektrometrie und konventionellen Verfahren zur direkten Identifizierung und Resistenzbestimmung von Mikroorganismen aus Blutkulturen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

30. Mai 2018

Datum

Unterschrift

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in Kooperation mit den Firmen Bruker Daltonik GmbH und Becton Dickinson GmbH am Institut für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Die zur Durchführung der Studie benötigten Geräte und Materialien wurden freundlicherweise von den Firmen bereitgestellt.

Ich danke an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Ulf B. Göbel für die Möglichkeit, diese Studie an seinem Institut durchführen zu können.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Adam für die Überlassung des Themas, die umfassende und freundliche Betreuung bei der Durchführung dieser wissenschaftlichen Arbeit und die konstruktive Kritik beim Verfassen der Dissertation. Seine engagierte und kompetente Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der vorliegenden Studie hat wesentlich zum Erstellen dieser Dissertation beigetragen.

Ich danke Herrn Evrim Ilden und Herrn Traugott Wierer für die umfangreiche statistische Hilfestellung bei der Datenanalyse und den Mitarbeitern des Instituts für Biometrie und klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin Frau Andrea Stroux und Herrn Klaus Lenz für die Beratung bei der Auswahl geeigneter statistischer Tests.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie und Hygiene der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin für die unkomplizierte und angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Ich bin meinen Eltern zutiefst dankbar für die Unterstützung meiner langen Berufsausbildung. Sie haben mich immer mit viel Verständnis, Liebe und Zuversicht auf meinem Lebensweg begleitet.

Ich danke meinen Geschwistern und meinen Freunden für den stetigen Zuspruch, die Ermutigung und den liebevollen Beistand in allen Lebenslagen.