

**Detektion bakterieller und mykotischer DNA in Patientenblut mittels einer automatisierten DNA-Präparation**

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

vorgelegt von:  
Dominik Bös  
aus Wien

Bonn 2007

Angefertigt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Rheinischen-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Stüber
2. Gutachter: Prof. Dr. Th. Dr.Minor

Tag der Mündlichen Prüfung: 02.04.2007

Aus der Klinik und Poliklinik Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
Direktor der Klinik: Prof. Dr. med. A. Hoeft

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
<http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss-online> elektronisch publiziert

Ich widme diese Arbeit meinem Bruder Leonhard

\*26.05.1974 † 21.05.2006

Dein Lachen wird in unseren Herzen immer weiterleben



<b>Inhaltsverzeichnis</b>		Seite
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	8
1.1	Bakterielle und Mykotische Infektionen	8
1.1.1	Erregerspektrum: Bakterien	8
1.1.1.1	Morphologie der Bakterien	8
1.1.1.2	Einteilung in grampositive und gramnegative Bakterien	8
1.1.2	Erregerspektrum: Pilze	9
1.2	Krankheitsbilder	10
1.2.1	Bakterielle Infektionen	10
1.2.2	Einteilung der Pilzerkrankungen	13
1.3	Risikopatienten	14
1.4	Fragestellung der Arbeit	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	16
2.1	Patientenkollektiv und Einschlusskriterien	16
2.1.1	Patientenkollektiv	16
2.1.2	Einschlusskriterien	16
2.1.3	Ausschlusskriterien	17
2.2	Dokumentation und untersuchte Parameter	18
2.2.1	Dokumentation	18
2.2.2	Score-Systeme	19
2.2.2.1	Glasgow Coma Scale (GCS)	19
2.2.2.2	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE 2)	20
2.2.2.3	New Simplified Acute Physiology Score (SAPS 2)	23
2.2.2.4	Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA)	25
2.3	Probenakquisition und Verarbeitung	26
2.3.1	Probenakquisition	26
2.3.1.1	Indikationen zur Anlage einer Blutkultur	26
2.3.1.2	Anlage der Blutkultur	27
2.3.2	Probenaufbereitung	27

2.3.2.1	Probenaufbereitung in der Mikrobiologie	27
2.3.2.2	Probenaufbereitung für Echtzeit-Polymerasekettenreaktion	28
2.3.3	DNA Präparation mit dem MagNA Pure LC <sup>TM</sup>	28
2.3.3.1	Isolierungsprinzip	29
2.3.3.2	Durchführung	29
2.3.4	DNA Amplifikation	31
2.3.4.1	Polymerasekettenreaktion	31
2.3.4.1.1	Prinzip	31
2.3.4.2	Quantitative Echtzeit-PCR	33
2.3.4.3	Echtzeit- PCR mit dem Light Cyclers <sup>TM</sup>	34
2.3.4.4	Light Cyclers <sup>TM</sup> Sonden	36
2.3.4.5	Schmelzkurvenanalyse	38
2.4	Materialien	40
2.4.1	Geräte	40
2.4.2	Verbrauchsmaterialien	40
2.4.3	Kits	40
2.5	Statistische Methoden	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>42</b>
3.1	Beschreibung des Gesamtpatientenkollektiv	42
3.1.1	Alter und Geschlecht des Gesamtpatientenkollektivs	45
3.1.2	Physiologische Parameter des Gesamtpatientenkollektivs	45
3.1.3	Berechnete Scores des Gesamtpatientenkollektivs	46
3.1.4	Antibiotische und antimykotische Therapie des Gesamtpatientenkollektivs	47
3.1.4.1	Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	47
3.1.4.2	Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme	47
3.1.4.3	Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	47
3.2	Aufteilung in Subkollektive und deren Vergleich	48
3.2.1	Alter und Geschlecht der Subkollektive	50
3.2.1.1	Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs	50
3.2.1.2	Vergleich des Mikrobiologie <sup>+</sup> und des PCR <sup>+</sup> Subkollektivs	51
3.2.2	Physiologische Parameter der Subkollektive	51

3.2.2.1	Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs	52
3.2.2.2	Vergleich des Mikrobiologie <sup>+</sup> und des PCR <sup>+</sup> Subkollektivs	53
3.2.3	Berechnete Scores der Subkollektive	55
3.2.3.1	Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs	55
3.2.3.2	Vergleich des Mikrobiologie <sup>+</sup> und des PCR <sup>+</sup> Subkollektivs	56
3.2.4	Antibiotische und antimykotische Therapie der Subkollektive	57
3.2.4.1	Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs	57
3.2.4.1.1	Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	57
3.2.4.1.2	Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme	58
3.2.4.1.3	Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	54
3.2.4.2	Vergleich des Mikrobiologie <sup>+</sup> und des PCR <sup>+</sup> Subkollektivs	60
3.2.4.2.1	Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	61
3.2.4.2.2	Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme	62
3.2.4.2.3	Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme	62
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1	Nosokomiale Infektionen	64
4.2	Sepsis	66
4.3	Neue Therapiekonzepte	66
4.4	Vorteile und Grenzen der Bestimmung bakterieller/mykotischer DNA	69
4.5	Vorteile und Grenzen der automatisierten DNA-Präparation	71
4.6	Ausblick	71
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7</b>	<b>Danksagung</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>8</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Bakterielle und mykotische Infektionen

### 1.1.1 Erregerspektrum: Bakterien

#### 1.1.1.1 Morphologie der Bakterien

Bakterien sind prokaryontische Mikroorganismen. Das bedeutet sie besitzen keinen für Eukaryonten typischen Zellkern, keine Mitochondrien oder endoplasmatisches Retikulum. Die DNA liegt in Form eines so genannten Kernäquivalent, dem Nukleoid vor. Dabei handelt es sich um ein zirkuläres, verknäultes DNA-Molekül ohne Kernmembran. Bakterien haben eine Größe von 0,3 – 5 µm und kommen in drei Grundformen vor: Kokken, gerade Stäbchen und einfach oder spiralig gekrümmte Stäbchen. Bakterien vermehren sich ungeschlechtlich durch Zellteilung, sie betreiben je nach Art Photo- oder Chemosynthese. Hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber O<sub>2</sub> unterscheidet man obligat aerobe und anaerobe, fakultativ anaerobe und aerotolerante anaerobe Bakterien. Die Zellwand besteht aus Polysaccharidketten, dem Glykan, die mit Peptiden quervernetzt sind. Dieses Peptidoglykan oder Murein hüllt die gesamte Zelloberfläche ein. Dieses Mureinnetz ist bei gramnegativen Bakterien nur ungefähr 2nm dick, bei grampositiven Bakterien besteht es aus bis zu vierzig Schichten mit einer Dicke von 15 – 40 nm.

#### 1.1.1.2 Einteilung in grampositive und gramnegative Bakterien

Die Vielzahl der bekannten Bakterien wird in zwei große Gruppen eingeteilt, zum einen die grampositiven und zum anderen die gramnegativen Bakterien. Diese Bezeichnung geht auf den dänischen Internisten und Pathologen Hans Christian Joachim Gram (1853 – 1938) zurück. Er entwickelte im Jahr 1884 die Differentialfärbung nach Gram. In einem ersten Schritt werden die Präparate mit einer der basischen Pararosanilinfarben Gentianaviolett, Methylviolett, Kristallviolett oder Hexamethylviolett gefärbt, zum Beizen der Farbe werden die Präparate mit Lugol'scher Lösung benetzt. Anschließend werden die Präparate mit 95%igem Äthylalkohol entfärbt. Bei Bakterien, die über eine dickere Zellschicht verfügen verhindert diese die Elution des Farbstoffs und damit das Entfärben, die Bakterien erscheinen im Mikroskop blau angefärbt und werden als grampositiv bezeichnet. Bakterien mit einer dünnen Zellschicht werden durch den Alkohol vollständig entfärbt und nehmen das verdünnte Carbolfuchsin der Gegenfärbung auf, im Mikroskop erscheinen rot und werden als gramnegativ bezeichnet. Mykobakterien werden zwar



zu den grampositiven Bakterien gezählt, lassen sich aber nur sehr schlecht oder gar nicht in der Gram-Färbung anfärben; sie werden nach der Spezialfärbung nach Ziehl-Neelsen angefärbt. Eine Übersicht über die wichtigsten Bakterienarten und deren Gram-Zuordnung gibt Tabelle 1.

Tab.1: Übersicht grampositive / gramnegative Bakterien

grampositive	gramnegative
Staphylococcus aureus	Escherichia coli
Coagulase neg. Staphylococcus	Pseudomonas aeruginosa
Streptococcus pneumoniae	Klebsiellen
$\beta$ -hämolyisierende Streptokokken	Enterobacter
Enterokokken	Acinetobacter
Corynebakterien	Salmonellen
Clostridium	Proteus
Bacillus anthracis	Haemophilus
	Neisseria
	Spirochaeten

### 1.1.2 Erregerspektrum: Pilze

Pilze sind eukaryontische Mikroorganismen. Das bedeutet sie besitzen einen oder mehrere Zellkerne, Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum. Pilze haben eine Größe von 5 -10  $\mu\text{m}$ . Man unterscheidet zwei morphologische Grundformen, zum eine die Hyphen, hierbei handelt es sich um verzweigte, tubuläre Strukturen, die in ihrer Gesamtheit als Myzel bezeichnet werden und zum anderen die Hefen, die ein runde bis ovale unizelluläre Form haben. Bei Pilzen gibt es sowohl die asexuelle als auch die sexuelle Vermehrung. Die asexuelle Vermehrung umfasst die Vermehrung von Hyphen und Hefen und die Bildung von asexuellen Sporen. Bei den Hyphen verlängert sich eine Zone unmittelbar hinter der Spitze oder es entstehen seitliche Ausstülpungen, durch Mitose entstehen Tochterkerne, die auf die neuen Hyphen verteilt werden. Die Hefen vermehren sich durch Zellsprossung, ausgehend von einer Ausstülpung der Zellwand die einen Kern enthält entsteht die Tochterzelle. Die Sporen entstehen durch Abschnürung oder Sprossung, sind einzellig und gegenüber exogenen Einflüssen der Umwelt weitgehend resistent. Die sexuellen Vermehrung erfolgt über sexuelle Sporen. Durch Meiose entstehen haploide Kerne, die auf Sporen verteilt werden. Durch Fusion zweier sexueller Sporen entsteht eine diploide

Zygote. Pilze bei denen die sexuelle Vermehrung nicht bekannt oder vorhanden ist werden als Fungi imperfecti bezeichnet. Pilze sind heterotroph, sind also auf die Aufnahme von organischen Verbindungen angewiesen. Pilze sind obligat aerob, Ausnahme sind Hefen die fakultativ anaerob sind. Die Zellwand der Pilze besteht zum Größten Teil aus Chitin, Glucane und Mannane (Kayser et al. 1998). Eine Übersicht über die wichtigsten Pilze gibt Tabelle 2.

Tab.2: Übersicht der wichtigsten Pilze

Erreger
<i>Histoplasma capsulatum</i>
<i>Candida albicans</i>
<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Mucor</i> sp.
<i>Torulopsis glabrata</i>
<i>Malassezia furfur</i>
<i>Trichophyton</i> sp.

## 1.2 Krankheitsbilder

### 1.2.1 Bakterielle Infektionen

Unter einer bakteriellen Infektion versteht man das Eindringen und die Vermehrung von Bakterien in den menschlichen Organismus, beim Auftreten von Symptomen spricht man von einer Infektionskrankheit. Die Übertragung der Erreger kann exogen erfolgen, das heißt aus der Umwelt heraus über Tröpfcheninfektion wie bei der Diphtherie, durch Kontakt oder Schmierinfektionen wie bei der Salmonellenenteritis, durch Austausch von Körperflüssigkeiten wie bei der Syphilis oder durch blutsaugende Insekten wie bei der Borreliose. Demgegenüber stehen endogenen Infektionen durch Erreger der körpereigenen Flora, die entstehen wenn Erreger in für sie untypische bzw. sonst keimfreie Körperregionen gelangen wie bei der Peritonitis oder der Aspirationspneumonie oder wenn Erreger bei geschwächter Immunlage nicht eliminiert oder adäquat unterdrückt werden können (Braun et al. 2001).

Bakterielle Infektionen können auftreten als Infektionen der:

- Atemwege
- Harnwege
- Haut
- Bauchraum
- Magen- Darmtrakt
- Skelettsystem
- HNO-Bereich
- ZNS

sowie als Sepsis, wenn eine mikrobiologische oder klinische nachgewiesene Infektion die Ursache einer systemischen Entzündungsreaktion ist (Bone et al., 1992).

Das Kompetenznetzwerk Sepsis (SepNet) hat in einer prospektiven, querschnittlichen, multizentrischen Studie gezeigt, dass in Deutschland jährlich 79000 Patienten wegen einer Sepsis und weitere 74500 wegen einer schweren Sepsis bzw. einem septischen Schock auf deutschen Intensivstationen behandelt werden. In Deutschland versterben täglich 162 Patienten an einer Sepsis, vergleichbar mit dem Tod am akuten Herzinfarkt (175/Tag) (Brunkhorst et al., 2005). Eine Übersicht über das Keimspektrum bei schwerer Sepsis und Bakteriämie gibt Tabelle 3.

Tab.3: Keimspektrum bei schwere Sepsis (Brun-Buisson et al. 1996)

Erreger	Häufigkeit (%)
grampositive	45
Staphylococcus aureus	19
Streptococcus pneumoniae	9
Coagulase neg. Staphylococcus	6
β-hämolysierende Streptokokken	4
Enterokokken	3
gramnegative	44
Escherichia coli	22
Pseudomonas aeruginosa	6
Klebsiellen	5
Enterobacter	4
Polymikrobielle	12

Eine wichtige Rolle in der heutigen Medizin spielen nosokomiale Infektionen. Dies sind Infektionen die im Krankenhaus erworben werden und sekundär als Komplikationen auftreten. Eine Übersicht über die relativen Häufigkeiten der Erreger bei nosokomialen Infektionen gibt Tabelle 4.

Tab.4: relative Häufigkeit der Erreger nosokomialer Infektionen in % (NIPED-Studie, 1995)

Bakterien	HWI	RTI	PWI	SEP	Rest	gesamt
E.coli	40,5	9,9	23,3	13,2	15,6	22,4
Enterokokken	19,8	29,5	27,2	0	11,7	14,75
S.aureus	3,2	25,4	45,5	15,8	13	11,11
koagulase-neg Staphylokokken	4,5	9,9	14,8	34,2	10,4	8,01
Pseudomonas aeruginosa	5,4	46,5	26	0	1,3	7,65
Klebsiellen sp.	4,1	20,8	15	10,5	3,9	6,01
Streptococcus sp.	1,8	16,8	8,2	0	9,1	4,74
Proteus mirabilis	5	4	2,4	0	2,6	3,1
Enterobacter sp.	1,4	4	4,7	2,6	1,3	2
Serratia sp.	0,9	1,7	3,8	7,9	0	2
sonstige Enterobacteriaceae	1,9	6,3	9,7	2,6	3,9	2
Acinetobacter sp.	2,7	5,7	1,2	0	0	1,82
Anaerobier	0,5	0	4,8	0	0	1,46
sonstige grampositive Bakterien	0	0	7,3	2,6	2,6	1,28
Morganella sp.	1,4	4	0	0	1,3	1,09
Providentia sp.	0,9	0	5	0	2,6	1,09
Pseudomonas außer P.aeruginosa	0	3,4	1,2	2,6	2,6	1,09
Pilze	0,5	0	5	2,6	1,3	3,48
Rest (unter 1%)	5,9	19,1	0	2,6	11,7	6,01

HWI= Harnwegsinfekt; RTI= Infektion des Respirationstrakt; PWI= post OP Wundinfekt; SEP= Sepsis; Rest= alle anderen Infektionen.

### 1.2.2 Einteilung der Pilzkrankungen

In der Humanmedizin lassen sich vier Arten von Pilzkrankungen unterscheiden:

1. Mykosen
2. Mykoallergosen
3. Mykotoxikosen
4. Myzetismus

Mykosen sind Erkrankungen bei denen Pilze in lebendes Gewebe eindringen. Sie können weiter unterteilt werden in System, Haut- und Schleimhautmykosen. Systemmykosen sind zumeist opportunistische Infektionen, prädisponierende Faktoren sind Chemotherapie, maligne Erkrankungen, Kortikosteroidtherapie, Diabetes mellitus, AIDS oder angeborene Immundefekte. Die am weitesten verbreiteten Systemmykosen sind die Candidose durch *Candida sp.*, Aspergillose in 90% durch *Aspergillus fumigatus*, Kryptokokkose durch *Cryptococcus neoformans* und die Histoplasmose durch *Histoplasma capsulatum*. Hautmykosen zählen weltweit zu den häufigsten Infektionen ( Kayser et al. 1998). Sie besitzen keratinlösende Enzyme und besiedeln Haut Haare und Nägel. Zu dem Krankheitsbildern zählen die Malassezia furfur durch Pityriasis versicolor, Tinea corporis oder palmaris durch *Trichophyton rubrum* oder die Candidose durch *Candida albicans*. Bei den Schleimhautmykosen spielt vor allem *Candida albicans* eine große Rolle.

Die Mykoallergosen entstehen durch Sporen, die über die Atemluft in den Respirationstrakt gelangen. Als potente Allergene können sie zu allergischer Rhinitis, allergischer Alveolitis oder Asthma bronchiale führen. Mykoallergosen können durch die Sporen einer Vielzahl von Pilzen hervorgerufen werden, dazu zählen z.B.: *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Fusarium sp.*.

Einige Pilze bilden Mykotoxine. Dabei handelt es sich um sekundäre Stoffwechselprodukte die vom Pilz freigesetzt werden und eine toxische Wirkung auf Menschen und Tiere haben, diese Toxine werden mit Lebensmitteln aufgenommen Beispiele hierfür sind: *Aspergillus flavus* und *parasiticus* die Aflatoxin B1 bilden, das mit Nüssen und Reis aufgenommen wird und zu Leberschäden und primärem Leberkarzinom führt, *Claviceps purpurea* der vor Allem Roggen befällt und zur Bildung des s.g. Mutterkorns führt und bei Verzehr zum klinische Bild des

Ergotismus führt mit Parästhesien, Magen- Darmstörungen, Kopfschmerz, Bewusstlosigkeit bis hin zum Tod.

Als Myzetismus hingegen bezeichnet man die Vergiftung durch den Verzehr eines ganzen s.g. Giftpilzes und damit die Aufnahme von Zellgiften wie Phallotoxine im Knollenblätterpilz die zu irreversible Leberzellschädigung, Übelkeit, Erbrechen, reiswasserähnlichen Durchfällen und schließlich zum Tod durch Schock oder Leberversagen führen.

### **1.3 Risikopatienten**

Auch noch rund 80 Jahre nach der Entdeckung des Penicillins durch Sir Alexander Fleming und der Weiterentwicklung der Antibiotika sowie der Entwicklung von Impfstoffen Ende des 19. Jahrhundert durch Paul Ehrlich und Louis Pasteur stellen Infektionskrankheiten weltweit, laut WHO mit 17 Millionen Todesfällen an Stelle eins der Todesursachen und auch in Deutschland sind septische Erkrankungen die 3. häufigste Todesursache (Brunkhorst et al., 2005). Besonders gefährdet sind Patienten mit einer immunsuppressiven Therapie. In der Medizin sind große Fortschritte gemacht worden, seit der ersten Nierentransplantation 1954 durch J.E. Murray oder der ersten Knochenmarstransplantation 1959 durch E.D. Thomas (Neuhaus 2001) sind immer effektivere Immunsuppressiva wie Ciclosporin, Azathioprin oder Tacrolimus entwickelt worden, die die Abstoßung der Transplantate verringern, die Patienten aber auch für Infektionen anfälliger machen; die zunehmende Etablierung der Knochenmarks- und Stammzellentransplantation erhöht die Zahl der infektionsgefährdeten Patienten weiter (Williams et al. 1999, Georg et al 2006). Auch der vermehrte Einsatz von Glucocorticoiden bei allergischen, rheumatischen oder entzündlichen Erkrankungen, Autoimmunkrankheiten und entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa oder M. Crohn führt zu vermehrten Infektionen (Yonezawa et al 2000, Rankin N.E. 1953).

Zusätzlich zu den Patienten bei denen das Immunsystem medikamentös supprimiert wird, sind Patienten mit einem allgemein geschwächten Immunsystem wie Frühgeborene, alte Menschen, HIV-Infizierte, Verbrennungsoffer, Patienten auf Intensivstationen oder Menschen mit hereditären Immundefekten (Di-George-syndrom, Wiskott-Aldrich-Syndrom) von bakteriellen, viralen und mykotischen Infektionen betroffen.

## 1.4 Fragestellung der Arbeit

Fragestellung dieser Arbeit ist die Anwendbarkeit einer automatisierten DNA-Präparation aus Patientenserum, zum Erregernachweis bei Patienten mit Fieberanstieg und oder Verdacht auf Bakteriämie der chirurgischen und anästhesiologischen Intensivstation, sowie der Vergleich zum „klassischen“ Erregernachweis mittels Blutkultur.

Eine schnelle Diagnose und Therapie ist von entscheidender Bedeutung in der Therapie bakterieller und mykotischer Infektionen. Der frühzeitige Nachweis und die Bestimmung der Erreger ermöglicht eine zielgerichtete antibiotische/antimykotische Therapie. Dadurch können Kosten durch unnötige Antibiotika- und Antimykotikagaben eingespart und Resistenzbildungen vermieden werden. Mit Hilfe PCR-basierter Nachweismethoden ist es heutzutage möglich schnell und spezifisch Diagnosen zu stellen. Der zusätzlichen Einsatz vollautomatischer Extraktionsautomaten wie dem MagNA Pure LC™ könnte diese Nachweismethoden sinnvoll ergänzen. Die Zeit und kostenaufwendigere händische Präparation würde entfallen, mögliche Kontaminationen würden durch das geschlossene System auf ein Minimum reduziert werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv und Einschlusskriterien**

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Nach Genehmigung der vorliegenden Untersuchung der Ethikkommission der Universität Bonn wurden 89 Patienten im Zeitraum vom 04/2002 –06/2003 in die Studie eingeschlossen.

Untersucht wurden Proben von 89 Patienten mit Fieberanstieg oder Verdacht auf Bakteriämie auf der Chirurgischen und der Anästhesiologischen Intensivstation der Universitätsklinik Bonn.

#### 2.1.2 Einflußkriterien

- Alter des Patienten > 18 Jahre
  
- Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters in die Auswertung der gewonnenen Daten
  
- Systemische Entzündungsreaktion und/ oder Sepsis

Sepsis wurde gemäß den Kriterien der Konsensuskonferenz 1992 des American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference (ACCP/SCCM) definiert (Bone et al., 1992). Nach diesen Kriterien liegt eine Sepsis vor, wenn eine mikrobiologische oder klinische nachgewiesene Infektion die Ursache einer systemischen Entzündungsreaktion ( SIRS, systemic inflammatory response syndrome )ist.



Eine SIRS wird durch mindestens zwei der folgenden Kriterien definiert:

- Körpertemperatur  $> 38^{\circ}\text{C}$  oder  $< 36^{\circ}\text{C}$
- Herzfrequenz  $> 90$  Schläge/min
- Atemfrequenz  $> 20$  /min oder  $\text{PaCO}_2 < 32$  mmHg oder  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 200$  bei maschineller Beatmung
- Leukozytenzahl  $> 12000$  Zellen<sup>3</sup> oder  $< 4000$  Zellen/mm<sup>3</sup> oder  $> 10\%$  unreife Formen

### 2.1.3 Ausschlußkriterien

- Alter  $< 18$  Jahre
- Schwangerschaft
- Fehlende Einwilligung des Patienten oder seines rechtlichen Vertreters in die Auswertung der Daten

Alle Patienten bzw. deren rechtliche Vertreter wurden mündlich und schriftlich gemäß dem Ethikantrag über die Untersuchung aufgeklärt (siehe Anlage). 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 Krankheitsbilds keine Geschäftsfähigkeit bestand, wurde die Zustimmung des nächsten Angehörigen, respektive die des zuständigen Vormundschaftsgerichts erbeten.

## 2.2 Dokumentation und untersuchte Parameter

### 2.2.1 Dokumentation

Die Dokumentation der patientenbezogenen Daten erfolgte auf der jeweiligen Intensivstation mit Hilfe der dort geführten Dokumentationsbögen.

Folgende Parameter wurden untersucht und in die Auswertung miteinbezogen:

- Patientenalter
- Patientengewicht
- Anzahl der Antibiotika
- Tage der Antibiotikatherapie
- Herzfrequenz Schläge/min
- Systolischer Blutdruck mmHg
- Mittlerer arterieller Druck mmHg
- Atemfrequenz Züge /min
- Kalium mmol/l
- Natrium mmol/l
- Standardbikarbonat mmol/l
- Thrombozytenzahl (G/l)
- Leukozytenzahl (G/l)
- Temperatur (°C)
- pH
- Hämoglobin (g/dl)
- Hämatokrit (g/dl)
- Harnstoff (mg/dl)
- Kreatinin (mg/dl)
- Gesamt- Bilirubin(mg/dl)
- Blutzucker (mg/dl)
- GOT (U/l)

## 2.2.2 Score-Systeme

Zur Abschätzung der Bewusstseinslage, der Erkrankungsschwere sowie der Organfunktion wurden folgende Scores erhoben:

- Glasgow Coma Scale (GCS)
- Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE 2)
- New Simplified Acute Physiology Score (SAPS 2)
- Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA)

### 2.2.2.1 Glasgow Coma Scale (GCS)

Der Glasgow Coma Scale (GCS) ist eine einfache Skala zur Abschätzung der Bewusstseinslage eines Patienten (Teasdale und Jennett, 1974). Es gibt drei Rubriken, für die jeweils Punkte vergeben werden, die Gesamtpunktzahl ergibt sich aus der Addition der drei Rubriken:

#### 1. Augen öffnen

- spontan 4 Punkte
- auf Aufforderung 3 Punkte
- auf Schmerzreiz 2 Punkte
- keine Reaktion auf Schmerzreize 1 Punkt

#### 2. Beste verbale Kommunikation

- konversionsfähig, orientiert 5 Punkte
- konversionsfähig, desorientiert 4 Punkte
- inadäquate Äußerung 3 Punkte
- unverständliche Laute 2 Punkte
- keine Reaktion auf Ansprache 1 Punkte

### 3. Beste motorische Reaktion

- auf Aufforderung 6 Punkte
- auf Schmerzreiz, gezielt 5 Punkte
- auf Schmerzreiz, abnorme Abwehr 4 Punkte
- auf Schmerzreiz, Beugeabwehr 3 Punkte
- auf Schmerzreiz, Strecksynergismen 2 Punkte
- keine Reaktionen auf Schmerzreiz 1 Punkte

Die maximale Punktzahl ist 15, die minimale 3.

- Bei < 8 Punkte wird von einem Koma ausgegangen, der Patient ist intubationspflichtig.
- 9 und 12 Punkte gelten als moderate Bewusstseinsstörung
- 13 und 15 Punkte leichte Bewusstseinsstörung

#### 2.2.2.2 Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE 2)

Das APACHE 2-Score-System ( Acute Physiology and Chronic Health Evaluation) ist ein Score-System zur objektiven Erfassung der Erkrankungsschwere von Intensivpatienten sowie zur Voraussage der Mortalität eines Patienten (Knaus WA et al 1985).

Der APACHE 2 setzt sich aus drei Rubriken zusammen für die Punkte vergeben werden, die Gesamtpunktzahl ergibt sich aus der Addition der drei Rubriken:

Erfassung der akut-physiologischen Parameter:

In diese Rubrik gehen zwölf klinische Parameter ein wobei jeweils der am weitesten von der Norm abweichende Wert verwandt wird. Nicht erfasste Parameter gehen mit 0 Punkten in die Gesamtpunktzahl ein.

Tab.5: Akut-physiologische Parameter

Punkte	4	3	2	1	0	1	2	3	4
Körpertemperatur (°C)	>41	39-40,9		38,5-38,9	36-38,4	34-35,9	32-33,9	30-31,9	<29,9
mittlere arterieller Druck (mmHg)	>160	130-159	110-129		70-109		50-69		<49
Herzfrequenz (Schläge/min)	>180	140-179	110-139		70-109		55-69	40-54	<39
Atemfrequenz	>50	35-49		25-34	12-24	10-11	6-9		<5
PaO <sub>2</sub> wenn FIO <sub>2</sub> > 50%	>500	350-499	200-349		<200				
PaO <sub>2</sub> wenn FIO <sub>2</sub> < 50%					<70	61-70		55-60	<55
arterieller pH	>7,7	7,6-7,69		7,5-7,59	7,33-7,49		7,25-7,32	7,15-7,24	<7,15
Standartbikarbonat (mmol/l)	>52	41-51,9		32-40,9	23-31,9		18-21,9	15-17,9	<15
Natrium (mmol/l)	>180		160-179	155-159	150-154	130-149	120-129	111-119	<110
Kalium (mmol/l)	>7	6-6,9		5,5-5,9	3,5-5,4	3-3,4	2,5-2,9		<2,5
Kreatinin (mg/dl)	>3,5	2-3,4	1,5-1,9		0,6-1,4		<0,6		
Hämatokrit (mg/dl)	>60		50-59,9	46-49,9	30-45,9		20-29,9		<20
Leukozyten (x 1000/µl)	>40		20-39,9	15-19,9	3-14,9		1-2,9		<1

Der GCS addiert sich mit seinem jeweiligen Wert hinzu.

## 2. Patientenalter:

- < 44 0 Punkte
- 45-54 2 Punkte
- 55-64 3 Punkte
- 65-74 5 Punkte
- > 75 6 Punkte

## 3. Erfassung chronischer Erkrankungen:

- Jeweils ein Punkt für

- Biopsiegesicherte Leberzirrhose
- Herzinsuffizienz (NYHA Klasse 4)
- Ausgeprägte COPD
- Chronische Dialyse
- Eingeschränkte Immunkompetenz

- zwei Punkte für elektive chirurgische oder neurochirurgische Eingriffe

- fünf Punkte für notfallchirurgische Eingriffe

Tab.6: APACHE 2-Score und Mortalität (Knaus WA et al 1985)

APACHE 2	nichtoperativ (%)	postoperativ (%)
0-4	4	1
5-9	6	3
10-14	12	6
15-19	22	11
20-24	40	29
25-29	51	37
30-34	71	71
>35	82	87

### 2.2.2.3 New Simplified Acute Physiology Score (SAPS 2)

Das SAPS 2-Score-System (New Simplified Acute Physiology Score) ist ein Score-System zur objektiven Erfassung der Erkrankungsschwere von Intensivpatienten sowie zur Voraussage der Mortalität eines Patienten (Le Gall et al., 1993).

Der SAPS 2 setzt sich aus vier Rubriken zusammen für die Punkte vergeben werden, die Gesamtpunktzahl ergibt sich aus der Addition der vier Rubriken:

#### 1. Erfassung der akut-physiologischen Parameter.

In diese Rubrik gehen elf klinische Parameter ein wobei jeweils der am weitesten von der Norm abweichende Wert verwandt wird. Nicht erfasste Parameter gehen mit 0 Punkten in die Gesamtpunktzahl ein.

Tab.7: physiologische Parameter

Punkte	0	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	12	13
Herzfrequenz Schläge/min	70- 119		40- 69		120- 159			> 160			< 40		
Systol. Blutdruck (mmHg)	100- 199		> 200			70- 99							< 70
Temperatur( °C)	< 39			>39									
Oxygenierungsquotient Pao2/FiO2 (mmHg)							>200		100- 199		<10 0		
Ausscheidung/ 24h (ml)	>1,0				0,5- 0,999						< 0,5		
Harnstoff (g/l)	<0,6						0,6- 1,79			> 1,8			
Leukozyten (x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1,9- 19,9			> 20									< 1,0
Kalium (mmol/l)	3,0- 4,9			>5 <3									
Natrium (mmol/l)	125- 144	> 145				<125							
Standartbikarbonat (mmol/l)				15- 19			< 15						
Bilirubin (mg/dl)	< 4				4-5,9				>6				

Des GCS addiert sich mit seinem jeweiligen Wert hinzu.



## 2. Patientenalter:

- < 40 0 Punkte
- 40-59 7 Punkte
- 60-69 12 Punkte
- 70-74 15 Punkte
- 75-79 16 Punkte
- >80 18 Punkte

## 3. Erfassung chronischer Erkrankungen:

- 9 Punkte für metastasierende Neoplasien
- 10 Punkte für hämatologisch Neoplasien
- 17 Punkte für AIDS-Erkrankung ( Wertung bei positiven HIV-Test und klinischen Komplikationen)

## 4. Aufnahmestatus

- 0 Punkte für geplant chirurgisch ( Operationstermin mindestens 24 Stunden geplant)
- 6 Punkte für medizinisch ( mindestens eine Woche nicht operiert)
- 8 Punkte für nicht-geplant chirurgisch ( Operationstermin erst in den letzten 24 Stunden geplant)

### 2.2.2.4 Sepsis-related Organ Failure Assessment (SOFA)

Das SOFA-Score-System ist ein einfaches Score-System zur Objektiven Quantifizierung des Grades der Organdysfunktion bzw. Organversagens bei Intensivpatienten. ( Vincent et al. 1996) Der SOFA wird aus sechs physiologischen Parametern berechnet, wobei jeweils der schlechteste Wert verwandt wird. Nicht erfasste Daten gehen mit 0 Punkten in die Gesamtpunktzahl ein. Den Gesamtscore erhält man durch Addition der Einzelwerte.

Tab.8: physiologische Parameter

Punkte	0	1	2	3	4
Herz/Kreislauf Medikamente ( $\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{min}$ )	keine Hypotension	MAP < 70 ohne Medikamente	Dopamin < 5 oder Dobutamin( jede Dosierung)	Dopamin > 5 oder Adrenalin/Noradrenalin < 0,1	Dopamin > 15 oder Adrenalin/Noradrenalin > 0,1
Thrombozyten ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Oxygenierungsquotient Pao <sub>2</sub> /FiO <sub>2</sub> (mmHg)	> 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Bilirubin (mg/l)	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12
Kreatinin (mg/dl)	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	> 5
GCS	15	13-14	10-12	6-9	< 6

Organversagen ist definiert ab einem SOFA-Score  $\geq 3$  (Vincent et al., 1996)

## 2.3 Probenakquisition und Verarbeitung

### 2.3.1 Probenakquisition

#### 2.3.1.1 Indikationen zur Anlage einer Blutkultur

Indikationen zur Anlage einer BK sind:

- Verdacht auf Sepsis
- septischer Schock
- zyklische Infektionskrankheiten
- Verdacht auf Bakteriämie oder Fungämie
- Fieber unklarer Ursache

### 2.3.1.2 Anlage der Blutkultur

Die Indikationsstellung zur Blutkultur erfolgte durch den zuständigen Intensivarzt. Proben wurden idealerweise zu Beginn des Fieberanstieges entnommen. Die Probenentnahme erfolgte möglichst vor Beginn einer antibiotischen Therapie, eine bereits laufende antibiotische Therapie stellt keine Kontraindikation dar. Proben wurden aseptisch entnommen. Dies beinhaltet Händedesinfektion der abnehmenden Person und ggf. sterile Handschuhe, Desinfektion der Punktionsstelle sowie Desinfektion des Blutkulturflaschendiaphragmas.

Die Entnahme sollte nicht aus liegenden Kathetern erfolgen, Ausnahme hiervon ist die Fragestellung des Katheters als Infektionsquelle.

Beimpft werden jeweils eine Kulturflasche für Aerobier, eine für Anaerobier und eine für Pilze. Jede der Flaschen wird mit je 8-10 ml Blut beimpft. Nach 30 Minuten und 60 Minuten wurden jeweils 3 weitere Flaschen beimpft. Gleichzeitig wurde ein 10 ml EDTA-Röhrchen für das weitere immunologische Monitoring abgenommen.

Die Blutkulturflaschen sowie das EDTA-Röhrchen wurden mit Patientennamen, Geburtsdatum, Entnahmezeit und Temperatur versehen und bis zum Transport in die Mikrobiologie bei  $36 \pm 1$  °C inkubiert. Das EDTA-Röhrchen verblieb bis zu seiner weiteren Bearbeitung in einem Kühlschrank bei  $\pm 4$  °C um eine mikrobielle Überwucherung und damit Verfälschung der Probe zu verhindern.

### 2.3.2 Probenaufbereitung

#### 2.3.2.1 Probenaufbereitung in der Mikrobiologie

Die weitere Bearbeitung der Blutkulturflaschen erfolgt im Institut für Mikrobiologie nach deren internen Standards, erste Ergebnisse stehen im Schnitt nach 24-48 Stunden zur Verfügung, endgültige nach 2-4 Tagen.

### 2.3.2.2 Probenaufbereitung für Echtzeit-Polymerasekettenreaktion

Die EDTA-Röhrchen werden im Labor 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Je 1000 µl des Plasmaüberstands werden in 4 sterile Eppendorfcups überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C weggefroren.

Zum Erregernachweis mittels Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (Echtzeit-PCR) muß die Erreger-DNA zunächst aus den Proben isoliert werden, anschließend wird sie mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Durch Verwendung fluoreszierender Primer/Sonden und anschließender Schmelzkurvenanalyse erfolgt die Erregerbestimmung.

### 2.3.3 DNA Präparation mit dem MagNA Pure LC™

Abb.1: MagNA Pure LC™

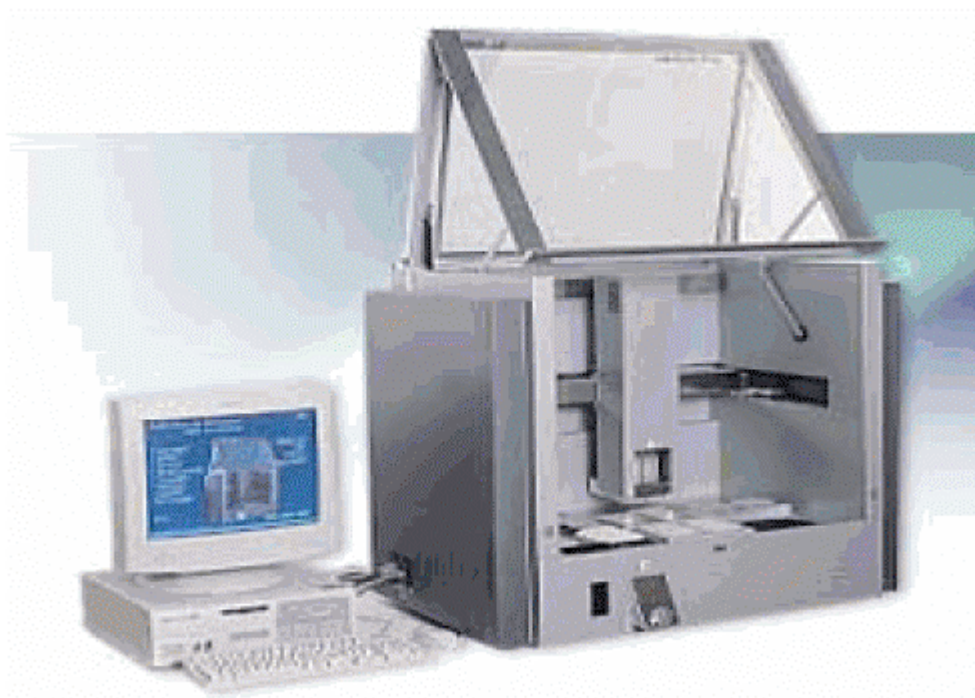


Abbildung nach Roche Diagnostics Corporation MagNA Pure LC™ operator's manual (2004)

Die DNA wird mit Hilfe des MagNA Pure LC™ (Roche Diagnostics) aus den Proben isoliert. Beim MagNA Pure LC™ handelt es sich um einen vollautomatischen Extraktionsautomaten der die automatische Isolierung von DNA aus bis zu 32 Proben parallel innerhalb von ca. zwei Stunden ermöglicht. Nach einer manuellen Vorbereitung werden die Proben in MagNA Pure LC™ Probenbehälter überführt.

Diese Probenbehälter werden in ihrer vorgesehenen Stelle im Gerät positioniert, darüber hinaus wird das Gerät mit den benötigten Puffern und sterilen Einmal-Plastikartikeln bestückt. Es handelt sich um ein geschlossenes System, nach Auswahl des gewünschten Programms laufen die weiteren Schritte vollautomatisch. Die Gefahr einer Kontamination der Proben wird dadurch auf ein Minimum reduziert. Die Isolierung erfolgt gemäß den Herstellerangaben.

#### 2.3.3.1 Isolierungsprinzip

Die Proben werden zuerst mittels spezieller Lyse-Puffer und Proteinase K behandelt, hierdurch werden die Bakterien lysiert. Bei der Extraktion macht man sich zu Nutze, dass Nukleinsäuren bei hohen Salzkonzentrationen und Ionenstärke an Glas binden. Aus diesem Grund gibt man magnetische Glaspartikel (MGP) bei. Diese MGP besitzen eine poröse Oberfläche aus Siliziumdioxid und einen Eisenkern. Diesen Eisenkern benötigt man zur magnetischen Extraktion der an die Partikel bindenden Nukleinsäuren. Nach Zugabe der MGP, bindet die aus der Probe freigesetzte DNA an deren Oberfläche. Ungebundene Substanzen oder Partikel werden in mehreren Schritten ausgewaschen. In einem letzten Schritt wird die DNA von den MPGs abgewaschen. Dazu werden die MPG bei hoher Temperatur in ein Medium mit niedriger Ionenstärke überführt, die Nukleinsäuren lösen sich wieder von den MPG und die MPG könne mit einem Magneten entfernt werden.

#### 2.3.3.2 Durchführung

##### 1. Manuelle Vorbereitung der Proben

Das Ausgangsvolumen der Probe sind 100 µl, zu diesen werden 130 µl Bakterien Lysepuffer und 20 µl Proteinase K beigegeben. Die Probe wird anschließend 10 min bei 65° C bis zur vollständigen Auflösung der Probe inkubiert.

## 2. Automatische Aufreinigung

Die Proben werden nun in die MagNA Pure LC™ Probenbehälter überführt. Nach Starten des Programms laufen alle weiteren Schritte voll automatisiert ab. Zuerst werden 300 µl Lyse/Binungs Puffer beigegeben, anschließend 150 µl MGP-Suspension. Die Probe wird durchmischt und inkubiert, freie DNA bindet an die magnetischen Partikel, deren Oberfläche aus Siliziumdioxid besteht. Mit einem Magneten werden die MGP mit der gebundenen DNA separiert und in 850 µl Waschpuffer 1 überführt um PCR-Inhibitoren zu entfernen.

Daran schließen sich zwei weitere Waschvorgänge an (Waschpuffer 2 und 3 je 450 µl) um Salze und Proteine zu entfernen.

Als letzter Schritt erfolgt das Abwaschen der DNA von den MGP durch 100 µl DNA-Waschpuffer auf einem Heizblock und die Entfernung der Glaspartikel durch einen Magneten. Die Probe wird anschließend auf einem Kühlblock heruntergekühlt.

Die Proben können nun manuell oder automatisiert durch den MagNA Pure LC™ für die PCR weiterbehandelt werden. Ist die Durchführung einer PCR zu diesem Zeitpunkt nicht gewünscht, können die Proben bei – 20° C asserviert werden .

Abb.2: Schematische Darstellung der automatischen Aufreinigung

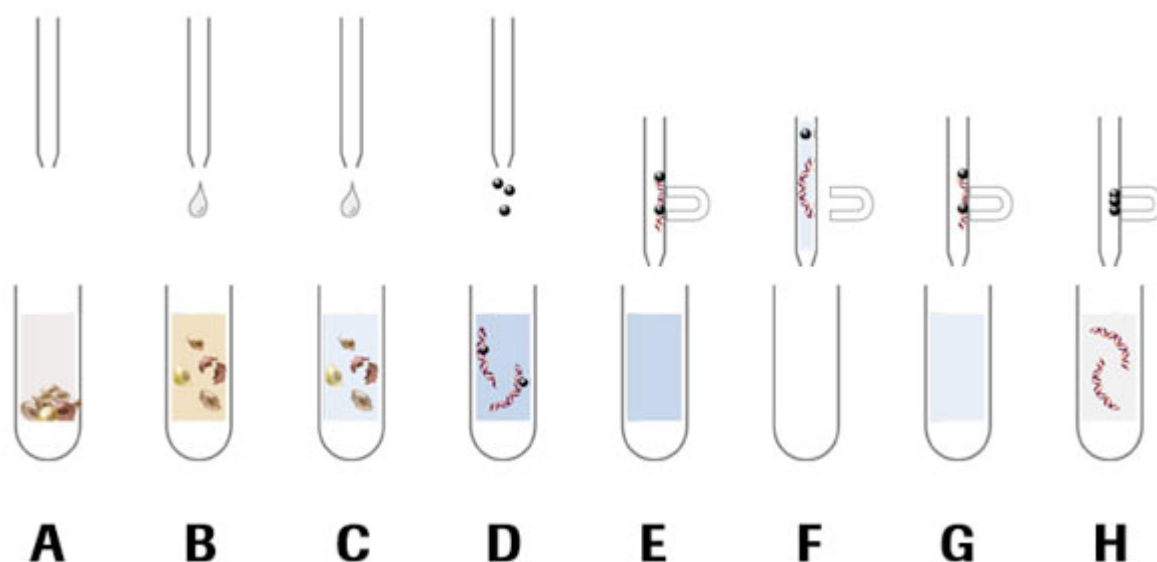


Abbildung nach Roche Diagnostics Corporation MagNA Pure LC™ operator's manual (2004)

A: Das Probenmaterial wird in die Probenbehälter gefüllt

B/C: Lysepuffer und Proteinkinase K werden zugegeben

D: Magnetische Glaspartikel werden zugegeben, die DNA bindet an

E: Mit Hilfe eines Magneten werden die Glaspartikel mit der gebundenen DNA entfernt

F-H: Die DNA wird von den Glaspartikeln abgewaschen und die Glaspartikel werden entfernt, in der Probe verbleibt die DNA.

### 2.3.4 DNA Amplifikation

Im Anschluss an die DNA Extraktion erfolgt der Nachweis erregerspezifischer DNA mittels PCR. Hierzu werden nach dem letzten Schritt der automatisierten Aufreinigung die Proben in Glaskapillaren überführt, diese manuell in das Probenkarussell des Light Cycler™ eingesetzt und die Echtzeit-PCR zum Nachweis erregerspezifischer DNA gestartet.

#### 2.3.4.1 Polymerasekettenreaktion

##### 2.3.4.1.1 Prinzip

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde Mitte der achtziger Jahre von Kary Mullis entwickelt (Mullis K.B., Faloona F.A. 1987) Bei der PCR nutzt man bestimmte Mechanismen der DNA Replikation.

Vorteile der PCR gegenüber anderen Methoden der Molekulargenetik sind, dass nur geringste Mengen von Ausgangsmaterial notwendig sind um eine große Anzahl von spezifischen DNA-Amplifikaten zu erhalten. Bei der PCR dient eine Einzelstrang-DNA als Matrize für die Synthese eines neuen, komplementären Stranges mit Hilfe des Enzyms DNA-Polymerase. Das Enzym DNA-Polymerase wurde erstmals 1957 von Kornberg aus *E. coli* isoliert und zur DNA-Synthese verwandt. Dieses Enzym ist jedoch hitzeempfindlich und wird bei den für die PCR notwendigen Temperaturen zerstört, so dass es bei jedem Zyklus von neuem zugegeben werden muß. Durch die Entdeckung des Bakteriums *Thermus aquaticus* wurde die Methode der PCR entschieden vereinfacht. Es handelt sich bei *Thermus aquaticus* um ein in heißen Quellen lebendes Bakterium.

Dessen DNA-Polymerase, die Taq-Polymerase, ist auch bei hohen Temperaturen noch stabil und muß dem Ansatz somit nur einmal zugegeben werden.

Die Matrizen erhält man durch Erhitzen der als Doppelhelix vorliegenden DNA auf 95° C. Bei dieser Temperatur lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen über die die beiden komplementären Stränge zur Doppelhelix verbunden sind; es entstehen zwei komplementäre Matrizen wobei der eine Strang als 3'-5' und der andere als 5'-3' Strang bezeichnet werden. RNA und DNA unterscheiden sich in ihren Pentosen. RNA-Nukleotide enthalten eine Ribose, DNA-Nukleotide eine 2'-Desoxyribose. Die einzelnen Mononukleotide sind durch Phosphodiesterbindungen zwischen C-3' und C-5' der Pentosen miteinander verknüpft. Die Moleküle besitzen also wegen der 3'-5' Bindung zwischen Zucker und Phosphat einen Richtungssinn. Die Richtung der Stränge hat deswegen Bedeutung, da die DNA-Polymerase nur in 3'-5' lesen und nur in 5'-3'-Richtung neue Basen verknüpfen kann.

Diese Einzelstrang-Matrizen können von der DNA-Polymerase wieder zu einer Doppelhelix nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung ergänzt werden.

Die DNA-Polymerase kann diese Synthese an der Matrize jedoch nicht de novo starten sondern benötigt ein kleines Stück Doppelhelix an das sie weitere Basen anbinden kann.

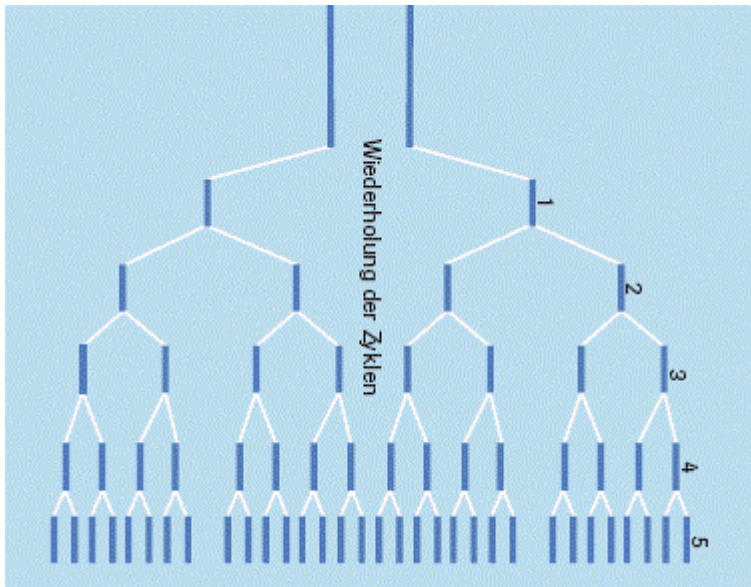
Dazu dienen die zugesetzten Primer.

Die Primer werden dabei immer so gewählt, dass der eine einem kleine Stück am 3'-Ende und der andere einem Stück am 5'-Ende komplementär binden kann, für die optimale Bindung der Primer kühlt man die Probe nach dem Erhitzen auf 52° C ab.

Im nächsten Schritt erhöht man die Temperatur auf 72° C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase. Nun beginnt die Kettenverlängerung nach dem Prinzip der komplementären Basenbindung und eine Doppelhelix entsteht. Dieser Zyklus von Erhitzen = Spalten der Doppelhelix, Abkühlen = Binden der Primer und erneutem Erhitzen = Synthese einer neuen Doppelhelix wird viele Male durchlaufen um die gewünschte Menge an DNA zu erhalten (siehe Abbildung 3)



Abbildung 3: Vervielfältigung der Ausgangsprobe



#### 2.3.4.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Die Grundlagen für die heute angewandte quantitative Echtzeit-PCR wurden 1992 von Higuchi et al. gelegt. Er stattete eine PCR-Maschine mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera aus. Dem PCR-Ansatz gab er Ethidiumbromid bei, welches die Eigenschaft hat, in doppelsträngige DNA eingebaut und durch UV-Licht zum fluoreszieren angeregt zu werden. Diese Fluoreszenz konnte gemessen und so die Konzentration der Ziel-DNA bestimmt werden (Higuchi et al., 1993). Die Fluoreszenz steigt proportional mit der Produktmenge.

Diese Methode wird heute noch angewandt, allerdings werden andere fluoreszierende Reporterfarbstoffe für die Echtzeit-PCR verwendet.

Mit Hilfe des Light Cycler <sup>TM</sup> wird über Detektionsmodule nach jedem Zyklus die mit der Produktzunahme steigende Fluoreszenz in Echtzeit gemessen.

Somit entfällt die zeitaufwändigere Auftrennung und Visualisierung der DNA mittels Gelelektrophorese.

Zur Quantifizierung der PCR benutzt man die Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwert, dem so genannten Threshold Cycle oder  $C_T$ -Wert. Zu Beginn einer jeden PCR kann nur die Hintergrundfluoreszenz gemessen werden, da die Reporterfluoreszenz wegen der noch geringen Produktmenge nach den ersten Cyclen nicht messbar ist. Der  $C_T$ -Wert ist der Wert an dem die Reporterfluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt; von diesem Zeitpunkt verläuft die Amplifikation exponentiell.

Bei jeder PCR werden parallel Matrizen bekannter Menge amplifiziert und deren  $C_T$ -Wert bestimmt. An Hand dieser Werte lässt sich eine Standardkurve erstellen, mit der einem  $C_T$ -Wert eine Matrizenkonzentrationen zugeordnet werden kann.

Abb.4: Schematische Abbildung einer PCR

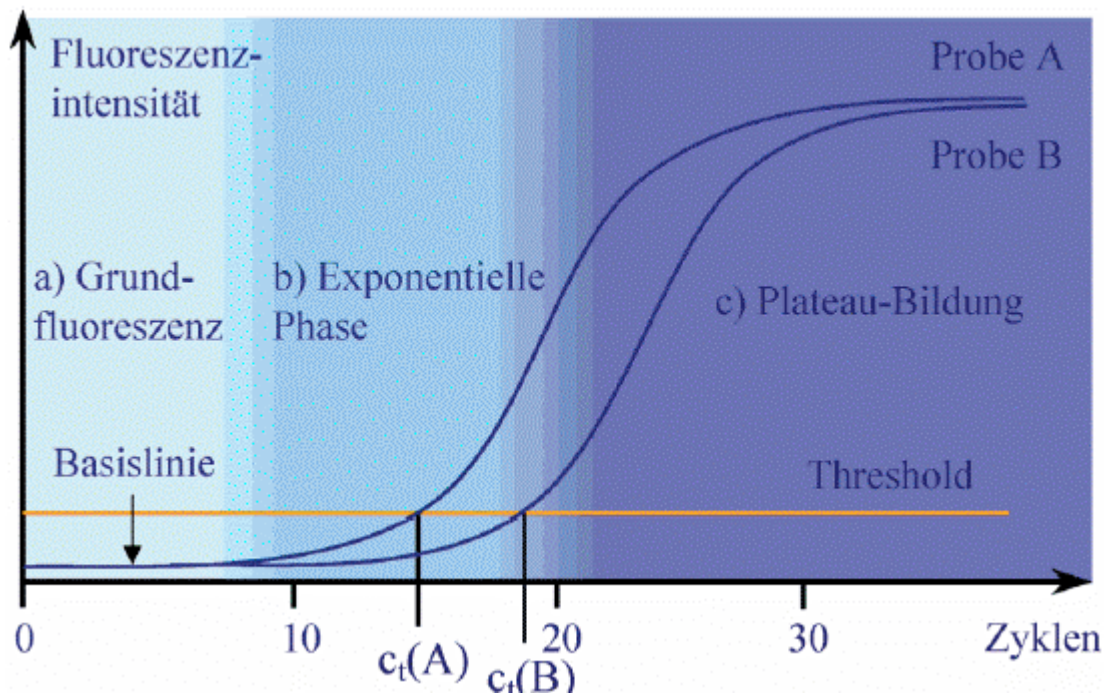


Abbildung nach Becker-Follmann et Baas (2004)

#### 2.3.4.3 Echtzeit-PCR mit dem Light Cycler™

Nach der automatischen Aufreinigung wird die isolierte DNA manuell oder automatisiert durch den MagNA Pure™ in gekühlte Light Cycler™ - Glaskapillaren pipetiert, hinzu kommt der so genannte PCR-Master-Mix, der die für die Amplifikation nötigen Reagenzien enthält. Jede Light Cycler™ - Glaskapillare enthält nun 10 µl nukleasenfreies Wasser, 2 µl Detektionsmix,

bestehend aus den keimspezifischen forward und reverse Primer sowie den Fluoreszin und den Light-Cycler™ -Red-640 (LC-Red-640) Sonden, 1 µl innere Kontrolle, 1,67 µl Enzymmix 1b, er enthält Taq-DNA-Polymerase Puffer und Desoxynukleotide mit dUTP anstelle dTTP, 0,33 µl Enzymmix 1a der die Taq-DNA-Polymerase enthält und 5 µl Probe so das ein Endvolumen von 20 µl entsteht. Eine Positivkontrolle ist im Kit enthalten, die innere Kontrolle dient der Detektion eventueller PCR-Inhibitoren.

Abb.5: Light Cycler™



Abbildung nach Roche Diagnostics Corporation Light Cycler™ operator's manual (2004)

Die Glaskapillare werden verschlossen und in das Probenkarussell des Light Cycler™ eingesetzt. Das gesamte Probenkarussell wird kurz bei 100g zentrifugiert um eventuelle Luftblasen zu eliminieren und um den Reaktionsansatz in den unteren Teil der Glaskapillare zu bringen.

Nach Einsetzen des Probenkarussells in den Light Cycler™ wird das Amplifikationsprogramm gestartet:

Tab.9: Amplifikationsprogramm

Prozess		Temperatur (°C)	Dauer (sek.)	Zyklenanzahl
Initiale	Denaturierung	95	600	1
Amplifikation	Denaturierung	95	10	40
	Abkühlen	50	15	
	Elongation	72	10	
Abkühlen		40	30	1

Die Gesamtdauer eines Programmdurchlaufs beträgt 45 Minuten.

#### 2.3.4.4 Light Cycler™ Sonden

Bei den Roche Sonden handelt es sich um keimspezifische Sonden. Die für die Amplifikation verwendeten Primer leiten sich von der Intronregion der jeweiligen Erreger. Hiermit wird sichergestellt, dass nur die DNA der Erreger amplifiziert wird, die der Fragestellung bzw. dem verwandten Kit entsprechen.

Die amplifizierte DNA wird mittels zweier Fluoreszenzsonden detektiert.

Diese Sonden bestehen aus zwei verschiedenen Olinukleotiden, die an eine spezifische Sequenz des amplifizierten Fragments binden, dies geschieht während der Abkühlphase der einzelnen Zyklen. Die beiden Sonden sind mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die eine Sonde am 5'-Ende mit LC Red 640, diese Sonde ist zusätzlich am 3'-Ende phosphoryliert um den Anbau weiterer Basen zu verhindern. Die andere Sonde ist am 3'-Ende mit Fluoreszein markiert.

Zu einer positiven Reaktion kommt es, wenn die Probe DNA des Erregers enthält für den das verwandte Kit spezifisch ist. In diesem Fall binden die Sonden an die Proben-DNA in einem Abstand von genau einer Base. Durch den engen Kontakt kommt es zwischen den beiden Farbstoffen zum Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Fluoreszein dient hierbei als Donor-Farbstoff, das Fluoreszein wird von der blauen Lichtquelle des Light Cyclers angeregt und strahlt darauf selbst Licht einer geringeren Wellenlänge ab. Dieses abgestrahlte Licht erregt dann seinerseits LC Red 640, der somit als Akzeptorfarbstoff fungiert und nun selber Licht emmetiert.

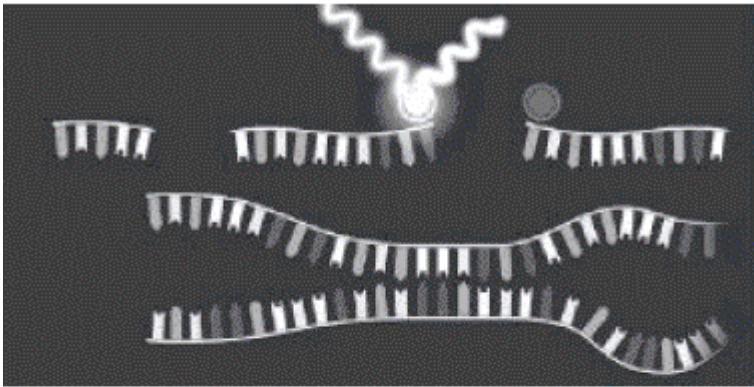


Dieser Energie-Transfer wird als „fluorescence resonance energy transfer“ (FRET-Effekt) bezeichnet; siehe Abbildung 5. Dieses Licht wird vom Light Cycler™ gemessen.

Das Fluoreszenzlicht wird während jedes einzelnen Zyklus gemessen. Somit kann die Zunahme des PCR-Produktes in Echtzeit verfolgt werden.

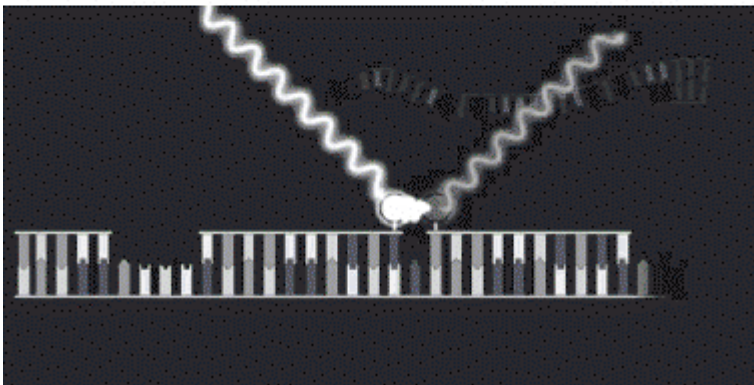
In der sich anschließenden Elongationsphase der PCR werden die beiden Sonden vom Einzelstrang verdrängt, sie sind nun zu weit von einander entfernt, so dass es zu keinem Energietransfer und somit zu keinem Signal mehr kommen kann. Auch während der Denaturierung eines jeden PCR-Zyklus findet keine Hybridisierung der Sonden mit dem DNA-Strang statt, so dass hier ebenfalls kein Signal gemessen wird.

Abb.6: FRET-Effekt



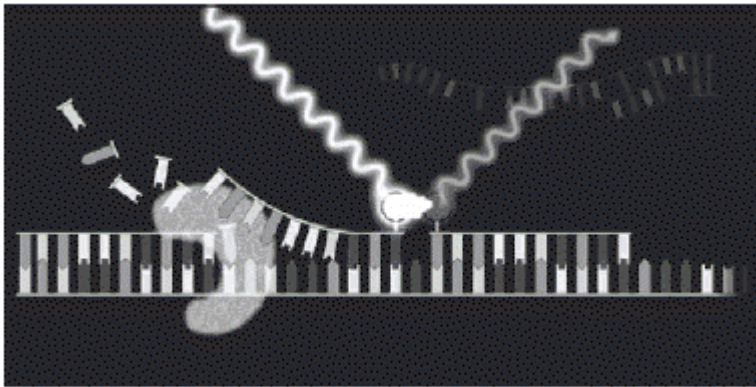
Denaturierung:

Die fluoreszenzmarkierten Sonden binden nicht an die DNA und befinden sich in keiner definierten Nähe zueinander.



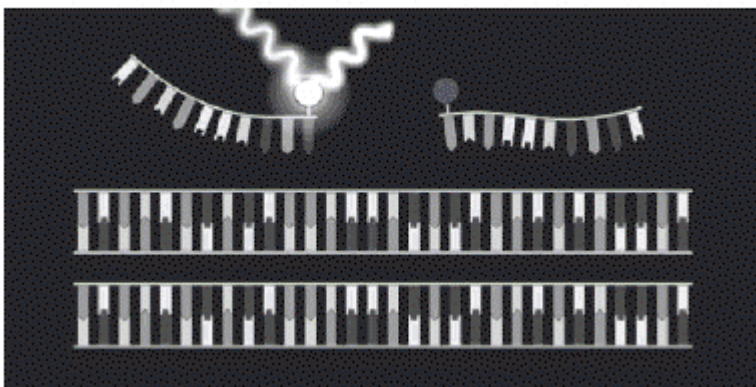
Abkühlung:

Die Sonden binden im Abstand von einer Base an den DNA-Strang. Es kommt zum FRET. Lichtemission kann gemessen werden.



Elongation:

Die Sonden werden wieder vom DNA-Einzelstrang verdrängt.



Nach Abschluß des PCR-Zyklus liegen die Sonden wieder frei vor.

Abbildung nach Roche Diagnostics Corporation Light Cycler™ operator's manual (2004)

#### 2.3.4.5 Schmelzkurvenanalyse

Die in den bakterienspezifischen-Kits enthaltenen Primer sind spezifisch für die jeweilige Bakterienart, binden jedoch universell an alle Spezies dieser Art. Das heißt, mit demselben Kit kann zum Beispiel sowohl *Staphylococcus aureus*, als auch *Staphylococcus haemolyticus* und *Staphylococcus epidermidis* amplifiziert werden.

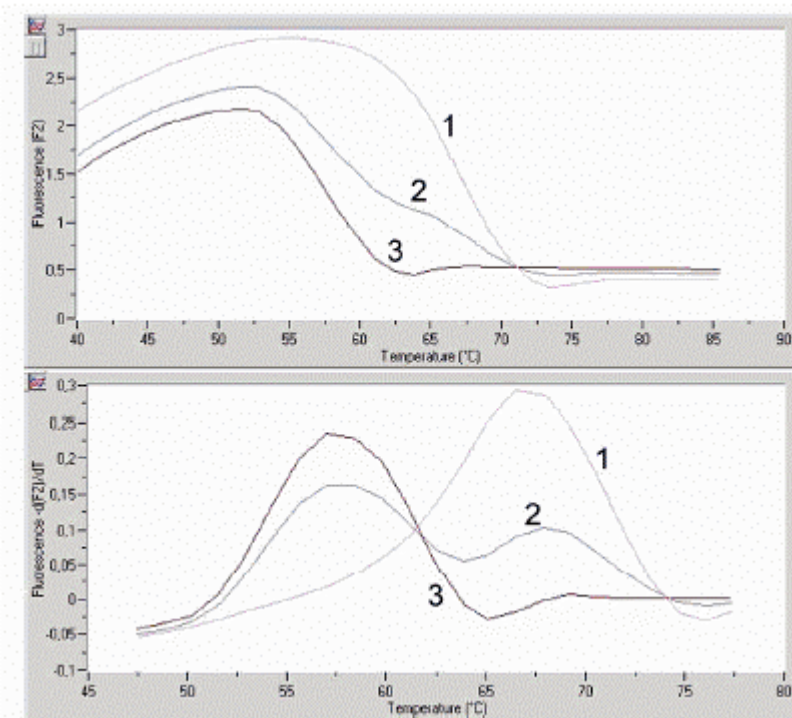
Zur genauen Speziesdifferenzierung wird deshalb im Anschluss an die Amplifikationszyklen eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Die eingesetzten Sonden hybridisieren mit den Amplifikaten, sie sind jedoch bei den einzelnen Spezies nicht in allen Basen komplementär und binden somit unterschiedlich stark an die Amplifikate. Das hat zur Folge, dass sie bei schrittweiser Erhöhung der Temperatur bei unterschiedlichen Temperaturen wieder vom Amplifikat abschmelzen.

Bei der Schmelzkurvenanalyse wird die Temperatur schrittweise von 50 °C auf 95 °C erhöht mit einer Geschwindigkeit von 0,2 °C / Sekunde. Mit steigender Temperatur trennen sich die DNA-

Doppelstränge, die Sonden schmelzen ab und es kommt zur Fluoreszenzabnahme. Die Signale werden kontinuierlich gemessen und spezifische Schmelzkurven werden errechnet.

Die Schmelzkurvenanalyse dient außerdem zur Unterscheidung zwischen spezifischem Produkt, Artefakten und Primerdimeren. Gerade Primerdimere entstehen häufig und können zu falsch positiven Werten führen, auf Grund ihrer geringen Länge jedoch trennen sie sich bei der Schmelzkurvenanalyse schon bei geringeren Temperaturen als die spezifischen Produkte und sind somit gut von ihnen zu unterscheiden. Abbildung 7 zeigt exemplarisch die Schmelzkurve einer Probe mit *B. anthracis*, 1 und 2 sind zwei verschiedene Wildtypen, 3 die Negativkontrolle.

Abb.7: Schmelzkurven



## 2.4 Materialien

### 2.4.1 Geräte

Light Cycler <sup>TM</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
MagNA Pure LC <sup>TM</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
Zentrifuge	Kendro Laboratory product, Osterode
Labofuge	Kendro Laboratory product, Osterode
Kühlschrank	Profi-line Liebherr, Oxenhausen
Gefrierschrank	Profi-line Liebherr, Oxenhausen
Eppendor-Pipetten	Eppendorf, Hamburg; Deutschland
Radio	Braun, Kronberg/Taunus

### 2.4.2 Verbrauchsmaterialien

EDTA-Monovetten ©	Sarstedt, Nurbrecht, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg; Deutschland
Pipettenspitzen (wattiert)	Eppendorf, Hamburg; Deutschland
Light Cycler <sup>TM</sup> -Glaskapillaren	Roche, Mannheim, Deutschland
Bactec Plus <sup>+</sup> Aerobic	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Ireland
Bactec Plus <sup>+</sup> Anaerobic	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Ireland
Bactec Plus <sup>+</sup> Mycosis	Becton, Dickinson and Company, Sparks, Ireland

### 2.4.3 Kits

Mag NA Pure LC <sup>TM</sup> DNA Isolation Kit III	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler <sup>TM</sup> Pseudomonas Kit M <sup>Grade</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler <sup>TM</sup> Enterococcus Kit M <sup>Grade</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler <sup>TM</sup> Staphylococcus Kit M <sup>Grade</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland
Light Cycler <sup>TM</sup> Candida albicans Kit M <sup>Grade</sup>	Roche, Mannheim, Deutschland



## 2.5 Statistische Methoden

Alle Analysen wurden mit dem Programm SPSS für Windows® (Version 12.01 deutsch; SPSS Inc., Chicago) durchgeführt. Zunächst wurden die Ergebnisse auf Normalverteilung geprüft: Lag keine Normalverteilung vor, wurden zur weiteren Auswertung verteilungsunabhängige Parameter (Median, Minimum(Min), Maximum(Max), 25 % Perzentile (unteres Quartil UQ) bzw. 75 % Perzentile (oberes Quartil OQ) verwendet.

Graphisch werden die Ergebnisse mit Boxplot-Wiskers-Diagrammen dargestellt. Dabei entspricht die untere Begrenzungslinie dem UQ und die obere dem OQ. Die Trennlinie stellt den Median dar. Die von der UQ-Linie nach unten bzw. von der oberen Linie nach oben gezogene Linie (Wiskers) erstrecken sich zu den Extrempunkten Min und Max, sofern die Extremwerte den zweifachen Quartilabstand nicht überschreiten. Über diese Abstände hinausgehende Ausreißer sind als Einzelmesspunkte dargestellt.

### Mann-Whitney-U-Test

Für den Vergleich zweier unabhängiger Stichproben wurde der verteilungsfreie Mann-Whitney-U-Test verwendet. Der Test prüft auf Unterschiede hinsichtlich der zentralen Tendenz von Verteilungen. Die Nullhypothese besagt, daß in beiden Grundgesamtheiten die gleiche Verteilung herrscht.

#### 2.5.1 Analytische Verfahren

Bei allen analytischen Verfahren wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgesetzt, eine Übersicht über die Signifikanzniveaus zeigt Tabelle 10

Tabelle 10: Signifikanzniveaus

Irrtumswahrscheinlichkeit p	$\geq 0,05$	$< 0,05$	$< 0,01$	$< 0,001$
Bedeutung	nicht signifikant	signifikant	sehr signifikant	hoch signifikant

Signifikanzniveaus nach Krentz (2002)

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung des Gesamtpatientenkollektiv

An der Studie nahmen insgesamt 87 Patienten teil. Auf Grund teilweise schwerer Erkrankungen und längerer Liegezeiten auf der Intensivstation kam es dazu, dass Patienten vereinzelt mehrfach in die Studie aufgenommen wurden. Dies geschah immer dann, wenn bei den Patienten zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutkulturen abgenommen wurden, sie also nicht demselben Fieberanstieg entstammen. Eine Übersicht über das Patientenkollektiv und deren Hauptdiagnosen gibt Tabelle 11.

Tabelle 11: Gesamtpatientenkollektiv und Hauptdiagnosen

Probe	Alter	Geschlecht	Hauptdiagnose
1	71	w	inf. Bypass re OS/US
2	46	m	Sepsis
3	45	w	retrop. Hämatom
4	62	m	Mitral u. Aortenklappenersatz
5	38	m	Polytrauma
6	45	w	retrop. Hämatom
7	72	w	Colonperforation
8	46	m	Sepsis
9	51	w	Liposarkomrezidiv
10	68	m	V.a. Urosepsis
11	68	m	V.a. Urosepsis
11.2	68	m	V.a. Urosepsis
12	24	m	Leberruptur
13	21	m	Pneumonie li mit Empyem
14	21	m	Pneumonie li mit Empyem
15	65	w	Fasziitis
16	78	m	Pneumonie
17	65	w	Fasziitis
18	68	m	V.a. Urosepsis
19	42	m	Dekortikation
20	42	m	Dekortikation
21	46	m	Pneumonie
22	65	w	Fasziitis

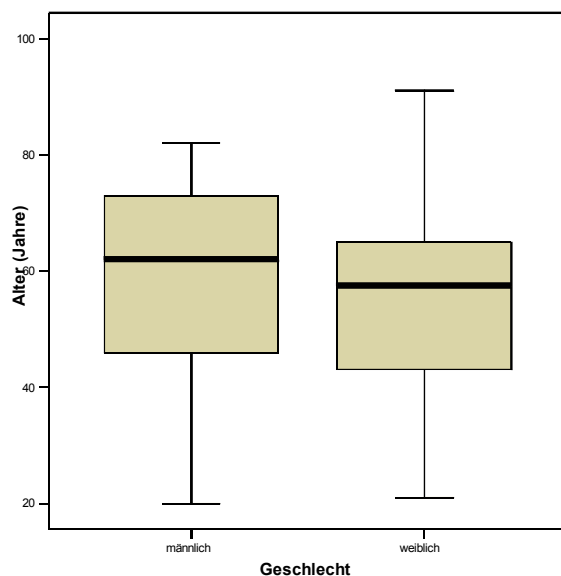
23	65	w	Fasziitis
24	46	m	V.a. Urosepsis
25	44	w	V.a. Urosepsis
25.2	44	w	V.a. Urosepsis
25.3	44	w	V.a. Urosepsis
26	45	w	Meningitis
27	59	w	Phäochromozytom li
27.2	59	w	Phäochromozytom li
27.3	59	w	Phäochromozytom li
28	47	m	Polytrauma
28.2	47	m	Polytrauma
28.3	47	m	Polytrauma
29	71	m	retrotracheale Blutung
30	76	m	BAA
30.2	76	m	BAA
30.3	76	m	BAA
31	80	m	nekr. Fasziitis
32	52	m	femorl. Bypass
33	34	m	Sepsis
34	51	w	offenes sep. Sternum
35	31	w	akute resp. Insuff.
36	82	m	obere GI _Blutung
37	20	m	Polytrauma
38	68	w	Polytrauma
39	42	w	Urollithiasis
40	80	m	Hüft-TEP
41	65	w	Hemicolektomie
42	80	m	Hüft-TEP
43	47	w	Pankeaskopf-CA ( Whipple)
44	57	w	Illeus
45	44	m	Pankreatitis
46	50	m	Hodentumor
47	62	w	Milzhämatom
48	67	w	Z.n. Whipple
49	77	m	sigmo-vesikale Fistel
50	24	w	Kardiomyopathie
51	44	m	nekr. Pankreatitis
52	21	w	Polytrauma
52.1	21	w	Polytrauma
53	21	w	Polytrauma

54	63	m	Kniegelenksemphysem
55	61	w	hypovol. Schock
56	38	w	Ovarial-Cystadenom
57	38	w	Ovarial-Cystadenom
58	77	m	sigmo-vesikale Fistel
60	61	w	hypovol. Schock
61	81	m	AKE
62.1	58	w	Papillenadenom
62.2	58	w	Papillenadenom
62.3	58	w	Papillenadenom
63	39	w	V.a. Urosepsis
64	48	m	Mundboden CA
65	65	w	Aspiratinspneumonie
66	75	m	Dünndarmilleus
67	75	m	Dünndarmilleus
68	66	m	Pneumonie
69	60	m	akut nekr. Pankreatitis
70	30	m	V.a. SIRS
71	32	m	lobärpneumonie bds
72	57	m	Mesenterialinfarkt
73	57	m	Embolektomie bei Verschluss A. fem. Re
74.1	73	m	Bypass
74.2	73	m	Bypass
74.3	73	m	Bypass
75	64	m	akute nekrotisierende Pankreatitis
76	71	m	atraumatische Milzruptur
77	55	m	Nierentumor
78	66	w	resp. Insuffizienz bei Blutung im NRR
79	75	w	BAA
80	91	w	akutes Abdomen Z. n. exp. Laparotomie
81	69	m	Lungenödem
83	72	m	akutes Abdomen
84	41	m	NN-Tumor, Tumorthrombose der V.Cava
85	48	w	abdominale Blutung
86	64	m	respiratorische Insuffizienz
87	59	m	Z.n. Reanimation
88	59	m	Z.n. Reanimation
89	28	w	OLTX bei Budd-Chiari

### 3.1.1 Alter und Geschlecht des Gesamtpatientenkollektivs

Von den 87 Patienten waren 37 (42,5 %) weiblichen Geschlechts und 50 Patienten (57,5 %) männlichen Geschlechts. Das mediane Alter der Patienten betrug 59 Jahre. Der jüngste Patient war 20 Jahre, der älteste 91 Jahre (Abbildung 8).

Abbildung 8: Patientenalter zum Zeitpunkt der Probenentnahme (untersuchte Proben n=101)



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.1.2 Physiologische Parameter des Gesamtpatientenkollektivs

Die Bewertung des Gesundheitszustandes, beziehungsweise die Abschätzung der Organfunktion der Patienten erfolgte mit Hilfe der Erhebung physiologischer Parameter.

Die Auswertung zeigte, daß der Median für Thrombozyten mit 201 G/l, für Gesamtbilirubin mit 0,9 mg/dl, Harnstoff mit 38 mg/dl, Kreatinin mit 1 mg/dl, GOT mit 13 U/l sowie für den pH-Wert mit 7,4 im Normbereich der jeweiligen Parameter lagen. Geringfügig über dem Normbereich liegende Mediane zeigten sich für Leukozyten mit 10,8 G/l sowie für den Blutzucker mit 120 mg/dl. Deutlicher erhöht zeigten sich der Median für Temperatur mit 38,9 °C.

Unterhalb des Referenzbereichs lagen der Hb mit 9,8 g/dl und der Hkt mit 29%.

Tabelle12: Erhobene physiologische Parameter (untersuchte Proben n=101)

	Thrombozyten (G/l)	Leukozyten (G/l)	Hb (g/l)	Hkt (%)
Median	201	10,8	9,8	29
Min/Max	11/606	0,6/32,6	6,8/13	4/37
UQ/OQ	119,5/310	7,3/15,6	8,4/10,7	26/32

	Gesamtbilirubin (mg/dl)	Harnstoff (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	GOT (U/l)
Median	0,9	38	1	13
Min/Max	0,16/16,5	4/227	0,3/4,9	2/375
UQ/OQ	0,5/2,4	27/57,5	0,7/1,4	9/20,2

	Temperatur °C	pH	BZ (mg/dl)
Median	38,9	7,4	120
Min/Max	35/40,1	7,063/7,590	67/289
UQ/OQ	38,1/39,3	7,37/7,44	104/159,2

### 3.1.3 Berechnete Scores des Gesamtpatientenkollektivs

Aus den dokumentierten Patientendaten sind zur Abschätzung der Organfunktion, Bewusstseinslage und der Erkrankungsschwere der GCS, APACHE 2, SAPS 2 und der SOFA berechnet worden. 31 mal konnten SAPS 2 und SOFA nicht berechnet werden, da kein Oxigenierungsquotient berechnet werden konnte (Berechnung SAPS 2 und SOFA siehe 2.2.2.). Der Grund dafür liegt darin, dass 24 Patienten nicht beatmet waren, wegen der teilweisen Mehrfachaufnahme von Patienten in die Studie (siehe 3.2) kommt es zum Fehlen dieser 31 Werte.

13 mal konnte der APACHE 2 nicht berechnet werden, da bei 6 Patienten keine Atemfrequenz dokumentiert worden ist, auf Grund der Mehrfachaufnahme (siehe oben) kommt es zum Fehlen der 13 Werte.

Die Patienten hatten im Median einen SAPS 2 von 45, einen SOFA von 9, einen APACHE 2 von 17 und einen GCS von 10.

Tabelle 13: Berechnete Scores des Gesamtpatientenkollektivs

	SAPS 2	SOFA	APACHE 2	GCS
Median	45	9	17	10
Min/max	15/84	2/20	1/35	3/15
UQ/OQ	33/58	6/13	13/23	6/15
n=	70	70	88	101

### 3..4 Antibiotische und antimykotische Therapie des Gesamtpatientenkollektivs

#### 3.1.4.1 Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

85 der Patienten erhielten zum Zeitpunkt der Probenentnahme Antibiotika, so dass 98 % aller Proben unter antibiotischer Therapie abgenommen wurden. Lediglich zwei Patienten, nämlich Probe Nummer 9 und 23 erhielten keine Antibiotika.

Die Patienten erhielten im Median seit 3 Tagen Antibiotika.

#### 3.1.4.2 Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Die Patienten erhielten im Median eine Kombinationstherapie aus 3 Präparaten, maximal wurden 6 Präparate kombiniert.

#### 3.1.4.3 Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Zusätzlich zur antibiotischen Therapie wurden 12 Patienten antimykotisch therapiert, so dass 11,9 % aller Proben unter antimykotischer Therapie abgenommen wurden. Antimykotika erhielten die Proben Nummer 1,12,22,38,49,51,55,60,69,77,85 und 86.

Die Patienten erhielten im Median seit 6 Tagen Antimykotika. Alle Patienten erhielten als Antimykotikum Fluconazol (Diflucan®).

Alle Patienten erhielten außerdem unabhängig von ihrer Grunderkrankung dreimal täglich eine Pipette Amphotericin B Suspension als Prophylaxe.

Tabelle 14: Antibiotische und antimykotische Therapie des Gesamtpatientenkollektivs

	Antibiotika seit x Tagen	Antibiotikakombinationen x Präparate	Antimykotika seit x Tagen	Antimykotika x Präparate
Median	3	2	6	1
Min/Max	1/20	1/6	1/20	1/1
UQ/OQ	2/5,5	2/3	3/10,5	1/1
n=	99	99	12	12

### 3.2 Aufteilung in Subkollektive und deren Vergleich

Nach der statistischen Auswertung des Gesamtkollektivs erfolgte eine Aufteilung in Subkollektive an Hand der Nachweisergebnisse.

Zuerst erfolgte die allgemeine Aufteilung der Proben in eine negativ und eine positiv befundene Gruppe (siehe Tabelle 10), wobei nicht unterschieden wurde ob der positive Erregernachweis mittels PCR oder Mikrobiologie gelungen ist. 86 der Proben erbrachten keinen Erregernachweis, 15 Proben erbrachten einen Erregernachweis.

Verglichen wurden die beiden Gruppen, positiver Befund gegenüber negativem Befund, in den Parametern: Alter, Geschlecht, physiologische Parameter (siehe 3.2.2.), Score-Systeme, antibiotische und antimykotische Therapie.

Nach Testung auf Normalverteilung wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung des Signifikanzniveaus der oben genannten Parameter benutzt.



Tabelle 15: Aufteilung nach positivem und negativem Erregernachweis

Nachweis	positiv	negativ
n=101	15	86

In einem zweiten Schritt erfolgte die Aufteilung der positiv befundeten Proben an Hand der Nachweismethode.

Verglichen wurden die Proben, die in der Mikrobiologie einen positiven Befund erbracht haben mit denen, die in der PCR positiv waren (siehe Tabelle 11). Bei 11 Proben erfolgte der Erregernachweis mit Hilfe der Mikrobiologie, 4 Proben erbrachten einen positiven Befund in der PCR.

Verglichen wurden die beiden Gruppen, positiver Befund Mikrobiologie gegenüber positiver Befund PCR in den Parametern: Alter, Geschlecht, physiologische Parameter (siehe 3.2.2.), Score-Systeme, antibiotische und antimykotische Therapie.

Nach Testung auf Normalverteilung wurde der parameterfreie Mann-Whitney-U-Test zur Berechnung des Signifikanzniveaus der oben genannten Parameter benutzt.

Tabelle 16: Aufteilung der positiven Befunde an Hand der Nachweismethode

Methode	positiv	negativ
Mikrobiologie n=101	11	90
Echtzeit-PCR n=101	4	97

### 3.2.1 Alter und Geschlecht der Subkollektive

#### 3.2.1.1 Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs

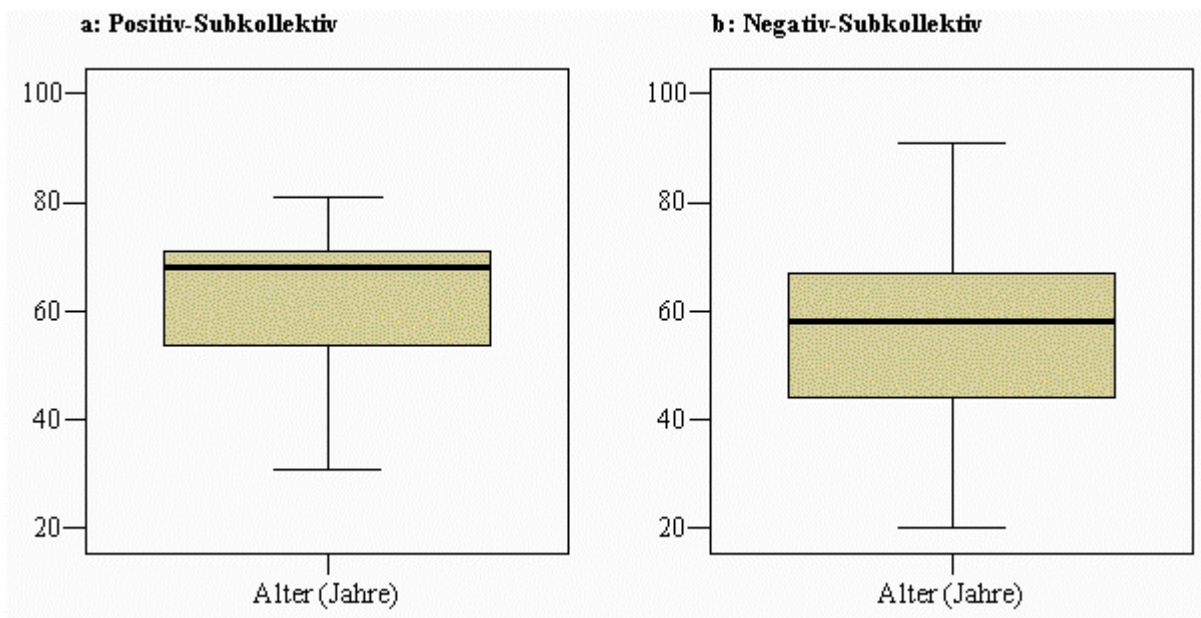
Das Positiv-Subkollektiv umfaßt eine Gruppe von 15 Patienten und 15 Proben, das Negativ-Subkollektiv umfaßt eine Gruppe von 72 Patienten und 86 Proben (Mehrfachteilnahme von Patienten siehe 3.2.).

Von den 15 Patienten des Positiv-Subkollektivs waren 3 (20%) weiblichen und 12 (80%) männlich Geschlechts. Das Negativ-Subkollektiv teilte sich auf in 34 (47,3%) weibliche und 38 (52,7%) männliche Patienten.

Das mediane Alter des Positiv-Subkollektivs betrug 68 Jahre, der jüngste Patient war 31 und der Älteste 81 Jahre alt. Im Negativ-Subkollektiv lag der Median bei 58 Jahren Jahren, der jüngste Patient war 20 Jahre der Älteste 91.

Hinsichtlich des Alters gab es keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,074$ ) bezüglich der beiden Subkollektiv.

Abbildung 9 a+b: Patientenalter Positiv- und Negativ-Subkollektivs



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.1.2 Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

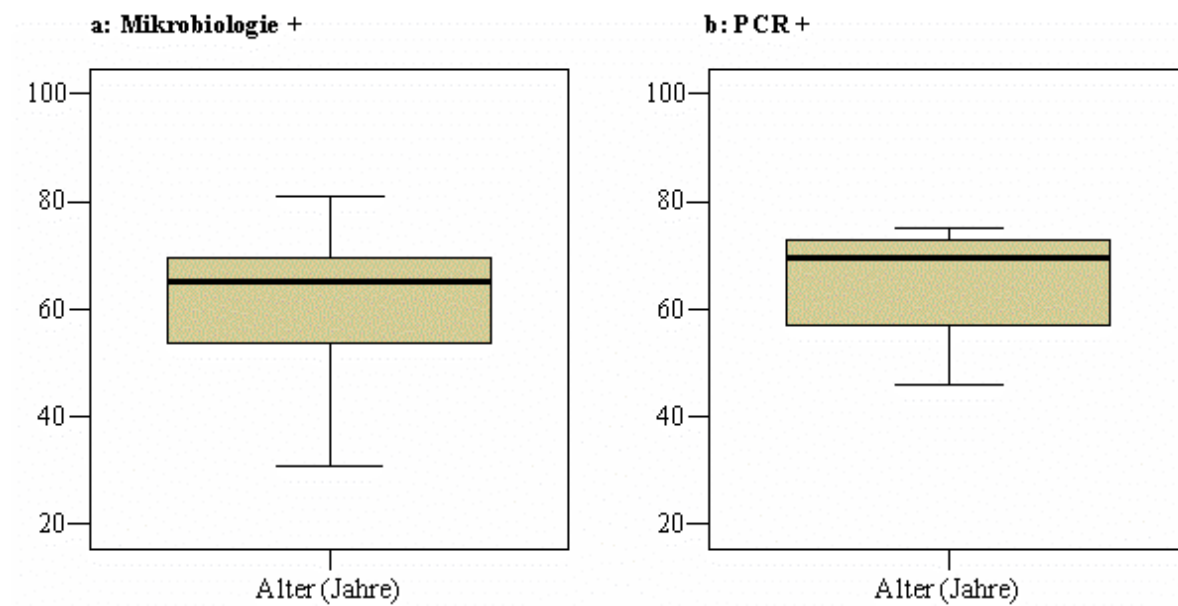
Das Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektiv besteht aus 4 Patienten und 4 Proben, das PCR<sup>+</sup> Subkollektiv umfaßt 11 Patienten und 11 Proben.

Von den 11 Patienten des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektiv waren 3 (27,3%) weiblichen und 8 (72,7%) männlich Geschlechts. Das PCR<sup>+</sup> Subkollektiv bestand ausschließlich aus Männern.

Die Patienten des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektiv hatten im Median ein Alter von 65 Jahre, der jüngste Patient war 31, der Älteste 81 Jahre. Im PCR<sup>+</sup> Subkollektiv betrug der Median 70 Jahre, der jüngste Patient war 46 der Älteste 75.

Hinsichtlich des Alters gab es keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,661$ ) bezüglich der beiden Subkollektiv.

Abbildung 10 a+b: Patientenalter Mikrobiologie<sup>+</sup> und PCR<sup>+</sup>



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.2 Physiologische Parameter der Subkollektive

#### 3.2.2.1 Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs

Die Auswertung der physiologischen Parameter des Positiv-Subkollektivs zeigte, daß der Median für Thrombozyten mit 171 G/l, Leukozyten mit 8,6 G/l, Harnstoff mit 44 mg/dl, Kreatinin mit 1,4 mg/dl, den pH-Wert mit 7,384 sowie für GOT mit 11 U/l im Normbereich der jeweiligen Werte lagen. Oberhalb des Referenzbereichs lagen die Werte für Temperatur mit 38,7 °C, den Blutzucker mit 134 mg/dl und das Gesamtbilirubin mit 1,11 mg/dl. Der Median für den Hb mit 9,1 mg/dl sowie den Hkt mit 28 % lag unterhalb des für die Werte angegebene Referenzbereich.

Im Negativ-Subkollektiv zeigte sich, daß die Werte für Thrombozyten mit 203 G/l, Harnstoff mit 38 mg/dl, Kreatinin mit 0,97 mg/dl, den pH mit 7,402 sowie GOT mit 13 U/l im Normbereich der jeweiligen Parameter lagen. Leicht erhöht waren die Leukozyten mit 10,85 G/l sowie der Blutzucker mit 120 mg/dl, deutlich erhöht war die Temperatur mit 38,9 °C. Unterhalb des Referenzbereichs lagen der Hb mit 9,9 g/dl und der Hkt mit 29 %.

Die Berechnung des Signifikanzniveaus der einzelnen physiologischen Parameter zeigte, daß es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der einzelnen Parameter bezüglich des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs gab.

Tabelle 17: Vergleich der physiologischen Parameter des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs

Proben		Thrombozyten (G/l)	Leukozyten (G/l)	Hb (g/dl)	Hkt (%)
positiv n=86	Median	171	8,6	9,1	28
	Min/Max	30/606	6/19,7	7,8/12	3,7/34
	UQ/OQ	113/432	7,3/14,8	8,4/10,3	25/31
negativ n=15	Median	203	10,85	9,9	29
	Min/Max	11/557	0,6/32,6	6,8/13	20/37
	UQ/OQ	123,3/309	7,4/16,4	8,4/10,7	26/32
p-Wert*		0,681	0,379	0,576	0,26

Proben		Gesamtbilirubin (mg/dl)	Harnstoff (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	GOT (U/l)
positiv n=86	Median	1,11	44	1,4	11
	Min/Max	0,16/3,9	4/227	0,31/4,9	7/34
	UQ/OQ	0,64/2,77	23/66	0,6/2	12601
negativ n=15	Median	0,8	38	0,97	13
	Min/Max	0,19/16,5	9/159	0,28/4,17	2/375
	UQ/OQ	0,51/2,27	27/57	0,72/1,28	9/13
p-Wert*		0,695	0,674	0,293	0,332
Proben		Temperatur °C	pH	BZ (mg/dl)	
positiv n=86	Median	38,7	7,384	134	
	Min/Max	35,4/40,1	7,22/7,5	72/222	
	UQ/OQ	38,2/39,7	7,34/7,42	104/173	
negativ n=15	Median	38,9	7,402	120	
	Min/Max	35/40	7,063/7,590	67/289	
	UQ/OQ	38/39,3	7,37/7,44	104/158	
p-Wert*		0,579	0,252	0,496	

\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test

### 3.2.2.2 Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

Die Auswertung des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektivs zeigte, daß der Median für Thrombozyten mit 171 G/l, Leukozyten mit 8,8 G/l, pH-Wert mit 7,384 und GOT mit 11 U/l innerhalb der Normbereiche der jeweiligen Werte lagen, leicht erhöht waren Harnstoff mit 51 mg/dl und das Gesamtbilirubin mit 1,03 mg/dl. Deutlich über die Norm erhöhte Werte zeigten sich für Kreatinin mit 1,61 mg/dl, die Temperatur mit 39 °C, den Blutzuckerspiegel mit 134 mg/dl. Die Werte für Hb mit 9,1 g/dl sowie den Hkt mit 28 % waren unter die Norm erniedrigt.

Für das PCR<sup>+</sup> Subkollektiv zeigte sich, daß der Median für Thrombozyten mit 380 G/l, Leukozyten mit 8,3 G/l, Harnstoff mit 34,5 mg/dl, Kreatinin mit 0,91 mg/dl und GOT mit 11 U/l im Normbereich der jeweiligen Werte lagen. Deutlich erhöht waren die Werte für die Temperatur mit 38,6 °C, den Blutzuckerspiegel mit 136 mg/dl und das Gesamtbilirubin mit 1,48 mg/dl. Unterhalb des Normbereichs lagen der Hb mit 9,2 g/dl und der Hkt mit 25 %.

Die Berechnung des Signifikanzniveaus der einzelnen physiologischen Parameter zeigte, daß es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der einzelnen Parameter bezüglich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs gab.

Tabelle 18: Vergleich der physiologischen Parameter des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

Proben		Thrombozyten (G/l)	Leukozyten (G/l)	Hb (g/dl)	Hkt (%)
Mikrobiologie positiv n=11	Median	171	8,8	9,1	28
	Min/Max	30/549	6/17,2	7,8/11,8	24/34
	UQ/OQ	88/348	7,1/14,8	8,4/10,3	27/33
PCR positiv n=4	Median	380	8,4	9,2	25
	Min/Max	126/606	7,3/19,7	7,9/12	3,7/29
	UQ/OQ	137/601	7,5/16,9	8/11,4	8,7/28
p-Wert*		0,226	0,949	0,949	0,949

Proben		Gesamtbilirubin (mg/dl)	Harnstoff (mg/dl)	Kreatinin (mg/dl)	GOT (U/l)
Mikrobiologie positiv n=11	Median	1	51	1,61	11
	Min/Max	0,31/3,95	12/227	0,51/4,9	8/34
	UQ/OQ	0,64/2,93	23/66	0,62/2	8/20
PCR positiv n=4	Median	1,5	31,5	0,91	11
	Min/Max	0,16/2,27	4/227	0,31/4,4	7/15
	UQ/OQ	0,39/2,5	10/179	0,46/3,5	8/14
p-Wert*		0,753	0,489	0,571	0,753

Proben		Temperatur °C	pH	BZ (mg/dl)
Mikrobiologie positiv n=11	Median	39	7,384	134
	Min/Max	35,4/40,1	7,22/7,45	72/222
	UQ/OQ	35,4/40,1	7,22/7,45	72/222
PCR negativ n=4	Median	38,6	7,415	136
	Min/Max	38,3/39,4	7,3/7,5	116/222
	UQ/OQ	38,3/39,2	7,31/7,41	116/205
p-Wert*		0,949	0,412	0,571

\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test

### 3.2.3 Berechnete Scores der Subkollektive

#### 3.2.3.1 Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs

Für das Positiv-Subkollektiv konnte SAPS 2 und SOFA 31 mal nicht berechnet werden, da kein Oxigenierungsquotient berechnet werden konnte (Berechnung SAPS 2 und SOFA siehe 2.2.2.), 3 mal konnte der APACHE 2 nicht berechnet werden, da bei 3 Patienten keine Atemfrequenz dokumentiert worden ist.

Die Patienten des Positiv-Subkollektivs hatten im Median einen SAPS 2 von 43, einen SOFA von 9, einen APACHE 2 von 17 und einen GCS von 11.

SAPS 2 und SOFA konnten 28 mal für das Negativ-Subkollektiv nicht berechnet werden, da kein Oxigenierungsquotient berechnet werden konnte (Berechnung SAPS 2 und SOFA siehe 2.2.2.) weil 21 Patienten nicht beatmet waren. Auf Grund der Mehrfachaufnahme von Patienten in die Studie (siehe 3.2) kommt es zum Fehlen der 28 Werte.

Die Patienten des Negativ-Subkollektivs hatten im Durchschnitt einen SAPS 2 von 48, einen SOFA von 9, einen APACHE 2 von 17 und einen GCS von 9.

Die Berechnung des Signifikanzniveaus bezüglich des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs hinsichtlich SAPS 2 ( $p = 0,143$ ), SOFA ( $p = 0,535$ ), APACHE 2 ( $p = 0,379$ ) und GCS ( $p = 0,296$ ) zeigten keinen signifikanten Unterschied.

Tabelle 19: Vergleich der berechneten Scores des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs

Proben		SAPS 2	APACHE 2	SOFA	GCS
positiv	Median	43	17	9	11
	Min/Max	16/76	11/34	3/18	3/15
	UQ/OQ	25/52	13/25	6/13	9/15
	n=	12	14	12	15
negativ	Median	45 +/- 14,7	17 +/- 6	10 +/- 4,3	10 +/- 4,5
	Min/Max	15/78	6/35	2/20	3/15
	UQ/OQ	36/59	13/23	6/13	6/15
	n=	58	74	58	86
	p-Wert*	0,143	0,379	0,535	0,296

\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test

### 3.2.3.2 Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

Für das Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektiv konnte SAPS 2 und SOFA 2 mal nicht berechnet werden, da kein Oxigenierungsquotient berechnet werden konnte (Berechnung SAPS 2 und SOFA siehe 2.2.2.).

Die Berechnung der Scores ergab für das Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektiv einen Median für SAPS 2 von 43 , SOFA von 10, APACHE 2 von 17 und eine GCS von 10.

Für das PCR<sup>+</sup> Subkollektivs konnten der SAPS 2 und SOFA 10 mal nicht berechnet werden, da kein Oxigenierungsquotient berechnet werden konnte (Berechnung SAPS 2 und SOFA siehe 2.2.2.). Wegen der fehlenden Dokumentation der Atemfrequenz konnte der APACHE 2 1 mal nicht berechnet werden.

Die Berechnung der Scores ergab für das PCR<sup>+</sup> Subkollektivs einen Median für SAPS 2 von 39, SOFA von 5, APACHE 2 von 19 und eine GCS von 12.

Es konnte kein signifikanter Unterschied hinsichtlich SAPS 2 ( $p = 0,727$ ), SOFA ( $p = 0,661$ ), APACHE 2 ( $p = 0,659$ ) und GCS ( $p = 0,661$ ) bezüglich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs festgestellt werden.

Tabelle 20: Vergleich der berechneten Scores des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

Proben		SAPS 2	APACHE 2	SOFA	GCS
Mikrobiologie positiv	Median	43	17	10	11
	Min/Max	16/84	11/34	3/18	3/15
	UQ/OQ	24/44	24/60	7/14	7/15
	n=	9	11	9	11
PCR negativ	Median	37 +/- 7,7	20 +/- 4,2	5 +/- 1,2	12 +/- 3,2
	Min/Max	28/43	17/25	4/6	9/15
	UQ/OQ	26/43	14/25	4/6	9/15
	n=	3	3	3	4
	p-Wert*	0,727	0,659	0,064	0,661

\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test



### 3.2.4 Antibiotische und antimykotische Therapie der Subkollektive

#### 3.2.4.1 Vergleich des Positiv- und Negativ-Subkollektivs

Tabelle 21: Übersicht über die antibiotische und antimykotische Therapie

Proben		Antibiotika seit x Tagen	Antibiotikakombinationen x Präparate	Antimykotika seit x Tagen	Antimykotika x Präparate
positiv n=15	Median	3,5	3	8	1
	Min/Max	1/16	2/5	4/12	1/1
	UQ/OQ	2/5	3/3	4/12	1/1
	n	14	14	2	2
negativ n=86	Median	3	3	5,5	1
	Min/Max	1/14	1/6	1/20	1/1
	UQ/OQ	1,5/4,3	3/3	2/9	1/1
	n	85	85	10	10
	p-Wert*	0,28	0,905	0,606	1

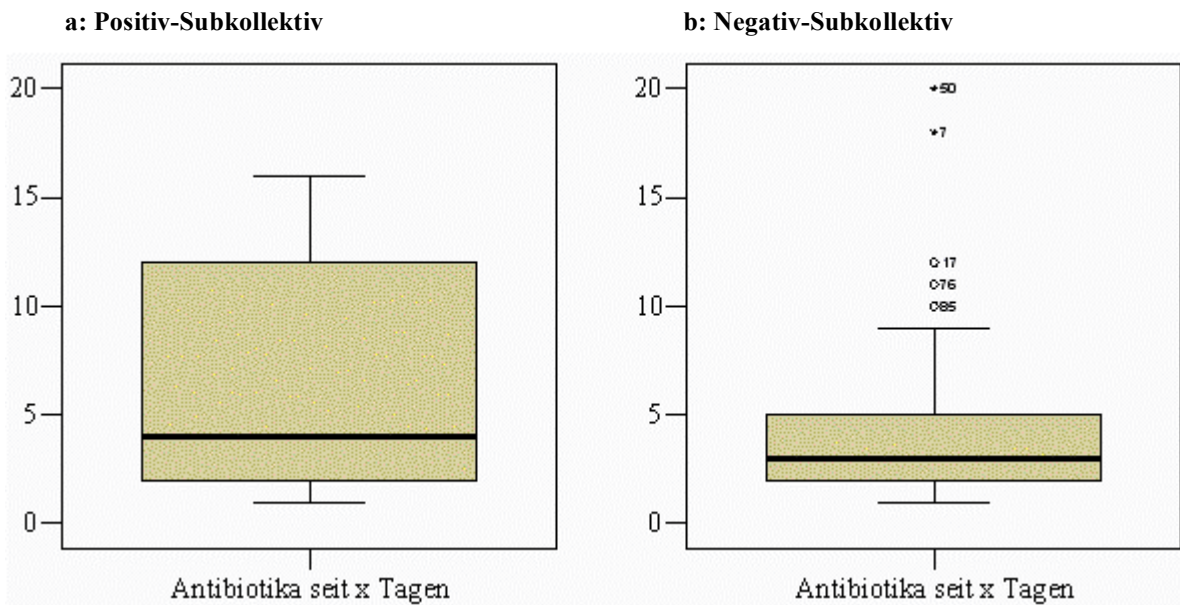
\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test

##### 3.2.4.1.1 Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Von den 15 Patienten des Positiv-Subkollektivs erhielten 14 Antibiotika, so daß 93 % der Proben unter Antibiotikatherapie abgenommen wurden. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme erhielten die Patienten im Median seit 3,5 Tagen Antibiotika. Im Negativ-Subkollektiv erhielten 85 der 86 Patienten Antibiotika wodurch 98, 8 % der Proben bei gleichzeitiger Antibiotikatherapie entnommen wurden. Im Median wurden die Patienten seit 3Tagen antibiotisch behandelt.

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,28$  zwischen den beiden Subkollektiven bezüglich der Dauer der antibiotischen Therapie.

Abbildung 11 a+b: Vergleich des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs



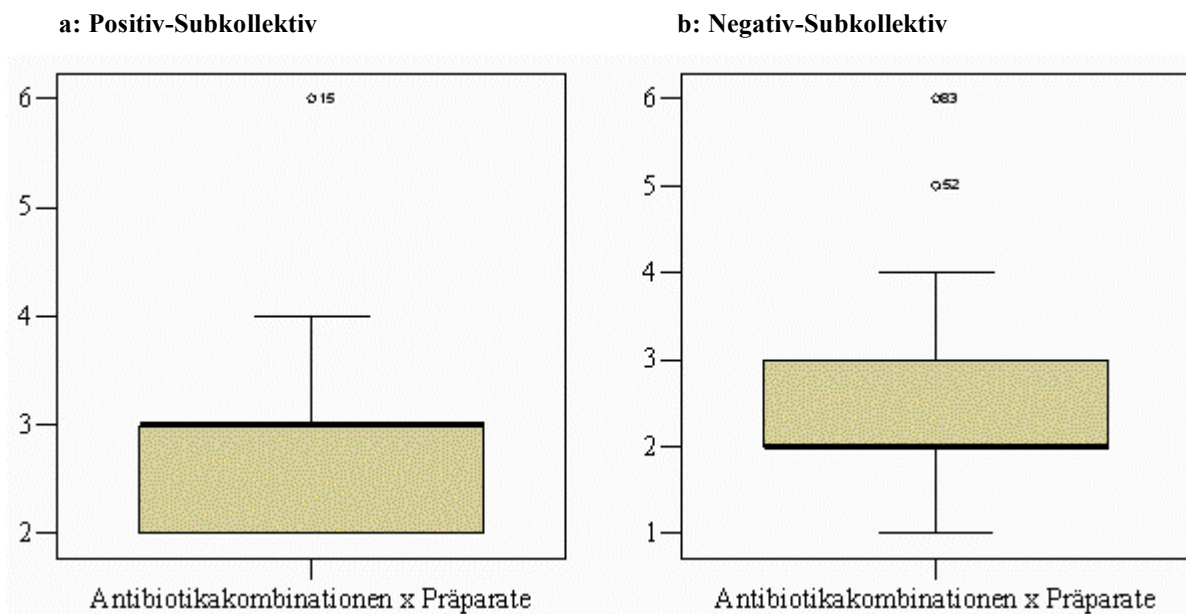
Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

#### 3.2.4.1.2 Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Die Patienten des Positiv-Subkollektivs erhielten im Median 3 Präparate, es wurden höchstens 5 Präparate kombiniert. Im Negativ-Subkollektiv erhielten die Patienten im Median 3 Präparate, höchstens 6 Präparate wurden kombiniert.

Das berechnete Signifikanzniveau mit  $p = 0,905$  zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl der kombinierten Antibiotika gibt.

Abbildung 12 a+b: Vergleich des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.4.1.3 Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

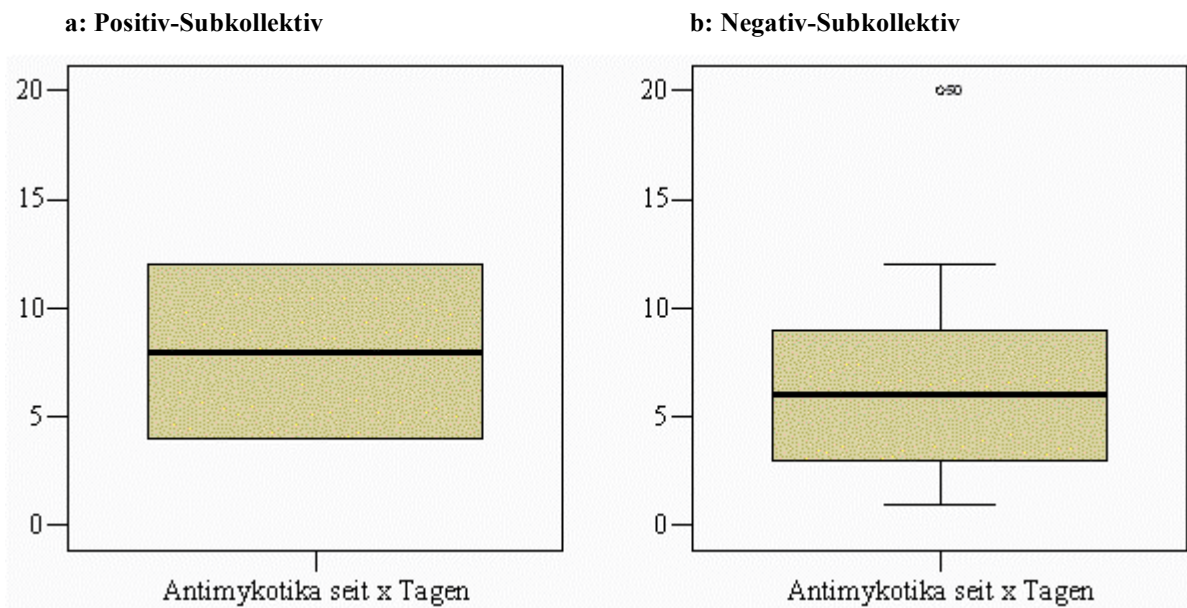
Zwei Patienten des Positiv-Subkollektivs erhielten Antimykotika und zwar im Median seit 8 Tagen, 11 der 86 Patienten des Negativ-Subkollektivs wurden im Median seit 5,5 Tagen antimykotisch therapiert. Alle Patienten des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs erhielten nur ein Antimykotikum und alle erhielten dasselbe, nämlich Fluconazol (Diflucan®).

Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,606$  zwischen den beiden Subkollektiven bezüglich der Dauer der antimykotischen Therapie.

Da immer dasselbe Antimykotikum verwandt wurde entfällt die Untersuchung nach einem signifikanten Unterschied bezüglich Antimykotikakombinationen.

Alle Patienten erhielten außerdem unabhängig von ihrer Grunderkrankung dreimal täglich eine Pipette Amphotericin B Suspension als Prophylaxe.

Abbildung 13 a+b: Vergleich des Positiv- und des Negativ-Subkollektivs



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.4.2 Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs

Tabelle 22: Übersicht über die antibiotische und antimykotische Therapie

Proben		Antibiotika seit x Tagen	Antibiotikakombinationen x Präparate	Antimykotika seit x Tagen	Antimykotika x Präparate
Mibi positiv n=11	Median	3,5	3	8	1
	Min/Max	2/8	3/5	4/12	1/1
	UQ/OQ	2/5	3/3	4/12	1/1
	n	10	10	2	2
PCR negativ n=4	Median	2,5	3		
	Min/Max	1/16	2/3		
	UQ/OQ	1/16	2/3		
	n	4	4	0	0
	p-Wert*	0,521	0,115		

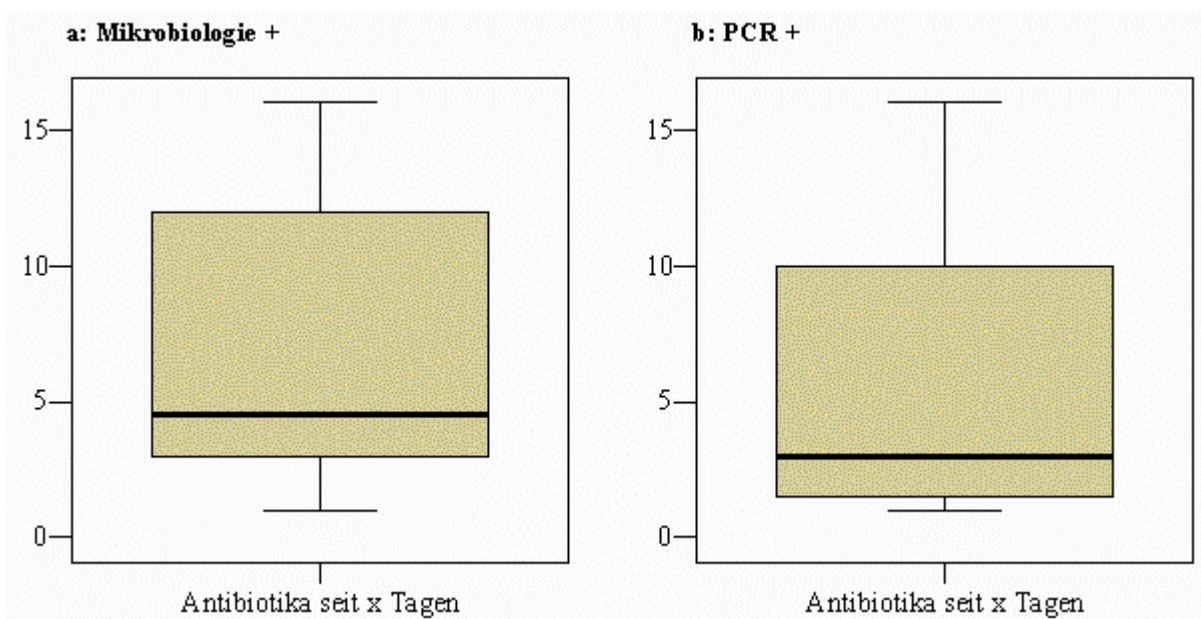
\*p-Wert: Mann-Whitney-U Test

### 3.2.4.2.1 Dauer der antibiotischen Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Von den 11 Patienten des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektivs erhielten 10 der 11 Patienten Antibiotika wodurch 91 % der Proben während einer antibiotischen Therapie abgenommen wurden. Die Patienten erhielten im Median seit 3,5 Tagen Antibiotika. Im PCR<sup>+</sup> Subkollektiv erhielten alle 4 Patienten Antibiotika, 100% der Proben wurden also unter Antibiotikagabe entnommen. Die Patienten erhielten im Median seit 2,5 Tagen Antibiotika.

Ein signifikanter Unterschied mit  $p = 0,28$  zwischen den beiden Subkollektiven bezüglich der Dauer der antibiotischen Therapie konnte nicht gezeigt werden

Abbildung 14 a+b: Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs



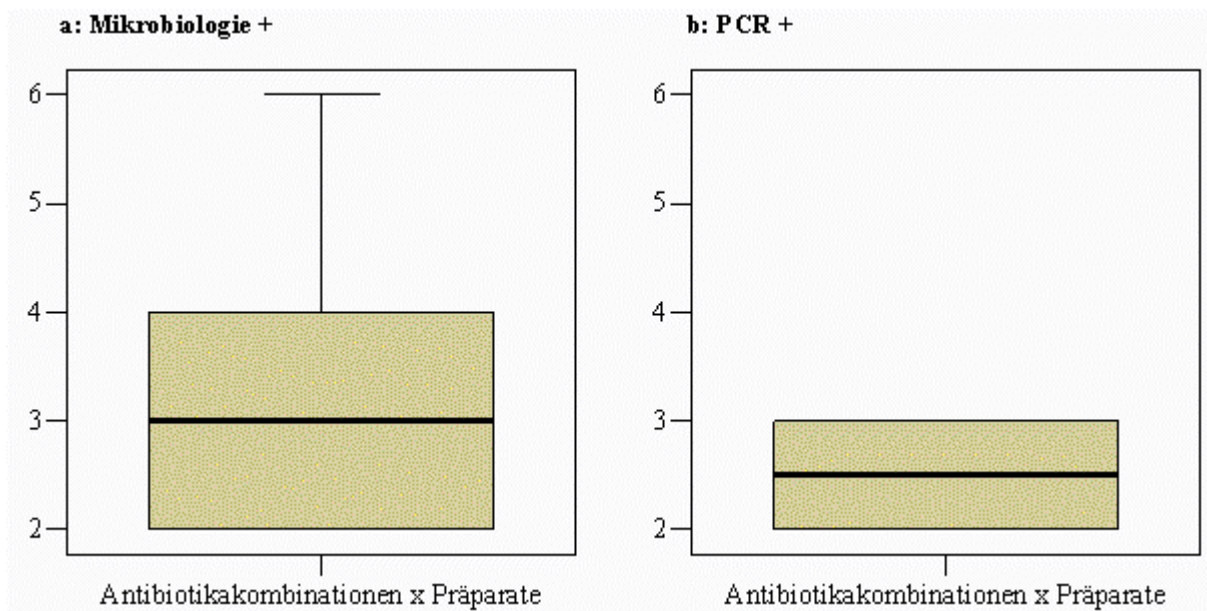
Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.4.2.2 Antibiotikakombinationen zum Zeitpunkt der Probenentnahme

Die Patienten des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektivs erhielten im Median eine Kombination von 3 Präparaten, es wurden höchstens 5 Präparate miteinander kombiniert. Im Median erhielten die Patienten des Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektivs 3 Präparate, es wurden höchstens 3 Präparate in dieser Gruppe kombiniert.

Bei einem Signifikanzniveau von  $p = 0,115$  zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subkollektiven bezüglich der Anzahl der kombinierten Antibiotika.

Abbildung 15 a+b: Vergleich des Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs



Der Strich innerhalb der Box entspricht dem Median, die durch die Box vorgegebenen Grenzen entsprechen der 25/75 Perzentile. Durch die Whiskers werden Minimum und Maximum angegeben.

### 3.2.4.2.3 Antimykotische Therapie zum Zeitpunkt der Probenentnahme

2 von 11 Patienten Mikrobiologie<sup>+</sup> Subkollektivs erhielten ein Antimykotikum, so daß 18,2 % der Proben unter antimykotischer Therapie entnommen wurden. Die Patienten erhielten im Median seit 8 Tagen ein Antimykotikum. Alle Patienten erhielten dasselbe Antimykotikum, Fluconazol (Diflucan®), Antimykotikakombinationen gab es nicht. Alle Patienten erhielten

außerdem unabhängig von ihrer Grunderkrankung dreimal täglich eine Pipette Amphotericin B Suspension als Prophylaxe.

Von den Patienten des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs erhielt keiner ein Antimykotikum, somit ist die Untersuchung nach einem signifikanten Unterschied bezüglich Antimykotika zwischen dem Mikrobiologie<sup>+</sup> und des PCR<sup>+</sup> Subkollektivs nicht möglich.

## 4 Diskussion

### 4.1 Nosokomiale Infektionen

Das Wort nosokomial leitet sich vom griechischen Wort für Krankenhaus *nosokomeion* ab. Von der CDC (Center of Disease Control) wird eine Infektion als nosokomial bezeichnet, wenn sie bei Aufnahme in ein Krankenhaus weder als Inkubation noch als manifeste Erkrankung besteht, jedoch nach 48-72 Stunden (Gamer et al. 1988). Nosokomiale Infektionen spielen in der heutigen Medizin eine große Rolle; die Medizin hat in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte gemacht und es wurden immer mehr invasive therapeutische und diagnostische Methoden entwickelt, die das Infektionsrisiko für den Patienten steigern. Generell können exogene von endogenen Infektionen unterschieden werden. Exogene Infektionen entstehen durch Aufnahme der Erreger aus der Umwelt des Patienten durch Kontakt mit anderen Personen oder kontaminierten Gegenständen oder Erregerhaltigen Umweltmedien wie Luft oder Wasser, als endogene Infektionen werden Infektionen durch die patienteneigene Flora bezeichnet. Die Prävalenz für nosokomiale Infektionen wird je nach Studienlage mit 3,5 bis 15 % angegeben (Gastmeier et al. 1998, Eggimann et al. 2000) die Prävalenz auf Intensivstationen liegt bei 15 bis 25 % (Hauer et al. 1996, Vincent et al 1995), rund 30 % aller nosokomialen Infektionen gelten als vermeidbar (Haley 1985). Die häufigsten Infektionen sind Harnwegsinfekte mit 42,1 %, Infektionen der unteren Atemwege mit 20,6 %, Wundinfektionen mit 15,8 % und Sepsis mit 8,3 % (Gastmeier et al., 1998). Neben der generellen gesundheitlichen Beeinträchtigung der Patienten führen nosokomialen Infektionen auch zu einer Verlängerung der Verweildauer im Krankenhaus, so verlängert sich zum Beispiel ein Intensivaufenthalt um 3 Tage bei Kathetersepsis oder um 6 Tage bei Pneumonie (Gastmeier et al. 2005) und führen in Deutschland zu Mehrkosten von 1,5 Milliarden Euro pro Jahr (Exner 2005). Ein weiteres Problem ist der vermehrte Einsatz von antibiotischen und antimykotischen Substanzen, die zur Entwicklung resistenter Keime führt So stieg der Anteil an Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Deutschland von 1,7 % 1990 auf 20,7 % im Jahr 2001 (Wille 2005), der Anteil Vancomycin-resistenter Enterokokken von 0,3 % 1989 auf 7,9 % 1993 (Rüden 1998). Eine wichtige Rolle bei der Vermeidung nosokomialer Infektionen spielen ein gut geschultes Personal, die Einhaltung der Hygienerichtlinien, Schaffung eines guten baulichen Umfeldes und die Erfassung nosokomialer



Infektionen. Seit 2001 regelt das Infektions Schutz Gesetz (IfSG) § 23 die Erfassung nosokomialer Infektionen. Krankenhäuser und Einrichtungen für ambulantes Operieren sind verpflichtet zur Erfassung und Bewertung bestimmter nosokomialer Infektionen sowie zur Erfassung von Erregern mit bestimmten Resistenzen und Multiresistenzen (Bundesgesundheitsblatt 2000). Die Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention macht auf Empfehlung des Robert-Koch Institut entsprechende Vorgaben. Tabelle 23 zeigt die nach § 23 Abs.1 zu erfassenden Erreger und die zu erfassenden Resistenzen.

Tabelle 23: Liste der zu erfassenden Erreger gem. § 23 Abs.1

Erregerspezies	zu erfassende Resistenz
S. aureus	Vancomycin, Oxacillin, Gentamicin, Chinolo Gr. IV, Teicoplanin, Quinupristin/Dalfopristin
S. pneumonuae	Vancomycin, Penicillin, Cefotaxim, Erythromycin, Chinolon Gr. IV
E. faecalis E. faecium	Vancomycin, Gentamicin ( "high level": Gentamicin 500 mg/l; Streptomycin 1000 mg/l (Mikrodil.) bzw. 2000 mg/l (Agardilution)) Teicoplanin; E. faecium: zusätzlich Quinupristin/Dalfopristin
E. coli Klebsiella spp.	Imipenen/Meropenem, Chinolon Gr. II, Amikacin, Ceftazidin, Piperacillin/Tazobactam, Cefotaxim oder analoge Testsubstanzen
Enterobacter cloacae Citerobacter spp. Serratia marcescens	Imipenen/Meropenem, Chinolon Gr. II, Amikacin
P aeruginosa A. baumannii	Imipenen/Meropenem, Chinolon Gr. II, Amikacin, Ceftazidin, Piperacillin/Tazobactam
S. maltophilia	Chinolon Gr. II, Amikacin, Ceftazidin, Piperacillin/Tazobactam, Cotrimoxazol
Candida spp.	Fluconazol

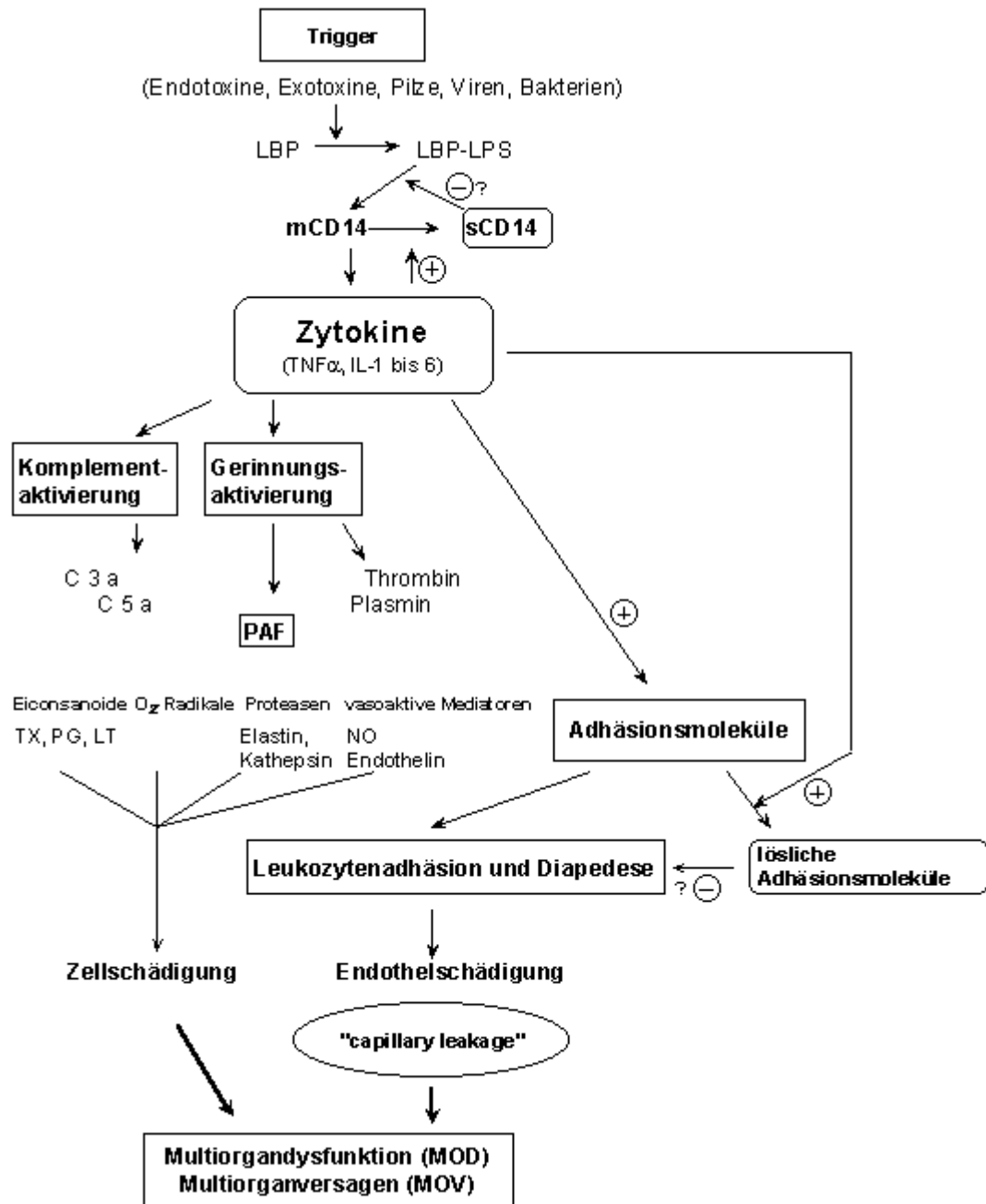
## 4.2 Sepsis

Sepsis stellt heute ein sehr häufiges Krankheitsbild dar, welches mit einer hohen Mortalität und enormen Kosten verbunden ist. Sepsis ist die Diagnose von 6-15 % aller Einweisungen auf die Intensivstation (Brun-Buisson et al., 1995), und macht 8,3 % der nosokomialen Infektionen aus (Gastmeier et al., 1998), die Mortalität der Sepsis und der schweren Sepsis ist mit 30-50 % sehr hoch (Angus et al., 2001, Bernard et al., 2001). Auf Grund der Schwere ist die mittlere Behandlungsdauer von septischen Patienten mit 17 Tage erheblich länger als die der anderen Patienten, wobei Überlebende im Schnitt vier Tage länger behandelt werden (Angus et al., 2001, Moerer et al., 2002). Die Behandlungskosten der Überlebenden liegen bei 22000 €, die der Verstorbenen sogar bei 25400 € (Moerer et al., 2002), Die direkten Kosten durch Medikamente, Routinelabore, Mikrobiologie, Einmalartikel, Unterkunft und Personal liegen bei 1,77 Milliarden Euro, hinzu kommen indirekten Kosten durch Produktivitätsverlust die auf 4,5 Milliarden Euro geschätzt werden; sodass durch Sepsis Gesamtkosten pro Jahr von 6,3 Milliarden Euro entstehen (AWMF-Leitlinie Nr.079/001, 2005). Die intensivmedizinische Behandlung einer Sepsis ist eine komplexe Therapie, die sich aus kausalen Therapiemaßnahmen wie der kalkulierten antimikrobiellen Chemotherapie und der Herdsanierung, supportiven Therapiemaßnahmen wie der Kreislaufstabilisierung, der mechanischen Beatmung, der Nierenersatztherapie und der Korrektur der gestörten metabolischen Homöostase sowie adjuvanten Therapiemaßnahmen zusammensetzt. Adjuvanten Therapiemaßnahmen sind Maßnahmen, die zusätzlich und parallel zur Standardtherapie einer Erkrankung angewandt werden (Reinhart et al., 2003)

## 4.3 Neue Therapiekonzepte

Die kausale Beteiligung pro-inflammatorischer Faktoren an der Genese einer Sepsis ist bekannt. Am Beginn steht das Einschwemmen von Erregern oder deren Toxinen in die Blutbahn; es kommt zum Kontakt mit Zellen des Immunsystems und zur Aktivierung von Mediatoren. Diese Mediatoren verstärken sich gegenseitig kaskadenartig (Vincent et al., 1992). Eine Übersicht über die Mediatorkaskade gibt Abbildung 16

Abb.:16 Mediatorkaskade nach Schuster (1996)



Eine überschießende Reaktion des Immunsystems wird durch gleichzeitige Ausschüttung spezifischer Antagonisten und Inhibitoren gestoppt (Christman 1992, Granowitz et al., 1991). Bei der Sepsis scheint ein Versagen der Inhibitionsmechanismen vorzuliegen (Pilz, Werdan; 1990).

In einer Vielzahl von Studien ist die Bedeutung einzelner Mediatoren als Diagnostikum bzw. die Blockade einzelner Mediatoren als Therapeutikum untersucht worden.

Bezüglich des TNF $\alpha$  konnten erhöhte Werte gemessen werden bei septischen Patienten (Simpson et al., 2000) bzw. Werte im oberen Grenzbereich bei Patienten, die im septischen Multiorganversagen verstorben sind (Borelli et al., 1996), es konnte jedoch keine Korrelation zwischen erhöhten TNF $\alpha$ -Werten und dem Outcome der Patienten gefunden werden bzw. keine Vorhersage über die Mortalität gemacht werden. Hinzu kommt die kurze Halbwertszeit des TNF $\alpha$  von 3-4 Stunden (Michie et al., 1989), die eine Bestimmung mehrmals täglich notwendig machen um Schwankungen sicher erkennen zu können (Michie et al., 1989) was im täglichen Routinebetrieb äußerst umständlich wäre.

Als guter Parameter für den Schweregrad einer Sepsis gilt Interleukin 6 (Yoshimoto et al., 1992, Vincent et al., 1992), die Höhe der gemessenen Werte korrelierte mit dem Outcome der Patienten nach Sepsis (Damas et al. 1989). Diese Werte müssen jedoch trotzdem kritisch bzw. im Kontext der Patientengeschichte gesehen werden, da erhöhte IL 6-Werte auch bei vielen anderen Stressreaktionen, Trauma oder postoperativ gemessen werden ( Oka et al.,1992, Taylor et al., 1997).

Im Rahmen klinischer Studien wurde der Einsatz von Anti-Zytokinen zur Therapie der Sepsis untersucht; eine Reduktion der Sterblichkeit konnte jedoch weder durch eine Interventionstherapie mit Anti-TNF-Antikörpern (Abraham et al.,1998), noch durch lösliche TNF-Rezeptoren ( Fisher et al., 1996) oder durch IL 1- Rezeptorantagonisten ( Opal et al., 1997) belegt werden.

Wegen der Interaktion des Gerinnungssystems in der Mediatorokaskade (siehe Abbildung 16) und der pathologische Gerinnungsaktivierung in der Sepsis wird auch vermehrt eine Modulation des Gerinnungssystems als Therapieziel untersucht. So konnte durch die Substitution von Antithrombin III (AT III) bei Patienten mit schwerer Sepsis oder septischen Schock keine Verbesserung der Sterblichkeit (Warren et al.,2001) nachgewiesen werden, trotz deutlichem Anheben der AT III- Spiegel. Durch die Gabe von rekombiniertem Protein C (Drotrecogin alfa) hingegen konnte eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit erreicht werden. So führte die

Gabe von Drotrecogin alfa zu einer Reduktion der Sterblichkeit von 30,8 % in der Placebogruppe auf 24,7 % in der Verumgruppe (Bernard et al., 2001).

Wegen ihrer anti-inflammatorischen Wirkung wurden Kortikoide bereits früh in der Therapie der Sepsis eingesetzt und deren Wirkung untersucht. Die von Cronin et al. 1995 durchgeführte Analyse aller Studien bezüglich Kortikoidtherapie bei Sepsis zeigte, dass hoch dosierte Kortikoidtherapie für den Patienten nicht supportiv sind; ihm sogar schaden können. Eingesetzt werden heute so genannte Stressdosen (300 mg Hydrocortison/24 Stunden), die einer physiologischen Ausschüttung der Nebenniere in Stresssituationen äquivalent sind. Diese niedrig dosierten Kortikoide führen zu einer signifikanten Reduktion der Mortalität (Annane et al., 2002).

#### **4.4 Vorteile und Grenzen der Bestimmung bakterieller/mykotischer DNA**

Die Einführung der PCR in die mikrobiologische Diagnostik hat die Möglichkeit einer sehr schnellen und sensitiven Diagnostik geschaffen (White et al. 1992, Didomenico et al. 1996). Der derzeitige Goldstandard in der Diagnostik der Sepsis ist die Anlage und Auswertung von Blutkulturen. Die Bestimmung bakterieller/mykotischer DNA mit Hilfe der PCR bietet eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Blutkultur, jedoch gibt es auch Grenzen bzw. Nachteile im Nachweis der DNA.

Die Aussaat von Erregern aus einem Infektionsherd ist kein lineares sondern ein wellenförmiges Geschehen somit ist für den sicheren Nachweis der Erreger die mehrmalige Anlage von Blutkulturen notwendig (Wickelhaus et al. 1999), wohingegen der Nachweis der DNA von dieser wellenförmigen Freisetzung unabhängig ist. Die mehrmalige Blutkulturenanlage ist mit einem vermehrten Aufwand und damit Kosten verbunden, zusätzlich besteht jedes Mal die erneute Gefahr der Kontamination der Proben. Einen wichtigen Faktor in der Therapie der Sepsis spielt der möglichst frühe und erregerspezifische Therapiebeginn. Stehen beim Nachweis von DNA mittels PCR erste Ergebnisse bereits nach 3-4 Stunden zur Verfügung, die komplette Untersuchung dauert 1-2 Tage, so ist nach der Anlage von Blutkulturen mit ersten Ergebnissen nach 24-48 Stunden zu rechnen, die endgültigen Ergebnisse brauchen 2-4 Tage (Kurlat et al. 1989). In der „klassischen“ Diagnostik erfolgt die Bestimmung der Erreger über die zeitaufwendige Anzucht auf Differential- und Selektivnährmedien sowie dem Vergleich von Stoffwechselleistungen mit Hilfe „ bunter Reihen“ wohingegen beim Nachweis von DNA

spezifische Primer eingesetzt werden. So können Mycobacterien heute nach einem Tag aus Proben isoliert werden (Telenti et al. 1993), deren Anzucht auf Spezialnährmedien (Löwenstein-Jensen-Agar) sonst 4-6 Wochen dauert (Kayser 1998). Die Anzucht auf Nährmedien entfällt somit und zum Nachweis bzw. zur Bestimmung der Erreger sind keine vitalen Keime notwendig; was sich als Vorteil erweist bei einer bereits begonnenen antibiotischen/antimykotischen Therapie. Beim Nachweis der DNA kann es jedoch auch zu falsch negativen oder falsch positiven Ergebnissen kommen. Falsch negative Ergebnisse sind zum Beispiel möglich, wenn die DNA-Menge im Probenmaterial zu gering ist und auch nach Amplifikation nicht ausreicht um ein eindeutiges Signal zu erzeugen. Die Ergebnisse können auch durch im Probenmaterial enthaltene Inhibitoren der RNA-Polymerase verfälscht werden. Diese zum Teil von den Erregern selbst stammenden Inhibitoren hemmen die RNA-Polymerase und verhindern die Amplifikation der Target-DNA und somit deren Nachweis. Bei fraglich falsch negativen Ergebnissen bzw. zum Ausschluss solcher Inhibitoren stehen Kits wie das Koll<sup>TM</sup> NC-45<sup>TM</sup> RNAP Activity & Inhibitor Screening Kit der Firma Biozym zur Verfügung. In Abwesenheit eines Hemmstoffes von RNA-Polymerasen werden – ausgehend von einem DNA-Nanocircle- große Mengen DNA transkribiert, deren Nachweis dann über Real-Time Fluoreszenz erfolgt. In Anwesenheit eines Hemmstoffes wird keine DNA transkribiert (Biozym 2005). Problematisch können auch Erreger-Varianten sein, die auf Grund einer veränderten Nukleotidsequenz eine Amplifikation mit dem verwendeten Primer nicht zulassen. Deswegen sollten immer, soweit möglich Primer aus bekannten und vor allem konstanten DNA-Bereichen gewählt werden (Kwah et. al 1990). Auf Grund des unterschiedlichen Wandaufbaus grampositiver und gramnegativer Erreger (siehe 1.1.1.1.) lassen sich grampositive Erreger schlechter nachweisen als gramnegative. Die dickere Mureinschicht der grampositiven Erreger stellt bei der Lyse der Erreger ein größeres Hindernis dar als die dünne Schicht der gramnegativen Erreger, so daß hier andere Lysezeiten beachtet werden müssen (Curson et al. 1999). Der Nachweis von DNA ist mit einem hohen Maß von Hygiene aller beteiligten Personen bzw. in allen Arbeitsschritten verbunden. Eine sterile Arbeitsweise ist unbedingt nötig um das Einschleppen von DNasen und oder RNasen ins Probenmaterial zu verhindern, die die nachzuweisende DNA verdauen und damit einem Nachweis unmöglich machen würden. Neben der sterilen Arbeitsweise komme auch DNase und RNase freie Einmalmaterialien zum Einsatz (siehe 2.4.2.) Darüber hinaus stellt die allgemeine Kontamination der Proben eine große Gefahr dar. Zum einen ist bereits bei der Gewinnung des Probenmaterials auf strenge hygienische Standards zu achten (siehe 2.3.1.2.) zum anderen bei der

Weiterverarbeitung der Proben um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Denn bereits geringfügige Verunreinigungen werden wie die Target-DNA bei der Amplifikation um ein vielfaches vervielfältigt und können so zu falschen Ergebnissen führen. Zur Vermeidung von Kontaminationen eignet sich das Einrichten getrennter prä/post PCR-Räume, der Einsatz von sterilem Einmalmaterial sowie wattegestopfter Pipetten, das häufige Wechseln von Handschuhen, das Mitführen von Negativkontrollen (Kwah et al. 1990) sowie der Einsatz vollautomatisierter Extraktionsautomaten wie zum Beispiel der MagNA Pure LC™ (Roche Diagnostics). Der Automat wird einmal mit allen benötigten Reagenzien, Einmal-Plastikartikeln und Probenmaterial bestückt. Alle weiteren Schritte laufen anschließend nach starten des gewünschten Programms vollautomatisch in einem geschlossenen System ab wodurch die Gefahr einer Kontamination des Probenmaterials auf ein Minimum reduziert wird (siehe 2.3.3.)

#### **4.5 Vorteile und Grenzen der automatisierten DNA-Präparation**

Seit einigen Jahren stehen für die DNA-Präparation Vollautomaten zur Verfügung. Nach Bestücken der Automaten (siehe 2.3.3.) und Auswahl des gewünschten Programms durchlaufen die Automaten alle weiteren Schritte vollautomatisch, diese Automaten werden auch als walk-away-Automaten bezeichnet, da sie einmal gestartet keiner weiteren Überwachung mehr bedürfen. Personal wird dadurch entlastet und freigestellt für andere anspruchsvollere Aufgaben (Ottenwälder 2006). Da es sich bei den Automaten um geschlossene Systeme handelt bieten diese zudem einen Schutz für das Personal bei der Arbeit mit infektiösem Material, da der Kontakt mit dem Material reduziert wird. Die bei der händischen Präparation mehrere Proben immer gegebene Gefahr der Verwechslung von Proben wird durch das vollautomatische Präparieren fast vollständig ausgeschlossen. Die vollautomatische Präparation in einem geschlossenen System verhindert zudem die Wahrscheinlichkeit falsch positiver Ergebnisse durch Kontamination der Proben wie sie bei der händischen Präparation gegeben ist (Kessler et al. 2001). Auch das Auftreten falsch negativer Ergebnisse durch das Einschleppen von DNasen und RNasen wird durch den Einsatz eines Vollautomaten sowie steriler Einmalmaterialien minimiert.

Ein wichtiger Vorteil der automatisierten Präparation ist das schnellere Vorliegen von Ergebnissen, so können mit Geräten wie dem MagNA Pure LC™ der Firma Roche Diagnostics 32 Proben in 2 Stunden oder dem QuickGene 810 von Fujifilm 8 Proben in 6 Minuten parallel bearbeitet werden und eine Diagnose ist innerhalb weniger Stunden möglich (Disque 2006). Dieses schnelle Vorliegen von Ergebnissen stellt einen großen Vorteil dar in der Therapie von

Erkrankungen wie zum Beispiel der Sepsis, bei der eine frühe und gerichtet antimikrobielle Therapie entscheidend ist für den Verlauf der Erkrankung; unabhängig von der Anzuchtbarkeit der Erreger (Ottewälde 2006).

#### **4.6 Ausblick**

Von den 101 untersuchten Proben erbrachten 11 in der mikrobiologischen Aufarbeitung einen Positiven Befund, 4 mal gelang der Nachweis durch die Echtzeit-PCR mittels einer Kombination von MagNA Pure LC™ und Light Cycler™. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen festgestellt werden. Ein Grund für die geringe Anzahl positiver Proben in der PCR-Gruppe mag das geringe in dieser Arbeit verwandte Ausgangsvolumen von 100 µl sein, die Chance auf einen positiven Erregernachweis steigt mit dem Volumen an potentiell infiziertem Probenmaterial. Der große Vorteil in der automatisierten DNA-Präparation liegt in der Schnelligkeit der Methode (Löffler et al., 2000), so ist bei Erkrankungen wie zum Beispiel der Sepsis eine frühe und zielgerichtete antibiotische/antimykotische Therapie entscheidend für das Outcome des Patienten. Auf Grund der geringen Zahl des Patientenkollektivs kann jedoch der Einsatz des MagNA Pure LC™ und auch des Light Cycler™ nicht abschließend beurteilt werden. Es sollten weitere Untersuchungen an größeren Patientenkollektiven durchgeführt werden um zu zeigen, ob die automatisierte DNA-Präparation bezüglich ihrer Sensitivität Vorteile gegenüber anderen Methoden mit sich bringt.



## 5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit einer automatisierten DNA-Präparation zum Nachweis bakterieller und mykotischer DNA bei septischen Patienten und oder Patienten mit Verdacht auf Bakteriämie untersucht.

Die automatisierte DNA-Extraktion erfolgte mit Hilfe des MagNA Pure LC <sup>TM</sup> (Roche Diagnostics), die anschließend durchgeführte PCR zum Nachweis der erregerspezifischen DNA erfolgte mit dem Light Cycler <sup>TM</sup> (Roche Diagnostics).

Diese automatisierte DNA-Extraktion wurde mit der „klassischen“ mikrobiologischen Nachweismethode, der Blutkultur, verglichen.

Insgesamt wurden 101 Proben untersucht. Zunächst erfolgte die allgemeine Aufteilung in eine positiv befundene Gruppe: 15 Proben und eine negativ Gruppe: 86 Proben. In einem zweiten Schritt wurde die positiv befundene Gruppe an Hand der Nachweismethode in eine Mibi<sup>+</sup>- und eine PCR<sup>+</sup>-Gruppe unterteilt. Mit Hilfe der Mikrobiologie erfolgte 11 mal ein positiver Befund, mittels automatisierter Präparation konnte 4 mal ein positiver Befund erbracht werden.

Es wurde untersucht ob ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen besteht bezüglich der Parameter: Alter, Geschlecht, physiologischer Parameter, Score-Systemen, antibiotischer und antimykotischer Therapie.

Bei einem festgesetzten Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Ein Grund für die geringe Anzahl positiver Proben in der PCR-Gruppe mag das geringe in dieser Arbeit verwandte Probevolumen von 100  $\mu$ l sein.

Ein großer Vorteil des Erregernachweis mittels automatisierter DNA-Extraktion und anschließender PCR ist die Schnelligkeit der Methode, erste Ergebnisse stehen bereits nach 3-4 Stunden zur Verfügung, die komplette Untersuchung dauert 1-2 Tage. Der MagNA Pure LC <sup>TM</sup> ist zudem ein geschlossenes System, so dass die Gefahr einer Kontamination der zu untersuchenden Proben auf ein Minimum reduziert wird, so waren allen in dieser Arbeit bei der

automatisierten DNA-Präparation und anschließenden PCR mitgeführten Negativkontrollen negativ.

Eine zu geringe DNA Menge im Probenmaterial die auch nach Amplifikation nicht ausreicht, ein eindeutiges Signal zu erzeugen, kann jedoch zu falsch negativen Ergebnissen führen. Ebenso sind Erreger-Varianten problematisch, die auf Grund von veränderten Nukleotidsequenzen eine Amplifikation mit den eingesetzten Primern nicht zulassen.

## 6 Literaturverzeichnis

NIPED-Studie: Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Erfassung und Prävention Teil I Prävalenz nosokomialer Infektionen, Qualitätssicherung in der Krankenhaushygiene. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit; 56. Nomos Verlagsgesellschaft, 1995.

Bundesgesundheitsblatt. 43, 887-890. 2000. Springer-Verlag.  
Ref Type: Report

Light Cycler Instrument operator's manual. 1 ed. Rotkreuz, Schweiz: Roche Diagnostics GmbH, 2004.

MagNa Pure LC operator's manual. 1 ed. Rotkreuz, Schweiz: Roche Diagnostics GmbH, 2004.

Abraham E, Anzueto A, Gutierrez G, Tessler S, San Pedro G, Wunderink R et al. Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. *Lancet* 1998; 351:929-933.

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

Annane D, Sebille V, Charpentier C, Bollaert PE, Francois B, Korach JM et al. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. *JAMA* 2002; 288:862-871.

Aries PH, Kurowski R, Renz-Polster H. Infektionskrankheiten. In: Renz-Polster H, editor. *Innere Medizin*. München, Jena: Urban & Fischer, 2001: 1018-1113.

Becker-Follmann J, Baas D. PCR- Eine Methode, drei Schritte. *BIOspektrum* 10. 2004.  
Ref Type: Magazine Article

Bernard GR, Vincent JL, Laterre PF, LaRosa SP, Dhainaut JF, Lopez-Rodriguez A et al. Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *N Engl J Med* 2001; 344:699-709.

Biozym. Koll<sup>TM</sup> NC-45TMRNAP Activity & Inhibitor Screening Kit Instruction manual. Hess, Oldendorf: 2005.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101:1644-1655.

Borrelli E, Roux-Lombard P, Grau GE, Girardin E, Ricou B, Dayer J et al. Plasma concentrations of cytokines, their soluble receptors, and antioxidant vitamins can predict the development of multiple organ failure in patients at risk. *Crit Care Med* 1996; 24:392-397.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J, Dellamonica P, Gouin F, Lepoutre A et al. Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. *JAMA* 1995; 274:968-974.

Brun-Buisson C, Doyon F, Carlet J. Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154:617-624.

Brunkhorst F.M., Engel C, Reinhardt K., Bone H.-G, Brunkhorst R, Burchardi H et al. Epidemiology of severe sepsis and septic shock in Germany - results from the German "Prevalence" study. *Critical Care* 2005; 9 Supp 1:S 83.

Christman JW. Potential treatment of sepsis syndrome with cytokine-specific agents. *Chest* 1992; 102:613-617.

Cronin L, Cook DJ, Carlet J, Heyland DK, King D, Lansang MA et al. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med* 1995; 23:1430-1439.

Cursons RT, Jeyerajah E, Sleight JW. The use of polymerase chain reaction to detect septicemia in critically ill patients. *Crit Care Med* 1999; 27:937-940.

Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P et al. Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity. *Ann Surg* 1992; 215:356-362.

DiDomenico N, Link H, Knobel R, Caratsch T, Weschler W, Loewy ZG et al. COBAS AMPLICOR: fully automated RNA and DNA amplification and detection system for routine diagnostic PCR. *Clin Chem* 1996; 42:1915-1923.

Eggimann P, Harbarth S, Constantin MN, Touvneau S, Chevrolet JC, Pittet D. Impact of a prevention strategy targeted at vascular-access care on incidence of infections acquired in intensive care. *Lancet* 2000; 355:1864-1868.

Exner M. Pressemitteilung 20.09.2004 [www.unibonn/Aktuelle/Pressemitteilung/2004/409-drwd.html](http://www.unibonn/Aktuelle/Pressemitteilung/2004/409-drwd.html). 2004.

Ref Type: Internet Communication

Fisher CJ, Jr., Agosti JM, Opal SM, Lowry SF, Balk RA, Sadoff JC et al. Treatment of septic shock with the tumor necrosis factor receptor:Fc fusion protein. The Soluble TNF Receptor Sepsis Study Group. *N Engl J Med* 1996; 334:1697-1702.

Garner JS, Jarvis WR, Emori TG, Horan TC, Hughes JM. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 1988; 16:128-140.

Gastmeier P, Kampf G, Wischnewski N, Hauer T, Schulgen G, Schumacher M et al. Prevalence of nosocomial infections in representative German hospitals. *J Hosp Infect* 1998; 38:37-49.

Gastmeier P, Stamm-Balderjahn S, Hansen S, Nitzschke-Tiemann F, Zuschneid I, Groneberg K et al. How outbreaks can contribute to prevention of nosocomial infection: analysis of 1,022 outbreaks. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2005; 26:357-361.

George B, Mathews V, Viswabandya A, Srivastava A, Chandy M. Infections in children undergoing allogeneic bone marrow transplantation in India. *Pediatr Transplant* 2006; 10:48-54.

Granowitz EV, Santos AA, Poutsiaika DD, Cannon JG, Wilmore DW, Wolff SM et al. Production of interleukin-1-receptor antagonist during experimental endotoxaemia. *Lancet* 1991; 338:1423-1424.

Haley R. Infection-control strategies save \$250,000 annually. *Hospitals* 1985; 59:63-65.

Hauer T, Lacour M, Gastmeier P, Schulgen G, Schumacher M, Ruden H et al. [Nosocomial infections intensive care units. A nation-wide prevalence study]. *Anaesthesist* 1996; 45:1184-1191.

Hebart H, Loffler J, Meisner C, Serey F, Schmidt D, Bohme A et al. Early detection of aspergillus infection after allogeneic stem cell transplantation by polymerase chain reaction screening. *J Infect Dis* 2000; 181:1713-1719.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992; 10:413-417.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11:1026-1030.

Kayser FH. Allgemeine Mykologie. In: Kayser FH, editor. *Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1998: 352-378.

Kessler HH, Muhlbauer G, Stelzl E, Daghofer E, Santner BI, Marth E. Fully automated nucleic acid extraction: MagNA Pure LC. *Clin Chem* 2001; 47:1124-1126.

Knaus WA, Draper EA, Wagner DP, Zimmerman JE. APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med* 1985; 13:818-829.

Krentz H. Statistische Grundbegriffe. In: Helga Krentz, editor. *Statistische Analysen und Datenverwaltung mit SPSS in der Medizin*. Aachen: Shaker Verlag, 2002: 15.

Kretz F SJ. Schock. In: Kretz F SJ, editor. Anästhesi, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag, 2000: 425-456.

Kurlat I, Stoll BJ, McGowan JE, Jr. Time to positivity for detection of bacteremia in neonates. *J Clin Microbiol* 1989; 27:1068-1071.

Kwah S, Innis MA, Gelfond DH, Sninsky JJ, White TJ. Procedure to minimize PCR-product carry-over. PCR-protocol, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, Inc, 1990.

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

Michie HR, Guillou PJ, Wilmore DW. Tumour necrosis factor and bacterial sepsis. *Br J Surg* 1989; 76:670-671.

Moerer O, Schmid A, Hofmann M, Herklotz A, Reinhart K, Werdan K et al. Direct costs of severe sepsis in three German intensive care units based on retrospective electronic patient record analysis of resource use. *Intensive Care Med* 2002; 28:1440-1446.

Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-350.

Neuhaus P, Pfitzmann R. Organtransplantation. In: Sievert R, editor. Chirurgie. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 2001: 779-795.

Oka Y, Murata A, Nishijima J, Yasuda T, Hiraoka N, Ohmachi Y et al. Circulating interleukin 6 as a useful marker for predicting postoperative complications. *Cytokine* 1992; 4:298-304.

Opal SM, Fisher CJ, Jr., Dhainaut JF, Vincent JL, Brase R, Lowry SF et al. Confirmatory interleukin-1 receptor antagonist trial in severe sepsis: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. The Interleukin-1 Receptor Antagonist Sepsis Investigator Group. *Crit Care Med* 1997; 25:1115-1124.

Pilz G, Werdan K. Cardiovascular parameters and scoring systems in the evaluation of response to therapy in sepsis and septic shock. *Infection* 1990; 18:253-262.

RANKIN NE. Disseminated aspergillosis and moniliasis associated with agranulocytosis and antibiotic therapy. *Br Med J* 1953; 1:918-919.

Reinhardt K., Brunkhorst F.M., Bloss F. Fortschritte in der Therapie der Sepsis. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100:2080-2086.

Reinhardt K., Brunkhorst F.M. Leitlinie, Diagnose und Therapie der Sepsis. 079/001. 2005. AWMF-Leitlinien.

Schuster HP. Abriss der Pathophysiologie als Grundriss der Therapie. In: Schuster HP, editor. *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 1996: 23-46.

Simpson AJ, Smith MD, Weverling GJ, Suputtamongkol Y, Angus BJ, Chaowagul W et al. Prognostic value of cytokine concentrations (tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, and interleukin-10) and clinical parameters in severe melioidosis. *J Infect Dis* 2000; 181:621-625.

Taylor NM, Lacoumenta S, Hall GM. Fentanyl and the interleukin-6 response to surgery. *Anaesthesia* 1997; 52:112-115.

Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2:81-84.

Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:175-178.

Vincent JL, Bihari D. Sepsis, severe sepsis or sepsis syndrome: need for clarification. *Intensive Care Med* 1992; 18:255-257.

Vincent JL, Bihari DJ, Suter PM, Bruining HA, White J, Nicolas-Chanoin MH et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. *JAMA* 1995; 274:639-644.

Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonca A, Bruining H et al. 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. *Intensive Care Med* 1996; 22:707-710.

Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I et al. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 286:1869-1878.

White TJ, Madej R, Persing DH. The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adv Clin Chem* 1992; 29:161-196.

Wichelhaus TA, Schafer V, Brade V. [Pathogen detection in blood culture. Contamination, colonization or infection]. *Zentralbl Chir* 1999; 124:699-702.

Williamson EC, Millar MR, Steward CG, Cornish JM, Foot AB, Oakhill A et al. Infections in adults undergoing unrelated donor bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 1999; 104:560-568.

Yonezawa M, Sugiyama H, Kizawa K, Hori R, Mitsuyama J, Araki H et al. A new model of pulmonary superinfection with *Aspergillus fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* in mice. *J Infect Chemother* 2000; 6:155-161.

Yoshimoto T, Nakanishi K, Hirose S, Hiroishi K, Okamura H, Takemoto Y et al. High serum IL-6 level reflects susceptible status of the host to endotoxin and IL-1/tumor necrosis factor. *J Immunol* 1992; 148:3596-3603.



## **7 Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Frank Stüber danke ich sehr für die Überlassung des Themas, sowie für seine Unterstützung.

Herrn Dr. Sven Klaschick möchte ich vor allem für die Hilfe in der Anfangsphase meiner Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Sabine Mering und Makbule Kolibay für die stets hilfreiche Unterstützung während der arbeiten im Labor.

Danken möchte ich auch meiner Familie, meiner Freundin Carolin und all meinen Freunden, die mich stets unterstützt haben und zu dem Menschen machen der ich bin.