

„Evaluation eines auf der Polymerasekettenreaktion basierten
Keimnachweises bei Intensivpatienten“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Julia Andrea Pochert

aus

Köln

2009

„Evaluation eines auf der Polymerasekettenreaktion basierten
Keimnachweises bei Intensivpatienten“

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Julia Andrea Pochert

aus

Köln

2009

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. F. Stüber
2. Gutachter: Professor Dr. med. J.C. Kalff

Tag der Mündlichen Prüfung: 27.4.2009

Aus dem Universitätsklinikum Bonn, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin

Direktor: Professor Dr. med. A. Hoeft

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für meine Eltern

Jörg und Margret

„ Die Wahrheit ist unser wertvollstes Gut.
Und entsprechend sparsam sollte man damit umgehen“.
Aus: André Kaminski, Nächstes Jahr in Jerusalem

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	8
2	Methoden	12
2.1	Einschlusskriterien	12
2.2	Scores	14
2.2.1	New Simplified Acute Physiology Score	15
2.2.2	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation	16
2.2.3	Sequential Organ Failure Assessment	16
2.3	Untersuchungsablauf und untersuchte Parameter	17
2.4	Probenakquisition, Probenverarbeitung	17
2.5	Real-Time PCR	23
2.6	Statistik	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Patientenkollektiv	33
3.2	Diagnosen	33
3.3	Entzündungszeichen und Laborwerte	34
3.4	Auswertung Scores	38
3.4.1	SAPS II	39
3.4.2	Apache II	40
3.4.3	SOFA	40
3.5	Ergebnisse Blutkultur und PCR	41
3.6	Korrelation von Blutkultur und PCR	42
4	Diskussion	44
4.1	Vergleich der Ergebnisse von Blutkultur und PCR Sonde	44
4.2	Gewinnung der Proben aus liegenden arteriellen Kathetern und Kontamination	46
4.3	PCR in der Diagnostik bakterieller Infektionen	47
4.4	Eingruppierung und Auswahl der Patienten	48

4.5	Zusammenfassung	49
5	Literaturverzeichnis	51

Verzeichnis der Abkürzungen

SIRS	systemic inflammatory response syndrome
DNS	Desoxyribonukleinsäure
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCT	Procalcitonin
IL-6	Interleukin-6
CRP	C-reaktives Protein
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
SAPS II	New Simplified Acute Physiology Score
Apache II	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
GCS	Glasgow Coma Scale
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
HCO ₃	Hydrogencarbonat
Hkt	Hämatokrit
HF	Herzfrequenz
RR	nicht invasiver Blutdruck nach Riva-Rocci
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
FRET	Fluorescens Resonance Energy Transfer
SYBR Green	Cyanin-Farbstoff

1 Einleitung

Eine generalisierte Entzündungsreaktion ist die häufigste Todesursache auf Intensivstationen, die nicht überwiegend akute Koronarsyndrome behandeln (Niederman et al., 1990; Parrillo et al., 1990; Sands et al., 1997).

Eine Studie von Angus et al. schätzt, dass mehr als 750000 Fälle von schwerer Sepsis jedes Jahr in den USA auftreten, daraus resultieren mehr als 500 Todesfälle jeden Tag (Angus et al., 2001).

Die steigende Inzidenz von septischen Patienten wird auf die mit dem Patientenalter ansteigenden Komorbiditäten, das Nutzen von potenteren Breitbandantibiotika und die zunehmende Anzahl von immunsupprimierten Patienten zurückgeführt (Parrillo et al., 1990; Pranatharthy et al., 1994).

Über 90% der auf Intensivstationen auftretenden systemisch entzündlichen Syndrome werden durch Bakterien verursacht und sind damit als Sepsis zu bezeichnen. Dabei ist das Auftreten von gramnegativen und grampositiven Bakterien in etwa gleich verteilt (Ibrahim et al., 2000).

Andere Ursachen für eine systemische Entzündungsreaktion können unterschiedliche Arten von Stress auf den Körper sein, ob es sich hierbei um einen bewusst gesetzten Stress, wie eine Operation oder um einen Verkehrsunfall handelt, ist für den Körper und seine Reaktion irrelevant.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass Blutkulturen zur Erkennung einer Bakteriämie nicht in allen Fällen ausreichend sind. Hierbei kommt es auf das jeweilige Patientengut an. Bei Patienten, die aufgrund einer Besiedelung von z.B. Herzklappen eine kontinuierliche Bakteriämie aufweisen, zeigen Blutkulturen eine Sensitivität von über 90 % (Aronson et al., 1987; MacGregor et al., 1972; Weinstein et al., 1983). Bei Patienten, die unter einem anderen Fokus, leiden ist die Zeitspanne, in der Bakterien im Blut vorhanden sind, deutlich geringer. Hierbei ist es schwierig, den genauen Zeitpunkt der tatsächlichen Bakteriämie zu erkennen und dann die Kulturen abzunehmen.

Weitere Studien haben ergeben, dass die Rate der durch Kontamination falsch positiven Kulturen über der der richtig positiven liegt. Die Sensitivität lag in diesen Studien noch bei 13 - 15% (Bates et al., 1991; Everts et al., 2001; McBryde et al., 2005).

Die sichere Erkennung einer Bakteriämie ist also nach wie vor schwierig. Der Nachweis einer Bakteriämie sollte auch aufgrund der hohen Folgekosten von empirisch kalkulierten Antibiosen sicherer werden.

Zur Unterscheidung von Patienten mit Sepsis oder SIRS müssen also andere Möglichkeiten gefunden werden.

Nach der Consensus Conference von 1992 wurden Definitionen festgelegt (Conference et al., 1992), die das klinische Bild einer systemischen Entzündungsreaktion unterteilen.

Zum einen hat sich dabei der Begriff des SIRS (systemic inflammatory response syndrome) durchgesetzt (Bone et al., 1992). Hierbei wird auf den Nachweis pathogener Mikroorganismen verzichtet. Im Vordergrund steht vielmehr die systemische Entzündungsreaktion als Folge von Infektion, Trauma, Operation, Verbrennung usw. (Böhrer et al., 1993). Während eine Infektion die Folge des Eindringens von Mikroorganismen darstellt, ist die Sepsis eine Immunantwort des Wirts (Herfarth et al., 1995; Marshall et al., 1990; Parrillo et al., 1993). Nicht die unmittelbaren Eigenschaften eindringender Mikroorganismen oder ihre direkte toxische Wirkung bestimmen das Krankheitsbild, sondern die Reaktion des Patienten auf den infektiösen Stimulus (Gramm et al., 1995). Die systemische Antwort kann dabei schrittweise verschieden ausgeprägt sein und im septischen Schock gipfeln. Die Ausprägung beider Krankheitsbilder kann gleich sein (Schein et al., 1997).

Die frühe Erkennung und adäquate Behandlung von systemischen Infektionen bei intensivpflichtigen Patienten verbessern das klinische Outcome (Kreger et al., 1980; Rothman et al., 2002). Dazu gehört vor allen Dingen das frühzeitige Einleiten einer adäquaten antibiotischen Therapie (Torres et al., 1990).

Eine Arbeitsgruppe der Klinik und Poliklinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin des Universitätsklinikums Bonn unter der Leitung von F. Stüber hat eine Methode zur Diagnostik von Bakterien-DNS aus Vollblut erarbeitet, mit dem Ziel, eine schnellere Identifizierung von Bakterien im Blut septischer Patienten zu ermöglichen. Dies würde die Zeitspanne zwischen einer ungezielten Antibiotikatherapie und dem Einleiten einer erregerspezifischen Therapie verkürzen und damit nicht nur das Risiko von Nebenwirkungen der Medikation minimieren, sondern auch dazu beitragen, die Vermehrung von resistenten Bakterien zu unterbinden.

Eine konventionelle Blutkultur liefert erste Ergebnisse nach ca. 48 Stunden. Ein Problem der Blutkultur ist neben der langen Bearbeitungszeit auch die Handhabung. Eine Blutkultur muss, um ein Bakterienwachstum zu ermöglichen adäquat gelagert und transportiert werden. In vielen Kliniken ist dies problematisch.

Das Verfahren der Real- Time PCR und Schmelzkurvenanalyse ermöglicht eine Identifizierung der Bakterien schon nach ca. 4 Stunden (Klaschik et al., 2002). Die Lagerung der Proben ist deutlich einfacher, da das Verfahren nicht darauf angewiesen ist, dass die Bakterien noch vermehrungsfähig sind.

Diese Arbeit vergleicht die Effektivität des Bakteriennachweises zwischen der konventionellen Blutkultur und der Real- Time PCR plus Schmelzkurvenanalyse. Eine genaue Beschreibung der Technik ist im Material und Methodenteil zu finden.

Hierfür wurde der Vergleich zwischen den beiden Gruppen gewählt, die sich hinsichtlich der PCT Konzentration als septisch oder in einer SIRS befanden.

Verschiedene Studien zeigten, dass eine frühzeitige Unterscheidung der Diagnosen septischer Schock und SIRS vor allen durch die Laborparameter Interleukin-6 (IL-6) und Procalcitonin (PCT) möglich sind (Du et al., 2002; Mokart et al., 2005; Reith et al., 1998). Eine Bestimmung des c-reactive protein (CRP) hilft hingegen nicht bei der Differenzierung. In der Studie von Du B et al. lagen die Serumkonzentrationen von PCT und IL-6 bei septischen Patienten bei 3,6 (1,8, 27,5 µg/l) bzw. 810 +/- 516 ng/l und damit signifikant höher als bei SIRS Patienten (0,5 (0,2, 1,8) µg/l, 235 +/- 177 ng/l).

Die oben genannten Studien geben geringfügig unterschiedliche PCT- Grenzwerte an, ab denen von einer Sepsis ausgegangen werden muss. Es besteht jedoch Konsens darüber, dass ein PCT von über 1,5 µg/l bis 2 µg/l auf ein Sepsis hindeutet. Bei PCT Werten über 10 mg/l handelt es sich in der Regel um Patienten im Multiorganversagen.

Bezogen auf die in die Studie eingeschlossene Patientengruppe bedeutet dies, dass sich in der Population 30 Proben von septischen Patienten befanden und 57 Proben von SIRS Patienten. Patienten mit PCT Werten ≥ 2 µg/l wurden als septisch eingestuft.

Mit dieser Arbeit soll versucht werden, die Zeitspanne zwischen Proben Akquirierung und Feststellung des Keimes, der zu einer zu behandelungspflichtigen Sepsis, führt deutlich zu verkürzen. Damit würde der Maßgabe näher gekommen, die richtige antibiotische Therapie schon nach kurzer Zeit zu verabreichen.

Des Weiteren kann mit der schnelleren Erkenntnis, ob es sich bei dem vorliegenden Krankheitsbildes um eine SIRS oder Sepsis handelt, deutlich dazu beigetragen werden, den Antibiotikaverbrauch zu reduzieren, und damit auf lange Sicht das Auftreten von multiresistenten Keimen zu verringern.

Sollte es mit den im Folgenden beschriebenen Techniken möglich sein die oben genannten Ziele zu erreichen, würden nicht nur die für Antibiotika auftretenden Kosten reduziert. Auch die hohe finanzielle Belastung, die durch die Isolation von Patienten mit multiresistenten Keimen verursacht wird, könnte auf lange Sicht reduziert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Einschlusskriterien

Bei zutreffenden Einschluss- und fehlenden Ausschlusskriterien (s.u.) wurden Patienten von den Intensivstationen der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin mit einer systemischen Entzündungsreaktion in die Untersuchung eingeschlossen. Die Indikationsstellung zur Durchführung einer Blutkultur erfolgte durch die auf den Intensivstationen tätigen Ärzte.

Einschlusskriterien:

- Alter des Patienten ≥ 18 Jahre
- Vorliegen der Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters in die Untersuchung
- Systemische Entzündungsreaktion und V.a. Infektion (Sepsis)

Ausschlusskriterien:

- Schwangerschaft
- Alter < 18 Jahre
- Fehlende Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters in die Untersuchung

Das Vorliegen einer Sepsis wurde gemäß den Kriterien der Konsensuskonferenz 1992 definiert:

- Temperatur, gemessen in der Harnblase: $>38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz: Tachykardie > 90 Schläge/min
- Atemfrequenz: Tachypnoe oder Dyspnoe, 20 Atemzüge/min oder $\text{paCO}_2 < 32$ mmHg
- Leukozytenzahl: Leukozytose oder Leukopenie > 12.000 Zellen/ mm^3 ,
 < 4.000 Zellen/ mm^3

Bei Vorliegen von zwei oder mehr dieser Kriterien spricht man von einem Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS). Diese Bezeichnung ist unabhängig von der Ursache des Syndroms. Sollte eine Infektion als Grundlage für die oben genannten Kriterien nachgewiesen sein, wird von einer Sepsis gesprochen. In diesen Falle werden beide Ausdrücke synonym verwendet (Conference et al., 1992).

Alle Patienten, bzw. deren rechtliche Vertreter wurden mündlich und schriftlich über die Untersuchung aufgeklärt. Die zuständige Ethikkommission hatte ihre Einwilligung gegeben. Die Patienten, bzw. deren rechtliche Vertreter wurden gebeten, ihre Einwilligung in die Teilnahme an der Studie schriftlich auf dem Einwilligungsbogen zu dokumentieren.

In den Fällen, in denen aufgrund der Schwere des begleitenden Krankheitsbildes keine Geschäftsfähigkeit bestand, wurde die Zustimmung des nächsten Angehörigen, respektive die des zuständigen Vormundschaftsgerichtes erbeten.

Die 74 Patienten, die in die Studie eingeschlossen wurden, wurden mit Hilfe von Scoresystemen eingeschätzt. Diese Systeme dienen dazu, eine Fülle von intensivmedizinisch erhobenen Parametern unter Berücksichtigung ihrer jeweiligen Relevanz zu bündeln und in der Gesamtheit zu interpretieren.

2.2 Scores

Es wurden vier verschiedene Scores verwendet, die die Todeswahrscheinlichkeit der Patienten in dem jeweiligen Zustand angeben.

1. SAPS II
(New Simplified Acute Physiology Score)
2. Apache II
(Acute Physiology And Chronic Health Evaluation)
3. SOFA
(Sequential Organ Failure Assessment)

Alle Scores weisen bestimmten klinischen oder laborchemischen Werten Punktzahlen zu, die später die Berechnung des Risikos der Mortalität und Morbidität der einzelnen Patienten zulassen und damit eine adäquate Reaktion des Intensivmediziners ermöglichen (Roche Diagnostics Corporation et al.). Die erhobenen Werte werden bei SAPS II und Apache II dazu genutzt, die Todeswahrscheinlichkeit in Prozent zu schätzen. SOFA hingegen beschreibt die Funktionalität der lebenswichtigen Organe. Überblick über die zur Berechnung verwendeten, klinisch erhobenen Werte gibt Tabelle 1.

Tabelle 1: in Spalte 1 alle Parameter mit denen die verschiedenen Sepsis Scores berechnet werden, die Kreuze in den folgenden Spalten zeigen die Parameter an, die für die jeweiligen Sepsis Scores (New Simplified Acute Physiology (SAPS II), Acute Physiology And Chronic Health Evaluation (Apache II), Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) benötigt werden

	SAPS II	Apache II	SOFA
GlascowComaScale	X	X	X
Serumkreatinin	X	X	X
Sauerstoffpartialdruck/ Sauerstoffkonzentration der Inspirationsluft	X		X
Bilirubin	X		X
Alter	X	X	
Blutdruck	X	X	
Pulsfrequenz	X	X	
Temperatur	X	X	
Leukozyten	X	X	
Kalium	X	X	
Natrium	X	X	
Hydrogencarbonat	X	X	
Thrombozyten			X
Aufnahmegrund	X		
Begleiterkrankung	X		
Harnvolumen	X		
Atemfrequenz		X	
Sauerstoffkonzentration der Inspirationsluft		X	
pH		X	
Hämatokrit		X	
Menge der Katecholamine			X

Im folgenden werden die verwendeten Scores kurz beschrieben:

2.2.1. New Simplified Acute Physiology

Der *New Simplified Acute Physiology Score* im folgenden SAPS II dient der Mortalitätsabschätzung. Der SAPS II-Score bedarf keiner Aufnahmediagnose. Das ist vorteilhaft, da diese in der akuten klinischen Situation oftmals schwierig festzustellen ist. Trotz einer vereinfachten Datenerhebung ist bei diesem Verfahren eine hohe Effizienz in

Bezug auf die Risikoabschätzung möglich (LeGall et al., 1993). SAPS II beinhaltet 17 Werte: 12 physiologische Parameter, Alter, Aufnahmeart (elektive Operation, Notoperation, internistisch) und drei allgemeine Grunderkrankungen (metastasierendes Tumorleiden, AIDS, hämatologisches Malignom). Der Score errechnet die Wahrscheinlichkeit der Krankenhaussterblichkeit. Bei geringstem Risiko ergibt der SAPS II den Wert 0.

2.2.2. Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score

Der *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score* im folgenden Apache II beinhaltet eine Klassifizierung von Patientengruppen auf der Basis von Verletzungs- bzw. Krankheitsgraden. Er besteht aus drei Elementen:

- a) Acute Physiology Score (APS) beschreibt die physiologischen Parameter
- b) altersbezogener Score
- c) Score zur Taxierung chronischer Krankheiten.

Der Schwerpunkt wird durch den physiologischen Score gebildet.

Für die Berechnung des *Acute Physiology Scores* werden jeweils die am weitesten von der Norm abweichenden Werte der einzelnen Organsysteme zugrunde gelegt.

Die Punktwerte korrelieren mit der Mortalität. Bei physiologischen Werten ergibt der Apache II den Wert 0.

2.2.3. Sequential Organ Failure Assessment

Der *Sequential Organ Failure Assessment* im folgenden SOFA Score ergänzt die bereits bestehenden Systeme. Während APACHE und SAPS-Score auf die Abschätzung der Mortalität kritisch kranker Patienten zielt, bewertet der SOFA Score die Morbidität. Mit dem SOFA Score wird eine Beschreibung der Komplikationssequenz bei kritisch kranken Patienten beabsichtigt (Vincent et al., 1996). Der SOFA Score ermöglicht es,

den Schweregrad des Organversagens der einzelnen Organe täglich neu zu bewerten. Der Normwert liegt bei 0.

2.3 Untersuchungsablauf und untersuchte Parameter:

Folgende Parameter wurden untersucht:

- Detektion und Spezifizierung von bakterieller DNA mittels Real- Time PCR (untersuchtes Keimspektrum siehe Tab. 2)
- Schweregrad der Erkrankung durch Dokumentation von SAPS II und SOFA-Score
- PCT, IL-6 und Leukozyten als Infektionsparameter
- Körpertemperatur

2.4 Probenakquisition, Probenverarbeitung

Bei zutreffenden Einschlusskriterien und Indikationsstellung zur konventionellen Blutkultur wurden parallel zu dieser 2 x 10 ml EDTA Blut aus liegenden Gefäßkathetern abgenommen.

Es wurden insgesamt 88 Blutkulturen und Proben von 61 Patienten in die Studie aufgenommen. Die Abnahme der Proben erfolgte wenn möglich im Fieberanstieg. Die gesammelten Proben wurden bis zu ihrer Verarbeitung bei 4°C für maximal 48 Stunden aufbewahrt.

Die weitere Verarbeitung wurde wie folgt durchgeführt:

alle 88 Blutproben wurden bei 2400 G für 4 Minuten zentrifugiert. Hierdurch sedimentierten die im Blut befindlichen Zellen am Boden des Reaktionsgefäßes. Im Vorfeld zu dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Bakterien aufgrund ihrer geringeren Masse im Vergleich zu anderen im Blut befindlichen Zellen bei dieser

Zentrifugationstechnik zum größten Teil im Plasmaüberstand verbleiben. Der Überstand wurde zu je 1000 μ l mittels Kolbenhubpipette und sterilen Pipettenspitzen in sterile Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C aufbewahrt.

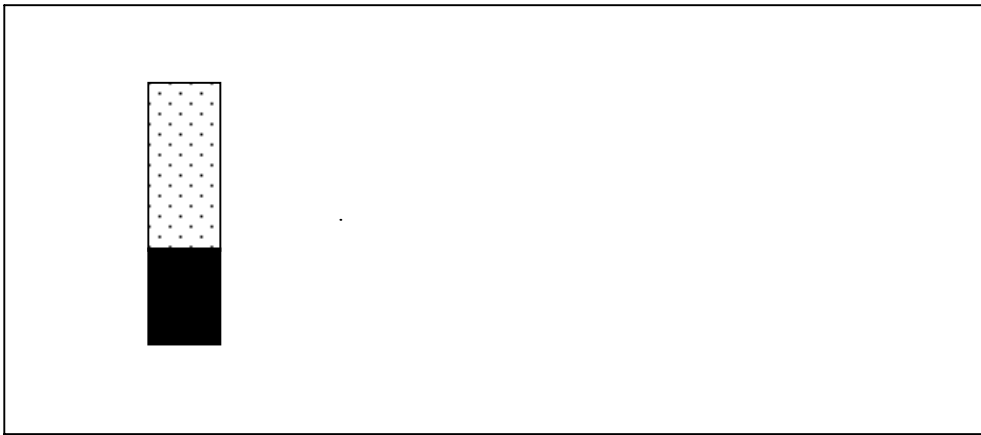


Abb. 1: Schematische Darstellung der durch den ersten Arbeitsgang, Zentrifugation mit 2400 G, entstanden Zell- und Plasmagradien. Im unteren Teil befinden sich die Erythrozyten (dunkel), die Bakterien verbleiben durch ihre niedrigere Masse im Überstand (Punkte)

Ein Teil der Bakterien gelangt bei der oben beschriebenen Zentrifugationstechnik dennoch in das abzentrifugierte Zellsediment. Um auch diese Bakterien für die Präparation zu akquirieren, wurde bei 33 der 88 Proben zusätzlich ein zweites Zentrifugationsprotokoll angewendet:

Schritt 1:

Durchführung eines so genannten „Softspin“, d.h. Zentrifugation des EDTA-Röhrchens bei 180 G für 4 Minuten.

Dadurch entsteht ein Zellgradient innerhalb des Röhrchens (Abb.2).

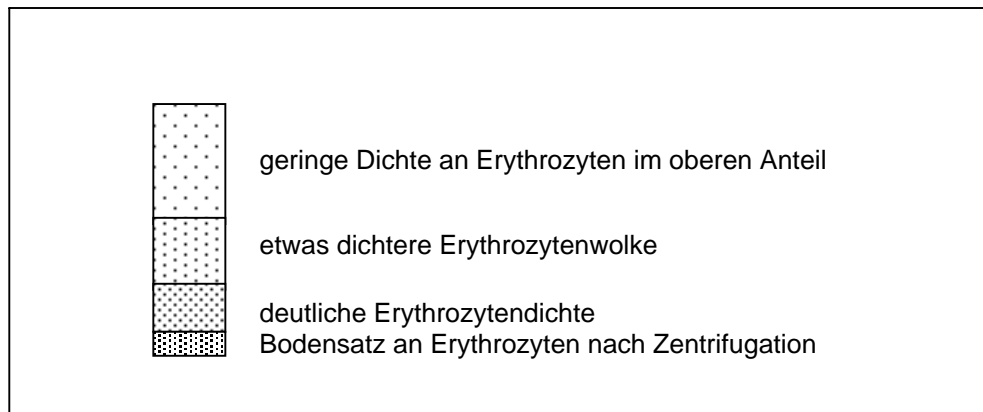


Abb.2: Nach dem alternativen Arbeitgang, der Zentrifugation mit 180 G, werden die Erythrozyten wegen der geringeren Zentrifugationsgeschwindigkeit nicht komplett in den Bodensatz gedrängt, (Punkte). Die Erythrozyten werden in ihrer Menge im Überstand reduziert, das Verhältnis Bakterien/ Erythrozyten verschiebt sich zu Gunsten der Bakterien, um dann im darauf folgenden Schritt durch eine schnellere Zentrifugation die Bakterien effektiver von den Erythrozyten zu trennen (siehe Abb.3)

Schritt 2:

Aus dem obersten Anteil des Gradienten wurde aus den gleichen Gründen wie zuvor, nämlich dass Bakterien aufgrund der geringen Masse im oberen Anteil der zentrifugierten Flüssigkeit verbleiben, 1 ml entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde bei 1170 G für 4 min zentrifugiert (Hartspin). Das entstehende Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes enthält ein Gemisch aus Bakterien und Erythrozyten (Abb.3) und kann im weiteren Verlauf präpariert werden.

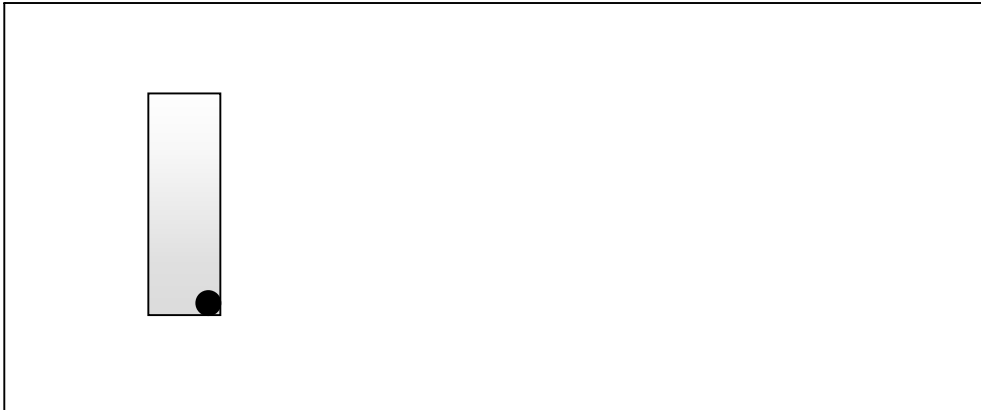


Abb.3: Nach Zentrifugation des, nach der 180 G Zentrifugation Enstandenen, Überstandes mit 1170 G, entsteht ein Erythrozytenpellet (schwarzer Kreis), welches sich durch die größere Masse der Erythrozyten von den leichteren Bakterien (graumeliert) trennt

Da freie DNA im Plasma nicht sedimentiert, wurden 800 Mikroliter Plasmaüberstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Pellet (sedimentierte Bakterien) und Plasmaüberstand (enthält die freie, nicht sedimentierte DNA) wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei - 20 °C eingefroren.

Zu den Zentrifugationsschemata siehe auch Abbildung 4.

Als Substrat für die nachfolgenden Präparation der DNA wurden verwendet:

1. Der Plasmaüberstand aus Zentrifugationsmethode 1. Dieser enthält Bakterien und freie DNA.
2. Das Bakterien/Erythrozytenpellet aus „Hardspin“ in Zentrifugationsmethode 2. Dieses enthält hauptsächlich Bakterien.
3. Der Plasmaüberstand nach „Hardspin“ in Zentrifugationsmethode 2. Dieser enthält freie DNA.

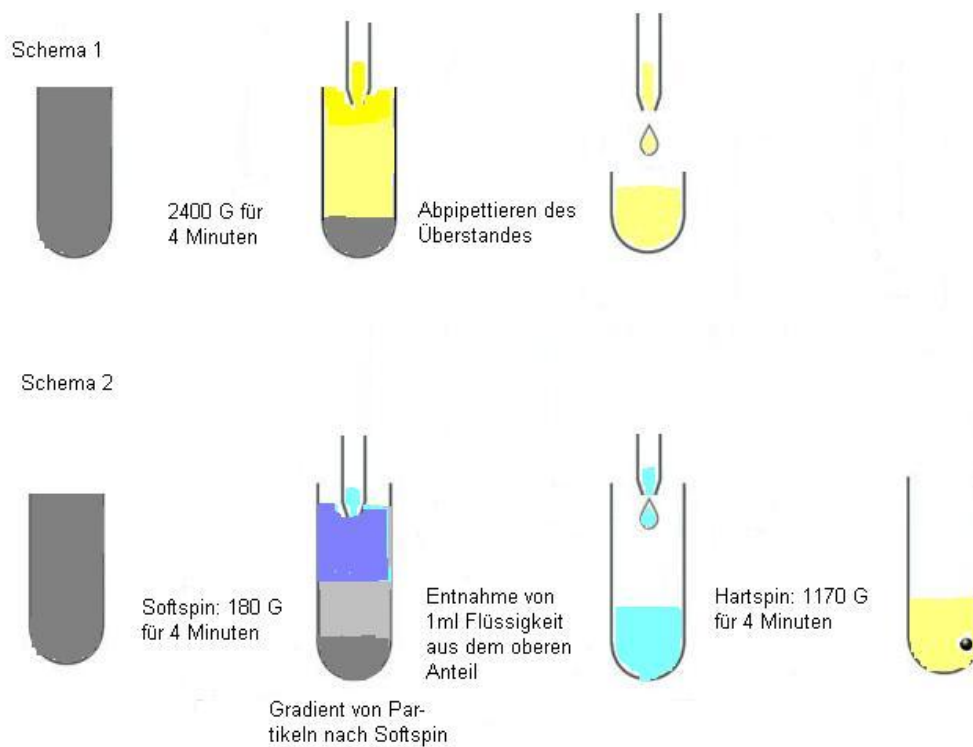


Abb. 4: Schematische Darstellung der beiden alternativen Zentrifugationsschemata mit denen die Proben vor Durchführung der Polymerasekettenreaktion behandelt wurden

Aus diesen verschiedenen aufbereiteten Proben, wurde mit Hilfe des Extraktionsautomaten MagNA Pure LC von Roche Diagnostics, DNA präpariert.

Der Extraktionsautomat MagNA Pure LC von Roche Diagnostics ist ein vollautomatischer Roboter zur Isolierung und Aufreinigung von Nukleinsäuren. Die Gewinnung von DNA, RNA und mRNA ist aus verschiedenen klinischen Materialien wie z.Bsp. Blut, Plasma, oder Serum möglich.

Das Extraktionsprinzip beruht auf der selektiven Adsorption von Nukleinsäuren an magnetische Glaspartikel, siehe Abbildung 5.

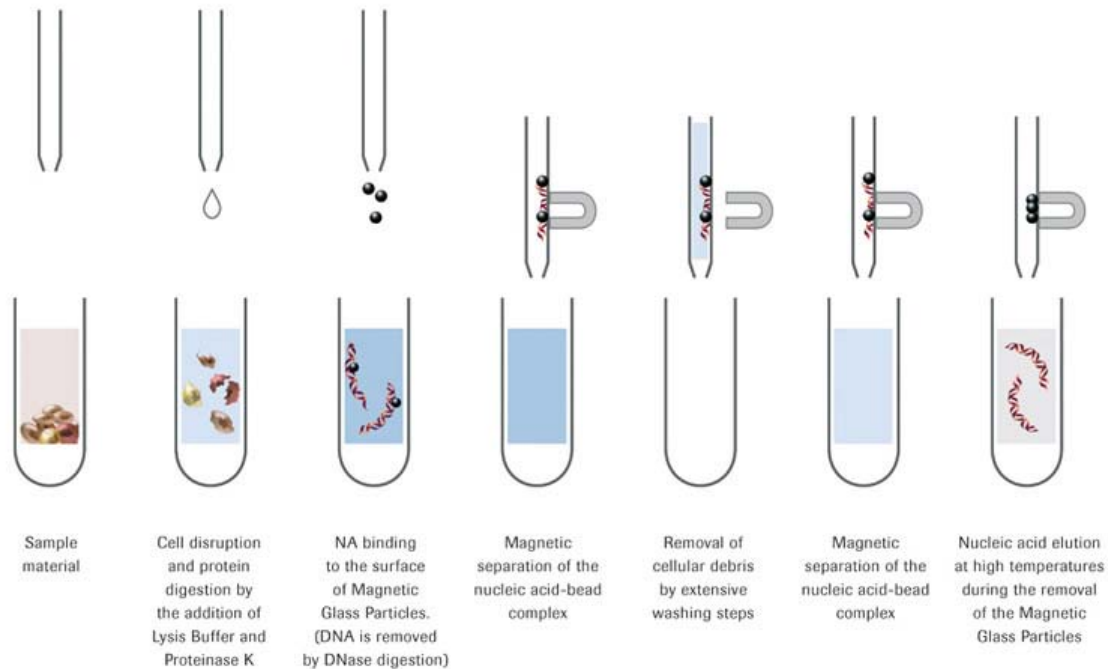


Abb. 5: Extraktionsprinzip von MagNA Pure LC TM
 Aufreinigung durch selektive Desoxyribonukleinsäure-Adhäsion an magnetische
 Glaspartikel
 (Roche.com, 2006)

Sämtliche Lysis- und Aufreinigungsschritte wurden computergesteuert durchgeführt, so dass in kurzer Zeit (< 60 min für 32 Proben in einem Durchgang) und ohne manuelle Schritte wie Zentrifugieren oder Einsatz von Vakuumpumpen qualitativ hochwertige DNA gewonnen werden konnten.

Kontamination der isolierten Nukleinsäuren durch Manipulation oder zwischen den einzelnen Proben stellten ein Problem für die nachfolgende Analyse durch die Polymerasekettenreaktion (PCR) dar. Der gesamte Isolationsprozess, mit der Methode von Roche, lief in einem abgeschlossenen Kompartiment ab, wodurch das Kontaminationsrisiko reduziert wurde.

2.5 Real- Time PCR

Die PCR ist ein Verfahren, um kleine Mengen DNA- Material, wie es in biologischen Problem zu finden ist, so zu vervielfältigen, dass ein sicherer Nachweis und gegebenenfalls auch eine Spezifizierung möglich ist.

Der PCR-Prozess besteht aus einer Serie von 20 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten (Abb.6).

Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 96°C erhitzt um die Stränge zu trennen (Melting). Die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, werden aufgebrochen. Es liegen nur noch Einzelstränge vor.

Nach der Trennung der Stränge wird die Temperatur gesenkt, so dass Primer sich an die einzelnen DNA-Stränge anlagern können (Annealing).

Als Primer werden Oligonukleotide bezeichnet, die von DNA-replizierenden Enzymen wie der DNA-Polymerase als Startpunkt benötigt werden. Sie sind kurz genug um sich spontan an einen komplementären DNA-Strang anzulagern, und damit die Replikation zu ermöglichen.

Dies erfolgt durch das Enzym DNA-Polymerase. Die fehlenden Stränge werden mit Nukleotiden aufgefüllt. Sie beginnt am angelagerten Primer und folgt dann dem DNA-Strang (Elongation).

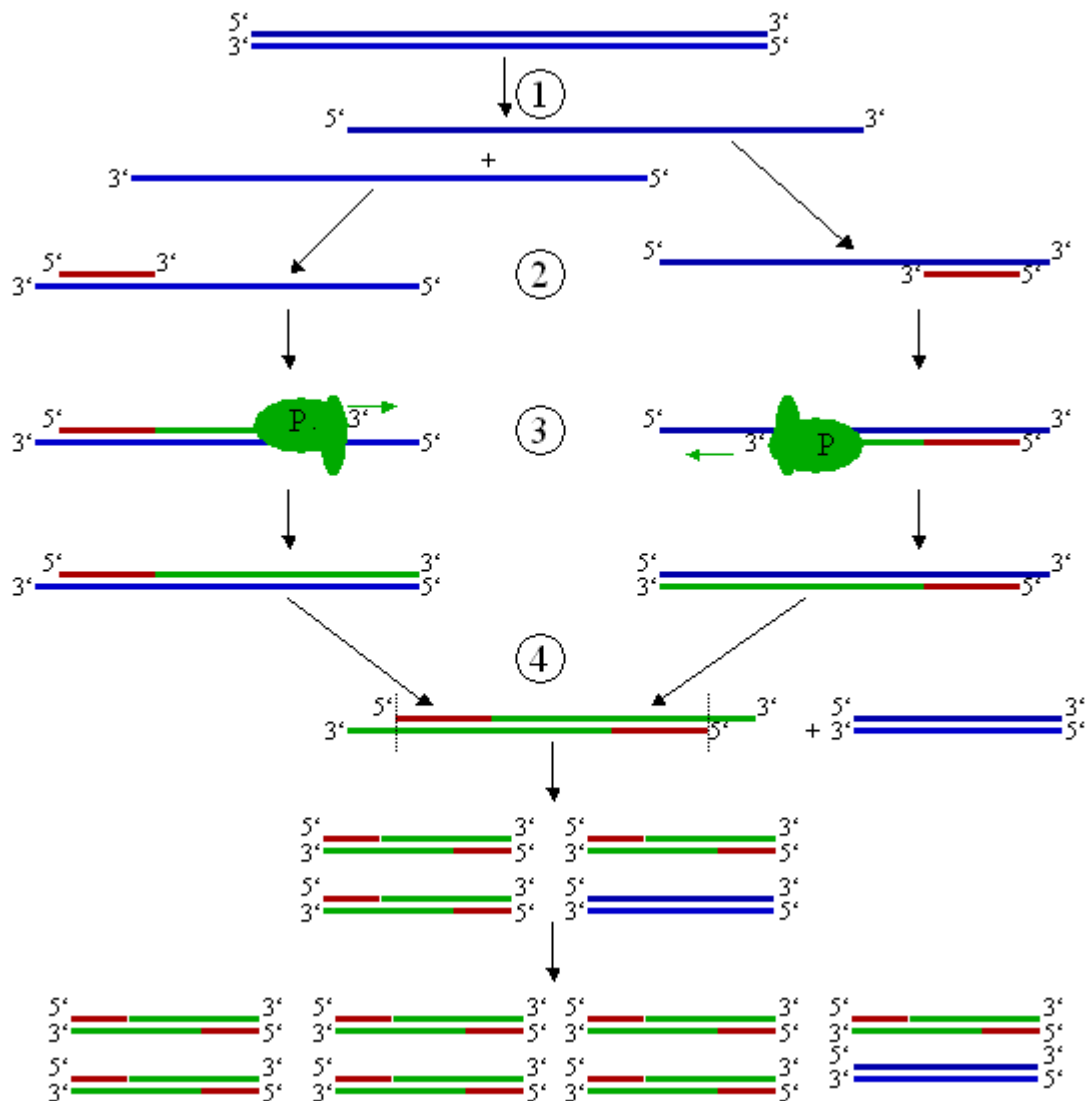


Abb. 6: Schematische Darstellung des Polymerasekettenreaktion-Zyklus

1. Schmelzen/ Trennen der Desoxyribonukleinsäure-Stränge (Melting)
2. Anlagerung der Primer (rot) (Annealing)
3. Verlängerung durch die Polymerase (P) (Elongation)
4. Erstes Produkt

Tabelle 2 zeigt intensivmedizinisch relevanter Keime, deren vervielfältigte DNA können mittels Real- Time PCR und Schmelzkurvenanalyse nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 2: Intensivmedizinisch relevante, mittels Polymerasekettenreaktion nachweisbare Keime getrennt nach grampositiv und gramnegativ

grampositive Keime	gramnegative Keime
Enterokokkus faecalis	Pseudomonas aeruginosa
Enterokokkus faecium	Klebsiella pneumoniae
Streptokokkus pyogenes	Escherichia coli
Staphylokokkus epidermidis	Proteus vulgaris
Staphylokokkus aureus	Haemophilus influenzae
	Enterobacter aerogenes
	Enterobacter cloacae
	Serratia marcescens
	Bacteroides fragilis
	Acinetobacter baumannii
	Legionella pneumophila
	Stenotrophomonas maltophilia

Die PCR wurde mit dem Lightcycler der Firma Roche durchgeführt, FastStart DNA Master SYBR Green I (Reaktionsgemisch beinhaltet: Faststart Taq DNA Polymerase, Deoxynucleosidtriphosphat Gemisch mit dUTP anstelle von dTTP, SYBR Green I dye, und 10 mM MgCl₂ von Roche) .

Das Protokoll der PCR lautete wie folgt:

1 Zyklus Denaturierung bei 95°C für 10 min (FastStart Aktivierung), 45 Zyklen der Vervielfältigung (15s Denaturierung bei 95°C, 8s bei 52°C zur Andockung der Primer, und 10s bei 72°C Vervielfältigung).

Die Entwicklung der Konsensusprimer PLK1 (5' – TAC GGG AGG CAG CAG T – 3') und PLK2 (5' – TAT TAC CGC GGC TGC T – 3') von Biosource Europe (Nivelle, Belgien) ermöglichte das folgende Versuchsprotokoll. Die beiden Primer banden an den hochkonservierten und für Bakterien hochspezifischen 16S DNA Bereich (Massi et al., 2003). Sie synthetisierten ein 187-bp langes Fragment.

Der Primer PLK2 wurde zusätzlich mit Fluorescein markiert, welcher zur Differenzierung der Bakterien später noch gebraucht wurde (s.u.).

Die PCR-Produkte wurden mit Fluorophoren markierten Sonden hybridisiert, den Fluoreszenzsonden ISN2 (5' – CCG CAG AAT AAG CAC CGG CTA ACT CCG T – 3') und ISP2 (5' – CCT AAC CAG AAA GCC ACG GCT AAC TAC GTG – 3'). Die gramnegative Sonde wurde am 3'-Ende mit LC 705 markiert. Beide Fluoreszenzsonden emittieren Licht bei verschiedenen Wellenlängen (640nm und 705nm). Sie ermöglichen eine Detektion bakterieller DNA mit Hilfe der Fluoreszenz-Signale nach Hybridisierung und Anwendung des FRET-Effektes (s.u.), sowie eine Differenzierung grampositiver bzw. gram-negativer Bakterien, in dem sie sich an den dem Primer anschließenden Bereich der DNA binden (Massi et al., 2003). Sie werden zusätzlich zur Analysierung der Schmelzkurven genutzt (s.u.).

Die von produktionsbedingten Rückständen bakterieller DNA hochgereinigten Primer (PLK1 und PLK2) binden an die bakterienspezifische 16S DNA - Region.

Die im ersten Schritt aus der PCR entstandenen Produkte enthalten nun beide Primer und einen der Marker (ISP2 oder ISN2). Diese emittieren, bei räumlicher Nähe zu den auf dem Primer befindlichen Fluoreszenzfarbstoff, einfallendes Licht zu unterschiedlichen Wellenlängen: grampositiv zu 705 nm und gramnegativ zu 640 nm. Dieses kann gemessen werden und die beiden Bakterienarten sind mit dem *Fluorescens Resonance Energy Transfer* (FRET – Prinzip) (s.u.) zu unterscheiden.

Das FRET – Prinzip wird im Folgenden genauer beschrieben:

Das auf dem Primer befindliche Fluorescein wird durch den LightCycler angeregt. Dieses transferiert das bei 470 nm einfallende Licht des LightCyclers und emittiert es bei 530 nm. Die beiden Marker ISP2 und ISN2 werden angeregt und emittieren Licht bei 640 nm (ISN2; gramnegativ) bzw. 705 nm (ISP2; grampositiv). Dieses Licht wird vom LightCycler detektiert. (Abb. 7 (Klaschik et al., 2002))

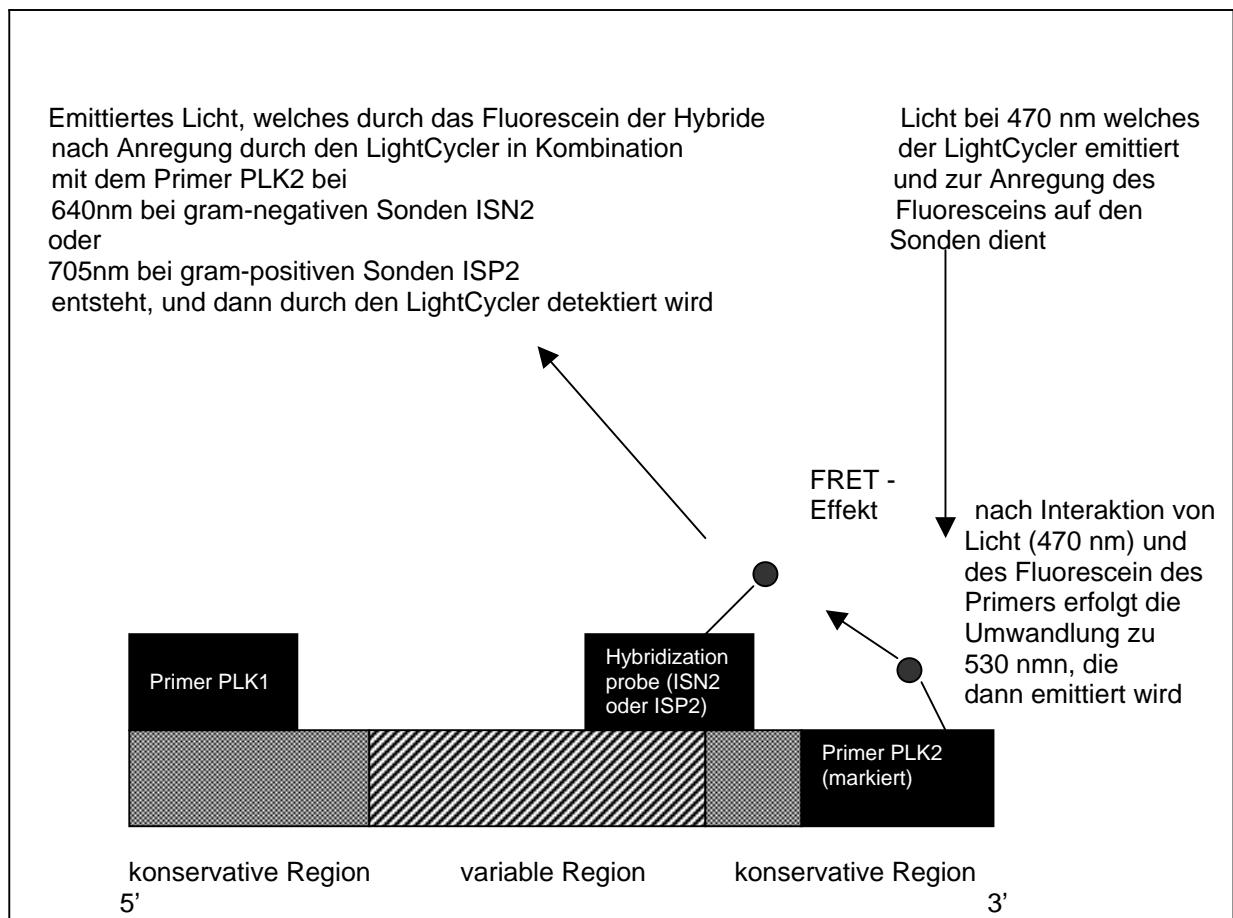


Abb 7: Schematische Darstellung des Fluoreszenz Resonance Energy Transfer Prinzips, welches zur Unterscheidung der Keime dient, die beiden Primer „PLK1“ und „PLK2“, sowie die auf Strängen hybridisierten grampositiven bzw. gramnegativen Marker „ISP2“ bzw. „ISN2“ und ihr Verhalten gegenüber dem einfallenden Licht

Schmelzkurvenanalyse:

Nach Ende der PCR-Amplifikation werden die PCR Produkte von 40°C auf 98°C erhitzt und wieder auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei lösen sich die DNA-Stränge voneinander, bzw. die Hybride vom DNA-Strang. Dieses Ablösen wird vom LightCycler durch ein Abfallen der Fluoreszenzsignale registriert. Es werden zwei Schmelzpunkte registriert:

Der erste wird vom Lösen der Hybride vom DNA Strang verursacht. Da die Hybride am Übergang der Regionen ansetzen, lösen sie sich, aufgrund der eingebauten Mismatches bei unterschiedlichen Temperaturen (Abb.8).

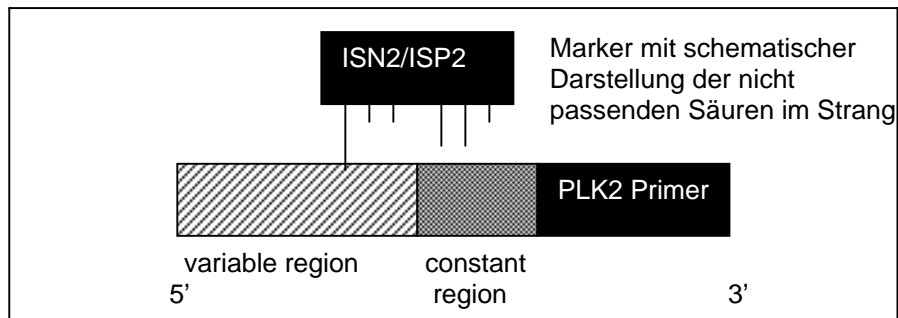


Abb. 8: Ausschnitt des bakteriellen Desoxyribonukleinsäure-Strangs mit Sonde und schematischer Darstellung der mismatches, welche für die unterschiedlichen Zeiten des Aufbrechens des Produktes verantwortlich sind und somit der Unterscheidung der Bakterien dienen

Mit dieser ersten Information ist es möglich, einige untersuchte Bakterien zu unterscheiden (siehe Abb. 9). Je mehr mismatches vorhanden sind, umso früher löst sich die Sonde.

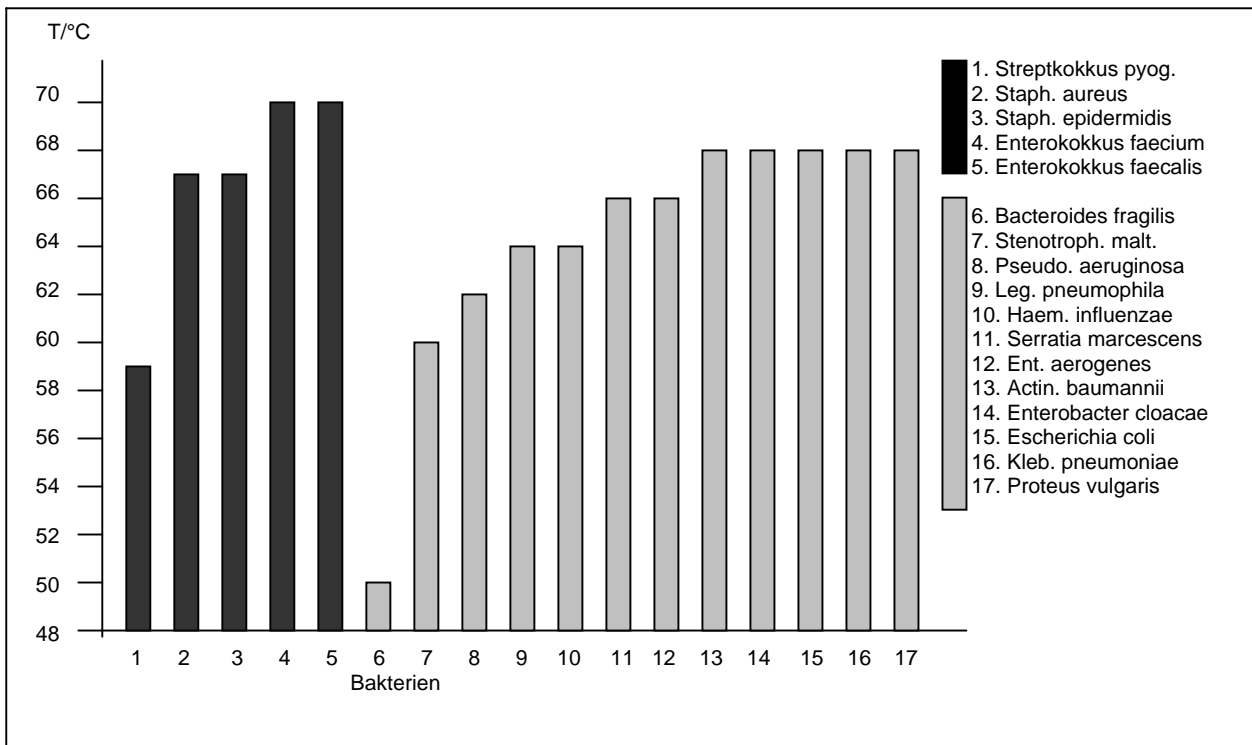


Abb.9: Vereinfachte Abb. aus (Klaschik et al., 2002). Erste Schmelztemperatur der Hybride bei der sich die Marker „ISP2“/ „ISN2“ lösen, aufgetragen gegen untersuchte Bakterien, dunkel grampositive Bakterien, hell gramnegative Bakterien.

Der in das Produkt eingebaute, markierte Primer PLK2 macht die Detektierung des zweiten Schmelzpunktes möglich. (Ähnlich der SYBR Green Schmelzpunkte) (siehe Abb.10).

Dieser wird durch das Lösen der beiden DNA Stränge voneinander verursacht. Die Doppelstränge der verschiedenen Bakterien lösen sich aufgrund der unterschiedlichen Basenpaarung und Bindungsenergie bei unterschiedlich hohen Temperaturen. Der dabei entstehende Fluoreszenzabfall wird vom LightCycler detektiert.

Die Entstehung dieses Signals ist nicht ganz geklärt. Es wird aber davon ausgegangen, dass die in den beiden Strängen enthaltenen Primer (PLK2) miteinander interagieren, und beim Auseinanderbrechen eine Veränderung ihres Verhaltens gegenüber des einfallenden Lichtes zeigen.

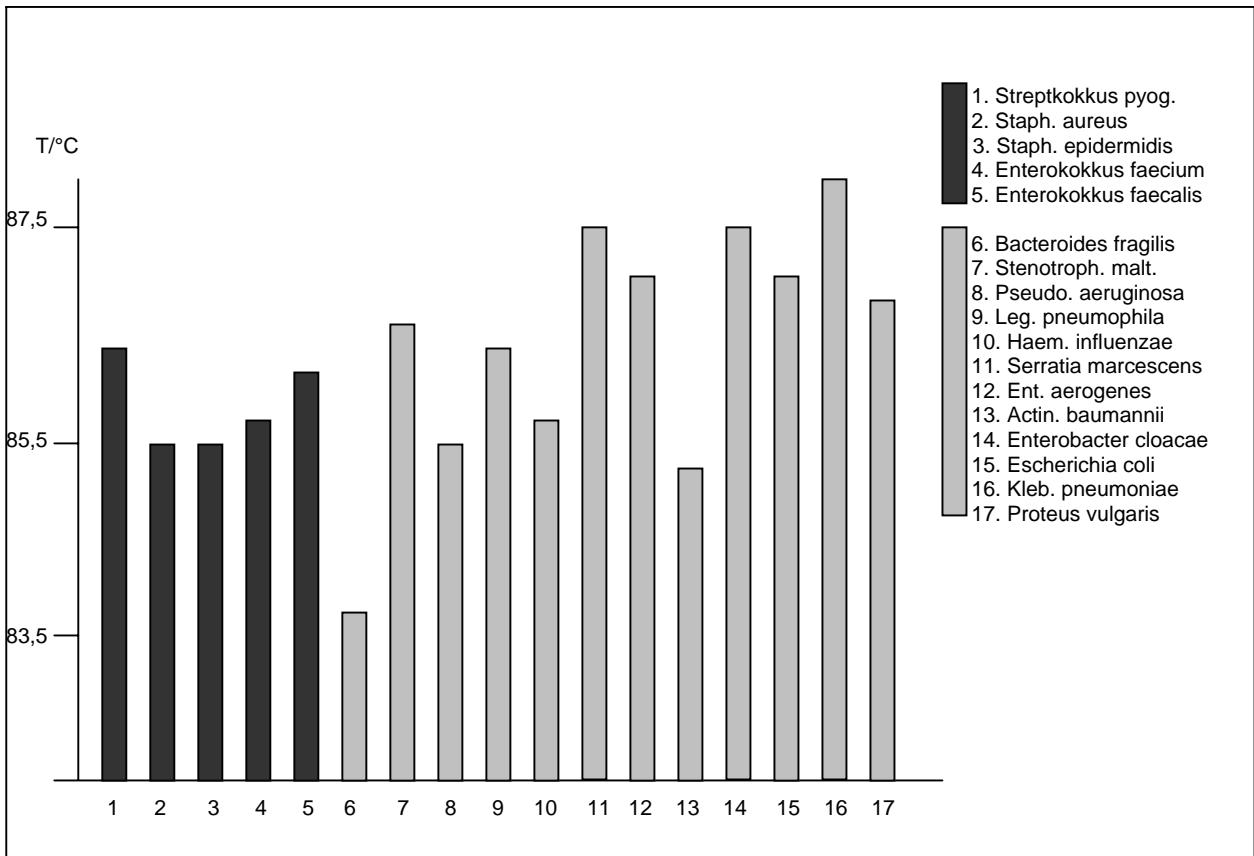


Abb.10: Vereinfachte Darstellung aus (Klaschik et al., 2002) ; Temperatur des zweiten Schmelzpunktes bei der sich der Primer „PLK2“ löst, abhängig von der Bakterienart, dunkel grampositive Bakterien, hell gramnegative Bakterien.

Mit diesen beiden Informationen lassen sich die oben genannten Keime unterscheiden. Eine Ausnahme bilden *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis* (siehe Abb.11). Zur Unterscheidung der beiden *Staphylokokken* müssen die Proben mit spezifischen Primern untersucht werden.

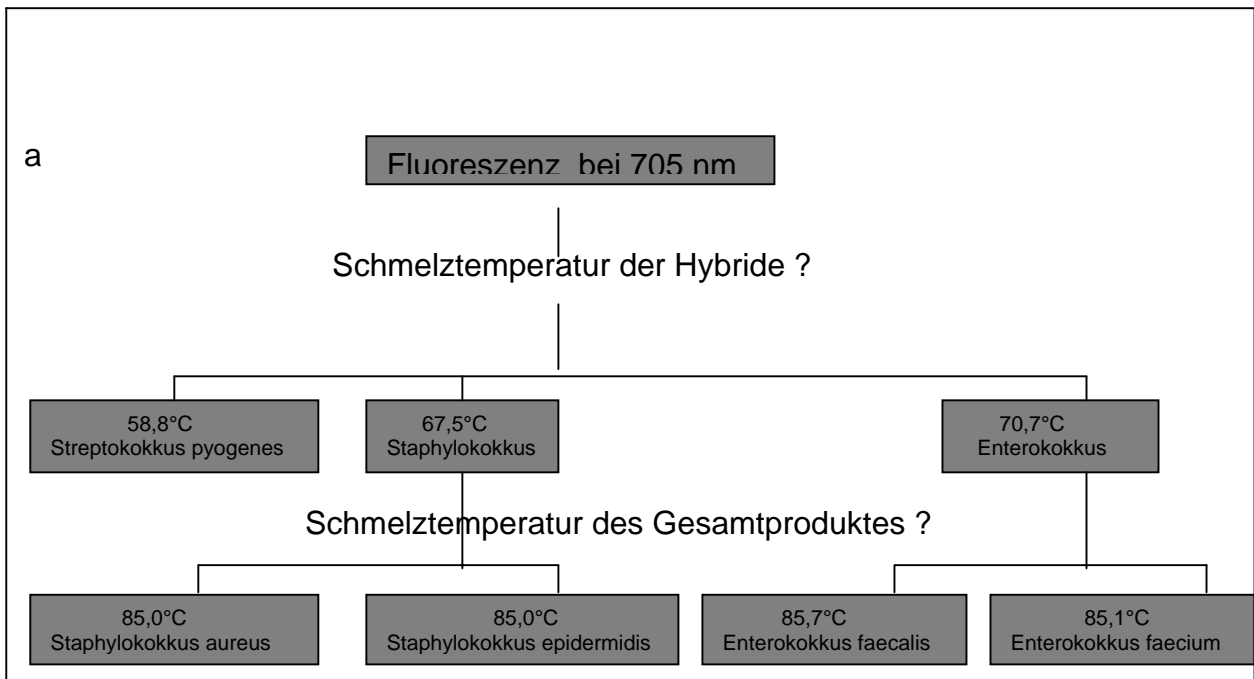


Abb.11: Diagnosediagramm zur Identifizierung grampositive Keime aus (Klaschik et al., 2002).

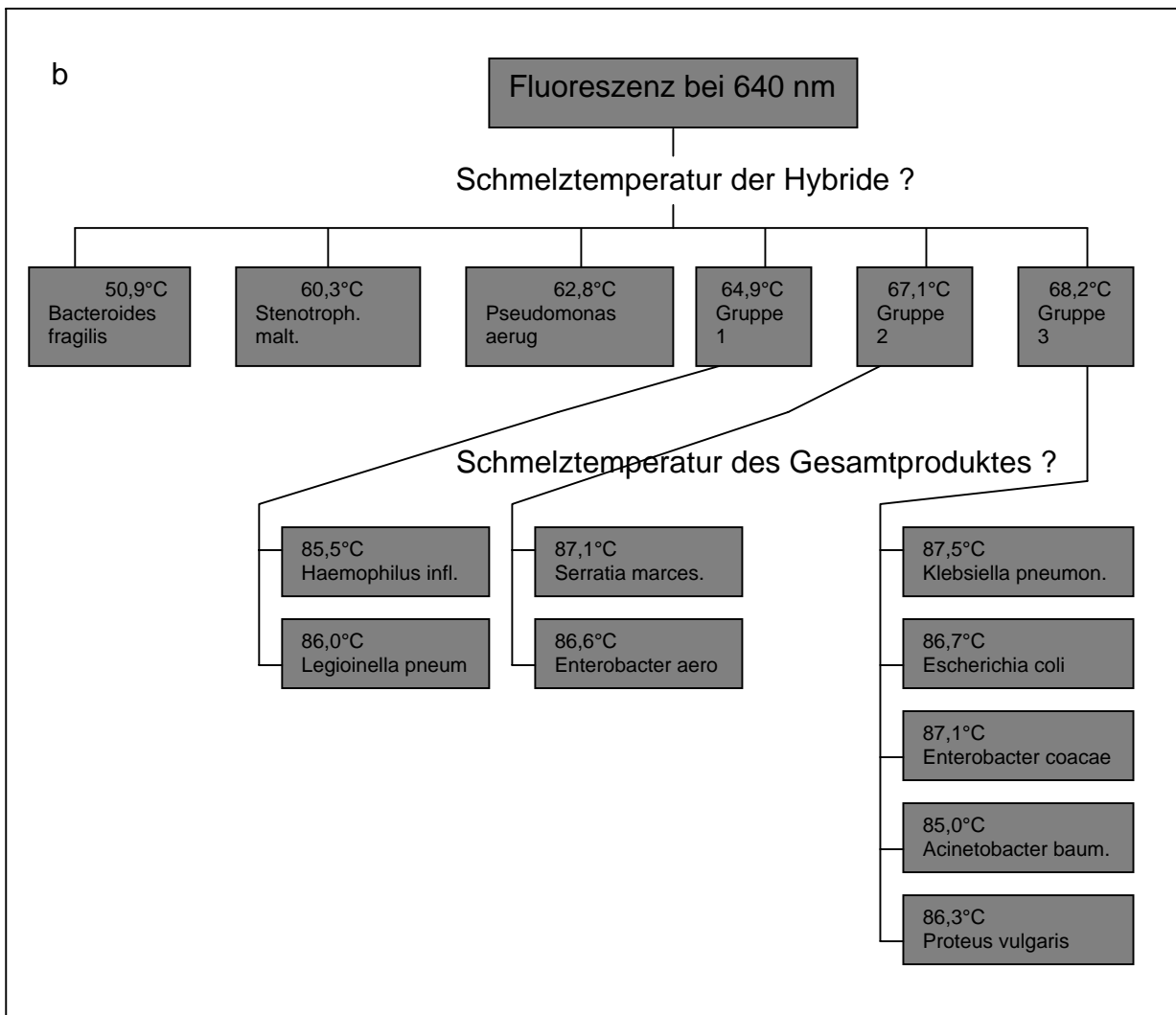


Abb.11: Diagnosediagramm zur Identifizierung von gramnegativen Keimen (Klaschik et al., 2002).

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde SPSS für Windows ® (Microsoft INC., USA) verwendet. Neben der deskriptiven Statistik wurde als parametrischer Test für unverbundene Stichproben der Mann – Whitney – Test verwendet.

3 Ergebnisse

Nach Genehmigung der vorliegenden Untersuchung durch die Ethikkommission der Universität Bonn wurden 74 Patienten im Zeitraum 03/2002 – 10/2002 in die Studie eingeschlossen.

Die Untersuchung wurde auf den Intensivstationen und dem Labor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Spezielle Intensivmedizin Bonn durchgeführt.

3.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv setzte sich zu 44,6 % (abs. 33) aus weiblichen Probanden und zu 55,4 % (abs. 41) aus männlichen Probanden zusammen.

Das durchschnittliche Alter lag bei 51,7 Jahren (w: 49,1 Jahre, m: 53,7 Jahre).

3.2 Diagnosen

Im Zeitraum 3/2002 bis 10/2002 wurden 88 Proben von 74 Patienten ausgewertet. Die Divergenz zwischen Probenanzahl und Patientenzahl ergab sich aus zwei Gründen: bei 8 Patienten wurden mehrer Blutproben zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung entnommen und bei 2 Proben ging bedauerlicher Weise das Ergebnis verloren. Eine schriftliche Einwilligung der Patienten, bzw. ihrer gesetzlichen Vertreter lag bei allen Probanden vor.

Die Diagnosen der Patienten können in drei Hauptkategorien eingeteilt werden:

1. sichere bakterielle Genese, z.Bsp. Nachweis von Eiter intraoperativ
2. wahrscheinlich bakterielle Genese
3. kein makroskopischer oder sonst nachvollziehbarer Hinweis auf ein bakterielles Geschehen.

Die Diagnosen werden in Tabelle 3 benannt.

Tabelle 3: Diagnosen der Patienten der 3 Kategorien nach sicherem, wahrscheinlichem und keinem bakteriellen Geschehen

Kategorie 1 (19 Patienten)	Kategorie 2 (11 Patienten)	Kategorie 3 (44 Patienten)
infizierter Bypass	retroperitoneales Hämatom	Mitral- und Aortenklappenersatz
Urosepsis	Colonperforation	Polytrauma
Pleuraempyem	retrotracheale Blutung	Liposarkom
nekrotisierende Faszitis	gastrointestinale Blutung	Leberruptur
Pneumonie	Z.n. Hüfttotalendoprothese	Phäochromozytom
bakterielle Meningitis	Milzhämatom	Bauchaortenaneurysma
Ostitis	sigmovesicale Fistel	femoraler Bypass
Kniegelenksempyem	V.a. Urosepsis	Urolithiasis
	Ileus	akute respiratorische Insuffizienz
		Hemicolektomie
		Whipple OP
		Pankreatitis
		Hodentumor
		Kardiomyopathie
		hypovolämischer Schock
		Ovarialzystadenom
		Mundbodenkarzinom
		Embolektomie bei Femoralisverschluss

3.3 Entzündungszeichen und Laborwerte

Im Folgenden wurden die, nach den Sepsiszeichen, erhobenen Entzündungszeichen in den beiden nach der PCT Konzentration eingeteilten Gruppen verglichen.

30 Proben von septischen Patienten und 57 Proben von SIRS Patienten wurden analysiert. Patienten mit einem PCT von $\geq 2 \mu\text{g/l}$ wurden als septisch eingestuft (Du et al., 2002; Mokart et al., 2005; Reith et al., 1998).

Der Mittelwert der PCT – Werte ($18,38 \mu\text{g/l}$) war in der Sepsis-Gruppe, da hierüber die Unterscheidung der beiden Gruppen erfolgte, signifikant höher als in der SIRS- Gruppe ($0,59 \mu\text{g/l}$) ($p=0$).

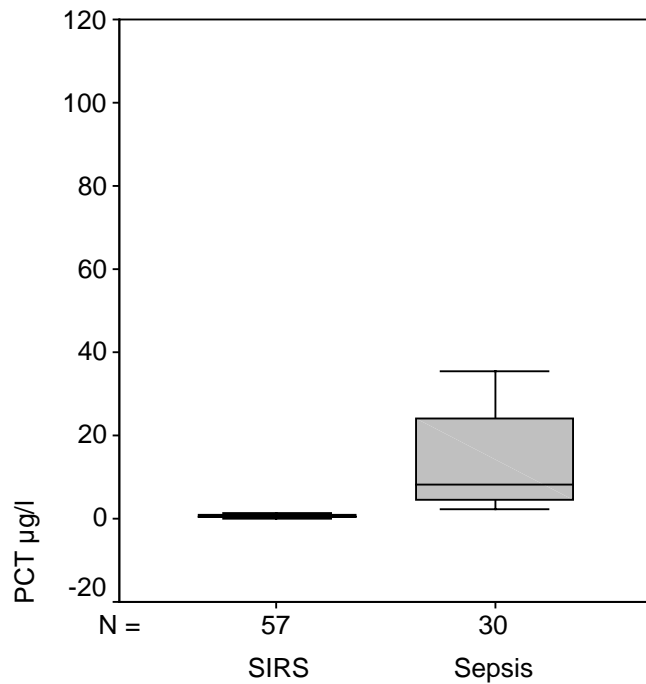


Abb.12: Procalcitonin (PCT) Werte in µg/l der beiden Patientengruppen (SystemicInflammatoryResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis) im Vergleich. Boxplots stellen den Bereich der PCT Werte innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

Der Mittelwert der IL- 6 Werte (Sepsis 941 ng/l vs. SIRS 240,7, $p = 0,079$) und der Leukozytenzahlen (11,44 1000/l vs. 12,83 1000/l, $p = 0,506$) ergaben keinerlei signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

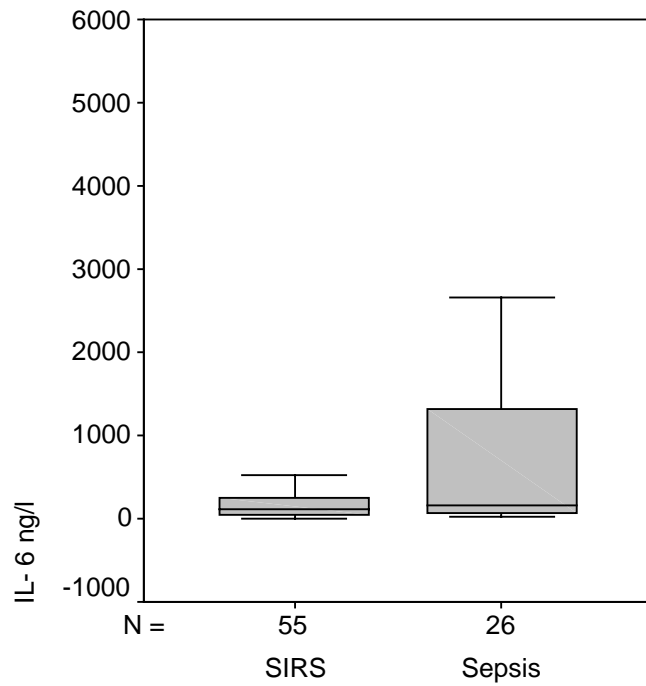


Abb.13: Interleukin- 6 (IL-6) Werte in ng/l der SystemicInflammatoryResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe. Boxplots stellen den Bereich der IL-6 Werte innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

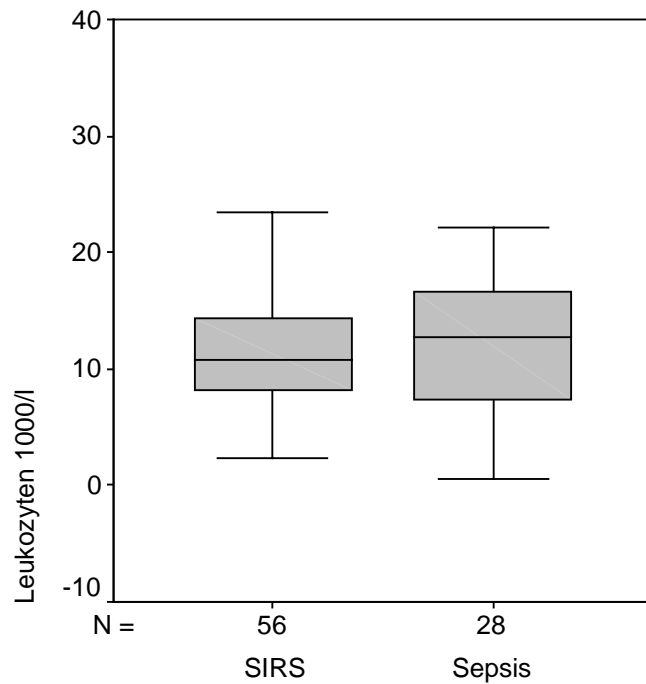


Abb. 14: Leukozytenzahlen in 1000/l der SystemicInflammatoryResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe. Boxplots stellen den Bereich der Leukozytenzahl innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

Alle Patienten wurden im Fieberanstieg eingeschlossen. Die Körpertemperatur lag bei beiden Patientengruppen im Mittel bei 38,5°C ($p=0,257$).

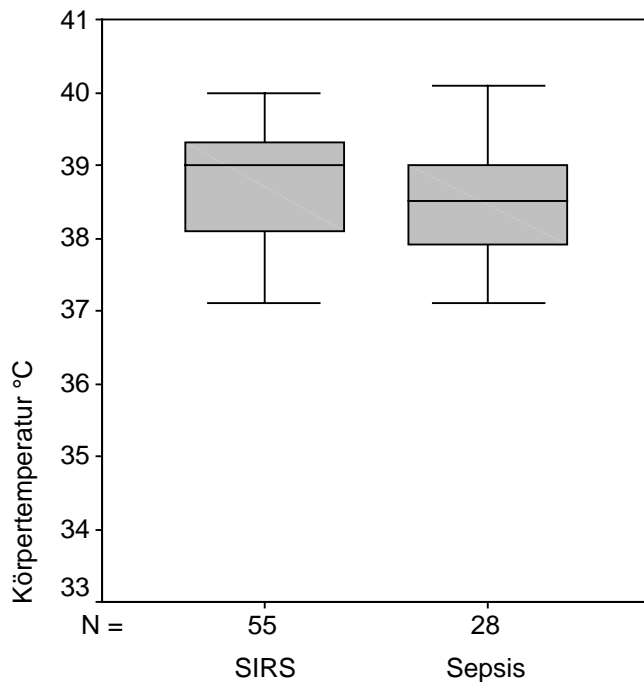


Abb.15: Körpertemperatur in °C der SystemicInflammatoryResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe. Boxplots stellen den Bereich der Körpertemperatur innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

3.4 Auswertung Scores

Alle Scores weisen bestimmten klinischen oder laborchemischen Werten Punktzahlen zu, die später die Berechnung des Risikos der Mortalität und Morbidität der einzelnen Patienten zulassen und damit eine adäquate Reaktion des Intensivmediziners ermöglichen. Die erhobenen Werte werden bei SAPS II und Apache II dazu genutzt, die Sterblichkeit in Prozent zu schätzen. SOFA hingegen beschreibt die Funktionalität der lebenswichtigen Organe.

Mit den Scores SAPS II, Apache II und SOFA lassen sich die in die Studie aufgenommenen Patienten folgender Weise einschätzen (s. auch Tab. 3):

3.4.1 New Simplified Acute Physiology Score im folgenden SAPS II

SAPS II ermittelt, wie auch Apache II, die voraussichtliche Sterblichkeit von Patienten unter der zu Hilfenahme von verschiedenen Laborparametern, Diagnosen und Angaben von z. Bsp. Alter des Patienten (s. Material und Methoden).

SAPS II zeigte im Mittel in den beiden Gruppen einen signifikanten Unterschied (Sepsis 58,5 vs. SIRS 48,63, $p= 0,014$). Diese Werte ergeben eine *predicted death rate* von 66,1 % für die Sepsis-Gruppe und 43,8%.

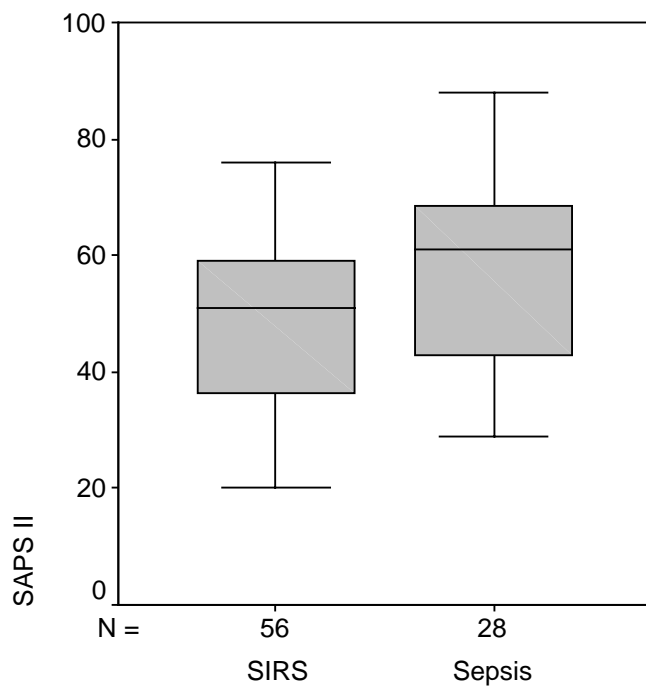


Abb. 16: Werte des new simplified acute physiology score (SAPS II) der SystemicInflammatoryResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe im Vergleich. Boxplots stellen den Bereich des SAPS II innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

3.4.2 Acute Physiology And Chronic Health Evaluation im folgenden Apache II

Auch hier waren die beiden Gruppen signifikant unterschiedlich ($p=0,002$).

Die SIRS Gruppe zeigte durchschnittlich Werte von 17,2 (pdr 26 %). Septische Patienten lagen bei 23,5 (pdr 46%).

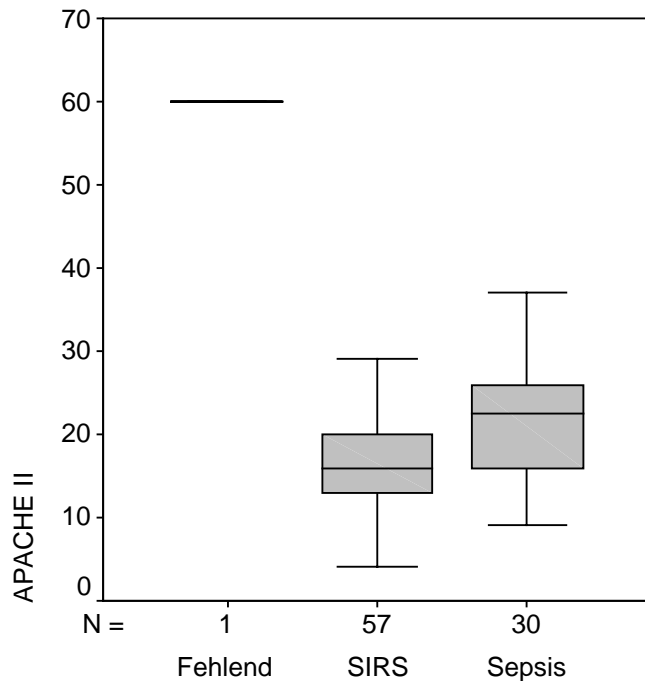


Abb. 17: Werte des acute physiology and chronical health evaluation (Apache II) der SystemicInflammatoyResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe im Vergleich (bei einem Patient konnte ein Laborwert, der zur Berechnung notwendig war nicht mehr nachvollzogen werden). Boxplots stellen den Bereich des Apache II innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

3.4.3 Sequential Organ Failure Assessment im folgenden SOFA

Der SOFA Score ergab folgende Werte: Die Sterblichkeit in Beziehung zum Wert des SOFA Scores liegt bei einem Score > 6 signifikant höher als bei gesunden Vergleichspatienten (Janssens et al., 2001; Vincent et al., 1996). Eine prozentuale Angabe wird in diesem System nicht gemacht. Auch hier zeigen sich die beiden

Gruppen signifikant unterschiedlich ($p=0$). Bei SIRS Patienten lag dieser Score durchschnittlich bei 5,9, septische Patienten wurden mit im Mittel 9,8 bewertet.

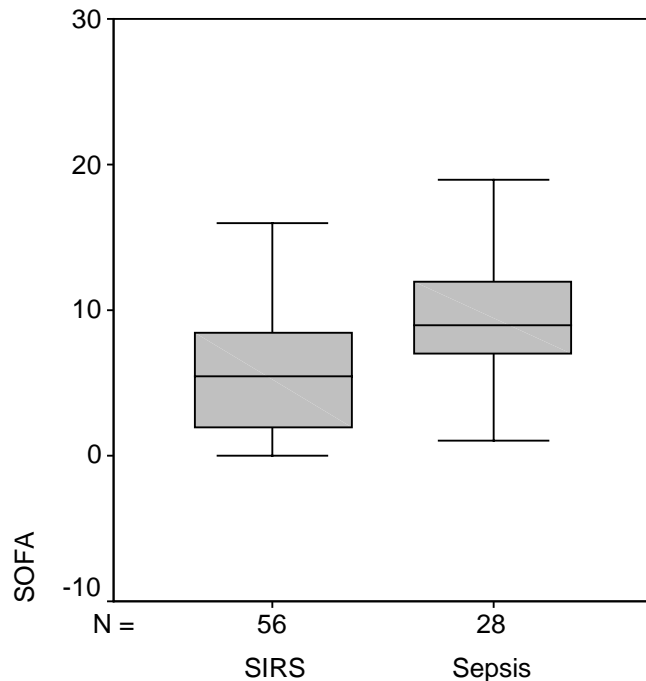


Abb. 18: Werte des sequential organ failure assessment (SOFA) der SystemicInflammatoyResponseSyndrome (SIRS) und Sepsis Gruppe im Vergleich Boxplots stellen den Bereich des SOFA innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes dar. Der errechnete Mittelwert ist mit einem Strich eingefügt.

3.5 Ergebnisse der Blutkulturen und PCRs

Von den 88 entnommenen Blutkulturen fielen 10 positiv aus (8,8 %).

6 Proben stammten aus dem als septisch (6/30 Proben) eingestuften Patientenkollektiv, 4 aus der SIRS Gruppe (4/57 Proben).

Bei den positiven Blutkulturen wurden 5 verschiedenen Erreger nachgewiesen, diese sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Die Bearbeitung der Proben durch die PCR Methode ergab 6 positive Proben (5,28%).

Tabelle 4: Übersicht der positive Ergebnisse der Blutkultur und Polymerasekettenreaktion (PCR) gegeneinander gesetzt unabhängig von der Zugehörigkeit in Sepsis oder SystemicInflammatoryResponseSyndrome Gruppe

Keim	grampositiv		gramnegativ	
	Blutkultur	PCR	Blutkultur	PCR
Corynebakterien	+			
Enterokokkus faecalis	+	+		
Koagulase neg. Staphylokokken	+	+		
Acinetobacter baumannii			+	
Klebsiella pneumoniae			+	+
Pseudomonas aeruginosa				+

3.6 Korrelation von Blutkultur und PCR

Die in der Kultur erlangten Keimnachweise konnten in 5 von 11 Fällen bestätigt werden (45,5%). In 5 Fällen waren die jeweiligen Blutkulturen positiv, die PCR Sonden ergaben allerdings keinen Keimnachweis (45,5%). In einem Fall ergab die PCR Untersuchung ein positives Ergebnis, die Kultur blieb negativ (0,09%).

Bei der Spezifizierung der Bakterien durch das FRET System wurden zu 100 % die gleichen Keime nachgewiesen, die auch in den Kulturen erkannt wurden (siehe Tab. 5).

Tabelle 5: Vergleich Keimnachweise Blutkultur und Polymerasekettenreaktion der in wenigstens einem Verfahren positiven Proben, links die Ergebnisse der Blutkultur, rechts die Ergebnisse der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Keimnachweis Blutkulturen	Keimnachweis PCR
Corynebakterien	neg.
Enterokokkus faecalis	Enterococcus faecalis
Koagulase neg. Staph.	Staphylococcus epidermidis
neg.	Enterococcus faecalis
Enterokokkus faecalis	neg.
Sproßpilze, koagu.neg.Staph.	Staphylococcus epidermidis
Enterokokken	neg.
Koagulase neg. Staph.	Staphylococcus epidermidis
Koagulase neg. Staph.	neg.
Acinetobacter baumannii	neg.
Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae

Sieht man sich die nach Einschätzung des Procalcitonins septischen Patientenproben an, stellt man fest, dass von 30 Proben, die nach Betrachtung der Diagnosen und der ermittelten Laborparameter als septisch eingestuft wurden, ausschließlich 6 einen positiven Keimnachweis erbrachten (18%), hierbei wurden 4 Proben von beiden Verfahren als positiv erkannt (80%).

Die Blutkulturen weisen vorrausgesetzt, dass ein PCT von $> 2 \mu\text{g/l}$ mit dem Vorhandensein von Keimen in der Blutbahn einhergeht (Du et al., 2002; Mokart et al., 2005; Reith et al., 1998), eine Sensitivität von 0,2. Das heißt, dass 20% der positiven Kulturen auch als positiv erkannt wurden.

Bei den PCR Sonden wurden 13 % der vermeintlich positiven Proben als positiv erkannt (Sensitivität von 0,13).

Alle restlichen Keimnachweise stammten aus Patientenproben, bei denen aus klinischer Sicht nicht primär mit einem Keimnachweis zu rechnen war. Von 11 positiven Blutkulturen lagen 7 in der klinisch und laborchemisch als septisch eingestuft Gruppe, die restlichen 4 in der zuvor als wahrscheinlich aseptischen geltenden Patientengruppe.

4 Diskussion

4.1 Vergleich der Ergebnisse von Blutkultur und PCR Sonde

Die frühzeitige und adäquate Behandlung einer Sepsis verbessert das Überleben von Intensivpatienten (Iregui et al., 2002; Kumar et al., 2006; Rothman et al., 2002). Kumar et al. beschrieben eine Verringerung der Überlebensrate bei septischen Patienten um 8 % je Stunde, die eine adäquate Antibiose nach Beginn der Symptome verabreicht wurde (Kumar et al., 2006). Um die Zeitspanne zwischen klinischen Verdacht einer Sepsis und der Therapie mit einem wirksamen Antibiotikum zu verkürzen, wurde in dieser Arbeit der Keimnachweis mittels PCR im Patientenblut mit der Blutkultur verglichen.

Von den 88 entnommenen Blutkulturen fielen 10 positiv aus (8,8 %). Diese Rate an positiven Blutkulturen liegt, nach Literaturangaben im Durchschnitt. Die Angaben variieren um die 10 % (Marchandin et al., 1995; Muller-Serieys et al., 2002; Murray et al., 1998; Nolte et al., 1993), vereinzelte Studien geben Werte von 16-30 % an (Levin et al., 2000).

Ein Grund, warum die Zahlen der positiven Blutkulturen so gering ausfallen, liegt darin, dass die Blutabnahme für die Kultur bereits unter der Gabe von Antibiotika erfolgt. Dieses Problem ist bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (Glerant et al., 1999; McKenzie et al., 1987). In weiteren, bisher unveröffentlichten Studien konnte die PCR Methode auch aus dem Grund, dass sie nicht mehr überlebensfähige Keime nachweist, überzeugen. In diesem Fall wurden weiterentwickelte Kits verwendet (Lehmann et al., 2008).

In unserem Fall war die Blutkultur insgesamt zuverlässiger.

Die PCR Sonden erkannten, bzw. übersehen zu in etwa gleichen Teilen die Keime, die in den Blutkulturen erkannt bzw. übersehen wurden.

Allerdings ist, wenn ein Keim gefunden wird, die Spezifizierung zu 100 % richtig.

Eine konkrete Behandlung mit dem passenden Antibiotikum ausgewählt nach positiven PCR Befund wäre also möglich.

Die unterschiedliche Präparation der Proben, wie im Material und Methodenteil beschrieben, ergaben bei den Ergebnissen keinerlei Unterschied. Die positiven Ergebnisse stammten alle aus den Plasmaanteilen der Präparation. Zwischen den verschiedenen Präparationen (Blutpellet oder ein Gradient) ergab sich kein Unterschied.

Ein Vorteil für die PCR ist der deutlich geringere Zeitaufwand. Blutkulturen liefern vorläufige Ergebnisse nach 24 Stunden, höchstens eine Gram-Differenzierung ist bereits nach 8 – 12 Stunden erhältlich. Eine weitere Differenzierung erfolgt erst nach 48 Stunden, ggf. dauert die Resistenzmustererstellung noch länger. Während dieser Zeit werden kritisch kranke Patienten mit Verdacht auf Sepsis empirisch mit einem oder mehreren Breitbandantibiotika behandelt. Dies birgt die Gefahr der inadäquaten Therapie und führt in einem solchen Falle zu einer erhöhten Mortalität (Torres et al., 1990). Ein schnellerer Nachweis der die Krankheit verursachenden Bakterien würde eine schnellere und treffendere antibiotische Therapie ermöglichen, welche das Überleben positiv beeinflusst. Es konnte gezeigt werden, dass die frühzeitige Gabe eines geeigneten Antibiotikums eine der wichtigsten Maßnahmen zur Verbesserung der Überlebenschancen bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis ist (Bindl et al., 2005; Larché et al., 2003; Weigand et al., 2003). Eine retrospektive Studie von Marwick et al. zeigt ein verbessertes Outcome in Patientengruppen, die bereits nach 4 Stunden eine geeignete Antibiose erhielten (Marwick et al., 2007), andere Studien verkürzen die Zeitspanne um ein geeignetes Antibiotikum zu verabreichen sogar auf bis zu 1 Stunde (Dellinger et al., 2004; Raghavan et al., 2006).

4.2 Gewinnung der Proben aus liegenden arteriellen Kathetern und Kontamination

Bakterielles Wachstum in Gefäßkathetern, die länger als einige Stunden liegen, ist eine wichtige Quelle bakterieller Infektionen (Fätkenheuer et al., 2002; Mermel et al., 2001; Pagani et al., 2007; Pagani et al., 2008).

Die Probengewinnung aus Kathetern, die länger als wenige Stunden liegen, und die daraus resultierende Kontamination der entnommenen Proben ist ein Problem, mit dem sich auch diese Studie beschäftigen muss. Levin, Hersch, Rudensky und Yinnon zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen Blutkulturen aus einmaliger Venenpunktion und Blutkulturen aus Proben, die aus arteriellen Kathetern genommen wurden. Der Unterschied bezieht sich allerdings nur auf grampositives Wachstum in Kulturflaschen. In dieser Studie waren 16% der Kulturen aus Venenpunktionen und 32% der Blutkulturen aus liegenden Gefäßkathetern positiv. Es wird allerdings ebenfalls erwähnt, dass bei vielen septischen oder unter einer SIRS leidenden Patienten auf einer Intensivstation einer Venenpunktion technisch sehr schwierig, wenn nicht sogar unmöglich ist. Die Punktion einer zentralen Vene ist im Nutzen- Risiko Vergleich nicht vertretbar.

Bei unserem Patientenkollektiv war es in den meisten Fällen nicht möglich, eine periphere Vene zu punktieren. Bei Wechsel der liegenden Katheter wurde in 85 % der Fälle routinemäßig die Spitze mikrobiologisch untersucht. Ein positives Ergebnis war nur in einem Fall zu finden. Es muss allerdings gesagt werden, dass es sich in diesem Fall ebenfalls um einen grampositiven Keim handelte.

Das Problem der Kontamination der Blutkulturen besteht auch bei Proben, die aus Punktion gewonnen werden. Eine Studie von Shahar, Wohl-Gottesmann und Sherkman ergab, dass die meisten Blutkulturen nicht, wie von vielen postuliert (Bartlett et al., 1974; Tilton et al., 1982; Washington et al., 1975), bei der Blutgewinnung kontaminiert werden, sondern erst im weiteren Verlauf falsch positiv werden (Shahar et al., 1990). Nach dieser Studie machte es keinerlei Unterschied, ob die Kulturen durch Punktion oder durch Katheter gewonnen wurden.

Da in unsere Studie leider keine Möglichkeit bestand, die Proben durch Venenpunktion zu erlangen, mussten wir uns auf die Proben aus arteriellen Kathetern verlassen.

Laut Studien von Frezza et al., sowie Hanna et al. und Schuerer et al. ist ein arterieller Katheter deutlich seltener bakteriell kontaminiert als ein zentralvenöser Katheter (0,4 % - 0,7 % zu 4,8 % - 8,3 %), weshalb falsch positive Ergebnisse als eher unwahrscheinlich angesehen werden konnten (Frezza et al., 1998; Hanna et al., 2003; Schuerer et al., 2007).

Desweiteren würde es bei unserer Fragestellung auch nicht zur Verfälschung der Ergebnisse führen, da wir zwei Nachweismethoden verglichen haben, die bei Kontamination entweder beide positiv oder negativ gewesen wären.

4.3 PCR in der Diagnostik bakterieller Infektionen

Der Nutzen der frühzeitigen Identifizierung des Krankheitserregers wurde bereits dargestellt.

Aufgrund der geringen positiven Proben und dem Übereinstimmen der Ergebnisse von Blutkultur und PCR kann zumindest ein systematischer Fehler während der Verarbeitung der Proben ausgeschlossen werden. Hierfür wurde darauf geachtet, dass hochreine Reagenzien verwendet wurden. Ebenfalls wurde auf hygienische Arbeitsbedingungen geachtet. Zwei „Blindproben“ wurden auf gleiche Weise wie die restlichen Proben untersucht. Diese stammten von gesunden Probanden, die sich freiwillig zur Verfügung stellten. Beide Proben blieben negativ.

Es muss festgehalten werden, dass nur 5 % der Proben von klinisch septischen Patienten einen positiven Bakterien Nachweis erbrachten.

Das wahrscheinlichste Problem der PCR ist die geringe Probenmenge, die verwendet wurde. Mögliche Lösungsansätze wären die Verwendung eines Kitts, der mit einem größeren Volumen arbeitet und damit positivere Ergebnisse liefern könnte.

Bei der im Material und Methodenteil beschriebenen Präparation der Proben, wird das vom Patienten stammende Blut, das der Methode zugeführt wird, auf bis zu 100 µl

reduziert. Es ist gut möglich, dass in einer so geringen Menge kein Bakterium nachgewiesen werden kann. Unterschiede in der Vorbereitung der Proben hatten keinerlei Auswirkung auf das Probenergebnis. Ob die PCR mit dem abzentrifugierten Plasma, Blutpellet oder Blutgradienten durchgeführt wurde, ergab keinerlei unterschiedliche Ergebnisse.

Die etwas besseren Ergebnisse der Blutkulturen können auch hierdurch erklärt werden. Eine Blutkulturflasche wird mit 8 bis 10 ml Blut beimpft. Das ist eine um den Faktor 3 größere Menge und somit könnten auch 10^3 weniger Bakterien in der Blutprobe vorhanden sein, ohne dass die Nachweismöglichkeit geringer wird.

4.4 Eingruppierung und Auswahl der Patienten

Zuzüglich zu den oben genannten Probleme wäre es möglich, dass die Patienten, die als potentiell septisch und nicht in einem SIRS befindlich, eingestuft wurden, trotz Erfüllen der Sepsis Kriterien und einem Krankheitsbild, dass einer Infektion entsprach, gar nicht an einer Bakteriämie litten.

Dazu muss nochmals die Einteilung der Patienten in die mit einer erwarteten Sepsis und die, die an einem SIRS litten betrachtet werden. Die Unterscheidung erfolgte nach den Serum PCT Werten. PCT als prädiktiver Faktor für eine schwere Sepsis konnte in verschiedenen Studien als signifikant erhöht und damit als guter prädiktiver Faktor in Patienten mit Sepsis gezeigt werden (Balci et al., 2003; Brunkhorst et al., 2000; Castelli et al., 2004; Dahaba et al., 2006; Enquix et al., 2001; Harbarth et al., 2001; Müller et al., 2000; Pettilä et al., 2002; Suprin et al., 2000). Allerdings erbrachte die Studie von Dahaba et al. auch, dass das PCT dem SOFA Score nicht überlegen ist. Der SOFA Score ermöglicht laut der genannten Studie bereits eine gute Einschätzung der Patienten am 3. Tag, wohingegen das PCT erst am 5 Tag des ICU Aufenthaltes an Bedeutung gewinnt. Nach aktuellen Literaturangaben bleibt Procalcitonin jedoch ein valider Faktor zur Erkennung einer Bakteriämie.

Die Einschlusskriterien der Patienten sind den akzeptierten Sepsiskriterien angepasst und scheiden somit als Fehlerquelle aus (Böhrer et al., 1993; Conference et al., 1992).

4.5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es die Möglichkeiten der Keimidentifikation durch Polymerasekettenreaktion mit der bewährten Blutkultur zu vergleichen. Die PCR, die es möglich macht innerhalb kürzester Zeit sowohl das Vorhandensein von Keimen, als auch eine Identifizierung der wichtigsten intensivmedizinisch relevanten Keimen zu gewährleisten, könnte die Effektivität der Sepsistherapie verbessern.

Die Möglichkeit, den bakterienspezifischen 16S DNA-Bereich zu nutzen um in Blutproben mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion Bakterien-DNA zu vervielfältigen und mit Hilfe der Schmelzkurvenanalyse zu identifizieren, eröffnete eine neue Chance in der Sepsistherapie.

In unserer Patientengruppe von 74 Patienten und 88 Proben konnte gezeigt werden, dass der Keimnachweis mittels PCR der Blutkultur an Qualität zumindest nicht unterlegen ist. Leider konnten aber nicht mehr Keime in der septischen Gruppe nachgewiesen werden. Beide Methoden waren deckungsgleich mit Ausnahme von zwei Proben. Einmal zeigte die Blutkultur ein positives Ergebnis und die PCR blieb negativ und einmal war es andersherum und die PCR erbrachte einen positiven Keimnachweis, während die Blutkultur negativ blieb. Es kann also gesagt werden, dass die Methode der Polymerasekettenreaktion schneller Ergebnisse bringt, aber eben noch nicht mehr Keime erkennt. Es wurden bereits Kits für die PCR entwickelt, die mit einem größeren Blutvolumen arbeiten und dadurch hoffentlich die Effektivität steigern können. Somit werden weitere Studien folgen, die mit einer ähnlichen Fragestellung erneut verglichen werden.

Wie bereits erwähnt, ist es wichtig, die Zeitspanne zwischen Erkrankung und Identifizierung des Keimes so kurz wie möglich zu halten, um früh adäquat antibiotisch therapieren zu können (Dellinger et al., 2004; Ibrahim et al., 2000).

Die Stärke der PCR, besonders schnell zu sein, muss hier gegen den Nachteil abgewogen werden, dass auch nach erfolgreicher Identifizierung des Keimes keine Anfertigung eines Antibiogramms erfolgen kann. Untypische Resistenzen des einzelnen

Keimes würden zunächst unerkant bleiben. Allerdings bietet die PCR grundsätzlich die Möglichkeit der Implementation der Bestimmung von Resistenzgenen.

Die gewählte Antibiose bleibt also kalkuliert, wenn auch mit einer deutlich eingegrenzten Auswahl, da der Keim bekannt ist. Eine noch nicht veröffentlichte Studie von Lehmann et. al. konnte zeigen, dass mit Hilfe der PCR die Zeitspanne von nicht effektiven Antibiotikagaben deutlich verringert werden konnte. Im Mittel um 2,06 Tage (Lehmann et al., 2008).

Betrachtet man die geringe Zeitspanne von wenigen Stunden, die zur Verfügung steht um eine adäquate antibiotische Therapie einzuleiten, ist es von Vorteil so schnell wie möglich zu wissen, welcher Keim eine systemische Entzündung verursacht. Nicht zielführend ist es aber auf eine Resistenzbestimmung gänzlich zu verzichten. Eine konventionelle Blutkultur sollte deshalb auf jeden Fall erfolgen.

Die verkürzte Zeitspanne ist wichtig, insgesamt liegt sie aber immer noch bei Tagen. Optimalerweise könnte sie auf Stunden reduziert werden.

Ob die Auswahl der empirischen Antibiose mit bekanntem Keim gegenüber der ohne PCR Ergebnis besser ist, hängt sicherlich nicht zuletzt von der Erfahrung des anwesenden Personals auf der Intensivstation ab. Die Kenntnis der lokalen Resistenzen muss zusätzlich vorhanden sein.

Weitere Untersuchungen zum schnelleren Keimnachweis und optimaler Weise auch zur schnellen Resistenzbestimmung müssen in Anbetracht der Häufigkeit der Erkrankung und auch der entstehenden Kosten, die diese verursachen, erfolgen. Insbesondere werden klinische „outcome“ Studien notwendig, welche einen möglichen Vorteil der PCR Diagnostik prüft.

5 Literaturverzeichnis

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29: 1303-1310

Aronson MD, Bor DH. Blood cultures. *Ann Intern Med* 1987; 106: 246-253

Balci C, Sungurtekin H, Gürses E, Sunqurtekin U, Kaptanoglu B. Usefulness of procalcitonin for diagnosis of sepsis in the intensive care unit. *Crit Care* 2003; 7: 85-90

Bartlett Blood cultures. In: Sheris, JC (ed.) *Cumitech I: Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*. Blood cultures. In: Sheris, JC (ed.) *Cumitech I: Cumulative Techniques and Procedures in Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, Washington D.C., 1974 1974:

Bates DW, Goldman L, Lee TH. Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results. *JAMA* 1991; 265: 365-369

Bindl L, Nicolai T. Management of septic chock and acquired respiratory distress syndrome in pediatric cancer patients. *Klin PEDIATR* 2005; 217: 130-142

Böhrer H, Schmidt H, Bach A. Intensivmedizinische Aspekte der Sepsis und des septischen Multorganversagens. *Zentralbl Chir* 1993; 118: 482-491

Bone R. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 1992; 268: 3452-3455

Brunkhorst FM, Wegscheider K. PCT for early diagnosis and differentiation of SIRS. *Intensiv Care Med* 2000; 26: 148-152

Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care Med* 2004; 8: R234-242

Conference A.C.o.C.P.S.o.C.C.M.C. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874
RD Corporation.

Dahaba AA, Hagara B, Fall A, Rehak PH, List WF, Metzler H. Procalcitonin for early prediction of survival outcome in postoperative critically ill patients with severe sepsis. *Br J Anaesth* 2006; 97: 1577-1583

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med* 2004; 32: 858-873

Du B, Li Y, Chen D, Pan J. Serum procalcitonin and interleukin-6 help differentiate between severe sepsis and systemic inflammatory response syndrome of non-infectious origin. *J Chin Med* 2002; 82: 1111-1114

Enquix A, Rey C, Concha A, Medina A, Coto D, Diéques MA. Comparison of procalcitonin with C-reactive protein and serum amyloid for the early diagnosis of bacterial sepsis in critically ill neonates and children. *Intensiv Care Med* 2001; 27: 211-215

Everts RJ, Vinson EN, Abholla PO, Reller LB. Contamination of catheter-drawn blood cultures. *J Clin Microbiol* 2001; 39: 3393-3394

Fätkenheuer G, Cornely O, Seifert H. Clinical management of catheter-related infections. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8: 545-550

Frezza EE, Mezghebe H. Indications and complications of arterial catheter use in surgical or medical intensive care units: analysis of 4932 patients. *Am Surg* 1998; 64: 127-131

Glerant JC, Hellmuth D, Schmit JL, Ducroix JP, Jounieaux V. Utility of blood cultures in community-acquired pneumonia requiring hospitalization: influence of antibiotic treatment before admission. *Respir Med* 1999; 93: 208-212

Gramm HJ, Hannemann L, Reinhart K, Lode H. Ein Begriff im Wandel. *Dtsch. med. Wschr* 1995; 120: 498-502

Hanna HA, Raad II, Hackett B, Wallace SK, Price KJ, Coyle DE, Parmley CL. Antibiotic-impregnated catheters associated with significant decrease in nosocomial and multidrug-resistant bacteremias in critically ill patients. *Chest* 2003; 124: 1030-1038

Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux C, Pittet D, Ricou B, Grau GE, Vadas L, Pugin J, Geneva Sepsis Network. Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 396-402

Herfarth Ch, Schumpelick V, Siewert JR. Sepsis- -Sepsis Syndrom -- Systemic inflammatory- Response- Syndrome. *Chirurg* 1995; 66: 1

Ibrahim EH, Sherman G, Warde S, Fraser VJ, Kollef MH. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infection on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 2000; 118: 146-155

Iregui M, Ward S, Sherman G, et. al. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002; 122: 262-268

Janssens U, Dahl J, Graf J, Lepper W, Ortlepp J, Merx M, Zarse M, Reffelmann T, Hanrath P. Value of SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) score and total maximum SOFA score in 812 patients with acute cardiovascular disorders. *Crit Care Med* 2001; 5: 225

Klaschik S, Lehmann L, Raadts A, Book M, Hoeft A, Stuber F. Real-Time PCR for Detection and Differentiation of Gram- Positive and Gram- Negative Bacteria. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4304-4307

Kreger BE, Craven DE, McCabe WR. Gram negative bacteremia IV. Re- evaluation of clinical features and treatment in 612 patients. *Am J Med* 1980; 68: 344-355

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. *Crit Care Med* 2006; 34: 1589-1596

Larché J, Azoulay E, Fieux F, Mesnard L, Moreau D, Thiery G, Darmon M, LeGall JR, Schlemmer B. Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock. *Intensiv Care Med* 2003; 29: 1688-1695

LeGall JR, Lemeshow S, Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPSII) based on a European/North American multicenter study. *JAMA* 1993; 270: 2957-2963

Lehmann LE, Alvarez J, Hunfeld K, Goglio A, Kost GJ, Louie RF, Raglio A, Regueiro BJ, Wissing H, Stüber F. Potential clinical utility of PCR in microbiological testing for sepsis. unveröffentlicht 2008:

Levin PD, Hersch M, Rudensky B, Yinnon AM. The use of the arterial line as a source for blood cultures. *Intensiv Care Med* 2000; 26: 1350-1354

MacGregor RR, Beaty HN. Evaluation of positive blood cultures. Guidelines for early differentiation of contaminated from valid positive cultures. *Arch Intern Med* 1972; 130: 84-87

Marchandin H, Compan B, Simeon de Bouchberg, et al. Detection kinetics for positive blood cultures bottles by using the VITAL automated system. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2098-2101

Marshall J, Sweeney D. Microbial Infection and the Septic Response in Critical Surgical Illness. *Arch Surg* 1990; 125: 17-23

Marwick C, Watts E, E J, Davey P. Quality of care in sepsis management: development and testing of measures for improvement. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60: 694-697

Massi MN, Shirakawa T, Gotoh A, Bishnu A, Hatta M, Kawabata M. Rapid diagnosis of typhoid fever by PCR assay using one pair primers from flagellin gene of *Salmonella typhi*. *J Infect Chemother* 2003; 9: 223-227

McBryde ES, Tilse M, McCormack J. Comparison of contamination rates of catheter-drawn and peripheral blood cultures. *J Hosp Infect* 2005; 60: 18-121

McKenzie R, Reimer LG. Effect of antimicrobials on blood cultures in endocarditis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1987; 8: 165-172

Mermel LA, Farr BM, Sherertz R, Raad II, O'Grady N, Harris JS, Craven DE. Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *J Intraven Nurs* 2001; 24: 180-205

Mokart D, Merlin M, Sannini A, Brun JP, Delpero JR, Houmaegel G, Moutardien U, Blanche JL. Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Surg* 2005; 94: 767-773

Müller B, Becker KL, Schächinger H, Rickenbacher PR, Huber PR, Zimmerli W, Ritz R. Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med* 2000; 28: 1226-1228

Muller-Serieys C, Bergogne-Bérézin E. Update on blood culture. *Presse Med* 2002; 31: 27-32

Murray PR, Hollick GE, Jerris RC, et al. Multicenter comparison of BACTEC 9050 and BACTEC 9240 blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1601-1603

Niederman MS, Fein AM. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia: a common clinical sequence. *Clin Chest Med* 1990; 11: 663-665

Nolte FS, Williams JM, Jerris RC, et al. Multicenter clinical evaluation of a continuous monitoring blood culture system using fluorescent-sensor technology (BACTEC 9240). *J Clin Microbiol* 1993; 31: 552-557

Pagani JL, Revelly JP, Chiolerio R, Eggimann P. Management of catheter-related infection: recommendations for clinical practice. *Rev Med Suisse* 2007; 3: 2836-2839

Pagani JL, Eggimann P. Management of catheter-related infection. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2008; 6: 31-37

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis cardiovascular dysfunction and therapy. *Ann Intern Med* 1990; 113: 227-242

Parrillo JE. Pathogenetic mechanism of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471

Pettilä V, Hynninen M, Takkunen O, Kuusela P, Valtonen M. Predictive value of procalcitonin and interleukin 6 in critically ill patients with suspected sepsis. *Intensiv Care Med* 2002; 28: 1220-1225

Pranatharthi PH, C M, William J, Brown MD. Clinical Issues of blood cultures. *Arch Intern Med* 1994; 154: 841-849

Raghavan M, Marik PE. Management of sepsis during the early "golden hours". *J Emerg Med* 2006; 31: 185-199

Reith HB, Mittelkötter U, Debus ES, Kusser C, Thiede A. Procalcitonin in early detection of postoperative complications. *Dig Surg* 1998; 15: 260-265

Roche.com https://www.roche-applied-science.com/sis/automated/magna_lc/system.jsp
Hoffmann F, Roche Ltd. 2006:

Rothman RE, Majmudar MD, Kelen GD, Madico G, Gaydos CA, Walker T, Quinn TC. Detection of Bacteremia in Emergency Department Patients at Risk for Infective Endocarditis Using Universal 16S rRNA Primers in a Decontaminated Polymerase Chain Reaction Assay. *J Infect Dis* 2002; 186: 167-1681

Sands KE, Bates DW, Lanken PN. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA* 1997; 278: 234-240

Schein M, Wittmann DH, Wise L, Condon RE. Abdominal contamination, infection and sepsis: a continuum. *Br J Surg* 1997; 84: 269-272

Schuerer DJ, Zack JE, Thomas J, Borecki IB, Sona CS, Schallom ME, Venker M, Nemeth JL, Ward MR, Verfan L, Warren DK, Fraser VJ, Mazuski JE, Boyle WA, Buchman TG, Coopersmith CM. Effect of chlorhexidine/silver sulfadiazine-impregnated central venous catheters in an intensive care unit with a low blood stream infection rate after implementation of an educational program: a before- after trial. *Surg Infect* 2007; 8: 445-454

Shahar E, Wohl-Gottesman BS, Shenkman L. Contamination of blood cultures during venepuncture: fact or myth? *Postgrad Med J* 1990; 66: 1053-1058

Suprin E, Camus C, Gacouin A, Le Tulzo Y, Lavoue S, Feuillu A, Thomas R. Procalcitonin: a valuable indicator of infection in a medical ICU ? *Intensiv Care Med* 2000; 26: 1232-1238

Tilton RC. The laboratory approach to the detection of bacteremia. *Annu Rev Microbiol* 1982; 36: 467-493

Torres A, Aznar R, Gatell JM. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142: 523-528

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, DeMendonca A, Bruining H, Reinhart CK, Suter PM, Thijs LG. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/ failure. On behalf of the Working Group on Sepsis- Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensiv Care Med* 1996; 22: 707-710

Washington JA. Blood cultures: principles and techniques. *Mayo Clin Proc* 1975; 50: 91-98

Weigand MA, Bardenheuer HJ, Bottiger BW. Clinical management of patients with sepsis. *Anaesthesist* 2003; 52: 3-22

Weinstein MP, Murphy JR, Reller LB, Lichtenstein KA. The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. *Rev Infect Dis* 1983; 5: 35-53