

Aus dem Institut/der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt
operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Nutzen des LightCycler®SeptiFast Tests zur Erregerdetektion bei
postoperativ septischen Patienten im Vergleich zur
Standarddiagnostik mit Blutkulturen**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Faust

aus Berlin

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhalt	
Abkürzungsverzeichnis.....	4
1. Abstrakt	5
2. Einleitung.....	7
2.1 Sepsis – Definition, Epidemiologie	7
2.2 Steigender Einfluss von Candidämien.....	8
2.3 Blutkultur – Sensitivität, Kontamination	8
2.4 SeptiFast Test	9
2.5 Herleitung der Aufgabenstellung und Studienziel.....	11
3. Patienten und Methoden.....	13
3.1 Studiendesign und Datenerhebungszeitraum	13
3.2 Ethik – und Datenschutzvotum.....	13
3.3 Studienlokalisierung	13
3.4 Ein- und Ausschlusskriterien	13
3.5 Studienein- und ausschluss.....	14
3.6 Probenversand.....	16
3.7 Befundmitteilung und Randomisierung.....	16
3.8 Entnahme und Analyse der Blutkulturen	16
3.9 Lightcycler® SeptiFast Test	17
3.9.1 Probenvorbereitung (mechanische Lyse und Nukleinsäurepräparation).....	17
3.9.2 Analyse mittels Lightcycler® SeptiFast Test	19
3.9.3 Erregeridentifikation	21
3.9.4 Sensitivität des SeptiFast Tests	22
3.9.5 Kontaminationsfreies Arbeiten	22
3.10 Datenerhebung.....	22
3.11 Zielgrößen	23
3.12 Statistik.....	23
4. Ergebnisse.....	25
4.1 Eingeschlossene Patienten und Basischarakteristika	25
4.2 Erregeridentifikation	26
4.3 Zeit – Analyse und Therapiemodifikation	29
5. Diskussion	34
5.1 eingeschlossene Patienten und Basischarakteristika.....	34
5.2 Erregeridentifikation	34

5.3 Zeit-Analyse und Therapiemodifikation	35
5.4 Stärken der Studie.....	36
5.5 Limitationen der Studie.....	37
5.6 PCR-basierte Diagnostik bei Candidämien	37
5.7 weitere PCR-basierte Methoden	38
5.8 Ausblick.....	38
6. Literaturverzeichnis	41
7. Eidesstattliche Erklärung	49
8. Lebenslauf	51
9. Publikationsliste	52
10. Danksagung	53

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ARDS	Atemnotsyndrom des Erwachsenen
BK	Blutkultur
CAP	Ambulant erworbene Pneumonie
CFU	Kolonienformende Einheiten
CG	Kontrollgruppe
CoNS	Koagulase negative Staphylokokken
COPRA	Computer Organized Patient Report Assistant
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HAI	Hauptstadtkongress für Anästhesiologie und Intensivmedizin
ICU/ITS	Intensivstation
IG	Interventionsgruppe
ISRCTN	Internationale standardisierte Nummer zur Registrierung von RCTs
ITS	Internal Transcribed Spacer
LC	Lightcycler® SeptiFast
NPV	Negativ prädiktiver Wert
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDMS	Patienten-Daten-Management-Systeme
PPV	Positiv prädiktiver Wert
RCT	Randomized Controlled Trial
SAP	Systeme Anwendungen Produkte
SAPS	Simplified Acute Physiology Score
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response – Syndrom
SML	SeptiFast Master Liste
SPSS	Statistical Package of the Social Sciences, Statistikprogramm
T _M	Schmelztemperatur
WPP2	Wahlpflichtpraktikum 2
ZVK	Zentraler Venenkatheter

1. Abstrakt

Einleitung

Die Schwere der Sepsis und ihre zunehmende Inzidenz erfordert Diagnostik, die einen schnellen Erregernachweis liefert, um frühzeitig eine effektive Therapie zu initiieren. Ziel dieser randomisiert kontrollierten klinischen Studie (RCT) ist der Vergleich initialer Diagnostiken bei Intensivpatienten mit pulmonogener oder abdomineller Sepsis und die Darstellung der Zeitersparnis sowie Therapiemodifikation durch Nutzung des auf multiplex PCR basierten Lightcycler® SeptiFast Tests (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gegenüber der Standarddiagnostik mit Blutkulturen.

Methoden

Der RCT wurde von August 2010 bis März 2012 auf sechs beteiligten Intensivstationen der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt. Eingeschlossene Patienten erhielten parallel zur Blutkulturdiagnostik die Abnahme von 1,5ml EDTA-Blut für den SeptiFast-Test. In die Interventionsgruppe randomisierte Patienten erhielten die zusätzliche PCR Diagnostik, deren Ergebnis telefonisch an die Intensivstation übermittelt wurde. Der RCT wurde mit der Studiennummer ISRCTN 70694559 registriert.

Ergebnisse

Es wurden 78 Patienten eingeschlossen, davon 37 in die Kontroll- und 41 in die Interventionsgruppe. Die Basischarakteristika beider waren vergleichbar. In der Interventionsgruppe betrug die durchschnittliche Zeitdauer von Probengewinnung bis Resultatübermittlung 15,9 Stunden. Die PCR konnte in 24,4% der Fälle einen Erreger detektieren. Die Ergebnisse der Kontrollgruppe erschienen durchschnittlich 22 Stunden später ($p < 0.001$). Eine Therapiemodifikation nach positivem SeptiFast-Resultat erfolgte in 40% der Fälle (zwei invasive Mykosen, einmal *Staphylococcus aureus*, einmal *Pseudomonas aeruginosa*). Die dafür benötigte Zeit ab initialer Diagnostik betrug in der Interventionsgruppe durchschnittlich 18 Stunden und in der Kontrollgruppe 38 Stunden.

Schlussfolgerung

Der Lightcycler® SeptiFast-Test zeigte gegenüber der Blutkulturdiagnostik eine signifikante Zeitersparnis von Probengewinnung bis Resultatübermittlung mit Einfluss auf die Therapiesteuerung. Molekulare PCR-basierte Methoden scheinen eine nützliche zusätzliche Diagnostikoption darzustellen, insbesondere bezüglich invasiver Mykosen.

Introduction

The severity of sepsis and its increasing incidence requires a fast diagnostic method in order to initiate early and effective therapy. This RCT aims to compare the multiplex PCR Lightcycler® SeptiFast test (Roche Diagnostics GmbH, Germany) with the standard blood culture diagnostic in ICU patients with abdominal and pulmonary sepsis demonstrating considerable time saving which could possibly lead to therapeutic modifications in the subsequent treatment.

Methods

This randomized controlled trial, run from August 2010 until March 2012, took place in six ICUs at the Charité University hospital, Berlin. Parallel to the standard blood culture diagnostic, an additional 1.5ml blood sample was taken from participating patients for the SeptiFast PCR. Patients randomized into the intervention group were additionally exposed to the multiplex PCR diagnostic with results immediately passed on by telephone. This RCT was authorized and registered (ISRCTN 70694559).

Results

Altogether, a total of 78 patients participated in this study, 37 were assigned to the control group (CG) and the other 41 participants randomized to the intervention group (IG). There was no significant difference in basic characteristics between both groups. In the IG, pathogens were detected by PCR in 24.4% of the cases with an average duration of 15.9 hours from the initial blood sampling to the final transmission of PCR-results to the corresponding ICU. By contrast, the CG received their test results with an average of 22 additional hours ($p < 0.001$). Therapy modification was performed in 40% of the positive cases (two invasive mycosis, one finding of *Staphylococcus aureus* and one of *Pseudomonas aeruginosa*). The mean time required for this alteration amounted 18 hours for the IG and 38 hours for the CG, measured from the initial diagnostic test.

Conclusion

This RCT showed that utilizing the Lightcycler® SeptiFast – Test compared to a standard blood culture diagnostic can significantly reduce the timespan from the initial blood sampling to the final result transmission impacting therapy management. Molecular PCR-based methods thus appear to be a useful and beneficial diagnostic test, especially for cases of suspected mycosis.

2. Einleitung

2.1 Sepsis – Definition, Epidemiologie

Die Sepsis, in direkter Übersetzung aus dem Griechischen als Fäulnis bezeichnet, wurde 1989 von dem amerikanischen Intensivmediziner Roger C. Bone als „eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion“ definiert¹. 1992 wurde in der Konsensuskonferenz der American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine (ACCP/SCCM) die bis heute gültigen Diagnosekriterien der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks erarbeitet² (Abbildung 1).

Abbildung 1: Diagnosekriterien der Sepsis, schweren Sepsis und des septischen Schocks (mod. nach³)

I - Nachweis der Infektion	II – Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) (mind. 2 Kriterien)	III – akute Organdysfunktion (mind. 1 Kriterium)
Diagnose einer Infektion über den mikrobiologischen Nachweis oder durch klinische Kriterien	<ul style="list-style-type: none"> • Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) bestätigt durch eine rektale oder intravasale oder – vesikale Messung • Tachykardie: Herzfrequenz ≥ 90 /min • Tachypnoe (Frequenz ≥ 20/min) o. Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 4.3$ kPa/ ≤ 33 mmHg) • Leukozytose ($\geq 12000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($\leq 4000/\mu\text{l}$) oder $\geq 10\%$ unreife Neutrophile im Differentialblutbild 	<ul style="list-style-type: none"> • Akute Enzephalopathie: eingeschränkte Vigilanz, Desorientiertheit, Unruhe, Delirium. • Relative oder absolute Thrombozytopenie: Abfall der Thrombozyten um mehr als 30% innerhalb von 24 Stunden oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\mu\text{l}$. Eine Thrombozytopenie durch akute Blutung oder immunologische Ursachen muss ausgeschlossen sein. • Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 10$ kPa (≤ 75 mmHg) unter Raumluft oder ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis von ≤ 33 kPa (≤ 250 mmHg) unter Sauerstoffapplikation. Eine manifeste Herz- oder Lungenerkrankung muss als Ursache der Hypoxämie ausgeschlossen sein. • Renale Dysfunktion: Eine Diurese von ≤ 0.5 ml/kg/h für wenigstens 2 Stunden trotz ausreichender Volumensubstitution und/oder ein Anstieg des Serumkreatinins $> 2\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches. • Metabolische Azidose: Base Excess ≤ -5 mmol/l oder eine Laktatkonzentration $> 1,5\times$ oberhalb des lokal üblichen Referenzbereiches.
<p>Sepsis: Kriterien I und II schwere Sepsis: Kriterien I, II und III septischer Schock: Kriterien I und II + sowie für wenigstens 1 Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck ≤ 65 mmHg oder notwendiger Vasopressoreinsatz, um den systolischen arteriellen Blutdruck ≥ 90 mmHg oder den arteriellen Mitteldruck ≥ 65 mmHg zu halten. Die Hypotonie besteht trotz adäquater Volumengabe und ist nicht durch andere Ursachen zu erklären.</p>		

Seither steht das Erkrankungsbild in intensivem Forschungsfokus der Intensivmedizin. Die weltweit steigenden Inzidenzen weisen regionale und jahreszeitliche Unterschiede auf⁴⁻¹⁰. Für die Vereinigten Staaten von Amerika ermittelten Lagu et al eine Inzidenz der schweren Sepsis von 300 pro 100.000 Patienten mit einer Mortalität von 87 pro 100.000 Patienten im Krankenhaus¹¹. In Deutschland liegt die Inzidenz der Sepsis bei 116 von 100.000 adulten Patienten, die der schweren Sepsis und des septischen Schocks liegt bei 110 von 100.000 Patienten¹². Daraus ergibt sich eine jährliche Neuerkrankungsrate der Sepsis von 79.000 Menschen. Des Weiteren stellt die Sepsis mit einer Prävalenz von 12,4 % und die schwere Sepsis mit einer Prävalenz von 11% die dritthäufigste Todesursache nach der Koronaren Herzerkrankung und dem Myokardinfarkt in Deutschland dar¹². Als ursächliche Foki treten dabei weltweit am häufigsten pulmonale und abdominale Infektionen auf^{10,13-16}.

2.2 Steigender Einfluss von Candidämien

Grampositive Organsimen stellen die größte Gruppe der kausalen Erreger der Sepsis dar, wobei die Anzahl der Pilzinfektionen stetig zunimmt¹⁷. Die Inzidenz für intensivmedizinisch behandelte Patienten mit postoperativen Candidämien liegt bei 3,3 von 1000 mit einer Letalität von 40 Prozent¹⁸. *Candida albicans* ist mit 60 Prozent der am häufigsten isolierte Erreger, gefolgt von *Candida glabrata* mit 16 Prozent^{19,20}. Manche Studien zeigen eine wachsende Häufigkeit von *nicht-Candida-albicans* Candidämien gegenüber *Candida albicans* Candidämien²¹⁻²⁴. Prädisponierende Faktoren für die Entwicklung von Candidämien auf Intensivstationen sind vorangegangene abdominalchirurgische Eingriffe, akutes Nierenversagen, intravasale Katheter, parenterale Ernährung, Breitspektrumantibiotika, verlängerter intensivmedizinischer Aufenthalt, Kortikosteroide und die muköse Kolonisation mit *Candida* spezies²⁵. Prognostisch entscheidend ist die rasche Diagnostik und Therapie²⁶.

2.3 Blutkultur – Sensitivität, Kontamination

Die Entnahme von Blutkulturen (BK) ist in der Diagnostik der Sepsis der Goldstandard²⁷. Die Sensitivität und die Spezifität der Blutkulturen sind abhängig von dem Entnahmeort^{28,29}. Die Entnahme der Blutkultur aus einem ZVK ist sensitiver als die aus einer peripheren Vene, jedoch weniger spezifisch^{28,29}. Bedingt durch die zweifach höhere Kontaminationsgefahr^{28,30}, sollte die Abnahme nur in Ausnahmefällen über einen zentralen Zugang erfolgen³. Der positiv prädiktive Wert (PPV) für beide

Entnahmeorte ist gering und liegt zwischen 58,3 und 63 Prozent beim ZVK und für die periphere Vene bei 66,7 bis 78 Prozent, wohingegen der negativ prädiktive Wert (NPV) für beide Entnahmeorte sehr gut ist und zwischen 95 und 98 Prozent liegt^{28,29}. Die Sensitivität der Blutkulturen erhöht sich, je mehr Blutkulturflaschen beimpft werden und variiert von 75 Prozent bei 2 Flaschen, über 89 Prozent bei sechs Flaschen bis zu 92 Prozent bei 12 abgenommenen Flaschen³¹. Die Erregeridentifikation unter antibiotischer Therapie ist erschwert. Verglichen mit den Blutkulturbefunden vor antibiotischer Therapie konnte in einer Studie von Grace et al unter antibiotischer Therapie nur ein neuer Erreger isoliert werden. Vor Beginn der Antibiotikagabe isolierte Erreger konnten dagegen in 45 Prozent der Fälle bestätigt werden³². Falsch-positive Befunde können den Nutzen aller Tests und somit auch den der Blutkulturen reduzieren. Kontaminationen der Blutkulturen variieren von 0,6 bis 6 Prozent²⁷. Koagulase negative Staphylokokken (CoNS) stellen hierbei in bis zu 80 Prozent die häufigsten Kontaminanten dar^{30,33-36}, obgleich aktuell zunehmend mehr CoNS bedingte Bakteriämien auftreten³⁷⁻³⁹.

2.4 SeptiFast Test

Der *SeptiFast* Test ist ein molekulares Testverfahren zur Erregeridentifikation basierend auf genomischer multiplex Polymerase Kettenreaktion (PCR) und kann unabhängig von der Pathogenvitalität die 25 häufigsten Erreger einer Sepsis ermitteln, welche in der *SeptiFast* Test Master Liste aufgeführt sind (Tabelle 1). Die *SeptiFast* Test Master Liste (SML) umfasst sowohl Bakterien im grampositiven und -negativen Bereich, als auch Pilze. Insgesamt können mit dem Lightcycler® *SeptiFast* Test 90 Prozent der ursächlichen Erreger einer Sepsis detektiert werden^{40,41}. Eine Differenzierung der Klebsiellen zwischen *Klebsiella pneumoniae* und *Klebsiella oxytoca* ist nicht möglich, ebenso die Differenzierung zwischen *Enterobacter cloacae* und *E. aerogenes*. In Tabelle 2 ist die genauere Aufspaltung der Koagulase negativen Staphylokokken (CoNS) sowie der Streptokokken aufgelistet.

Für die Analyse werden 1,5ml Vollblut aus befüllten EDTA Röhrchen benötigt. Diese werden mittels des standardisierten und teilautomatisierten molekularbiologischen *SeptiFast* Lightcyclers® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) – Analysegerät untersucht. Basierend auf Multiplex Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) im Echtzeit PCR Format wird eine schnelle Erregerdetektion gewährleistet, die durchschnittlich 6 Stunden von Bearbeitungsbeginn bis zur Erregerdetektion benötigt.

Die detaillierte Beschreibung dieses Tests erfolgt im Methodenteil (siehe Seite 17).

Tabelle 1: SeptiFast Test Master Liste: Darstellung aller detektierbaren Erreger des SeptiFast Lightcyclers® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

Gramnegative Bakterien	Grampositive Bakterien	Pilze
Escherichia coli	Staphylococcus aureus	Candida albicans
Klebsiella (pneumoniae / oxytoca)	CoNS (Coagulase negative Staphylococci)	Candida tropicalis
Serratia marcescens	Streptococcus pneumoniae	Candida parapsilosis
Enterobacter (cloacae / aerogenes)	Streptococcus spp.	Candida glabrata
Proteus mirabilis	Enterococcus faecium	Candida krusei
Pseudomonas aeruginosa	Enterococcus faecalis	Aspergillus fumigatus
Acinetobacter baumannii		
Stenotrophomonas maltophilia		

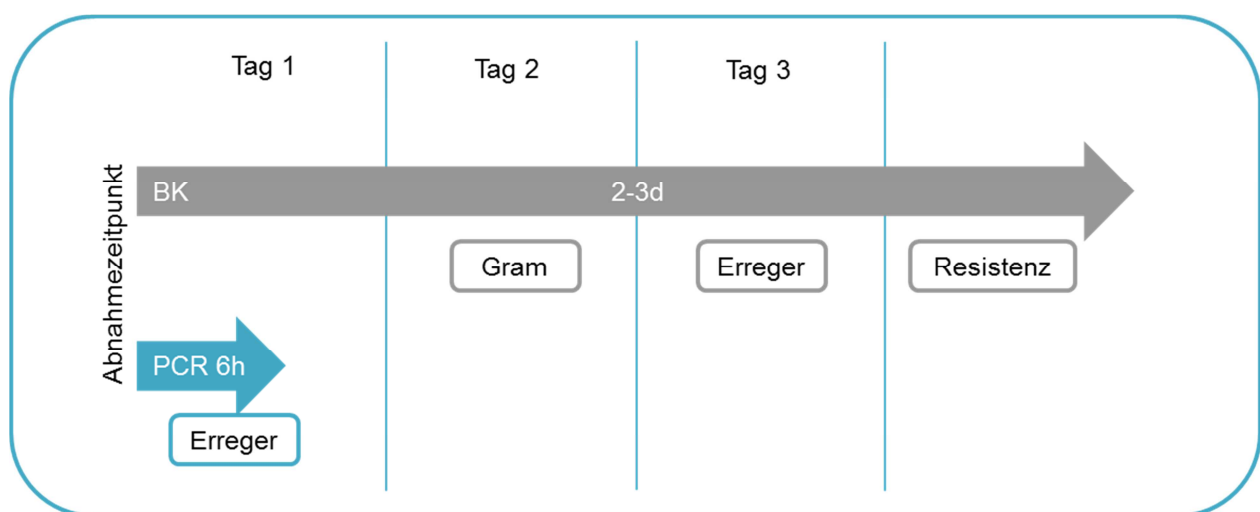
Tabelle 2: mittels Lightcycler® SeptiFast Test positiv getestete Streptokokken und CoNS

Streptococcus spp.	CoNS
<i>S. agalactiae</i> <i>S. anginosus</i> <i>S. bovis</i> <i>S. constellatus</i> <i>S. cristatus</i> <i>S. gordonii</i> <i>S. intermedius</i> <i>S. milleri</i> <i>S. mitis</i> <i>S. mutans</i> <i>S. oralis</i> <i>S. parasanguinis</i> <i>S. pneumoniae</i> <i>S. pyogenes</i> <i>S. salivarius</i> <i>S. sanguinis</i> <i>S. thermophilus</i> <i>S. vestibularis</i> <i>S. viridans</i>	<i>S. hominis subsp novobiosepticus</i> <i>S. pasteurii</i> <i>S. warneri</i> <i>S. cohnii subsp. urealyticum</i> <i>S. hominis subsp. Hominis</i> <i>S. lugdunensis</i> <i>S. cohnii subsp. cohnii</i> <i>S. capitis subsp. ureolyticus</i> <i>S. capitis subsp. capitis</i> <i>S. caprae</i> <i>S. saprophyticus</i> <i>S. saprophyticus subsp. saprophyticus</i> <i>S. xylosum</i> <i>S. epidermidis</i> <i>S. haemolyticus</i>

2.5 Herleitung der Aufgabenstellung und Studienziel

Die Diagnostik und daraus resultierende Therapie der Sepsis stellen für Intensivmediziner eine wichtige und gleichzeitig diffizile Aufgabe dar. Es dauert mindestens 48 Stunden bis das erste Ergebnis der Blutkultur vorhanden ist und dementsprechend eine Adaptation der Antibiotikatherapie erfolgen kann⁴⁰. Der nötige Antibiotikaeinsatz ist in bis zu 50 Prozent der Fälle ineffizient^{40,42-44} und gleichzeitig mortalitätsbeeinflussend⁴⁵. Verglichen mit einer anfänglich effektiven Antibiotikatherapie ist die Mortalität im Krankenhaus signifikant höher, wenn die Antibiotikatherapie anfänglich unwirksam ist⁴⁵. Ein weiteres Problem stellt der Mangel an positiven mikrobiologischen Befunden dar. Die Rate der positiven Blutkulturen zum Beispiel variiert je nach Infektionsursache von zwei Prozent bei der ambulant erworbenen Pneumonie (CAP)⁴⁶ bis zu 66 Prozent bei der bakteriellen Meningitis⁴⁷. Die beginnende Therapie mit Breitbandantibiotikagabe beeinflusst die Resistenzentwicklung der Erreger und diese antimikrobielle Resistenz erhöht sowohl die Kosten pro Patient um \$6000 - \$30000 als auch die Krankenhausverweildauer⁴⁸. Da die Therapie und damit die Reduktion der Breitbandantibiotikagabe erst optimiert werden kann, wenn der Erreger identifiziert wurde, kann diesem Problem durch eine schnellere Diagnostik zum Beispiel mithilfe molekularer Tests wie der PCR begegnet werden⁴⁹ (Abbildung 2).

Abbildung 2: Darstellung der zeitlichen Varianz zwischen PCR und Blutkultur(BK) bis zur Erregerdetektion



Die schnellere Erregeridentifizierung kann ebenso dabei helfen, schwierige Infektionen frühzeitig gezielt zu therapieren. Zu den besonders häufig falsch behandelten Bakteriämien zählen solche, verursacht durch Erreger wie *Escherichia coli*, *Candida spp* und *Klebsiella spp*⁴¹. Infektionen mit *Acinetobacter spp.*, *Stenotrophomonas spp.*, *Enterococcus spp.*, *Candida spp.* und *Pseudomonas spp.* stellen besonders schwierig zu therapierende Bakteriämien dar⁴¹. Ein wichtiger Aspekt dabei ist der frühestmögliche Beginn einer kalkulierten antibiotischen Therapie. Die Mortalität steigt bereits deutlich an, wenn sich der Beginn der Antibiotikatherapie um nur eine Stunde verzögert⁵⁰. Die aktuelle ProCESS Studie unterstreicht den hohen Stellenwert der frühzeitigen Sepsisdiagnose in Kombination mit einer ebenso frühzeitigen antiinfektiven Therapie für das Outcome der Patienten⁵¹. Funk et al formulierten die Faustregel in der Behandlung lebensbedrohlicher Infektionen, insbesondere der des septischen Schocks, mit „Speed is life“⁵². Der Inhalt dieser drei Worte verdeutlicht, dass der Stellenwert einer schnellen Erregerdiagnostik und der dadurch bedingte frühe Beginn einer gezielten antibiotischen Therapie nicht hoch genug eingeschätzt werden kann.

Die vorliegende Studie hat zum primären Ziel, die initiale Diagnostik bei intensivmedizinisch behandelten Patienten mit pulmogener oder abdomineller Sepsis zu vergleichen und die Zeitersparnis sowie Therapiemodifikation durch Nutzung des auf multiplex PCR basierten *SeptiFast* Tests gegenüber der Standarddiagnostik mit Blutkulturen darzustellen. Der zweite Studienendpunkt umfasst den Vergleich des Erregerspektrums beider Methoden sowie die Evaluation des *SeptiFast* - Test als neue mikrobiologische Diagnostik.

3. Patienten und Methoden

3.1 Studiendesign und Datenerhebungszeitraum

Bei der *SeptiFast* - Studie handelt es sich um eine prospektive randomisierte kontrollierte klinische Pilotstudie (RCT). Diese wurde mit 100 Patienten von August 2010 bis März 2012 an der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.2 Ethik – und Datenschutzvotum

Die Überprüfung und Genehmigung der *SeptiFast* Studie wurde sowohl von der Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin (Ethiknummer: EA1/043/09), als auch von dem behördlichen Datenschutz durchgeführt. Die Erhebung und Speicherung der Daten im Rahmen der vorliegenden Studie wurde autorisiert. Der RCT wurde internationalem Standard entsprechend mit der Studiennummer ISRCTN 70694559 registriert.

3.3 Studienlokalisierung

Auf insgesamt sechs Intensivstationen konnten Patienten für die *SeptiFast* Studie eingeschlossen werden, drei davon am Campus Charité Mitte und ebenso drei am Campus Virchow Klinikum. Es handelt sich hierbei um vier anästhesiologisch geführte Intensivstationen, eine chirurgisch geführte und eine gemischt anästhesiologisch, neurochirurgisch und neurologisch geführte Intensivstation. Die Intensivstationen 105i, 103i und 101i des Campus Charité Mitte verfügen über insgesamt 33 Betten und versorgen Patienten mit allgemeinchirurgischen, kardiochirurgischen und allgemein postoperativen Schwerpunkten. Die drei Intensivstationen des Campus Virchow Klinikum K1, 8i und 14i verfügen über insgesamt 39 Betten. Auf der Station K1 werden neurologische und neurochirurgische Patienten behandelt. Die Stationen 8i und 14i sind überregionales Zentrum für das Atemnot-Syndrom des Erwachsenen (ARDS) und versorgen allgemein- und unfallchirurgische, mund-kiefer-gesichtschirurgische, gynäkologische Patienten und solche der Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde sowie Polytraumata.

3.4 Ein- und Ausschlusskriterien

In die *SeptiFast* Studie wurden erwachsene Patienten (Alter ≥ 18 Jahre) mit der Erfüllung zweier Systemic Inflammatory Response Syndrom (SIRS) – Kriterien und vermutetem abdominellen oder pulmonalem Fokus als Auslöser der Sepsis

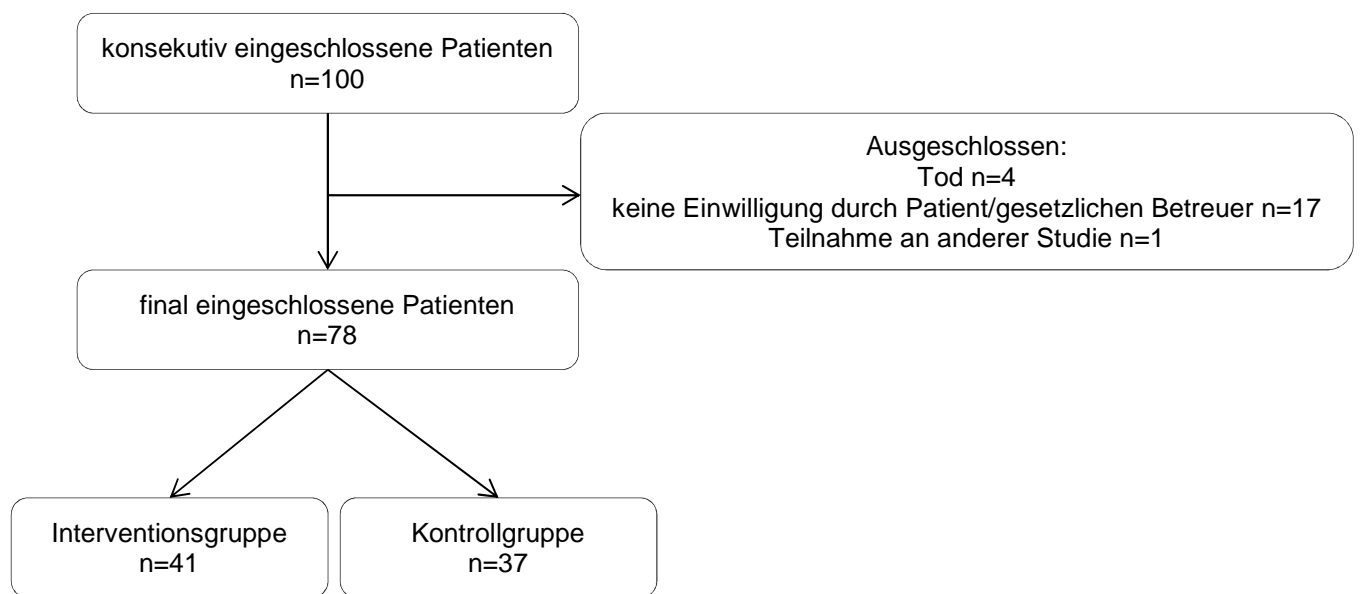
eingeschlossen. Zu den SIRS – Kriterien zählen Hyper- (> 38°C) beziehungsweise Hypothermie (< 36°C), Tachykardie mit einer Herzfrequenz größer 90 Schläge pro Minute, Tachypnoe mit einer Atemfrequenz von größer 20 Atemzügen pro Minute, Hyperventilation mit einem arteriellen Kohlenstoffdioxidpartialdruck von < 4,3 kPa beziehungsweise < 33mmHg und Leukozytopenie von < 4000 Leukozyten/ μ l oder Leukozytose von größer 12000 Leukozyten/ μ l Blut. Eine weitere Voraussetzung zum Einschluss in die *SeptiFast* - Studie war die Indikation zur Blutkultur-Abnahme bei bisher noch nicht sicher bekanntem Erreger. Die Definition der Infektionen erfolgte zusätzlich über standardisierte Kriterien im Infektionsmanagement, die seit 2006 fester Bestandteil der teilnehmenden Intensivstationen sind⁵³. Der im Folgenden beschriebene PCR - Ablauf bedarf geschulten Personals und war daher nur im Tagesablauf realisierbar, wohingegen die Blutkultur als Routinediagnostikum auch nachts inokuliert werden kann. Für die Studie sollte jedoch ein späteres Einsatzszenario angenommen werden, bei dem die *SeptiFast*-Diagnostik zu allen Tageszeiten zur Verfügung steht. In Anbetracht dessen wurde ein Studieneinschlusszeitraum gewählt, der eine Bearbeitung der Proben innerhalb von 12 Stunden garantierte und demnach die zeitliche Spanne von Sonntag bis Donnerstag, jeweils von 18.00 Uhr abends bis 06.00 Uhr morgens, umfasste. Somit wurde die gleichzeitige Analyse der Blutkultur und PCR in der Mikrobiologie gewährleistet und die Vergleichbarkeit beider Methoden gesichert. Zu den Ausschlusskriterien der *SeptiFast* Studie zählten die sichere Auslösung der Sepsis durch einen bereits bekannten Erreger, Personen die jünger als 18 Jahre alt waren und Schwangere. Moribunde Patienten, die voraussichtlich die kommenden 24 Stunden nicht überleben werden, wurden ebenso ausgeschlossen wie Personen in polizeilichem Gewahrsam. Die Teilnahme an anderen prospektiv klinischen Antibiotikatherapiestudien innerhalb der letzten 30 Tage stellte ebenso ein Ausschlusskriterium dar.

3.5 Studienein- und ausschluss

Über den Studienzeitraum von August 2010 bis März 2012 wurden von 100 Patienten je eine abgenommene EDTA-Probe im Rahmen der *SeptiFast*-Studie analysiert. Die Proben wurden jeweils nach Überprüfung der Erfüllung der Einschlusskriterien entnommen. Bei Erfüllung der Einschlusskriterien ist für die *SeptiFast* Studie zusätzlich und parallel zur initialen Blutkulturabnahme ein EDTA-Röhrchen, gefüllt mit mindestens 1,5ml Blut, aus derselben Blutkultur - Punktionsstelle zu entnehmen. Bis zur Abholung des EDTA Röhrchens durch einen Fahrradkurier wurde dieses bei 4°C gekühlt gelagert.

Alle Patienten wurden nur einmalig in die Studie eingeschlossen. Sofern die Patienten zum Abnahmezeitpunkt einwilligungsfähig waren, erfolgte die Studienaufklärung durch den zuständigen Stationsarzt der Intensivstation. Abhängig vom klinischen Zustand, ist eine bedeutende Anzahl an Patienten auf Intensivstation nicht einwilligungsfähig. Da die Sepsis dringende diagnostische und therapeutische Interventionen erfordert, die Zustimmung in eine Studie aber ausreichend von den Patienten und Angehörigen überdacht werden sollte, durften nach Einverständnis durch die Ethikkommission Patienten nach Konsultationsverfahren unabhängiger Ärzte beim Abnahmezeitpunkt sofort in die *SeptiFast* Studie eingeschlossen werden. Die Einwilligung des Patienten oder gesetzlichen Betreuers wurde dann zeitnah durch das Studienteam eingeholt. Für alle eingeschlossenen Patienten liegt eine unterschriebene Einwilligungserklärung des Patienten oder des gesetzlichen Betreuers vor.

Abbildung 3: Flussdiagramm der eingeschlossenen Patienten



Im Nachhinein mussten insgesamt 22 dieser 100 Patienten von der Studie ausgeschlossen werden, da zum einen die Teilnahme an der Studie von den Patienten selbst oder deren gesetzlichen Betreuern abgelehnt wurde oder sich der klinische Verlauf unerwartet verschlechterte und die Patienten ohne Erlangen einer Einwilligungsmöglichkeit und vor der Initiierung einer gerichtlichen Betreuung verstarben (Abbildung 3). Die Daten dieser ausgeschlossenen Patientengruppe wurden entsprechend des Votums der Ethikkommission gelöscht.

3.6 Probenversand

Die Blutkulturen wurden mit dem Standardtransport in die Mikrobiologie gesendet. Das EDTA Röhrchen für den SeptiFast Test wurde mittels Fahrradkurier von der jeweiligen Station zur Mikrobiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin transportiert. Der Kurier wurde nach täglichen Anrufen auf den Stationen durch das Studienteam, im Falle des Vorhandenseins einer Probe, benachrichtigt. Das EDTA Röhrchen wurde dafür in einem speziellen Transportbehälter mit gepolsterter Hülle gelagert und zur stetigen Kühlung während des Transports mit einem Kühlakku ummantelt. Dieses Versand-Kit wurde in den Kühlschränken der jeweiligen Intensivstation gelagert.

3.7 Befundmitteilung und Randomisierung

Die Block-Randomisierung erfolgte mit 25 Blöcken zu je vier Patienten in der Mikrobiologie anhand einer Randomisierungsliste, die durch einen externen Statistiker bereitgestellt wurde. Zur Reduzierung möglicher Bias erfolgte die Zuordnung verblindet für alle Studienteilnehmer und Klinikmitarbeiter, mit Ausnahme der Mitarbeiter der Mikrobiologie. Zur Maximierung der verdeckten Zuordnung waren den behandelnden Ärzten das Randomisierungsschema und die damit verbundene Einteilung der Patienten in Interventions- und Kontrollgruppe, bis zum Erhalt des PCR-Ergebnisses, unbekannt. Die Proben des Interventionsarmes wurden sofort mithilfe des SeptiFast Lightcyclers® analysiert. Bei Vorliegen des Ergebnisses, wurde dieses umgehend durch die mikrobiologischen Ärzte telefonisch an die jeweiligen Stationen übermittelt. Die Proben des Kontrollarmes wurden bei -80°C gelagert und zeitversetzt analysiert. Diese Ergebnisse wurden nicht telefonisch übermittelt, sondern in der Mikrobiologie schriftlich dokumentiert. Die Wahl des antiinfektiven Therapieregimes unterlag den behandelnden Ärzten der Intensivstationen, zu denen das Studienteam nicht gehörte.

3.8 Entnahme und Analyse der Blutkulturen

Bei vermuteter Pneumonie wurden zwei Blutkulturserien, je eine aerobe und anaerobe Flasche umfassend, sowie Proben des Respirationstraktes, entnommen. Bei vermutetem abdominellem Infektionsfokus sind ebenso zwei Blutkulturserien empfohlen und zusätzlich mindestens eine Kultur des Primärherdes bei zum Beispiel erfolgtem viszeralchirurgischen Eingriff. Die Blutkulturflaschen (BACTEC™, Becton Dickinson, USA) beinhalten je 10ml Blut und werden standardgemäß für sechs Tage inkubiert. Isolierte Kolonien werden mittels sequentieller Gramfärbung, biochemischer Testung und antimikrobieller Empfindlichkeit identifiziert. Positive Gram-Resultate wurden den

Intensivstationen telefonisch übermittelt. Erregername sowie Antibiogramm wurden dem elektronischen Patientendatensystem entnommen.

3.9 Lightcycler® SeptiFast Test

Die Analyse der 1,5ml Vollblut aus den EDTA Röhren erfolgte mittels des standardisierten und teilautomatisierten molekularbiologischen SeptiFast Lightcyclers® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) – Analysegerät. Basierend auf multiplex PCR im Echtzeit PCR Format wird eine schnelle Erregerdetektion gewährleistet, die durchschnittlich sechs Stunden von Bearbeitungsbeginn bis zur Erregerdetektion benötigt.

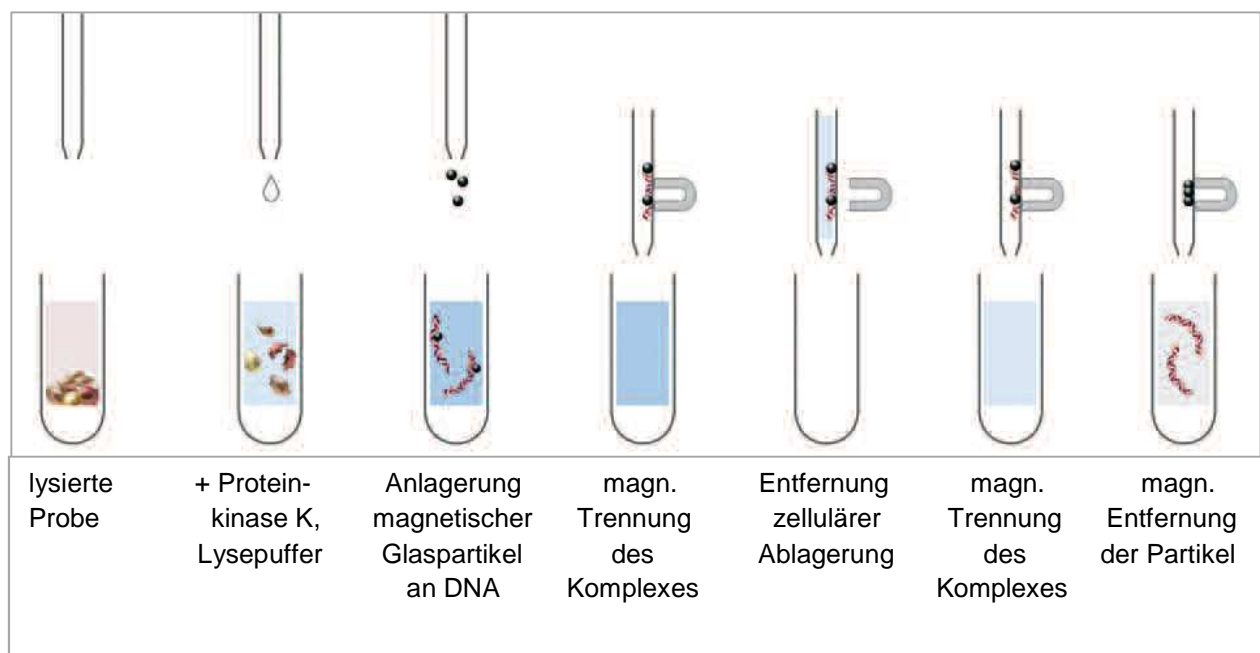
Die Analyse der abgenommenen Blutproben zur Diagnostik mit dem SeptiFast Test erfolgt in drei Schritten. Zuerst wird die Probe mechanisch lysiert und die DNA aufgereinigt, sodass sie für die weiteren Vorgänge optimal vorbereitet ist. Der zweite Schritt beinhaltet die Amplifikation der Ziel-DNA mit Echtzeit PCR. Danach können mithilfe der speziellen SeptiFast Identification Software (SIS) die Spezies und Kontrollen automatisiert detektiert werden.

3.9.1 Probenvorbereitung (mechanische Lyse und Nukleinsäurepräparation)

Für die mechanische Lyse werden die abgenommenen 1,5ml Vollblut für 30 Minuten gemischt und danach in spezielle SeptiFast Röhren aus dem SeptiFast Lys Kit MGrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), bestehend aus Quarz- und Keramikkügelchen, pipettiert. Diese werden anschließend im MagNA Lyser – Gerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) für 70 Sekunden bei 7000 U/min rotiert und im Folgenden für 10 Minuten außerhalb des Gerätes gelagert. Das Aufreinigen der DNA zur Nukleinsäurepräparation erfolgt mithilfe des MagNA Pure Compact Systems (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), welches, mit bis zu maximal acht Proben in einem Durchlauf, die Nukleinsäure automatisch isolieren kann. Hierfür wird das Gerät mit einer vorbefüllten Reagenzienkartusche aus dem MagNA Pure Nucleic Acid Isolation Kit I - Large Volume (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bestückt. Vor dem Einsetzen wird der zugehörige Barcode der Kartusche eingescannt, um somit vorinstallierte Isolationsprotokolle zu aktivieren. Zusätzlich zu den Bestandteilen des Isolation Kits werden 600µl der zuvor im MagNA Lyser lysierten Probe in die, dem Isolation Kit zugehörigen 2ml Sample Tubes, pipettiert. Diesen 600µl werden noch 6µl interne Kontrolle aus dem Lightcycler® SeptiFast Kit MGrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) hinzugefügt

und anschließend wird beides durch Vortexen vermengt. Die interne Kontrolllösung, bestehend aus synthetischer Doppelstrang-DNA mit Primerbindungsstelle, unterscheidet sich von der Ziel-DNA nur durch die fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden - Bindungsregion. Die nun vollständig befüllten Sample Tubes werden zu der Reagenzienkartusche in das MagNA Pure Compact Gerät gestellt und am integrierten Computerbildschirm wird das Programm DNA_Blood_100_400_V3_2 ausgewählt. In gleicher Anzahl wie die zu analysierenden Proben werden dem Gerät noch Elutions-Röhrchen hinzugefügt, die ebenso wie die Reagenzienkartusche über einen Barcode verfügen, welcher zur Identifizierung eingescannt werden muss. Das nun vollständig bestückte MagNA Pure Compact Gerät wird verschlossen und die Nukleinsäurepräparation gestartet. Dafür nutzt das Gerät eine Magnet-Kügelchen-Technologie (Abbildung 4).

Abbildung 4: schematische Darstellung der Nukleinsäurepräparation mittels MagNA Pure Compact System (mod. nach⁵⁴)



Die Probe wird während des Laufs zuerst mit Proteinkinase K und Lysepuffer versetzt. Der Lysepuffer besteht zu 50 Prozent aus Guanidinthiocyanat, Tris – HCl – Puffer und zu 20 Prozent aus Triton X 100. Die hinzugegebenen Puffer schützen die freigesetzte DNA vor Desoxynukleasen im Blut. Diesem Gemisch werden im folgenden Schritt

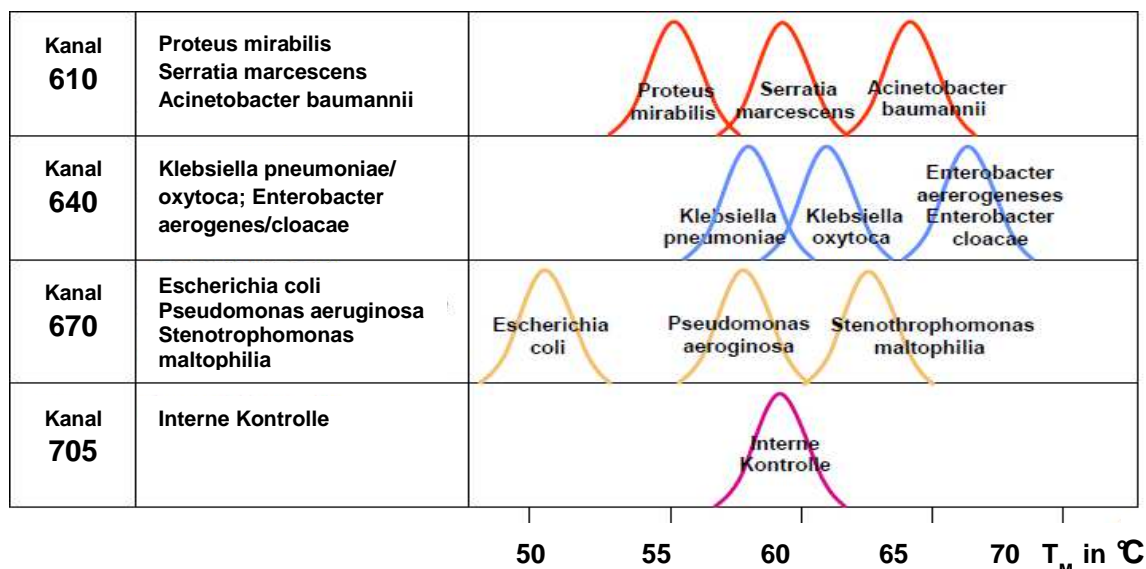
magnetische Glaspartikel hinzugefügt, an deren Oberfläche die bakterielle, fungale und humane Nukleinsäure bindet. Anschließend wird die an die Glaspartikel gebundene Nukleinsäure magnetisch von der restlichen Probe getrennt und zelluläre Ablagerungen unter der Nutzung von Waschpuffer, bestehend aus 0,2 Prozent Natriumchlorid, Tris HCL Puffer und 80 Prozent Ethanol, ausgewaschen. Der so entstandenen Nukleinsäure-Elution werden die Glaspartikel unter Erhitzung des Eluats magnetisch entfernt. Ein Lauf des MagNa Pure Compact Systems dauert circa 39 Minuten.

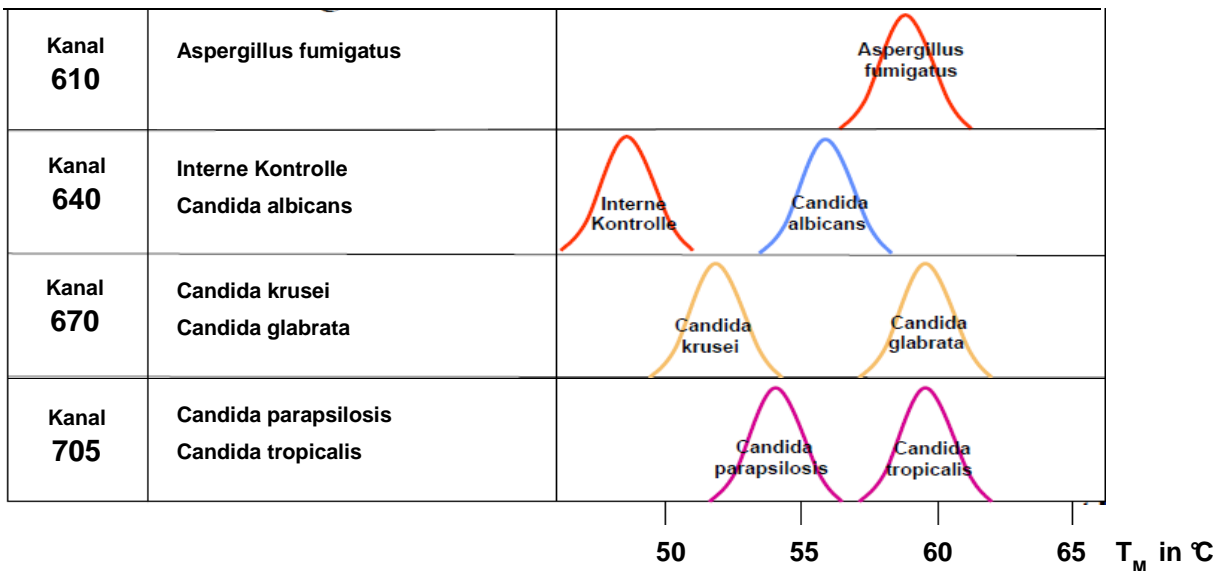
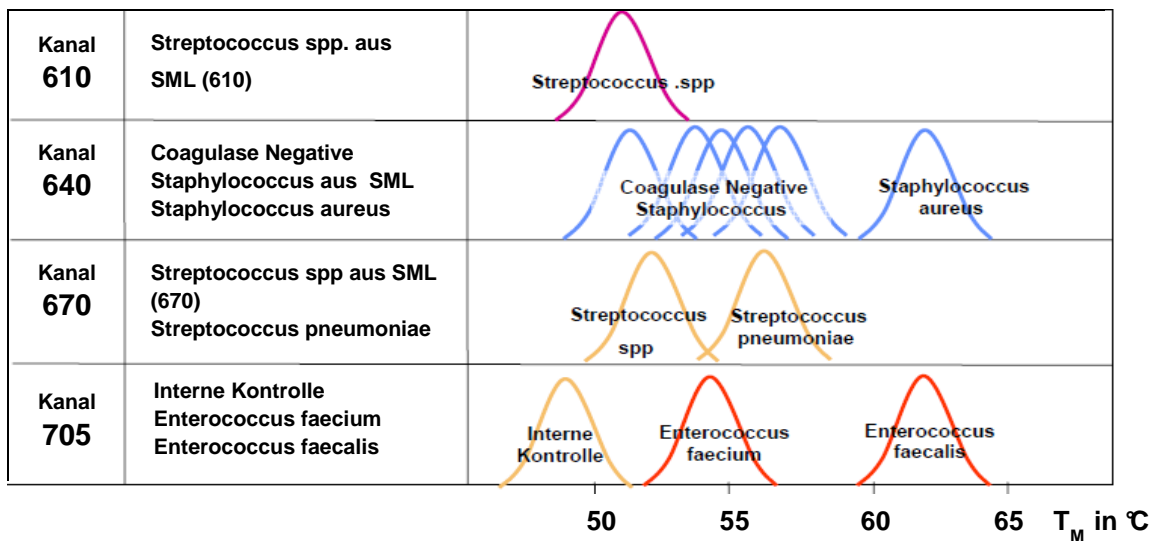
3.9.2 Analyse mittels Lightcycler® SeptiFast Test

Das nun gewonnene Eluat wird einem 1,5ml fassenden DNA freien Reagenzröhrchen mit einer DNA freien Serumpipette zugegeben, welches als Template für das Lightcycler® SeptiFast Kit MGrade (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) genutzt wird. Je 50µl des Probeneluats werden zur Analyse im grampositiven, gramnegativen und fungalen Bereich verwendet. Um die Analyse starten zu können, bedarf es noch der Herstellung des Master Mixes für die drei zu untersuchenden Speziesgruppen. Dafür wird dem Reaktionsmix 1a bestehend aus 3U/µl Faststart Taq-Polymerase, <0,1 Prozent AmpErase Enzym (Uracil – N – Glykosylase) eine Menge von 600µl des Reaktionsmixes 1b (<1 Prozent Brij, <0,1 Prozent Magnesiumlösung, dNTP, Tris HCl Puffer) hinzugefügt und durch viermaliges auf – und abpipettieren vermischt. Zur Herstellung des Master Mixes für grampositive/gramnegative Bakterien und Pilze wird der Detektionsmix für die jeweilige Spezies (<0,001 Prozent Primer, Sonden für grampositive /gramnegative Bakterien und Pilze, <1 Prozent Brij, Tris HCl Puffer) mit 200µl des soeben hergestellten Reaktionsmixes versetzt. Für eine zu untersuchende Blutprobe müssen neun Kapillaren in das Probenkarussell des Lightcyclers® eingesetzt werden. Diese werden vorher im SeptiFast Kühlblock mit den Reagenzkontrollen, Negativkontrollen, Probeneluaten und den hergestellten Master Mixen befüllt. 50µl des hergestellten Master Mixes für grampositive Bakterien werden den Kapillaren eins, vier und sieben (obere Reihe) dazugegeben. Der Master Mix für gramnegative Bakterien wird den Positionen zwei, fünf und acht (mittlere Reihe) hinzugegeben und die 50µl des Master Mixes für Pilze den Kapillaren der Positionen drei, sechs und neun (untere Reihe). Im Folgenden werden die Probeneluat in die Kapillaren auf den Positionen sieben bis neun pipettiert. Im Anschluss daran wird die Negativkontrolle (<35 Prozent Polyethylenglycol 10000, Tris HCl Puffer) in die Kapillaren auf den Positionen vier bis sechs pipettiert. Die

Reagenzkontrolle (<0,001 Prozent DNA-Kontroll-Template für gramnegative, grampositive Bakterien und Pilze, EDTA, Tris HCl Puffer) wird in die Kapillaren auf Position eins bis drei pipettiert. Die Kapillaren werden entsprechend ihrer Positionen in das Lightcycler® Probenkarussell eingesetzt und in der LC Carousel Centrifuge 2.0 zentrifugiert, bevor das Probenkarussell in das SeptiFast Lightcycler® 2.0 Analysesystem (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) eingesetzt wird. Als Zielsequenz für die Identifizierung der bakteriellen und fungalen Spezies wurde die Internal Transcribed Spacer (ITS) – Region gewählt. Diese befindet sich auf unterschiedlichen Bereichen der ribosomalen DNA. Für Bakterien im Bereich zwischen 16S und 23S Sequenzen und für Pilze im Bereich zwischen 18S und 5,8S Sequenzen. Die Amplifikation der Zielsequenzen der festgelegten Spezies erfolgt mithilfe der Verwendung allgemeiner oder spezifischer Primer. Der Nachweis des bei der Echtzeit PCR entstehenden Amplifikats erfolgt durch spezifische HybProbe-Sonden. Diese fluoreszenzmarkierten Sonden hybridisieren an eine interne Sequenz während des Amplifikationszyklus in der Annealingphase. Je größer die zunehmende Fluoreszenz ist, desto mehr Amplifikate sind entstanden. Die Fluoreszenz wird in den Detektionskanälen des SeptiFast Lightcycler® 2.0 Analysesystems (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gemessen. Den grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie den Pilzen sind jeweils vier Kanäle zugewiesen. Nach Beendigung der Amplifikationszyklen wird eine Schmelzkurvenmessung durchgeführt. Die Schmelztemperatur T_M , anhand welcher die Spezies ermittelt werden, ist dabei abhängig von den Sequenzen, der Länge und dem Homologiegrad zwischen den Sonden und der Ziel DNA. Abbildung 5 zeigt die Schmelzkurven für Bakterien und Pilze.

Abbildung 5: Schmelzkurven für gramnegative und - positive Bakterien und Pilze mit deren Detektionskanälen (mod. nach⁵⁵)





3.9.3 Erregeridentifikation

Die Erregeridentifizierung erfolgt mithilfe der SeptiFast Identification Software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) welche, mittels Schmelzpunktanalyse und fluoreszenzmarkierten Hybridisierungssonden der DNA, spezifische Reaktionsprodukte ermitteln kann. Nach jedem Lauf des SeptiFast Lightcycler® 2.0 Analysesystems (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) werden der höchste Punkt der Schmelzkurven (Peak) aller Kanäle und Speziesgruppen manuell markiert. Durch das Markieren kann die Software die Schmelztemperaturen T_M und die Höhe des Peak-Wertes automatisch berechnen und somit den Erreger ermitteln. Anhand der mitanalysierten Kontrollen als Merkmal der Qualitätssicherung des Lightcycler® SeptiFast Tests (interne Kontrolle, Negativkontrolle, Reagenzkontrolle) können die

Ergebnisse validiert werden. Bei positivem Ergebnis für *Staphylococcus aureus* kann eine *mecA* Resistenztestung erfolgen, die mithilfe eines speziellen *SeptiFast mecA Kits MGrade* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt wird.

3.9.4 Sensitivität des *SeptiFast* Tests

Die analytische Sensitivität des *SeptiFast* Tests variiert von drei bis 100 CFU/ml im EDTA-Blut für die einzelnen detektierbaren Spezies⁵⁵. Bis auf *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Streptococcus agalacticae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* und *Streptococcus mitis*, die ab einer CFU von 100/ml EDTA Blut nachgewiesen werden können, können die restlichen Spezies ab 30 CFU/ml im EDTA-Blut detektiert werden. Somit werden niedrige Konzentrationen von CoNS und Streptococci, die eine Kontamination vermuten lassen, nicht bei der Auswertung angezeigt.

3.9.5 Kontaminationsfreies Arbeiten

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit menschlicher DNA der Haut und oder der Atemwege, wurden während des gesamten Arbeitsprozesses Laborkittel und puderfreie Handschuhe getragen. Die Laminar Flow Sterilbank als Arbeitsplatz für die Probenvorbereitung wurde regelmäßig mit DNA – Dekontaminationsreagenz gereinigt, ebenso die PCR Workstation. Die verwendeten Reagenzien wurden, wie in der Produktinformation empfohlen, regelrecht gelagert und verwendet.

3.10 Datenerhebung

Die Datenerfassung in die auf Microsoft-Excel 2010 basierte Studiendatenbank erfolgte prospektiv und täglich über die gesamte Dauer des Intensivaufenthalts aller Patienten, beginnend am Tag vor der Abnahme für *SeptiFast*. Es wurden Basischarakteristika, intensivmedizinische und mikrobiologische Parameter erhoben. Diese Parameter wurden sowohl den elektronische Patienten-Daten-Mangement-Systemen (PDMS) COPRA Version v5.19.081 (Computer Organized Patient Report Assistant) und SAP Version ECC 6.0 (Systeme, Anwendungen, Produkte) als auch den medizinischen schriftlichen Befunden aus vorigen Aufenthalten an anderen Krankenhäusern oder an der Charité selbst entnommen. In Kombination beinhalten die beiden elektronischen Programme den kompletten medizinischen Verlauf der Patienten auf der Intensivstation. Während des gesamten Zeitraums der Datenerhebung war die Funktion der PDM – Systeme nie beeinträchtigt. Die Datenerhebung erfolgte durch die alleinige Doktorandin.

3.11 Zielgrößen

Der Zeitbedarf von dem PCR basierten SeptiFast - Test gegenüber der Standarddiagnostik mit Blutkulturen als initiale mikrobiologische Diagnostik wurde als primäre Zielgröße der vorliegenden Studie definiert. Der Zeitpunkt der sterilen Venenpunktion zur Blutentnahme sowie die telefonische Übermittlung des Ergebnisses an die Intensivstation galten hierbei als zeitliche Rahmenpunkte. Die sekundäre Zielgröße umfasste den Vergleich des Erregerspektrums beider Methoden. Die identifizierten Erreger beider diagnostischer Methoden wurden pro Patient für beide Studiengruppen dargestellt und miteinander verglichen. Als weitere sekundäre Zielgröße wurde eine mögliche Modifikation der bestehenden antiinfektiven Therapie nach Resultatübermittlung untersucht. Hierbei erfolgte eine qualitative Untersuchung der applizierten Agenzien unter Berücksichtigung der telefonischen Übermittlungen von Erregerergebnissen an die jeweilige Intensivstation und konsekutive Therapiemodifikation.

3.12 Statistik

Die Version SPSS 19.0 (SPSS Inc. USA) diente der statistischen Auswertung der Daten dieser Studie. Die untersuchten Variablen wurden in absoluten Zahlen oder Prozentangaben, Median mit Quartilen oder Mittelwert mit Standardabweichung, basierend auf den Skalenniveaus und der Normalverteilung, angegeben. Jede Signifikanzprüfung wurde zweiseitig mit einem Fehler erster Art von $\alpha=0,05$ durchgeführt. In Abhängigkeit des Skalenniveaus und der Gruppeneigenschaften (abhängig oder unabhängig) wurden unterschiedliche Testverfahren genutzt. Für unabhängige Stichproben zum einen der exakte χ^2 - Test nach Fisher, der t-Test und der Mann-Whitney Test. Im Vorhinein konnte keine Fallzahlermittlung im Rahmen einer Poweranalyse durchgeführt werden, da aus den zurzeit bestehenden Daten kein zeitlicher Bedarf für die Erregerdetektion per PCR im klinischen Entscheidungsfindungsprozess vorhersehbar war. Daher wurde die Studiengröße, dem konservativen Ansatz folgend, auf 100 Patientenproben festgelegt. Aufgrund der Studienergebnisse konnte eine Power-Analyse durchgeführt werden. Diese hatte zum Ziel die Anzahl der Patienten mittels parameterfreiem unpaarigem Wilcoxon-Mann-Whitney-U Test zu berechnen, die nötig ist, um bei einer Power von 80% und einem zweiseitigen α von 5% einen Unterschied im zeitlichen Bedarf mithilfe der PCR-

basierten mikrobiologischen Diagnostik in einem bestätigenden RCT aufzeigen zu können (nQuery 7th Edition).

4. Ergebnisse

4.1 Eingeschlossene Patienten und Basischarakteristika

In der *SeptiFast* - Studie wurden 78 Patienten analysiert, von denen 37 der Kontrollgruppe und 41 der Interventionsgruppe angehörten.

Die Basischarakteristika der Patientenpopulation sind in Tabelle 3 dargestellt. Diese Charakteristika variierten zwischen den beiden Patientengruppen nicht. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Interventionsgruppe befanden sich mehr männliche Patienten. Das durchschnittliche Alter in der Kontrollpopulation betrug im Median 59 Jahre und in der Interventionsgruppe lag es bei 67 Jahren. Der pulmonale Fokus der Sepsis stellte mit 78% in der Kontrollgruppe und 63% in der Interventionsgruppe den häufigsten Grund für den Einschluss von Patienten in die *SeptiFast* - Studie dar. Somit ist dieser pulmonale Fokus in der Gesamtpopulation der häufigste Grund für die Nutzung mikrobiologischer Diagnostik und die Einleitung eines antiinfektiven Therapieregimes. Insgesamt befanden sich 68% der Patienten der Kontrollgruppe und 49% der Interventionsgruppe im septischen Schock. Der Aufenthalt auf einer der sechs Intensivstationen belief sich bei der Kontrollgruppe im Durchschnitt auf 32 Tage, der der Interventionsgruppe lag durchschnittlich bei 34 Tagen. Der Gesamtkrankenhausaufenthalt war bei der Interventionsgruppe mit durchschnittlich 53 Tagen länger als bei der Kontrollgruppe mit durchschnittlich 37 Tagen.

Tabelle 3: Basischarakteristika für Kontroll- und Interventionsgruppe. Angaben absolut und in Prozent %, Mittelwert (\pm Standardabweichung) oder Median (25% - 75% Quartile) *statistisch signifikant $p < 0,05$

	Kontrollgruppe N=37	Interventionsgruppe N=41	p-Wert
Alter (Jahre)	59 (47 – 67)	67 (53 – 74)	0,057
ITS Aufenthalt (Tage)	32 (16- 57)	34 (13 – 65)	0,685
Klinikaufenthalt (Tage)	37 (20 – 76)	53 (33 – 79)	0,145

Ergebnisse

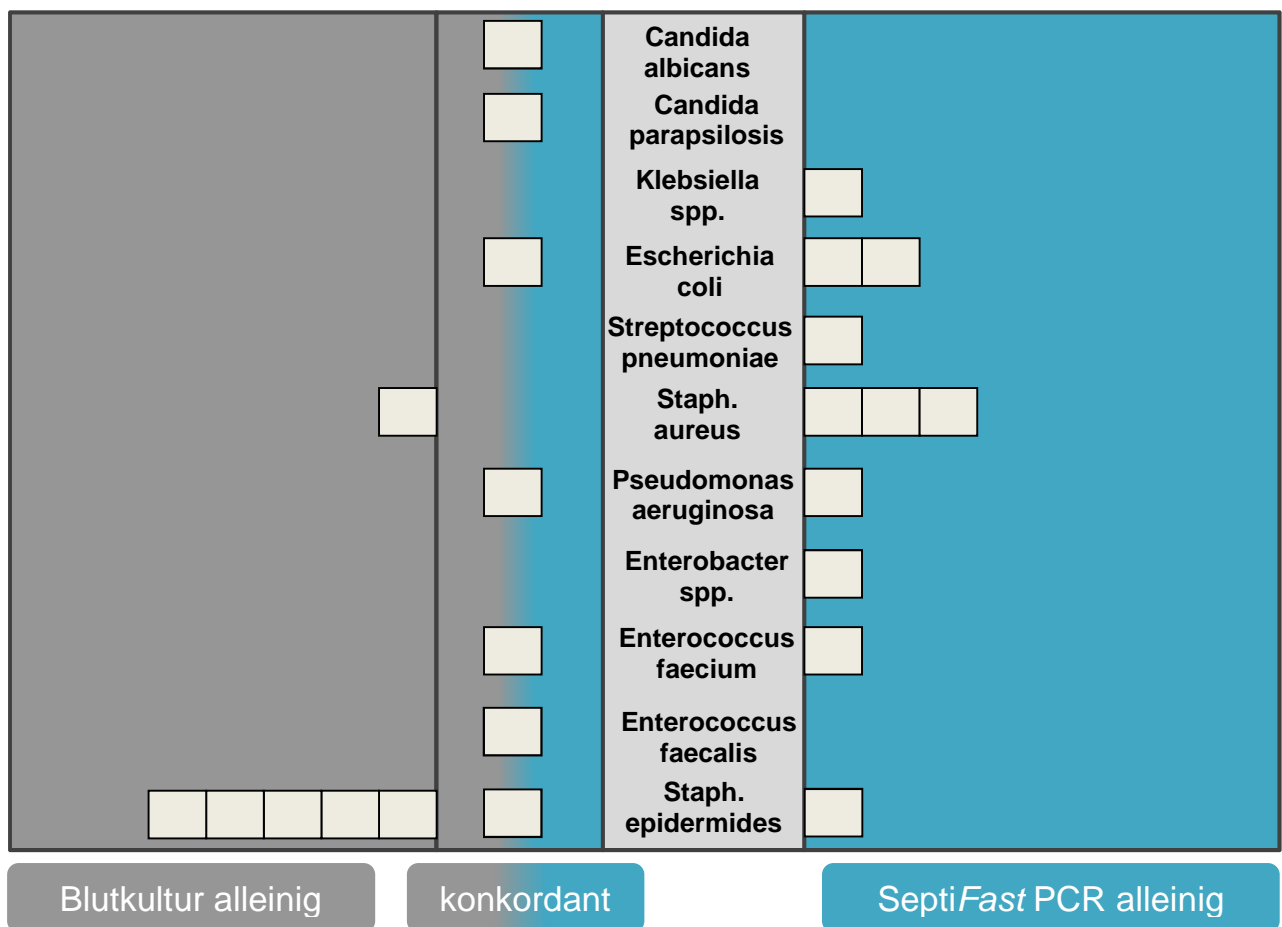
Beatmungsdauer (Stunden)	608 (246 – 990)	522 (76 – 1206)	0,787
Frauen	13 (35%)	15 (37%)	>0,999
SAPS II bei Aufnahme	47 (34 – 65)	40 (32 – 50)	0,109
Immunsuppression	6 (16%)	6 (14%)	0,905
Alkoholabusus	5 (14%)	4 (10%)	0,729
Sepsis Fokus			
- abdominal	8 (22%)	15 (37%)	0,258
- pulmonal	29 (78%)	26 (63%)	0,258
Schock	25 (68%)	20 (49%)	0,156
ITS Mortalität	8 (22%)	7 (17%)	0,775

4.2 Erregeridentifikation

In der Interventionsgruppe wurden in 10 von 41 getesteten EDTA - Blutproben Erreger per PCR - basierendem SeptiFast - Test identifiziert. Das entspricht einer Häufigkeit von 24,4%. In zwei der 10 Proben konnte *Escherichia coli* nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde in einer Probe *Enterococcus faecium* identifiziert, in einer weiteren *Enterobacter cloacae/ aerogenes*. Erreger, die ebenso in jeweils einer Probe identifiziert wurden, sind *Staphylococcus aureus*, *Candida parapsilosis*, *Candida albicans* und *Klebsiella pneumoniae/ oxytoca*. Die restlichen zwei der 10 positiven Proben in der Interventionsgruppe zeigten den Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Vergleichsblutkulturen der Interventionsgruppe zeigten in fünf Fällen ein Erregerwachstum, was einer Häufigkeit von 12,2% entspricht. In vier der genannten Fälle ließen sich sowohl im PCR-Ergebnis als auch in den Blutkulturen dieselben

Erreger identifizieren. Diese Übereinstimmung traf bei einem der in der PCR nachgewiesenen *Pseudomonas aeruginosa*, einem *Escherichia coli* und beiden *Candida*-Fällen zu. Die mikrobiologischen Ergebnisse aller eingeschlossenen Studienpatienten sind in Abbildung 6 zusammengefasst.

Abbildung 6: Mikrobiologische Resultate der Standardblutkulturdiagnostik und der SeptiFast multiplex PCR Diagnostik für alle eingeschlossenen Studienpatienten, wobei jedes Kästchen einen Patienten repräsentiert. Die linke Seite stellt die Befunde dar, die alleinig bei der Blutkulturdiagnostik identifiziert wurden. Im dazugehörigen SeptiFast – Test zeigte sich ein negatives Ergebnis. Analog dazu verkörpert die rechte Seite die alleinigen Ergebnisse der multiplex PCR SeptiFast Diagnostik, bei der sich in der korrespondierenden Blutkultur kein Wachstum zeigte. Die mittleren Kästchen zeigen die übereinstimmenden Ergebnisse beider Diagnostiken für dieselbe Probe. Das heißt, ein Kästchen der konkordanten Spalte repräsentiert jeweils eine Übereinstimmung durch positive Erregeridentifikation sowohl der Blutkulturdiagnostik als auch des SeptiFast – Tests bei einem Patienten.



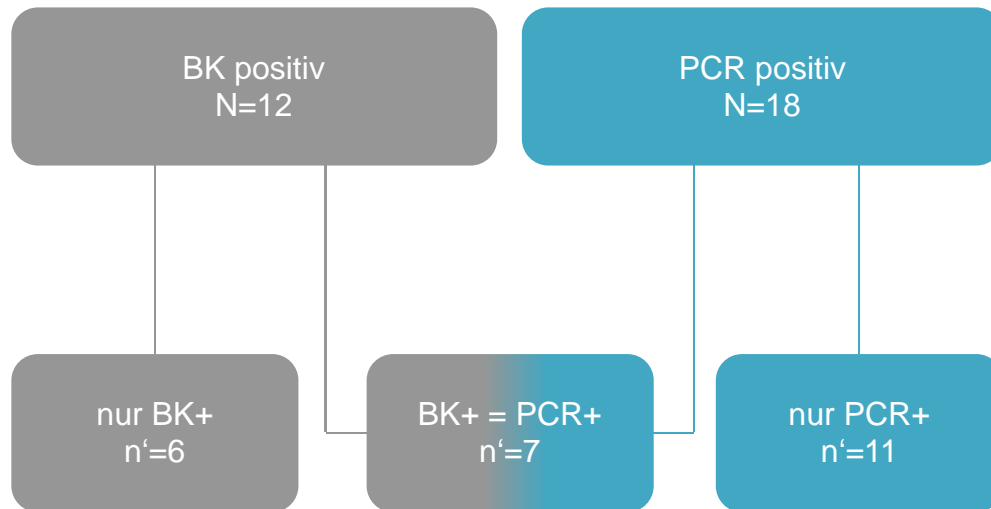
In der Kontrollgruppe wurden mit einer Häufigkeit von 18,9% Erreger in den Blutkulturen nachgewiesen, was sieben der 37 getesteten Blutkulturserien entspricht. Viermal konnte ein *Staphylococcus epidermidis* identifiziert werden, einmal ein *Enterococcus faecium* und bei einer anderen Blutkultur wurde *Staphylococcus aureus* kultiviert. Bei der siebten positiven Blutkultur wurden zwei Spezies identifiziert, zum einen *Staphylococcus epidermidis* und zum anderen *Enterococcus faecalis*. Die Post-hoc-Analyse der zu den Blutkulturen gehörenden, per PCR analysierten, EDTA-Blutproben mittels SeptiFast - Test zeigten in acht Fällen einen Erregernachweis. Es wurde einmal *Escherichia coli*, einmal *Enterococcus faecalis*, ein *Enterococcus faecium*, einmal *Streptococcus pneumoniae*, zweimal *Staphylococcus aureus* und zweimal *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen. Im Falle der zweifach positiven Blutkultur identifizierte der multiplex PCR SeptiFast - Test nur den *Enterococcus faecalis*. Übereinstimmende Ergebnisse mit positiver Erregeridentifikation zwischen den SeptiFast - Testergebnissen und den Ergebnissen der Blutkulturen zeigten sich in der Kontrollgruppe in insgesamt drei Fällen (20%).

Von den insgesamt 78 getesteten Proben konnte die SeptiFast - Diagnostik in davon 18 Fällen einen Erreger identifizieren (23,1%). In den Blutkulturen zeigte sich in 12 der Fälle ein Erregerwachstum (15,4%), wobei, wie bereits erwähnt, in einem der Fälle zwei Erreger in einer Probe bestimmt werden konnten. Insgesamt wurden 30 positive Befunde durch beide diagnostische Methoden ermittelt. In davon 11 Fällen konnte der SeptiFast - Test, im Vergleich zu der Blutkulturdiagnostik, als einzige mikrobiologische Diagnostik einen positiven Erregernachweis erbringen (36,7%). Ebenso wie die PCR - SeptiFast - Diagnostik, war auch die Blutkulturdiagnostik in mehreren Fällen die mikrobiologische Diagnostik, mit dem alleinigen Erregernachweis. Das erfolgte in sechs der insgesamt 30 positiven Fälle und entspricht einer Häufigkeit von 20%. Die Abbildung 7 zeigt die Anzahl der positiven Ergebnisse beider Diagnostiken und gliedert diese in Übereinstimmung und Nichtübereinstimmung auf.

Um einschätzen zu können, wie sich die Übereinstimmungsrate zwischen den PCR-Ergebnissen und denen der Blutkulturen verhält, verglichen wir die Resultate beider diagnostischer Methoden, wobei die Blutkultur als Goldstandard fungierte. Die Übereinstimmungsrate zwischen multiplex PCR SeptiFast Diagnostik und Blutkulturen, inklusive der Blutkulturprobe, die zwei Erreger identifizierte, beträgt mit 56 von 78 Proben 71,8%. Die Sensitivität des SeptiFast Tests für positive Resultate liegt bei

58,3% und entspricht somit sieben von 12 positiv getesteten Proben. Die korrespondierende Spezifität liegt bei 83,3% (55/66 Proben).

Abbildung 7: Anzahl der positiven Erregeridentifikationen von SeptiFast- und Blutkulturdiagnostik und deren Übereinstimmung.



N = Anzahl der positiven Proben

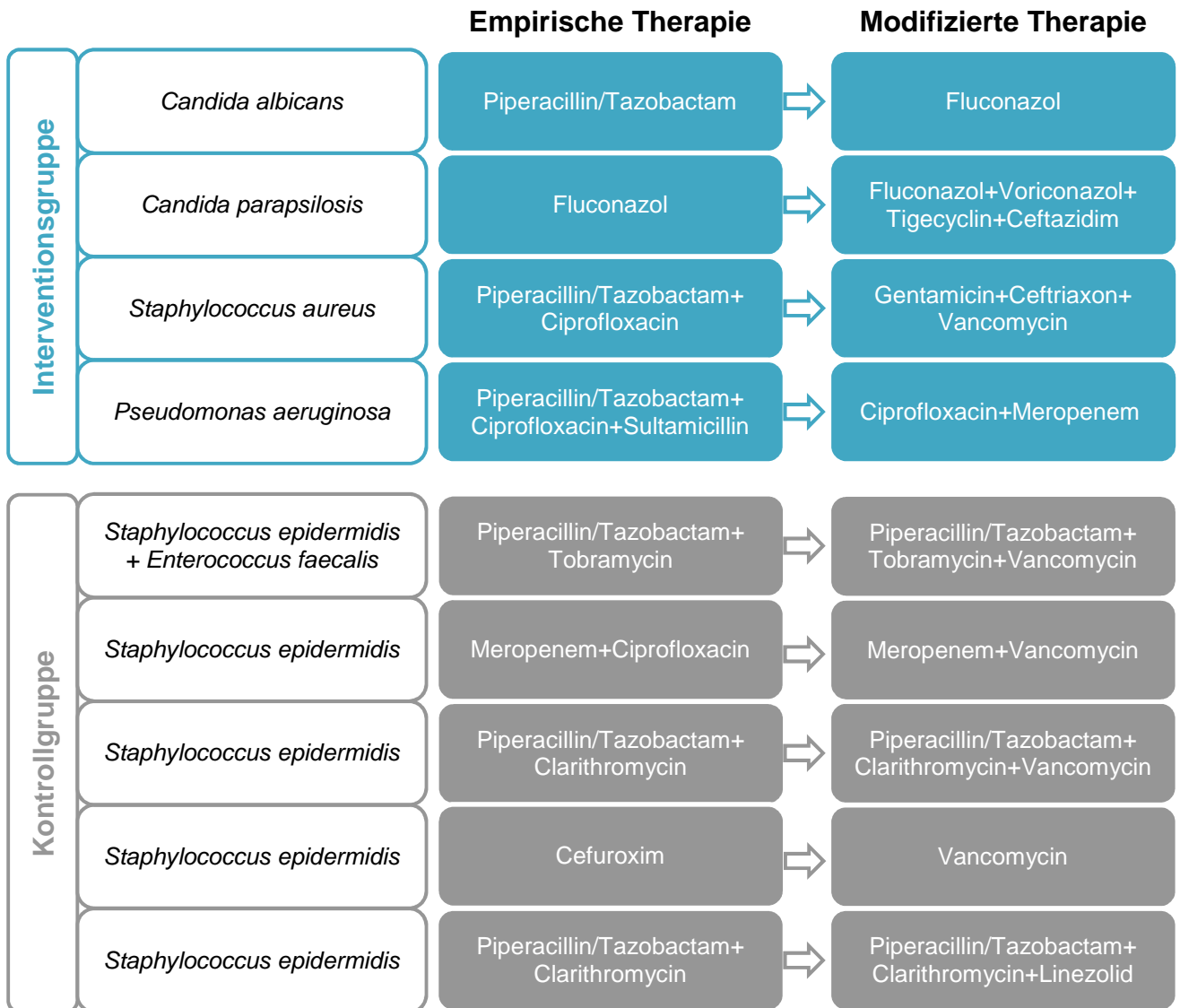
n' = Anzahl der gefundenen Erreger

4.3 Zeit – Analyse und Therapiemodifikation

Zur Klärung der Hauptzielsetzung der vorliegenden Studie analysierten wir den Zeitbedarf von steriler Abnahme der Blutkultur mit zusätzlicher Entnahme eines EDTA-Röhrchens für den SeptiFast - Test als initiale mikrobiologische Diagnostik bis hin zur telefonischen Mitteilung eines Erregernachweises beziehungsweise eines Gramstatus des Erregers an die behandelnden Ärzte der zugehörigen Intensivstation. Diese Dauer von Blutentnahme bis zur Befundmitteilung betrug in der Interventionsgruppe im Mittel 15,9 (\pm 5,9) Stunden. In Analogie zu der Interventionsgruppe betrug für die Kontrollgruppe der Zeitaufwand von steriler Entnahme der Blutprodukte bis zur Befundmitteilung im Mittel 38,1 (\pm 11,6) Stunden ($p < 0,001$ mit dem exakten Mann-Whitney-Test). Die telefonische Befundmitteilung an die behandelnden Ärzte auf den Intensivstationen führte zu vier sich unverzüglich anschließenden Therapieanpassungen in der Interventionsgruppe. Dabei handelte es sich um zwei invasive Candidämien (einmal *Candida parapsilosis* und einmal *Candida albicans*), den einmaligen Nachweis von *Staphylococcus aureus* und den ebenso einmaligen Nachweis von *Pseudomonas aeruginosa*. Von allen positiven PCR-Ergebnissen des

SeptiFast - Tests in der Interventionsgruppe führte demnach die Resultatübermittlung an die jeweilige Intensivstation in 40 Prozent der Fälle zu einer sofortigen Therapiemodifikation. Die dargestellten Therapiemodifikationen zeigt Abbildung 8.

Abbildung 8: Therapiemodifikationen beider Studiengruppen



Der Nachweis von *Candida albicans* führte zur Deeskalation von Piperacillin/Tazobactam und zur sofortigen Gabe von Fluconazol. Der Patient mit dem positiven Nachweis von *Candida parapsilosis* durch den SeptiFast - Test erhielt nach Befundübermittlung zusätzlich Voriconazol, Tigecyclin und Ceftazidim zur bisherigen Therapie mit Fluconazol. Die Detektion von *Staphylococcus aureus* im EDTA – Blut führte bei diesem Patienten zur Umstellung der bestehenden antibiotischen

Kombinationstherapie mit Piperacillin/Tazobactam und Ciprofloxacin auf die Kombination von Gentamicin, Ceftriaxon und Vancomycin. Die vierte Therapiemodifikation der Interventionsgruppe erfolgte nach Identifikation von *Pseudomonas aeruginosa* mittels SeptiFast - Test. Die antiinfektive Therapie dieses Patienten mit Sultamicillin, Piperacillin/Tazobactam und Ciprofloxacin, wurde auf eine Kombination mit Meropenem und Ciprofloxacin umgestellt und Piperacillin/Tazobactam, sowie Sultamicillin beendet. Die übermittelte mikrobiologische Information der Kontrollgruppe führte in fünf Fällen zu einer Therapieumstellung (13,5%). Es handelte sich bei diesen fünf Fällen um den Nachweis von *Staphylococcus epidermidis* und bei einer dieser fünf Proben um den zusätzlichen Nachweis von *Enterococcus faecalis*. Bei zwei dieser fünf Patienten mit Therapiemodifikation nach Erhalt des mikrobiologischen Resultates von *Staphylococcus epidermidis* wurde die bestehende Therapie um Vancomycin erweitert. Die zwei vorbestehenden antiinfektiven Therapien umfassten die Kombinationstherapie von Tobramycin und Piperacillin/Tazobactam und die Kombination aus Piperacillin/Tazobactam und Clarithromycin. Bei einem der fünf Patienten mit Cefuroximtherapie wurde nach Resultatübermittlung auf eine Therapie mit Vancomycin umgestellt. Bei einem weiteren Patienten mit anschließender Therapieanpassung nach Erhalt des mikrobiologischen Befundes wurde die empirische antibiotische Therapie mit Clarithromycin und Piperacillin/Tazobactam um Linezolid eskaliert. Bei dem letzten der fünf Therapiemodifikationen auf dem Boden eines Nachweises von *Staphylococcus epidermidis* wurde aus der bestehenden Therapie mit Meropenem und Ciprofloxacin das Fluorchinolon durch Vancomycin ersetzt. Die beschriebenen Therapiemodifikationen der Kontrollgruppe sind ebenso in Abbildung 8 ersichtlich.

Für die Patienten der Interventionsgruppe betrug die Zeit von Entnahme der Blutproben für die sich anschließende mikrobiologische Diagnostik bis zur Anpassung des antiinfektiven Therapieregimes im Mittel 18,8 (\pm 5,6) Stunden. Diese Therapieumstellung nach erfolgter mikrobiologischer Diagnostik betrug in der Kontrollgruppe im Mittel 38,3 (\pm 14,5) Stunden ($p = 0,063$ mit dem exakten Mann-Whitney-Test). Die zeitlichen Angaben sind in Tabelle 4 und Abbildung 9 dargestellt.

Basierend auf diesen Ergebnissen konnte der SeptiFast - Test die Zeit von Initialisierung der mikrobiologischen Diagnostik bis hin zur Anpassung der Therapie um 19 Stunden reduzieren.

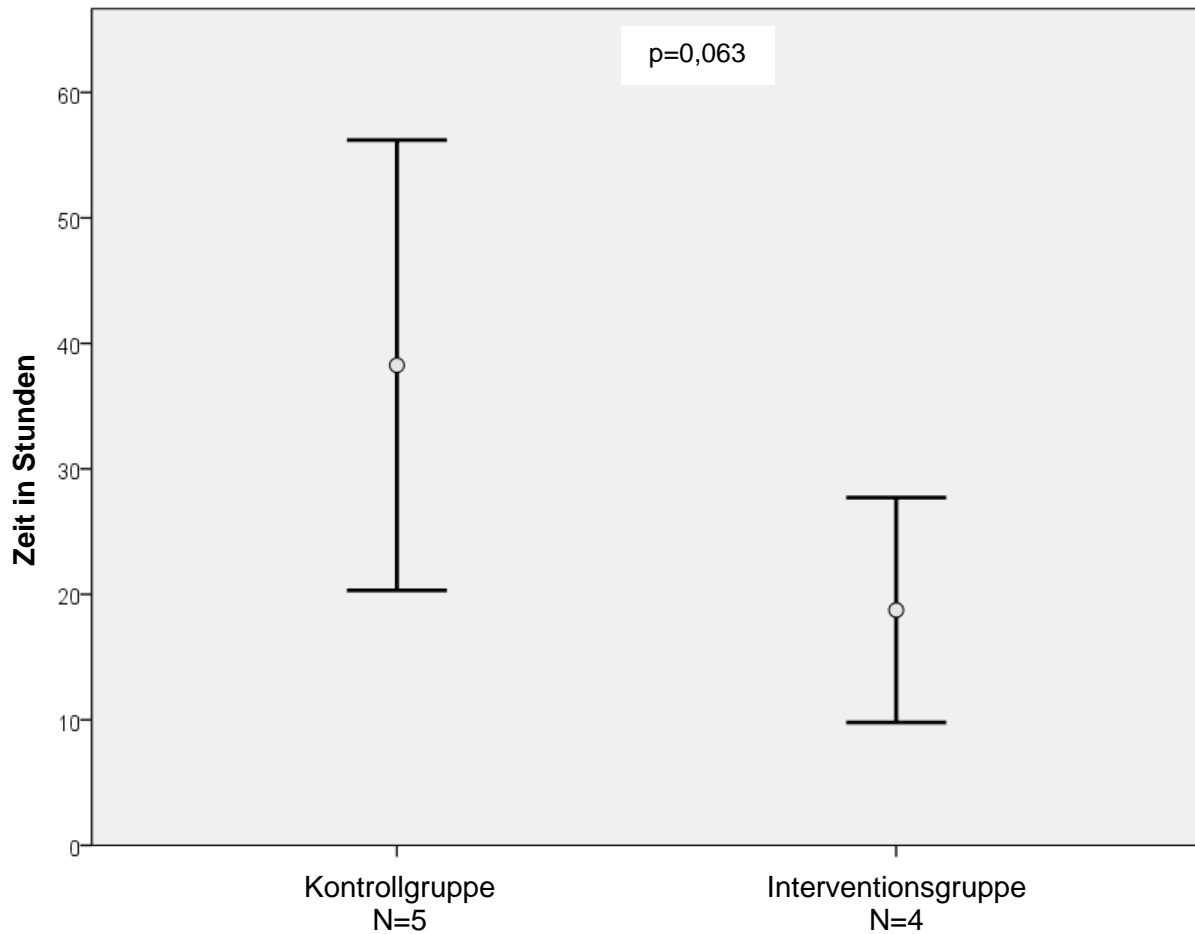
Tabelle 4: Resultate der Zeitanalyse für Interventions- und Kontrollgruppe. Angaben absolut und in Prozent %, Mittelwert (\pm Standardabweichung) oder Median (25% - 75% Quartile), statistisch signifikant $p < 0,05$

	Kontrollgruppe N=37	Interventionsgruppe N=41	p- Wert
Dauer von Entnahme bis Gramfärbung positiver Blutkulturen (Stunden) °	38.1 (± 11.6)	41.8 (± 12.9)	0,935
Dauer von Entnahme bis positivem PCR-Ergebnis (Stunden)	-	15.9 (± 5.9)	
Dauer von Entnahme bis Therapieadaption (Stunden) #	38.3 (± 14.5)	18.8 (± 5.6)	0,063

° Anzahl der positiven Blutkulturen in der Kontrollgruppe N=7, Interventionsgruppe N=5

Anzahl der Patienten mit Therapieanpassung aufgrund positiver mikrobiologischer Diagnostik Kontrollgruppe N=5, Interventionsgruppe N=4

Abbildung 9: Darstellung der Dauer von Entnahme der Blutproben bis hin zur Therapieanpassung, mittleres und 95% Konfidenzintervall in Stunden



Aufgrund dieser Resultate der vorliegenden Pilotstudie, konnte eine post-hoc Power – Analyse durchgeführt werden, um die Beispielgröße eines confirmatorischen RCTs abzuschätzen. Mit den angegebenen Mittelwerten und Standardabweichungen dieser Studie ermittelt man eine hohe Effektstärke von 1,687, was bei den Stichprobenumfängen (N=4 und N=5) sowie einem zweiseitigen $\alpha = 0,05$ zu einer Power von circa 50 Prozent führt (nichtparametrischer Mann-Whitney-Test). Legt man für die Planung einer neuen Studie eine Power von 80 Prozent bei den gleichen Eckpunkten fest, erhält man eine Fallzahl von neun Patienten pro Gruppe, um den erreichten Effekt statistisch signifikant nachzuweisen.

5. Diskussion

Die Nutzung des multiplex-PCR-basierten *SeptiFast* - Tests bei der vorliegenden randomisierten kontrollierten klinischen Pilotstudie als initiales molekulares mikrobiologisches Diagnostikverfahren im Vergleich zum Goldstandard der Blutkulturen zeigte eine deutliche Zeitreduzierung von 22 Stunden von der Probenentnahme bis zur Resultatübermittlung bei Patienten mit klinisch nachgewiesener Sepsis pulmonaler oder abdomineller Herkunft. Diese sehr schnelle, weniger als 24 Stunden umfassende, Identifikation des ursächlichen Erregers per multiplex PCR wurde in den klinischen Entscheidungsprozess integriert und führte somit zur zügigen und frühen Adaptation der begonnenen empirischen antiinfektiven Therapie. Die dafür benötigte Zeit konnte mithilfe des *SeptiFast* - Tests um 19 Stunden reduziert werden.

5.1 eingeschlossene Patienten und Basischarakteristika

Bedingt durch die sechs beteiligten postoperativen Intensivstationen mit unterschiedlichen klinischen Schwerpunkten, konnte bei diesem RCT eine Studienpopulation eingeschlossen werden, die, verglichen mit bisherigen, ein spezifisches klinisches Szenario berücksichtigenden Studien, ein breiteres Patientenspektrum darstellt. Dazu zählen unter anderem die Observationsstudie von Chaidaroglu et al, die Proben von 30 Thoraxtransplantatempfängern⁵⁶ zum Vergleich zwischen *SeptiFast*- und Blutkulturdiagnostik heranzieht oder die von Torres - Martos et al, die diese Diagnostikmethoden auf einer Intensivstation für Neonaten untersuchte⁵⁷. Die Basischarakteristika der vorliegenden Studie weisen sowohl in der Interventions- als auch in der Kontrollgruppe eine gleichartige Verteilung auf.

5.2 Erregeridentifikation

Bei der vorliegenden Studie konnte der verwendete *SeptiFast* - Test Erreger identifizieren, die in sieben von 12 positiv getesteten Proben mit den Resultaten der Standardblutkulturdiagnostik übereinstimmten. Das entspricht einer Sensitivität von 58,3%. Die Spezifität des *SeptiFast* - Tests liegt bei dieser Studienarbeit bei 83,3%. Lehmann et al konnten anhand ihrer experimentellen Studie zeigen, dass die Sensitivität des *SeptiFast* - Tests selbst bei einer Erregerdichte von drei CFU/ml zwischen 50 und 100% variiert, abhängig von der jeweiligen Erregerspezies. Bei dieser Studie konnte ebenso demonstriert werden, dass die Sensitivität mit Zunahme des abgenommenen Blutvolumens gesteigert werden kann⁵⁵. Des Weiteren wird in der benannten Studie eine Spezifität von 100% beschrieben, die aber durch Kontamination

während der stationären Probengewinnung und während des Arbeitsablaufs im mikrobiologischen Labor, trotz halbautomatisiertem Testverfahrens, geschmälert werden könnte. Wie bereits in der Einleitung aufgeführt (siehe Seite 8), ist die Kontamination in der Blutkulturdiagnostik ein nicht zu vernachlässigendes Problem. Für die mikrobiologische Diagnostik mit Blutkulturen auf den Intensivstationen wird eine Kontaminationsrate von bis zu fünf Prozent beschrieben⁵⁸. Um bei der Interpretation das Risiko einer Kontamination mit Koagulase negativen Staphylokokken, einem der häufigsten dafür verantwortlichen Erregerspezies³⁶, von vornherein berücksichtigen zu können, wurde bei dem PCR-basiertem *SeptiFast* - Test der zum Nachweis benötigte Cut-off-Wert für eben diese Erregergruppe angepasst⁵⁵. Da die Anzahl von Bakteriämien bedingt durch Koagulase negative Staphylokokken derzeit zunimmt³⁹, müsste diese Veränderung des Cut-off-Wertes für die Nutzung des *SeptiFast* - Tests bei kommenden Studienabläufen eventuell adaptiert werden. Betrachtet man die Sensitivität von 58,3% und die Spezifität von 83,3% der vorliegenden Studie und vergleicht sie mit der Sensitivität und Spezifität anderer klinischer Studien zu diesem Thema, so konnten ähnliche Prozentwerte ermittelt werden. In einer aktuellen Studie von Fernández-Cruz et al, die Patienten mit komplizierten Septitiden untersuchte, werden eine Sensitivität von 56% und eine Spezifität von 79,5% beschrieben⁵⁹.

5.3 Zeit-Analyse und Therapiemodifikation

Die Nutzung des *SeptiFast* - Testsystems bei dieser Studienarbeit reduzierte die Zeit von mikrobiologischer Diagnostik bis zur Therapiemodifikation im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik um 19 Stunden. Ebenso konnte demonstriert werden, dass in 40% der positiven Fälle in der Interventionsgruppe eine Therapiemodifikation nach Übermittlung des *SeptiFast* Resultats an die behandelnde Intensivstation erfolgte. Herne et al konnten ähnliche Werte für die Therapiemodifikation bei Erhalt eines positiven PCR Ergebnisses finden. Bei dieser Studie mit 144 Patienten, wurde die Therapie in 38,9% der positiven Fälle angepasst⁶⁰. Bei der vorliegenden Studie umfasste die Dauer von der Probenentnahme bis zur Resultatübermittlung an die jeweilige Intensivstation in der Interventionsgruppe im Mittel 15,9 Stunden und in der Kontrollgruppe im Mittel 38,1 Stunden. Eine aktuelle Studie von Chaidaroglou konnte zeigen, dass bei Übereinstimmung von *SeptiFast*- und Blutkulturergebnis, das des *SeptiFast* Tests im Mittel 1,5 Tage früher vorlag als das der Blutkultur⁵⁶. Ähnliche Ergebnisse konnten bei einer weiteren aktuellen Interventionsstudie mit 437 Blutproben

von 2013 gefunden werden. Dort konnte das Resultat des *SeptiFast* - Tests bei Übereinstimmung beider diagnostischer Methoden im Mittel 2,5 Tage früher übermittelt werden als das der Blutkulturen⁶¹. Rechtzeitige schnelle diagnostische Verfahren ermöglichen nicht nur eine rasche Modifikation des empirisch begonnenen Therapieregimes, sondern bieten des Weiteren die Möglichkeit antibiotisch wirksame Medikamente gezielter einzusetzen. Eine kostenanalytische Studie bei ITS Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock zeigte, dass diese zielgerichtete Medikation zu geringerem Verbrauch von Antibiotika führt, die Patienten weniger antiinfektiven Substanzen aussetzt und insgesamt die Krankenhausliegedauer verkürzt. Pro Patient konnte demnach durchschnittlich eine Summe von 9970€ eingespart werden, die Mortalitätsrate wurde in Interventions- und Kontrollgruppe jedoch nicht beeinflusst⁶². In ihrer quasi-experimentellen Studie konnten Hranjec et al aufzeigen, dass ein zurückhaltender Gebrauch antiinfektiver Medikamente kombiniert mit effektiver und schneller Diagnostik als konservative Therapie- und Diagnostikstrategie ein besseres klinisches Outcome von kritisch kranken Patienten auf Intensivstationen bewirkt und möglicherweise deren Mortalität reduzieren kann⁶³. Diese Resultate berücksichtigend, könnte der *SeptiFast* - Test oder vergleichbare schnelle molekulare diagnostische Methoden zukünftig die Verschreibung antibiotisch wirksamer Medikamente verringern.

5.4 Stärken der Studie

Spezifische Vorkehrungen wie die externe Randomisierung in der Mikrobiologie und die verdeckte Zuordnung sowie die Trennung von den Klinikärzten und dem Studienteam, dienten dazu, Risiken von Bias für Studie im Vorhinein durch das Studiendesign dieses RCTs zu minimieren. Wie bereits in Unterpunkt 5.1 erwähnt, konnte bei dem vorliegenden RCT im Vergleich zu bisherigen Studien ein breiter gefächertes Patientenkontinuum berücksichtigt werden^{56,57}. Eine weitere Stärke stellt die Homogenität beider Studiengruppen dar und lässt sich als Hinweis auf eine effektive Randomisierung deuten. Das von dem Transport jeglicher mikrobieller Diagnostik des Universitätsklinikums unabhängige Transportverfahren der *SeptiFast* - Proben via Fahrradkurier sicherte sowohl die zuverlässige und schnelle Ankunft dieser Materialien in der Mikrobiologie als auch die sofortige Abgabe beim zuständigen Laborpersonal. Die dennoch vorhandenen Limitationen der Studie werden im Folgenden aufgeführt.

5.5 Limitationen der Studie

Um eine Vergleichbarkeit zwischen beiden diagnostischen Methoden garantieren zu können, musste sichergestellt werden, dass bei Ankunft einer *SeptiFast* - Probe im mikrobiologischen Labor Personal arbeitete, welches den halbautomatisierten multiplex - PCR - basierten Test bedienen konnte. Das extra für diese Studie und den damit einhergehenden PCR - Arbeitsablauf geschulte Laborpersonal konnte eine Sicherstellung der Probenbearbeitung nur im Tagesverlauf, in einem zeitlichen Rahmen von 12 Stunden, garantieren. Aufgrund des technischen Fortschritts eines halbautomatisierten Testverfahrens, dessen Durchführung spezialisiertes Personal erforderte, musste diese Einschränkung der Einschlusszeiten im klinischen Tagesablauf auf den Spät- und Nachtdienst erfolgen. Im Gegensatz dazu kann das standardisierte mikrobiologische Erregeridentifikationsverfahren mittels der Blutkulturen, welche sofortiges Wachstum und automatisierte Inkubation von Organismen ermöglichen, zu jeder Tageszeit analysiert werden. Die demnach an die Verfügbarkeit des spezialisierten Personals angepassten Einschlusszeiten entsprachen einem Zeitraum von Sonntag bis Donnerstag 18 Uhr abends bis 6 Uhr des nächsten Morgens. Die externe Validität ist somit noch limitiert und hängt derzeit von den Voraussetzungen zur Einsatzfähigkeit des PCR - basierendem Diagnostikverfahrens ab. Die Integration des *SeptiFast* - Tests als vielversprechendes diagnostisches Instrument in den klinischen Entscheidungsfindungsprozess konnte im Vorfeld nicht garantiert werden. Eine Therapiemodifikation aufgrund des erhaltenen PCR - Ergebnisses, muss bei dieser neuen diagnostischen Methode erst eine breitere Akzeptanz erfahren.

Die ökonomische Seite mit den wirtschaftlichen Auswirkungen der Nutzung des multiplex PCR-basierten *SeptiFast* - Test im Vergleich zur Blutkulturdiagnostik wurde in dieser Studie nicht untersucht und wird in einem Anschlussprojekt evaluiert werden.

5.6 PCR-basierte Diagnostik bei Candidämien

Der Nachweis per PCR innerhalb eines Tages von zwei *Candida*spezies, einmal *Candida albicans* und einmal *Candida parapsilosis*, in der Interventionsgruppe erfolgte bei dieser Studie sowohl durch den *SeptiFast* -Test als auch durch die Standard-Blutkulturdiagnostik. Durch die schnelle telefonische Befundübermittlung des *SeptiFast* - Ergebnisses an die behandelnden Ärzte der jeweiligen Intensivstation konnte die laufende antiinfektive Therapie zügig angepasst werden. Zwischen der Abnahme des Blutes für die mikrobiologische Diagnostik und der Therapiemodifikation

lagen nur 20 Stunden. Die rasche Diagnostik und Therapie der Candidämien ist prognostisch entscheidend, da die Mortalität signifikant bei Verzögerung der Initiierung einer antifungalen Therapie ansteigt⁶⁴. Eine schnelle mikrobiologische PCR-basierte diagnostische Methode könnte gerade für Patienten mit einem hohen Risiko für Candida-Infektionen von Nutzen sein⁶⁵.

5.7 weitere PCR-basierte Methoden

Die vorliegende Studie diente dem Ziel, spezifisch den *SeptiFast* – Test als molekulare Diagnostik in klinischer Umgebung zu beurteilen und nicht einen Vergleich aller auf PCR-basierten Testverfahren, die aktuell im Interesse der Wissenschaft stehen, zu erstellen. Neben dem *SeptiFast* - Test existieren derzeit noch mindestens zwei weitere PCR-basierte Testverfahren zur molekularen Diagnostik. In einer aktuellen Studienarbeit wurde der VYOO® - Test (SIRS – Lab GmbH, Jena, Deutschland) auf einer interdisziplinären Intensivstation des Universitätsklinikums Jena bei Patienten mit vermuteter Sepsis getestet. Dort konnte eine Sensitivität von 60% und eine Spezifität von 75% verglichen mit der Standardblutkulturdiagnostik ermittelt werden⁶⁶. Eine aktuelle Studie von Orszag et al untersuchte die Vergleichbarkeit von Blutkulturdiagnostik und dem SepsitestTM - Testverfahren (Molzym, Bremen, Deutschland) bei kritisch kranken Patienten während extrakorporaler Membranoxygenierung. Der SepsitestTM zeigte in der besagten Studie eine Sensitivität von 78,6% und eine Spezifität von 88,4%⁶⁷. Die Integration dieses Tests in die tägliche Laborroutine zeigte, dass die molekulare Diagnostik gerade bei Patienten mit negativer Blutkultur und weiterhin bestehendem klinischen Verdacht auf ein infektiöses Geschehen eine brauchbare Option zur ergänzenden Diagnostik darstellt⁶⁸. Eine alle drei Methoden nutzende und mit der Standardblutkulturdiagnostik vergleichende Studienarbeit, bei welcher der *SeptiFast* - Test prozentual am häufigsten Erreger detektieren konnte, beschrieb eine geringe Störanfälligkeit für falsch positive Resultate aller drei molekularen Diagnostiken⁶⁹. Es sind weitere klinische Studien von Nöten, um die Einsatzfähigkeit molekularer Testverfahren als Routinediagnostikum im klinischen Alltag abschließend beurteilen zu können.

5.8 Ausblick

Diese vorliegende Pilotstudie zeigt den Nutzen molekularer diagnostischer Methoden in Form des *SeptiFast* Tests verglichen mit der Standarddiagnostik der Blutkulturen. Sie wurde auch dafür durchgeführt, um die Ausmaße einer bestätigenden randomisiert

kontrollierten Studie mit vergleichbarem Studiendesign ermitteln zu können. Basierend auf den bei dieser Studie erzielten Resultaten und mit einer Power von 80 Prozent, bräuchte es eine Anzahl von 18 Patienten, bei denen eine Therapiemodifikation aufgrund des *SeptiFast* - PCR – Ergebnisses durchgeführt wird, um eine statistische Signifikanz mit einem zweiseitigen alpha - Level von fünf Prozent erreichen zu können. Die Studienpopulation würde eine Patientenanzahl von 180 umfassen, sofern konservativ von einer geringen Erregerdetektion von zehn Prozent ausgegangen werden würde. Die Eingliederung von molekularen Testverfahren in den klinischen Entscheidungsprozess führt zu einer schnelleren Erregeridentifizierung und könnte somit einen grundlegenden Umbruch im diagnostischen und therapeutischen Konzept von bakteriellen und fungalen Septikämien bedingen und die Mortalität kritisch kranker Patienten positiv beeinflussen. Da diese noch sehr neuen diagnostischen PCR-basierten Methoden einem stetigen Wandel unterliegen und es somit in kurzer Zeit zu vielen Innovationen diesbezüglich kommt, gibt es bereits Verbesserungen bezüglich der Probengewinnung und des Arbeitsablaufs verglichen mit dem hier genutzten *SeptiFast* Test⁶⁹. Um Sicherheit und Effektivität molekularer diagnostischer Methoden nachweisen zu können und deren standardisierte Nutzung im Infektionsmanagement bei kritisch kranken Patienten ermöglichen zu können, bedarf es weiterführender klinischer Studien mit größeren Studienpopulationen und mit unterschiedlichen klinischen Rahmenbedingungen. Molekulare PCR-basierte diagnostische Methoden zur Erregerdetektion können die aktuelle Standarddiagnostik mit Blutkulturen nicht ersetzen. Sie stellen allerdings ein zusätzliches hilfreiches diagnostisches Spektrum dar⁷⁰. Es besteht somit die Möglichkeit mit den Neuerungen der letzten Jahre in der mikrobiologischen Diagnostik und der damit verbundenen Erregerdetektion innerhalb von sechs Stunden zwischen Probengewinnung und Erhalt des Resultats, den Antibiotikaverbrauch wirksam zu reduzieren. Unter Berücksichtigung der Infektionsschwere, könnte nicht primär mit einer empirischen Therapie sondern direkt mit der gezielten antimikrobiellen Therapie begonnen werden. Insofern ergäbe sich daraus auch die Aussicht auf Minimierung der antibiotikainduzierten Resistenzentwicklung von Mikroorganismen. Kritisch kranke Patienten könnten von schnellerer effektiverer Therapie profitieren. Der Lightcycler® *SeptiFast*-Test zeigte gegenüber der Blutkulturdiagnostik eine signifikante Zeitersparnis von Probengewinnung bis Resultatübermittlung mit Einfluss auf den klinischen Ablauf.

Molekulare PCR-basierte Methoden scheinen eine nützliche zusätzliche Diagnostikoption, insbesondere bezüglich invasiver Mykosen, darzustellen.

6. Literaturverzeichnis

1. Balk RA, Bone RC. The septic syndrome. Definition and clinical implications. *Critical care clinics* 1989;5:1-8.
2. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical care medicine* 1992;20:864-74.
3. Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Prevention, diagnosis, therapy and follow-up care of sepsis: 1st revision of S-2k guidelines of the German Sepsis Society (Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG)) and the German Interdisciplinary Association of Intensive Care and Emergency Medicine (Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI)). *German medical science : GMS e-journal* 2010;8:Doc14.
4. Angus DC, Pereira CA, Silva E. Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 2006;6:207-12.
5. Harrison DA, Welch CA, Eddleston JM. The epidemiology of severe sepsis in England, Wales and Northern Ireland, 1996 to 2004: secondary analysis of a high quality clinical database, the ICNARC Case Mix Programme Database. *Critical care (London, England)* 2006;10:R42.
6. Elias AC, Matsuo T, Grion CM, Cardoso LT, Verri PH. Incidence and risk factors for sepsis in surgical patients: a cohort study. *Journal of critical care* 2012;27:159-66.
7. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *The New England journal of medicine* 2003;348:1546-54.
8. Blanco J, Muriel-Bombin A, Sagredo V, et al. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. *Critical care (London, England)* 2008;12:R158.
9. Danai PA, Sinha S, Moss M, Haber MJ, Martin GS. Seasonal variation in the epidemiology of sepsis. *Critical care medicine* 2007;35:410-5.

10. Vesteynsdottir E, Karason S, Sigurdsson SE, Gottfredsson M, Sigurdsson GH. Severe sepsis and septic shock: a prospective population-based study in Icelandic intensive care units. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 2011;55:722-31.
11. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. *Critical care medicine* 2012;40:754-61.
12. Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive care medicine* 2007;33:606-18.
13. Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, et al. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Critical care medicine* 2006;34:344-53.
14. Molina FJ, Diaz CA, Barrera L, et al. [Microbiological profile of infections in the Intensive Care Units of Colombia (EPISEPSIS Colombia)]. *Medicina intensiva / Sociedad Espanola de Medicina Intensiva y Unidades Coronarias* 2011;35:75-83.
15. Carrillo-Esper R, Carrillo-Cordova JR, Carrillo-Cordova LD. [Epidemiological study of sepsis in Mexican intensive care units]. *Cirugia y cirujanos* 2009;77:301-8; 279-85.
16. Perner A, Carlsen S, Marcussen K, et al. [Septic shock in intensive care]. *Ugeskrift for laeger* 2010;172:1206-10.
17. Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert review of anti-infective therapy* 2012;10:701-6.
18. Marchetti O, Bille J, Fluckiger U, et al. Epidemiology of candidemia in Swiss tertiary care hospitals: secular trends, 1991-2000. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2004;38:311-20.
19. Diekema D, Arbefeville S, Boyken L, Kroeger J, Pfaller M. The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2012;73:45-8.

20. Ylipalosaari P, Ala-Kokko TI, Karhu J, et al. Comparison of the epidemiology, risk factors, outcome and degree of organ failures of patients with candidemia acquired before or during ICU treatment. *Critical care (London, England)* 2012;16:R62.
21. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009;48:1695-703.
22. Pereira GH, Muller PR, Szeszs MW, Levin AS, Melhem MS. Five-year evaluation of bloodstream yeast infections in a tertiary hospital: the predominance of non-*C. albicans* Candida species. *Medical mycology : official publication of the International Society for Human and Animal Mycology* 2010;48:839-42.
23. Bassetti M, Mikulska M, Viscoli C. Bench-to-bedside review: therapeutic management of invasive candidiasis in the intensive care unit. *Critical care (London, England)* 2010;14:244.
24. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Current opinion in critical care* 2010;16:445-52.
25. Bouza E, Munoz P. Epidemiology of candidemia in intensive care units. *International journal of antimicrobial agents* 2008;32 Suppl 2:S87-91.
26. Morrell M, Fraser VJ, Kollef MH. Delaying the empiric treatment of candida bloodstream infection until positive blood culture results are obtained: a potential risk factor for hospital mortality. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2005;49:3640-5.
27. Hall KK, Lyman JA. Updated review of blood culture contamination. *Clinical microbiology reviews* 2006;19:788-802.
28. Martinez JA, DesJardin JA, Aronoff M, Supran S, Nasraway SA, Snyderman DR. Clinical utility of blood cultures drawn from central venous or arterial catheters in critically ill surgical patients. *Critical care medicine* 2002;30:7-13.

29. Beutz M, Sherman G, Mayfield J, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical utility of blood cultures drawn from central vein catheters and peripheral venipuncture in critically ill medical patients. *Chest* 2003;123:854-61.
30. Norberg A, Christopher NC, Ramundo ML, Bower JR, Berman SA. Contamination rates of blood cultures obtained by dedicated phlebotomy vs intravenous catheter. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 2003;289:726-9.
31. Lamy B, Roy P, Carret G, Flandrois JP, Delignette-Muller ML. What is the relevance of obtaining multiple blood samples for culture? A comprehensive model to optimize the strategy for diagnosing bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2002;35:842-50.
32. Grace CJ, Lieberman J, Pierce K, Littenberg B. Usefulness of blood culture for hospitalized patients who are receiving antibiotic therapy. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;32:1651-5.
33. Souvenir D, Anderson DE, Jr., Palpant S, et al. Blood cultures positive for coagulase-negative staphylococci: antiseptic, pseudobacteremia, and therapy of patients. *Journal of clinical microbiology* 1998;36:1923-6.
34. Calfee DP, Farr BM. Comparison of four antiseptic preparations for skin in the prevention of contamination of percutaneously drawn blood cultures: a randomized trial. *Journal of clinical microbiology* 2002;40:1660-5.
35. Schifman RB, Strand CL, Meier FA, Howanitz PJ. Blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Probes study involving 640 institutions and 497134 specimens from adult patients. *Archives of pathology & laboratory medicine* 1998;122:216-21.
36. Elzi L, Babouee B, Vogeli N, et al. How to discriminate contamination from bloodstream infection due to coagulase-negative staphylococci: a prospective study with 654 patients. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012.

37. Thylefors JD, Harbarth S, Pittet D. Increasing bacteremia due to coagulase-negative staphylococci: fiction or reality? *Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America* 1998;19:581-9.
38. Rogers KL, Fey PD, Rupp ME. Coagulase-negative staphylococcal infections. *Infectious disease clinics of North America* 2009;23:73-98.
39. Piette A, Verschraegen G. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. *Veterinary microbiology* 2009;134:45-54.
40. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999;115:462-74.
41. Harbarth S, Garbino J, Pugin J, Romand JA, Lew D, Pittet D. Inappropriate initial antimicrobial therapy and its effect on survival in a clinical trial of immunomodulating therapy for severe sepsis. *The American journal of medicine* 2003;115:529-35.
42. Davey P, Brown E, Fenelon L, et al. Interventions to improve antibiotic prescribing practices for hospital inpatients. *Cochrane database of systematic reviews (Online)* 2005:CD003543.
43. Byl B, Clevenbergh P, Jacobs F, et al. Impact of infectious diseases specialists and microbiological data on the appropriateness of antimicrobial therapy for bacteremia. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 1999;29:60-6; discussion 7-8.
44. Garnacho-Montero J, Garcia-Garmendia JL, Barrero-Almodovar A, Jimenez-Jimenez FJ, Perez-Paredes C, Ortiz-Leyba C. Impact of adequate empirical antibiotic therapy on the outcome of patients admitted to the intensive care unit with sepsis. *Critical care medicine* 2003;31:2742-51.
45. Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000;118:146-55.

46. Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Ackroyd-Stolarz S, Dickinson G. Utility of blood cultures in the management of adults with community acquired pneumonia discharged from the emergency department. *Emergency medicine journal : EMJ* 2003;20:521-3.
47. van de Beek D, de Gans J, Spanjaard L, Weisfelt M, Reitsma JB, Vermeulen M. Clinical features and prognostic factors in adults with bacterial meningitis. *The New England journal of medicine* 2004;351:1849-59.
48. Cosgrove SE. The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: mortality, length of hospital stay, and health care costs. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;42 Suppl 2:S82-9.
49. Peterson LR, Dalhoff A. Towards targeted prescribing: will the cure for antimicrobial resistance be specific, directed therapy through improved diagnostic testing? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004;53:902-5.
50. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical care medicine* 2006;34:1589-96.
51. A Randomized Trial of Protocol-Based Care for Early Septic Shock. *The New England journal of medicine* 2014.
52. Funk DJ, Kumar A. Antimicrobial therapy for life-threatening infections: speed is life. *Critical care clinics* 2011;27:53-76.
53. Tafelski S, Nachtigall I, Deja M, et al. Computer-assisted decision support for changing practice in severe sepsis and septic shock. *The Journal of international medical research* 2010;38:1605-16.
54. Roche Diagnostics GmbH: MagNA Pure Compact System. 2010. (Accessed at https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/compact/compact_docs/mpc_system_brochure.pdf.)

55. Lehmann LE, Hunfeld KP, Emrich T, et al. A multiplex real-time PCR assay for rapid detection and differentiation of 25 bacterial and fungal pathogens from whole blood samples. *Medical microbiology and immunology* 2008;197:313-24.
56. Chaidaroglou A, Manoli E, Marathias E, et al. Use of a multiplex polymerase chain reaction system for enhanced bloodstream pathogen detection in thoracic transplantation. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation* 2013;32:707-13.
57. Torres-Martos E, Perez-Ruiz M, Pedrosa-Corral I, et al. [Evaluation of the LightCycler(R) SeptiFast test in newborns and infants with clinical suspicion of sepsis]. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 2013;31:375-9.
58. Stohl S, Benenson S, Svirni S, et al. Blood cultures at central line insertion in the intensive care unit: comparison with peripheral venipuncture. *Journal of clinical microbiology* 2011;49:2398-403.
59. Fernandez-Cruz A, Marin M, Kestler M, Alcalá L, Rodríguez-Creixems M, Bouza E. The value of combining blood culture and SeptiFast data for predicting complicated bloodstream infections caused by Gram-positive bacteria or *Candida* species. *Journal of clinical microbiology* 2013;51:1130-6.
60. Herne V, Nelovkov A, Kutt M, Ivanova M. Diagnostic performance and therapeutic impact of LightCycler SeptiFast assay in patients with suspected sepsis. *European journal of microbiology & immunology* 2013;3:68-76.
61. Paolucci M, Stanzani M, Melchionda F, et al. Routine use of a real-time polymerase chain reaction method for detection of bloodstream infections in neutropaenic patients. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2013;75:130-4.
62. Alvarez J, Mar J, Varela-Ledo E, et al. Cost analysis of real-time polymerase chain reaction microbiological diagnosis in patients with septic shock. *Anaesthesia and intensive care* 2012;40:958-63.
63. Hranjec T, Rosenberger LH, Swenson B, et al. Aggressive versus conservative initiation of antimicrobial treatment in critically ill surgical patients with suspected

- intensive-care-unit-acquired infection: a quasi-experimental, before and after observational cohort study. *The Lancet infectious diseases* 2012;12:774-80.
64. Garey KW, Rege M, Pai MP, et al. Time to initiation of fluconazole therapy impacts mortality in patients with candidemia: a multi-institutional study. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2006;43:25-31.
65. Rath PM, Saner F, Paul A, et al. Multiplex PCR for rapid and improved diagnosis of bloodstream infections in liver transplant recipients. *Journal of clinical microbiology* 2012;50:2069-71.
66. Bloos F, Sachse S, Kortgen A, et al. Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS one* 2012;7:e46003.
67. Orszag P, Disque C, Keim S, et al. Monitoring of Patients Supported by Extracorporeal Membrane Oxygenation for Systemic Infections by Broad-Range rRNA Gene PCR Amplification and Sequence Analysis. *Journal of clinical microbiology* 2014;52:307-11.
68. Haag H, Locher F, Nolte O. Molecular diagnosis of microbial aetiologies using SepsiTTest in the daily routine of a diagnostic laboratory. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2013;76:413-8.
69. Schreiber J, Nierhaus A, Braune SA, de Heer G, Kluge S. Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin* 2013;108:311-8.
70. Skvarc M, Stubljar D, Rogina P, Kaasch AJ. Non-culture-based methods to diagnose bloodstream infection: Does it work? *European journal of microbiology & immunology* 2013;3:97-104.

7. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Jana Faust, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Nutzen des Lightcycler® SeptiFast Tests zur Erregerdetektion bei postoperativen septischen Patienten im Vergleich zur Standarddiagnostik mit 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik und Resultaten entsprechen den URM und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jana Faust hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: *Fallbericht - Diagnostik invasiver Mykosen mittels LightCycler® SeptiFast Test bei einer intensivmedizinischen Patientin mit Candidasepsis*. Anästh Intensivmed 2012; 53:S524. Sept 2012 HAI. Jana Faust; Sascha Tafelski, Irit Nachtigall; Evgeny A. Idelevich; Gerda Silling; Karsten Becker; Maria Deja, Thomas Adam; Stefan Bereswill; Claudia Spies

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung, Postermitemstellung

Publikation 2: Faust J; Tafelski S, Nachtigall I; Idelevich E; Silling G; Becker K; Deja M, Adam T Bereswill S; Spies C. *Fallbericht - Diagnostik invasiver Mykosen mittels LightCycler® SeptiFast Test bei einer intensivmedizinischen Patientin mit*

Candidasepsis. Posterkongress im WPP2, Reformstudiengang Medizin der
Charité.06.07.2012

Beitrag im Einzelnen: Datenerhebung, Postererstellung, Posterpräsentation

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden
Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Lebenslauf

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

9. Publikationsliste

Fallbericht - Diagnostik invasiver Mykosen mittels LightCycler® SeptiFast Test bei einer intensivmedizinischen Patientin mit Candidasepsis. Anästh Intensivmed 2012; 53:S524.

Sept 2012 HAI. Jana Faust; Sascha Tafelski, Irit Nachtigall; Evgeny A. Idelevich; Gerda Silling; Karsten Becker; Maria Deja, Thomas Adam; Stefan Bereswill; Claudia Spies

Faust J; Tafelski S, Nachtigall I; Idelevich E; Silling G; Becker K; Deja M, Adam T Bereswill S; Spies C. *Fallbericht - Diagnostik invasiver Mykosen mittels LightCycler® SeptiFast Test bei einer intensivmedizinischen Patientin mit Candidasepsis.*

Posterkongress im WPP2, Reformstudiengang Medizin der Charité.06.07.2012

10. Danksagung

Frau Professor Dr. Claudia Spies danke ich für ihr Vertrauen, mich als Doktorandin bei dieser spannenden Studie einzusetzen. Von Beginn an mit der Schaffung hervorragender Rahmenbedingungen bis hin zur finalen Durchsicht meiner Arbeit begleitete sie mich zu jedem Zeitpunkt mit Ideen und kontinuierlichen Ratschlägen, sowie den immer sehr hilfreichen thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen.

An Herrn Dr. Sascha Tafelski geht ein riesiges Dankeschön für die Mitarbeit an der Studie, für sein starkes Engagement und dafür, dass er mich, wo möglich, unterstützte und mir immer beratend zu Seite stand. Frau Dr. Irit Nachtigall danke ich für ihre Kompetenz und absolute Zuverlässigkeit. Frau Professor Maria Deja, Herrn Dr. Andreas Rothbart, Frau Susanne Heim, Herrn Dr. Robert Powollik, Frau Sara Casu und dem restlichen ABx-Team möchte ich sehr herzlich für die Mitarbeit und Hilfe danken.

Ein ganz besonderer Dank gilt den Mikrobiologen Professor Dr. Stefan Bereswill, Prof. Dr. Thomas Adam und den medizinisch technischen Assistentinnen Antje Große, Gitina Fiedler und Angela Pohlisch. Ohne euch, die ihr mit der Analyse mittels SeptiFast-Test betraut wart, wäre diese Studie nie zustande gekommen.

Professor Wernecke und den Mitarbeitern der Sostana GmbH danke ich für die ausgezeichnete Beratung bezüglich der statistischen Analysen.

Den mitarbeitenden Ärzten auf den Intensivstationen bin ich zu großem Dank verpflichtet, denn nur durch ihre Mitarbeit konnte die Studie gut funktionieren. Hierbei möchte ich gerne Frau Dr. Susanne Marz, Herrn Dr. Marc Simon, sowie Frau Dr. Laura Hagemann besonders dankend hervorheben.

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich ganz herzlich für die Unterstützung, Motivation, Kritik und Ratschläge während des gesamten Zeitraums danken. Ohne eure offenen Ohren und euren Beistand wäre vieles schwieriger geworden. Es ist ein schönes Gefühl, zu wissen, dass ihr hinter mir steht. Danke, dass es euch gibt!

Enden möchte ich mit einem Zitat, das mich in den intensiven Jahren mit der Studie stets motivierte:

„Nicht das Beginnen wird belohnt, sondern einzig und allein das Durchhalten.“

- Katharina von Siena -