

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer**

**Evaluation einer molekularbiologischen Methode zur
Identifikation von Bakterien und der Resistenzgene *mecA*
und *vanA*, -*B* und -*C* aus positiven Blutkulturen**

Dissertation

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine Universität
Düsseldorf**

vorgelegt von

Mathis Steindor

2011

Diese Arbeit wurde im Rahmen einer Multicenter-Studie durchgeführt und als solche publiziert. Die in der Dissertationsschrift enthaltenden Daten wurden ausschließlich in Düsseldorf erhoben, es wurden keine Daten aus anderen Studienzentren zitiert oder mitbewertet. Die Publikation erschien im *Journal of Clinical Microbiology* im Januar 2012 (vol. 50:1, 157-159; doi:10.1128/JCM.06086-11; elektronisch vorab veröffentlicht am 9. November 2011):

Steindor, M., M. Weizenegger, N. Harrison, A. M. Hirschl, B. Schweickert, U. Göbel, and Colin R. MacKenzie. Use of a Commercial PCR-Based Line Blot Method for the Identification of Bacterial Pathogens and the *mecA* and *van* Genes from BacTAlert Blood Culture Bottles.

Gewidmet meiner Mutter,

an deren Verständnis ärztlichen Handelns ich mich immer orientieren will

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Bakterielle Infektionen der Blutbahn.....</i>	1
1.1.1	Definitionen und Begriffsklärung	1
1.1.2	Epidemiologie, Pathogenese und klinische Aspekte der Sepsis	3
1.2	<i>Mikrobiologische Diagnostik der Infektionen der Blutbahn</i>	5
1.2.1	Die Rolle des mikrobiologischen Labors im Sepsis-Management	5
1.2.2	Der State of the Art der mikrobiologischen Bakterämiediagnostik.....	6
1.2.3	Neuere Entwicklungen in der Bakterämiediagnostik.....	7
1.2.4	Antibiotikaresistenzen	9
1.3	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	11
2	Material und Methoden.....	13
2.1	<i>Überblick.....</i>	13
2.2	<i>Material.....</i>	14
2.2.1	Blutkulturen	14
2.2.2	GenoCards und GenoCard-Stanze.....	14
2.2.3	Geräte.....	16
2.2.4	Plastikware	16
2.2.5	PCR-Mix-Komponenten.....	17
2.2.6	Komponenten der reversen Hybridisierung und des Line-Blottings ...	17
2.3	<i>Methoden</i>	18
2.3.1	Probenauswahl und Ausschlusskriterien	18
2.3.2	Umgang mit den positiven Blutkulturen im Rahmen der Studie.....	19
2.3.3	Methoden der Routine- und Referenzdiagnostik	19
2.3.4	Der GenoType	20

2.3.5	Umgang mit diskrepanten Ergebnissen	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	<i>GenoType BC grampositive.....</i>	27
3.2	<i>GenoType BC grampositive Resistenzgennachweis</i>	29
3.2.1	MecA	29
3.2.2	Vancomycin-Resistenzgene.....	29
3.3	<i>GenoType BC gramnegative</i>	29
3.4	<i>Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	31
3.5	<i>Vergleich mit äquivalenter Methode für BACTEC-Blutkultur-medien</i>	31
4	Diskussion.....	33
4.1	<i>Erläuterung und Einordnung der Identifizierungsergebnisse.....</i>	33
4.1.1	Keimidentifikation	33
4.1.2	Resistenzgenidentifikation.....	34
4.1.3	Beurteilung der Identifikationsergebnisse.....	35
4.2	<i>Handhabung</i>	35
4.3	<i>Kontaminationsanfälligkeit.....</i>	36
4.4	<i>Zeitaufwand des GenoType und Auswirkungen auf den Patienten</i>	38
5	Zusammenfassung	41
6	Literaturverzeichnis	42
7	Danksagungen	52
8	Lebenslauf	53

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Hybridisierte Sonde auf dem Membranstreifen	13
Abb. 2.2: Beimpfte und gestanzte GenoCard	15
Abb. 2.3: Mögliche Bandenmuster des GenoType grampositive	25
Abb. 2.4: Mögliche Bandenmuster des GenoType gramnegative	26

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Definitionen der mit Bakterämie und Sepsis assoziierten Diagnosen.	2
Tabelle 2.1: Verwendete Geräte	16
Tabelle 2.2: Verwendete Plastikware	16
Tabelle 2.3: Prä-Mix-Komponenten.....	17
Tabelle 2.4: Master-Mix-Komponenten.....	17
Tabelle 2.5: Programm des Thermocyclers.....	22
Tabelle 2.6: Programm des Horizontalschüttlers (Twincubator).....	24
Tabelle 3.1: Ergebnisse der mit GenoType erkennbaren grampositiven Keime	28
Tabelle 3.2: Ergebnisse der mit GenoType nicht erkennbaren grampositiven Keime	29
Tabelle 3.3: Ergebnisse der mit GenoType erkennbaren gramnegativen Keime	30
Tabelle 3.4: Ergebnisse der mit GenoType nicht erkennbaren gramnegativen Keime	31
Tabelle 3.5 Ergebnisse des GenoType für Blutkulturmedien des Typs BACTEC und BacT/Alert im Vergleich	32

Abkürzungsverzeichnis

ACCP	American College of Chest Physicians
ALI	acute lung injury
CRP	C-reaktives Protein
DIC	disseminated intravascular coagulation
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
MODS	multiple-organ-dysfunction syndrome
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NAT	nucleic acid-based technologies
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBP	penicillin-binding-protein/Penicillin-Bindendes-Protein
PCR	polymerase chain reaction
PN-Mix	Primer-Nukleotid-Mix
PPR	pattern-recognition receptors
SCCM	Society of Critical Care Medicine
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SPS	sodium polyanetholsulfonate (Natrium-Polyanetholsulfonat)
TLR	toll-like receptor

1 Einleitung

1.1 Bakterielle Infektionen der Blutbahn

1.1.1 Definitionen und Begriffsklärung

Der Begriff Bakteriämie bezeichnet das Vorhandensein von Bakterien im Blut eines Patienten. Der Zustand der Bakteriämie kann transient, intermittierend oder kontinuierlich sein [95, 102]. Die Ursachen einer transienten Bakteriämie, deren Dauer zwischen Minuten und Stunden tendiert, liegen häufig in Manipulation an physiologisch mikrobiell besiedelten Gebieten, z.B. im Rahmen einer Koloskopie oder einer transkutanen Katheterisierung bzw. der Manipulation an lokalen Infektionen (z.B. Furunkel) [65, 102]. Die intermittierende Bakteriämie ist gekennzeichnet durch rezidivierende Episoden einer Bakteriämie durch einen Keim, typischerweise assoziiert mit räumlich abgeschlossenen oder fokalen Infektionen wie Abszessen, Pneumonien oder Osteomyelitis [65, 102]. Die kontinuierliche bzw. persistierende Bakteriämie findet man z.B. im Rahmen einer infektiösen Endokarditis [65, 102]. Alle drei oben genannten Formen der Bakteriämie können zum Krankheitsbild der Sepsis führen [65] und erhalten mit Entwickeln der Sepsis einen über die der Bakteriämie zu Grunde liegende Infektion hinausgehenden Krankheitswert. Die Sepsis ist definiert als Infektion mit systemischer entzündlicher Reaktion, dem sogenannten Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) [6, 68], wobei die Definition des SIRS und somit auch der Sepsis immer wieder diskutiert und modifiziert wurde [11, 58]. Tritt zu einer Sepsis mindestens eine Organdysfunktion oder ein Hypoperfusions- oder Hypotensionszustand hinzu, spricht man definitionsgemäß von einer schweren Sepsis [58]. Besonders fulminante Verläufe der Sepsis können sich mit einem multiple-organ-dysfunction syndrome (MODS) oder einem septischen Schock präsentieren. Die aktuellen Definitionen der mit Bakteriämie assoziierten Diagnosen nach ACCP/SCCM-Kriterien [58] sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Diagnose/Krankheitsbild	Definition
Bakteriämie	Transientes, intermittierendes oder kontinuierliches Vorhandensein von Bakterien in der Blutbahn
Systemic inflammatory response syndrome (SIRS)	<p>≥2 der folgenden Symptome:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur >38°C oder <36°C • Tachykardie >90/min • Tachypnoe >20/min • pCO_2 <32 mmHg • Leukozyten >12000/μl oder <3000/μl oder Stabkernige/unreife Neutrophile >10%
Sepsis	SIRS aufgrund einer vermuteten oder bestätigten Infektion
Schwere Sepsis	Durch Organdysfunktion, Hypoperfusion oder Hypotension verkomplizierte Sepsis
Septischer Schock	Sepsis mit Hypotension trotz adäquater Volumentherapie und Vorhandensein von Perfusionsanomalien
Multiple-organ-dysfunction syndrome (MODS)	Zeichen einer schweren multiplen Organdysfunktion

Tabelle 1.1 Definitionen der mit Bakteriämie und Sepsis assoziierten Diagnosen.

Entnommen aus Levy et al, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference [58] (SIRS, Sepsis, Schwere Sepsis, Septischer Schock, MODS) und Seifert, The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections [102]

An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass ein SIRS keine Sepsis oder andere Infektionen voraussetzt, sondern auch durch andere Ursachen wie Verbrennungen, Traumata oder sterile Entzündungen wie z.B. der akuten Pankreatitis ausgelöst sein kann [11, 58, 68], was aber nicht Bestandteil dieser Abhandlung sein soll.

1.1.2 Epidemiologie, Pathogenese und klinische Aspekte der Sepsis

Die klinische Relevanz der Sepsis ist enorm. So ist sie einerseits ein häufiger Grund für intensivmedizinische Betreuung, auf der anderen Seite eine mögliche Komplikation schon vorher intensivpflichtig gewordener Patienten [126]. Die Inzidenz der Sepsis hat über die letzten Jahrzehnte trotz medizinischen Fortschritts weltweit zugenommen [35, 57, 67]. Laut einer im Jahr 2007 veröffentlichten Studie von Lever und Mackenzie treten in den USA pro Jahr etwa 750.000 Fälle von bakterieller oder pilzbedingter Sepsis mit 210.000 Todesfällen auf, was einer Inzidenz von 3 auf 1.000 entspricht, wobei die Mortalität der schweren Sepsis mit 25-30% und die des septischen Schocks mit 40-70% angegeben ist [57]. Ebenfalls 2007 zeigte eine prospektive Multicenterstudie über die Epidemiologie der Sepsis in den Intensivstationen Deutschlands von Engel et al eine Krankenhausmortalität der schweren Sepsis und des septischen Schocks von 55,2% und eine Prävalenz der Sepsis von 23,4% im Studienkollektiv (12,4% schwere Sepsis, 11% septischer Schock)[35]. Winters et al weisen in ihrem Review außerdem darauf hin, dass die langfristige durchschnittliche Lebensqualität nach überlebter Sepsis durch die Langzeitfolgen und Komplikationen signifikant sinkt [126]. Nicht außer Acht lassen sollte man darüber hinaus den finanziellen Aspekt der Sepsis. Angus et al errechneten 2001 jährliche Kosten der Sepsis in den USA von 16,7 Mrd. US-Dollar [4, 106].

Wie bereits weiter oben beschrieben, ist eine vermutete oder bestätigte Infektion ein obligates Kriterium für die Diagnose einer Sepsis. Häufig ist das der Sepsis zu Grunde liegende SIRS mit einer bakteriellen Infektion und damit einhergehender Bakteriämie assoziiert, kann aber auch durch mykotische, parasitäre und virale Infektionen hervorgerufen werden [11, 105]. Das Eintreten der Keime in die Blutbahn kann auf zwei Wegen erfolgen: Erstens durch lymphatische Drainage des eines mikrobiellen Infektionsfokus in die Blutbahn, v.a. aus dem Respirationstrakt, den ableitenden Harnwegen und den abdominalen Organen, oder zweitens durch Einbringen mikrobiell kontaminierten Materials in die Blutgefäße (Drogenabusus, sonstige Gefäßpunktion) bzw. mikrobielle Besiedlung von intravasalen Materialien (z.B. Venen-/Arterienkatheter, Verweilkanülen) [30, 95, 119]. *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Koagulase-negative Staphylokokken, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Enterobacter*

cloacae und *Candida albicans* wurden sowohl in Studien in Europa [27, 63, 94], als auch in Studien in den USA [95, 119] am häufigsten bei Infektionen der Blutbahn isoliert. Für das klinische Erscheinungsbild einer Sepsis spielt einerseits die Virulenz des Keims, auf der anderen Seite aber vor allem die Immunantwort des Patienten eine Rolle [98]. So entsteht das für die Entwicklung einer Sepsis vorausgesetzte SIRS durch die komplexe Immunantwort auf die Keime. War man zunächst von einer rein überschießenden Immunreaktion ausgegangen, so entwickelt sich nach neueren Erkenntnissen das klinische Bild der bakteriellen Sepsis aufgrund eines Ungleichgewichts von pro- und antiinflammatorischer Immunreaktion des Organismus auf bakterielle Antigene [3, 18, 19]. Die entscheidende Rolle bei der Immunantwort auf Sepsis-auslösende Pathogene spielt das angeborene Immunsystem, dessen Reaktion durch pattern-recognition receptors (PPRs), wie z.B. die toll-like receptors (TLRs), initiiert wird. Diese erkennen spezifische mikrobielle Strukturen, sogenannte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) [18]. Beispiele für PAMPs sind das Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure oder Flagellin [3]. Die Aktivierung der PPRs durch die PAMPs, aber auch durch endogene Entzündungsmediatoren, führt über einen intrazellulären Signalweg zur vermehrten Ausschüttung von pro- (z.B. TNF- α) und antiinflammatorischen Molekülen (z.B. Interleukin-10), die eine weitere Ausschüttung immunmodulatorischer Mediatoren durch verschiedene Zellen der Immunabwehr, der Gefäßwand und Erythro- sowie Thrombozyten zur Folge hat [3, 18, 19, 47, 98, 108]. Es resultiert eine systemische Immunantwort und durch die unterschiedliche Wirkung der ausgeschütteten Mediatoren ein potentielles Ungleichgewicht bezüglich Inflammation, Koagulation, Apoptose und oxidativem Stress, das vor allem durch Ödeme, Hypoxie und Ischämie gekennzeichnete Mikrozirkulationsstörungen und somit Organschäden mit Funktionsverlust des Organs bedingen kann [18, 19]. Vasodilatation und Endothelschäden (capillary leak) führen zusätzlich zu einer Redistribution des intra- und extravasalen Volumens sowie zu einer Verringerung des peripheren Gefäßwiderstandes, was das kardiovaskuläre System affektiert und zum Schock führen kann [98]. Zusätzlich kann es durch mikrovaskuläre Schädigungen zur acute lung injury (ALI) und somit zur respiratorischen Insuffizienz kommen [98]. Ein weiteres häufig in Mitleidenschaft gezogenes Organ ist die Niere, deren Hypoperfusionszustände in 23% bei schwerer Sepsis und 51% bei septischem

Schock zu einem akuten Nierenversagen führen, wobei die Mortalität durch akutes Nierenversagen bei vorliegen einer Sepsis auf 70% beziffert wird [101].

Die komplizierte Pathogenese und variierende Organbeteiligung bedingen eine relative Symptomen- und Befundvielfalt bei Vorliegen einer Sepsis. Die klinische Diagnose einer Sepsis stützt sich auf die Symptome Fieber/Hypothermie, Tachypnoe/Tachykardie unklarer Ursache, Zeichen der peripheren Vasodilatation, Schockzeichen und Veränderungen des Mentalstatus [68]. Dazu kommen als Labor- und hämodynamische Parameter wie ein verringelter systemischer Gefäßwiderstand, erhöhtes kardiales Auswurfvolumen, erhöhte Sauerstoffausschöpfung, Leukozytose/Neutropenie, Laktatazidose, Leber- oder Nierenfunktionsstörung, Thrombozytose, disseminierte intravasale Gerinnung (DIC) und erhöhte Werte für C-reaktives Protein (CRP), Procalcitonin und verschiedene Zytokine [68].

Das Management der schweren Sepsis und des septischen Schocks stützt sich auf mehrere Säulen. Die aktuellen Richtlinien sehen folgende Maßnahmen vor [28]:

- a. Initiale Volumensubstitutionstherapie
- b. Diagnostische Maßnahmen, vor allem Blutkulturen und eventuell kulturelle Keimisolierung anderer Spezimen vor initialer Antibiotikagabe
- c. Intravenöse Antibiotikagabe innerhalb einer Stunde nach Feststellen der Sepsis bzw. des septischen Schocks
- d. Kontrolle des Infektionsfokus/-ursprungs (z.B. der nekrotisierenden Fasziitis oder der intestinalen Infarzierung)
- e. Weitere Flüssigkeitstherapie (kolloid/kristalloid)

Für nähere Erläuterungen sei auf die angegebene und weitere Fachliteratur verwiesen.

1.2 Mikrobiologische Diagnostik der Infektionen der Blutbahn

1.2.1 Die Rolle des mikrobiologischen Labors im Sepsis-Management

Die aktuellen Richtlinien des Sepsis-Managements sehen die Abnahme von Blut für Blutkulturen vor der initialen empirischen Antibiotikagabe vor [28]. Für die Akuttherapie spielt das mikrobiologische Labor bislang allerdings nur eine untergeordnete Rolle, da je nach Keimentität mindestens 24 bis 72 Stunden verstreichen, bis die infektiöse Ursache durch das mikrobiologische Labor belegt bzw. identifiziert ist [9].

Die in den Richtlinien und oben genannten Maßnahmen wie Volumensubstitution, Fokussanierung und empirische Antibiotikatherapie spielen in der Akutphase die Hauptrolle im klinischen Management der Sepsis. Die Bedeutung der mikrobiologischen Diagnostik liegt vielmehr darin, eine nachträgliche Modifikation der initialen Antibiotikatherapie zu ermöglichen und spezifisch auf den Keim und dessen Resistenzlage einzugehen [28, 65]. Diverse Studien weisen auf eine erhöhte Mortalität durch inadäquate Antibiotikatherapie hin und verdeutlichen somit direkt oder indirekt die Bedeutung einer präzisen und schnellen mikrobiologischen Diagnostik [50, 56, 61, 120, 130]. Kumar et al identifizierten 2006 die Zeit der Hypotension bis zur adäquaten Antibiotikatherapie als entscheidende Determinante für das Überleben der Patienten mit septischem Schock und bezifferten die Abnahme des Überlebens dieser Hypotensionszeit ohne effektive Antibiotikatherapie auf 8% pro Stunde [54].

1.2.2 Der State of the Art der mikrobiologischen Bakterämiediagnostik

Die Blutkulturen stellen den aktuellen Goldstandard der mikrobiologischen Diagnostik der Infektionen der Blutbahn dar [65, 111]. Das Blut wird direkt am Patienten in ein Nährmedium gebracht. Es existieren unterschiedliche Medien von verschiedenen Herstellern. Das im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene Düsseldorf etablierte BacT/Alert-Blutkultursystem (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland) soll an dieser Stelle beispielhaft für vergleichbare Systeme der kulturellen Keimdetektion stehen. Es ist in Deutschland weit verbreitet und seine diagnostische Reliabilität bestätigt [75-77, 87, 96, 97, 104, 117, 124]. Im Falle der BacT/Alert-Blutkulturen werden üblicherweise 5 bis 10ml Patientenblut in die Blutkulturflasche injiziert, wobei für 10ml diagnostische Vorteile bezüglich der Keimdetektion und der Geschwindigkeit der Keimdetektion zumindest für einige Keimentitäten nachgewiesen werden konnten [118]. Im klinischen Alltag sind die Füllmengen allerdings häufig schwankend und oft werden aufgrund verschiedener Faktoren weniger als 5 Milliliter injiziert, was negative Auswirkungen auf die Keimdetektion haben kann [5, 12, 21, 65, 118]. Die beimpfte Blutkulturflasche wird in speziellen Brutschränken wie dem BacT/Alert 3D (bioMérieux), dem BACTEC 9240 (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) oder dem VersaTREK (TREK Diagnostic Systems, Cleveland, USA) bebrütet. In diesen Brutschränken wird automatisiert kontinuierlich überprüft, ob ein Keimwachstum bzw. eine Keimvermehrung stattgefunden hat.

den hat. Die Keimdetektion beruht im Falle des BacT/Alert 3D auf der kontinuierlichen absorptionsspektrometrischen Messung von CO₂-Konzentrationsveränderungen in der Blutkulturflasche durch die CO₂-Produktion in der Flasche wachsender Mikroorganismen [110]. Der BACTEC 9240 misst die CO₂-Konzentrationsveränderungen mit Fluoreszenssensoren, der VersaTREK misst Druckveränderungen in der Blutkulturflasche entstehend durch den Gasverbrauch bzw. die Gasproduktion der Mikroorganismen in der Flasche [65]. Wird eine Flasche durch die kontinuierlich messenden Brutschränke als positiv im Sinne eines Keimwachstums gemeldet, wird in der Regel eine Keimidentifikations- und Antibiotikaresistenzdiagnostik durchgeführt. Neben der Gramfärbung mit Mikroskopie sind die aktuellen Standardverfahren phänotypische Tests wie Immunoassays bzw. Latexagglutinationstests wie das Prolex Staph Xtra (Pro-Lab Diagnostics, Köln, Deutschland) zur Differenzierung von Staphylokokken und Methoden, die auf biochemischen Stoffwechselleistungen der Mikroorganismen beruhen, wie zum Beispiel das System VITEK 2 (bioMérieux). Die Inkubation im Blutkulturschrank dauert in der Regel zwischen 24 und 72 Stunden bis zum positiven Signal durch die automatischen Systeme [9], die Identifikation und Resistenzbestimmung des Keims nach der Detektion mittels phänotypischer Identifikation nimmt danach abermals 18 bis 48 Stunden in Anspruch [17, 65]. Können diese phänotypischen Tests zwar einen hohen Anteil der Keime identifizieren, so ist es neben Sensitivitätsdefiziten der Blutkultursysteme bei polymikrobiellen Blutbahninfektionen [66, 86] und nach Antibiotikagabe [48, 55, 115] vor allem der zeitliche Aspekt, der die Suche nach Innovationen in der Sepsisdiagnostik antreibt.

1.2.3 Neuere Entwicklungen in der Bakteriämiediagnostik

Verschiedene Ansätze sind im Laufe der letzten Jahre und Jahrzehnte erforscht und teilweise im Labor etabliert worden. Hervorgetan haben sich hier vor allem nukleinsäurebasierte Technologien (nucleic acid-based technologies, NAT), also genotypische Diagnostik, und die sogenannte MALDI-TOF-Massenspektrometrie (matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry) [31, 78, 103]. Bei den NAT konkurrieren der Nukleinsäure-Nachweis direkt aus Patientenblut, -serum oder -plasma und der Nukleinsäurenachweis aus Blutkulturmateriel. Es existieren erregerspezifische Assays, Genusassays, Breitspektrumassays und

Multiplexassays. Um sich nicht in Einzelheiten in der Fülle der verschiedenen Methoden zu verlieren, soll im Folgenden nur auf übergeordnete Möglichkeiten und Problematiken der Ansätze eingegangen werden.

Erregerspezifische Assays gibt es sowohl für den Direktnachweis bestimmter Erreger aus Blut [44, 81, 86], als auch für Erregerdiagnostik aus positiven Blutkulturen [32, 109]. Die Problematik hinter derartigen Assays, die nur einen bestimmten Erreger oder eine kleine Erregergruppe identifizieren, liegt auf der Hand: Die hohe Vielfalt an Erregern einer Blutbahninfektion limitiert den klinischen Nutzen [65].

Genusassays identifizieren Erregergruppen ohne weitere Subspezifizierung, z.B. Salmonellen oder Aspergillen [37, 52], was vor allem für Immunkompromittierte, für die bestimmte Erregergruppen eine besondere Gefährdung darstellen, sinnvoll sein kann [26].

Breitspektrumassays zielen auf die Identifikation und Amplifikation hochkonservierter, nicht keimspezifischer DNA-Regionen von Bakterien oder Pilzen ebenfalls sowohl direkt aus Patientenmaterial und aus positiven Blutkulturen. Für genauere Keimidentifizierungen müssen hier weitere Test wie Sequenzierungen oder real-time PCR angeschlossen werden [41, 90]. Breitspektrumassays haben also eher eine Bedeutung in der Veri- oder Falsifikation negativer Blutkulturen, vor allem im Falle des starken klinischen Verdachtes einer Blutbahninfektion mit negativer Blutkultur [100] oder in der Evaluation falsch-positiver Ergebnisse der Blutkulturdiagnostik [90]. Ein potentieller Vorteil der Breitspektrumassays gegenüber den Blutkulturen könnte darin liegen, auch nicht-kultivierbare Keime entdecken zu können [65], was aber in dieser Arbeit nicht diskutiert werden soll.

Multiplexassays dienen der Identifikation einzelner Keimspezies aus einer durch die Primer definierten Gruppe von Keimen. In einer Multiplex-PCR richten sich die verschiedenen in einem einzelnen Ansatz eingesetzten Primer auf spezifische DNA-Abschnitte verschiedener Keime und erlauben somit die genaue Keimidentifikation aus einer Gruppe möglicher Keime in einem Ansatz, sofern der zu identifizierende Keim durch einen Primer im PCR-Ansatz repräsentiert ist. Diese Diagnostik verspricht also im konkreten Fall einer Blutbahninfektion, den jeweiligen Erreger aus einer Gruppe der häufigsten Erreger der Blutbahninfektionen in einem Durchlauf detektieren und z.B. mittels Elektrophorese [62], Hybridisierung mit anschließen-

dem enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [121], Multiplex-real-time PCR [122] oder anderen Verfahren identifizieren zu können.

Des weiteren existiert noch das DNA-Microarray-Verfahren, bei dem mittels PCR amplifizierte (bakterielle) DNA auf einem Chip mit DNA-Sonden hybridisiert werden und im Sinne einer Keimdiagnostik analysiert werden kann [20].

Vor allem die Multiplex- und Microarray-Verfahren werden von Mancini et al in einem aktuellen Review über molekulare Diagnostik der Sepsis als vielversprechende Technologien gesehen [65].

Die MALDI-TOF-Massenspektrometrie dient der Identifikation von Keimen aus Kulturmedien auf der Basis der spezifischen Laserdesorptionseigenschaften verschiedener Keime und verspricht eine Identifikation des Keims in weniger als 2 Stunden nach kulturellem Wachstum [31].

1.2.4 Antibiotikaresistenzen

Die Resistenzen der Bakterien gegenüber antimikrobiellen Chemotherapeutika sind eine der großen aktuellen Herausforderungen sowohl des mikrobiologischen Labors als auch der klinisch tätigen Ärzte. Die zunehmende Zahl der multiresistenten Keime wie Methicillin-resistenter Staphylokokken und Vancomycin-resistenter Enterokokken erschwert das antimikrobielle Management und führt zur Zunahme inadäquat therapiierter bakterieller Infektionen, was wiederum das Morbidität und Mortalität von Patienten mit Infektionen durch multiresistente Keime verschlechtert [23, 24, 38, 49, 53]. Das frühe Erkennen von Resistenzen und entsprechendes Anpassen der antimikrobiellen Therapie hat demzufolge direkten Einfluss auf das klinische Outcome des Patienten und untermauert die Notwendigkeit zuverlässiger und schneller diagnostischer Methoden.

1.2.4.1 *Methicillin-Resistenz*

Die Wirkung der β -Lactam-Antibiotika beruht auf Acylierung mit konsekutiver Inaktivierung von Penicillin-bindenden Proteinen (penicillin-binding proteins, PBP), die als membranständige Enzyme den letzten Schritt der Peptidoglykan-Biosynthese der bakteriellen Zellwand katalysieren [10, 80]. Bereits in den 1960er Jahren konnten jedoch Fälle Methicillin-resistenter Staphylokokken dokumentiert werden, die das chemotherapeutische antimikrobielle Management vor neue Probleme stellten [10,

88]. Der erweiterten Resistenz dieser Staphylokokken gegenüber β -Laktam-Antibiotika liegt die Expression des penicillin-binding-protein 2A (PBP 2A) zu Grunde, das vom chromosomalen *mecA*-Gen von *Staphylococcus aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken codiert wird [16, 69, 112]. PBP 2A ist der einzige Vertreter der PBP, der in Anwesenheit von β -Laktam-Antibiotika funktionell aktiv bleibt [82, 88]. Das liegt an der im Vergleich zu den anderen PBP niedrigeren Affinität des PBP 2A zu β -Laktam-Antibiotika, das sich somit der Acylierung entzieht [88].

Die Zuverlässigkeit molekularer Methoden zur Identifikation des *mecA*-Gens als Vermittler der Methicillin -Resistenzen hat bereits zu einer Verlagerung des Gold-standards zur Identifikation von Methicillin -Resistenzen auf molekulare Methoden geführt, die auf PCR-basierter Detektion des *mecA*-Gens beruhen [13, 70, 109].

1.2.4.2 Vancomycin-Resistenz

Der Wirkungsmechanismus von Vancomycin besteht, wie auch bei β -Laktam-Antibiotika, in der Hemmung der bakteriellen Zellwandbiosynthese. Vancomycin hemmt die Transglykosylation von Peptidoglykanen der bakteriellen Zellwand, was eine fehlende Quervernetzung (Transpeptidation) selbiger zur Folge hat. Angriffs-punkt ist das D-Alanyl-D-Alanin-Ende von Vorläuferpeptiden des UDP-N-Acetylglucosamin-Pentapeptids, das als designierter und für die Quervernetzung obligater Baustein somit nicht an das entstehende Peptidoglykan konjugiert werden kann [34, 128]. Bislang sind sieben phänotypische Vancomycin-Resistenztypen für Enterokokken beschrieben: *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL* [85]. Die verminderte Suszeptibilität für Vancomycin beruht infolgedessen einerseits auf Produktion abnormer Vorläuferpeptide der Peptidoglykane, in denen das terminale Alaninmolekül der Vancomycin-Zielstruktur D-Ala-D-Ala durch D-Lactat (*vanA*, *vanB*, *vanD*) oder D-Serin (*vanC*, *vanE*, *vanG*, *vanL*) ersetzt wird, oder andererseits durch hydrolytische Spaltung oder Elimination des D-Ala-D-Ala-Endes [15, 29, 84, 85]. Die Genetik der Vancomycin-Resistenzmechanismen ist entsprechend komplexer als die der Methicillin-Resistenz. Diagnostisch zu Nutze macht man sich heutzutage vor allem die induzierbaren resistenzvermittelnden Gene des Typs *vanA* (high-grade-Resistenz), *vanB* (moderately high-grade-Resistenz), die vor allem für *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecalis* beschrieben sind, sowie *vanC1* und *vanC2* (low-grade-Resistenz), die als intrinsische Resistenzgene bei den beweglichen

Enterokokkenspezies *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus gallinarum* und *Enterococcus flavescent* eine Rolle spielen [25, 71, 99, 129]. In Zukunft könnte es zudem von zunehmender Bedeutung sein, dass weltweit bereits 11 *Staphylococcus aureus*-Stämme bei Patienten isoliert wurden, die eine nachgewiesene *vanA*-Typ-Vancomycin-Resistenz trugen, die sie wahrscheinlich über horizontalen Gentransfer von Vancomycin-resistenten Enterokokken erhalten haben [42, 85].

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Die bisherigen Ausführungen haben gezeigt, dass molekulare Keimidentifikationsverfahren wahrscheinlich eine noch größere Rolle in der Zukunft der Mikrobiologie spielen werden, als sie es jetzt schon tun, was neben vielen anderen Raoult et al in ihrem Zukunftsausblick postulierten [93]. Millar et al haben im Jahr 2000 aufgezeigt, dass PCR-basierte Methoden mit den weit verbreiteten Blutkulturmedien des Typs BacT/Alert FAN Probleme bereiten. Sie identifizierten das in dem Blutkulturmedium enthaltene antikoagulatorische und antikomplementäre Agens Natrium-Polyanetholsulfonat (englisch: sodium polyantholsulfonate, SPS) und die Aktivkohle, die seit Jahrzehnten als Zusatz zur Wachstumsbeschleunigung bestimmter Bakterien und zur Absorption antimikrobieller Substanzen (z.B. bei vor Spezimengewinnung begonnener Antibiotikatherapie) in mikrobiologischen Nährmedien verwendet wird, als PCR-Inhibitoren [39, 40, 43, 51, 73, 89]. Problematisch scheint hierbei unter anderem die Eigenschaft der Aktivkohle zu sein, freie DNA zu binden, was auch für das dem DNA-Molekül ähnliche SPS beschrieben ist [40, 72]. Fredricks et al zeigten auf, dass das Entfernen des SPS aus PCR-Ansätzen die Amplifikation verbessert [40]. Neben den Bestandteilen des Nährmediums der Blutkulturflaschen besitzen allerdings auch Blut- und Plasmakomponenten selbst PCR-inhibitorisches Potential, was bereits in einigen Studien gezeigt werden konnte [1, 2, 83]. Die diagnostische Methode, die in dieser Arbeit behandelt wird, ist eine NAT für positive Blutkulturen des Typs BacT/Alert FAN (bioMérieux), in der in dem Blut-Nährmedium-Gemisch enthaltene PCR-Inhibitoren durch Diffusion in einem Filterpapier von dem der PCR zugeführten Material getrennt werden sollen. Die Möglichkeiten und Grenzen dieses Assays sollen im Folgenden aufgezeigt und mit den von Eigner et al erhobenen Ergebnissen der äquivalenten Methode für BACTEC-Blutkulturmedien (Becton Dickin-

son) [33] verglichen werden, die im Gegensatz zu BacT/Alert FAN-Blutkulturmedien weniger SPS (0,03% gegenüber 0,035%) und keine Aktivkohle enthalten [125].

2 Material und Methoden

2.1 Überblick

Das GenoType ist ein Multiplex-PCR-Verfahren, an das eine reverse Hybridisierung mit anschließendem Line-Blot gekoppelt ist. Die PCR-Produkte binden in diesem Fall komplementär und sequenzspezifisch an immobilisierte Oligonukleotide auf einem Membranstreifen, die in räumlich getrennten Linien auf dem Streifen liegen (Line-Blot). Dieses Kombinieren zweier DNA-Einzelstränge, in diesem Fall ein DNA-Einzelstrang entsprechend dem PCR-Produkt und ein DNA-Einzelstrang entsprechend des Target-Oligonukleotids des Membranstreifens, nennt sich DNA-DNA-Hybridisierung. Um diese durch Hybridisierung entstandene Bindung sichtbar zu machen, wird an die PCR-Produkte alkalische Phosphatase gekoppelt, die durch eine Substratumsetzung eine Anfärbung der Membranstreifenbande bewirkt. Die Kopplung der alkalischen Phosphatase an die PCR-Produkte wird dadurch ermöglicht, dass die Primer und somit die PCR-Produkte mit Biotin markiert sind, welches mit dem an die alkalische Phosphatase gebundenen Streptavidin einen Komplex bildet.

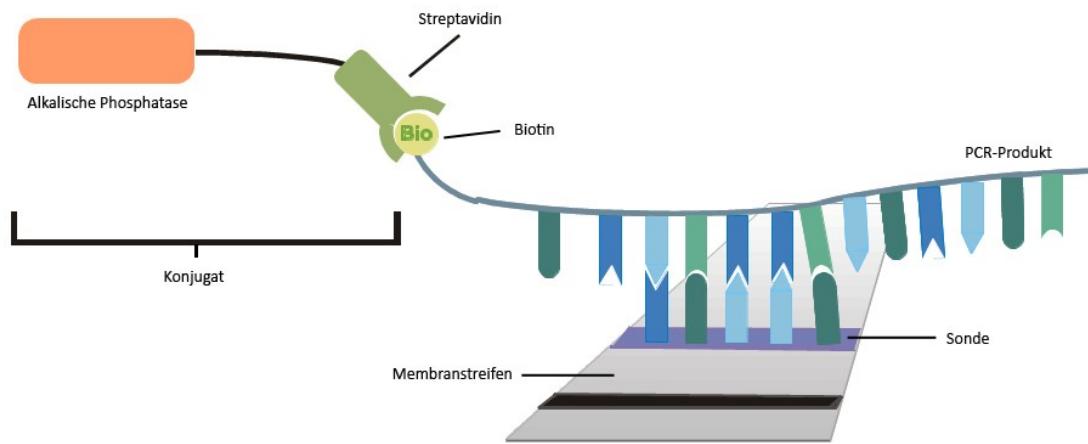


Abb. 2.1: Hybridisierte Sonde auf dem Membranstreifen
Quelle: Hain Lifescience GmbH (Abbildung modifiziert)

Dieser Streptavidin-Biotin-Komplex entsteht durch eine der stärksten bekannten nicht-kovalenten Bindung zwischen zwei Makromolekülen und ist heutzutage

Grundlage moderner diagnostischer Assays [60, 116]. Während die Affinität von Biotin zu in Vögeln enthaltenem Avidin bzw. durch *Streptomycetaceae* produziertem Streptavidin lange vorher bekannt war [74, 107], wurde die Verwendung des Biotin-Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Komplexes zur Sichtbarmachung von DNA-DNA-Hybridisierungen in Zellkulturen erstmals 1987 von Lewis et al beschrieben [59]. Die Umsetzung hinzugegebenen Substrates durch die alkalische Phosphatase ist bei diesen Assays die Grundlage einer Einfärbung der hybridisierten DNA-Stränge, die im Falle des GenoType Banden auf den Membranstreifen sichtbar werden lässt. Da die Anwendung des GenoType-Testkits ein essentieller Teil dieser Arbeit ist, wird auf dessen Materialien und die Methodik im Folgenden sehr ausführlich eingegangen.

2.2 Material

2.2.1 Blutkulturen

Die Studie diente der Überprüfung und Validierung der Speziesidentifikation mittels GenoType aus BacT/Alert FAN-Blutkultur-Flaschen. Die in der Studie verwendeten Proben waren zufällig ausgewählte, positive Blutkulturen aus der herkömmlichen Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf. Die Keimidentifikation mittels GenoType erfolgte sowohl aus BacT/Alert-Blutkultur-Flaschen für aerobe Keime, als auch für BacT/Alert-Blutkultur-Flaschen für anaerobe Keime. Es wurden keine zusätzlichen Blutkulturen für Studienzwecke abgenommen.

2.2.2 GenoCards und GenoCard-Stanze

Die von der Hain Lifescience GmbH zur Verfügung gestellten GenoCards dienten der Trennung von bakterienhaltigem Blut-Kulturmedium-Gemisch und möglichen PCR-inhibitorischen Substanzen. Grundlage für die Trennung war eine Lage aus Filterpapier, die bewirkte, dass sich das bakterienhaltige Kulturmedium von möglichen PCR-Inhibitoren durch Diffusion in das Filterpapier trennt und separat mit der Stanze inklusive Filterpapier entnommen und dem PCR-Mix zugeführt werden konnte. Zu diesem Zweck wurden mithilfe von herkömmlichen sterilen Spritzen mit steriler

Kanüle kreisförmige Filterpapierstellen, von denen jede GenoCard vier Stück aufwies, mit einem Tropfen des Inhaltes der positiven Blutkulturflaschen beimpft.

Eine kugelschreiberähnliche GenoCard-Stanze wurde ebenfalls von der Hain-Lifescience GmbH zur Verfügung gestellt. Mit ihrer Hilfe ließen sich aus dem roten Randbereich des Kulturmedium-Spots der GenoCard kleine Pellets von einem Durchmesser von etwa 2mm ausstanzen. Durch einen in der Stanze integrierten, mit einem Rückfedermechanismus versehenen Metallstift ließen sich die Pellets dann aus der Stanzenspitze in die PCR-Tubes drücken.

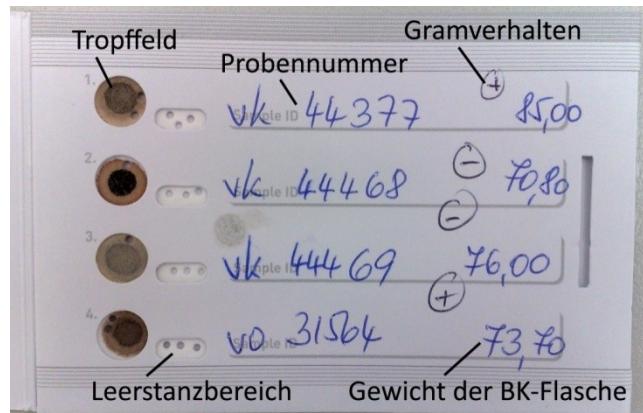


Abb. 2.2: Beimpfte und gestanzte GenoCard
Beschriftet mit Labornummer der Probe, Gramverhalten des enthaltenen Keims und Gewicht der Blutkulturflasche

2.2.3 Geräte

Für die Aufbereitung der Proben bis zur PCR wurden folgende Geräte verwendet:

Gerät	Hersteller
Blutkultur-Brutschrank (BacT/Alert 3D)	bioMérieux, Nürtingen, Deutschland
Digitalwaage	Hain-Lifescience , Nehren, Deutschland
Sterile Werkbank (PCR-Chamber)	BÄRO, Leichlingen, Deutschland
Tischrüttler	Hain-Lifescience
Werkbank mit Abzug	Schulz Lufttechnik, Sprockhövel, Deutschland
GenoCard-Stanze	Hain-Lifescience
Stanzunterlage	Hain-Lifescience
Thermocycler (2720 Thermocycler)	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Horizontalschüttler (TwinCubator)	Hain-Lifescience
Pinzette (steril)	

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte

2.2.4 Plastikware

Produkt	Hersteller
Einmalspritzen, -kanülen (steril)	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
PCR-Tubes (steril)	B. Braun Melsungen
Plastikpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspitzen mit Filter 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Horizontalschüttlerwännchen (12 Kavitäten)	Hain-Lifescience

Tabelle 2.2: Verwendete Plastikware

2.2.5 PCR-Mix-Komponenten

2.2.5.1 Prä-Mix

Komponente	Hersteller
H ₂ O, Molekularer Grad	Qiagen, Hilden, Deutschland
PCR-Puffer (15mM MgCl ₂)	Qiagen
MgCl ₂ -Lösung (25mM MgCl ₂)	Qiagen

Tabelle 2.3: Prä-Mix-Komponenten

2.2.5.2 Master-Mix

Komponente	Hersteller
Prä-Mix	Qiagen
Primer-Nukleotid-Mix Grampositiv/Gramnegativ	Qiagen
Taq-Polymerase (1U/Ansatz)	Qiagen

Tabelle 2.4: Master-Mix-Komponenten

2.2.6 Komponenten der reversen Hybridisierung und des Line-Blottings

2.2.6.1 Membranstreifen (DNA-Strips)

Die kleinen im GenoType-Testkit mitgelieferten Membranstreifen weisen je nach grampositiver und gramnegativer Version eine unterschiedliche Zahl von Banden auf, auf denen die keim- oder gattungsspezifischen Target-Oligonukleotidsequenzen für die PCR-Produkte liegen. Im Falle einer vorhandenen Bindung eines PCR-Produktes im Sinne eines Line-Blots findet hier eine durch Substratumsetzung hervorgerufene Dunkelfärbung statt, die die Bande makroskopisch als positiv erkennbar werden lässt. Das spezifische Bandenmuster erlaubt die Keimidentifikation.

2.2.6.2 Denaturierungslösung

Die Denaturierungslösung bewirkt eine chemische Denaturierung der doppelsträngigen DNA der PCR-Produkte im Sinne einer Auftrennung in ihre Einzelstränge.

2.2.6.3 Waschlösung (Stringent Solution) und Spülösung (Rinse Solution)

Die Waschlösung entfernt unspezifisch gebundene DNA-Einzelstränge von den Membranstreifen. Die Spülösung dient der Entfernung verbliebener Wasch- oder Hybridisierungslösung von den in den Kavitäten liegenden DNA-Strips.

2.2.6.4 Konjugat

Bei dem Konjugat handelt es sich um mit Streptavidin konjugierte alkalische Phosphatase. Das Streptavidin bindet an das Biotinmolekül der biotinmarkierten Primer, die alkalische Phosphatase setzt das Substrat um.

2.2.6.5 Substrat

Die Farbumschlag des Substrates nach Umsetzung durch die alkaliische Phosphatase ist die molekulare Entsprechung des Einfärbens der positiven Banden des Membranstreifens.

2.2.6.6 Weitere Komponenten

Weitere Hilfskomponenten der Hybridisierung und des Line-Blottings waren Hybridisierungspuffer, Konjugatpuffer und Substratpuffer der Firma Hain Lifescience GmbH und Aqua Destillata.

2.3 Methoden

2.3.1 Probenauswahl und Ausschlusskriterien

In die Studie aufgenommen wurden 183 zufällig ausgewählte positive Blutkulturen aus der Routinediagnostik des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene verwendet. Eine Vorselektion wurde nicht durchgeführt. Die Blutkulturen enthielten insgesamt 95 grampositive und 89 gramnegative Keime, isoliert aus insgesamt 141 Patienten. In 41 Fällen wurden zwei Proben eines Patienten getestet, jeweils aerob und anaerob. In einem Fall wurden Blutkulturen von einem Patienten getestet, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Krankheitsverlaufes abgenommen wurden. Eine Blutkultur enthielt zwei unterschiedliche Keime. Ausgeschlossen wurden 5 Blutkulturen, bei denen die enthaltene Keimspezies nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte. Die phänotypische Identifikation des

mikrobiologischen Labors wurde als Goldstandard definiert. Zur Identifizierung diskrepanter Ergebnisse wurde eine Sequenzierung durchgeführt.

2.3.2 Umgang mit den positiven Blutkulturen im Rahmen der Studie

Nachdem sich eine Blutkultur im BacT/Alert 3D-Blutkultur-Brutschrank als positiv herausgestellt hatte, wurde sie einerseits der Routinediagnostik des Labors zugeführt, andererseits erfolgte ein Auftröpfen des Blutkulturflascheninhalts auf die GenoCard und eine separate Beimpfung einer Agarplatte zwecks Keimisolierung. Von diesen Agarplatten wurden Ausstriche angefertigt, deren Keime 24 Stunden bei 36 +/- 1° C bei aeroben Bedingungen oder unter 5%-CO₂-Begasung bebrütet wurden und auf Glycerin oder in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS-Puffer) bei -70°C eingefroren wurden. Anhand dieser isolierten und eingefrorenen Keime wurden nachträglich Keime diskrepanter Testungen einer Sequenzierung unterzogen. Die beimpfte GenoCard wurde mittels GenoType analysiert.

2.3.3 Methoden der Routine- und Referenzdiagnostik

2.3.3.1 Kultivierung der klinischen Blutkulturproben

Die Kultivierung der klinischen Blutkulturproben erfolgte im BacT/Alert 3D-Gerät mit den Blutkulturmedien BacT/Alert FAN.

2.3.3.2 Speziesbestimmung

Bei positiven Blutkulturen wurde das Gramverhalten des enthaltenen Keims im Ausstrich bestimmt und es wurde eine Subkultivierung auf kommerziellen Blut-, Kochblut-, MacConkey- oder Sabouraud-Agar durchgeführt, bei bestimmten Erregern wurden selbsthergestellte Kulturmedien verwendet. Die Speziesbestimmung gramnegativer Keime erfolgte mittels biochemischer Standardmethoden, bei Streptokokken und Staphylokokken zum Teil zusätzlich mittels Agglutinationsreaktionen (Prolex Staph Xtra Latex-Kit, Pro-Lab Diagnostics).

2.3.3.3 Resistenzbestimmung

Die Methicillin-Resistenzbestimmung der Staphylokokken wurde nach CLSI-Standards durch Agar-Diffusion und im halbautomatischen Gerät VITEK 2 ermittelt. Die Vancomycin-Resistenzbestimmung der Enterokokken wurde durch Broth-Dilution oder Etest (bioMérieux) durchgeführt.

2.3.4 Der GenoType

2.3.4.1 Isolation und Amplifikation der bakteriellen DNA

2.3.4.1.1 Entnahme des Materials und Auftröpfen auf die GenoCard

Um das DNA-haltige Material der Blutkultur von anderen Bestandteilen des BacT/Alert-Mediums zu trennen, wurde Flascheninhalt abgeimpft und etwa 50µl entsprechend eines frei fallenden Tropfens auf das vorgesehene Feld der GenoCard aufgebracht.

2.3.4.1.2 DNA-Extraktion

Die Struktur des Filterpapiers der GenoCard bewirkt nach dem Beimpfen eine makroskopisch zweiphasige Auftrennung des Kulturmediums. Im Normalfall entstand ein rötlicher Spot mit schwarzem Zentrum. Die GenoCards verblieben für etwa 30min bei 35°C im Brutraum, um ein schnelleres Trocknen des Spots zu erreichen.

2.3.4.1.3 Vorbereiten der PCR

Bevor das Testmaterial aus der GenoCard entnommen wurde, mussten die PCR-Tubes in einer geeigneten DNA-freien Umgebung unter dem Abzug vorbereitet werden. Hierbei ergaben sich Unterschiede, je nachdem, ob grampositive oder gramnegative Erreger identifiziert werden sollten. Das ergab sich aus dem Ergebnis der Gramfärbung im Rahmen der Routinediagnostik. Ergab die Gramfärbung des Blutkulturmaterials gramnegative Erreger, wurde für jede Patientenprobe ein einzelnes PCR-Tube mit 45µl PCR-Mix präpariert. Der PCR-Mix bestand aus 10µl Prä-Mix (5µl PCR-Polymerasepuffer zu 15mM MgCl₂, 2µl MgCl₂-Lösung zu 25mM MgCl₂, 3µl Wasser molekularen Grades), 35µl Primer-Nukleotid-Mix und 0,2µl Taq-Polymerase (entspricht 1U) pro Ansatz. Sowohl die Primer des gramnegativen, als auch des grampositiven Primer-Nukleotid-Mixes waren biotinmarkiert. Bei der Spezifizierung grampositiver Erreger wurden für jede Patientenprobe zwei PCR-Ansätze zu 45µl präpariert, entsprechend der Spezies- und Resistenzdiagnostik. Im Rahmen der Resistenzdiagnostik kamen fünf Primer zum Einsatz: Einer bindet spezifisch an Teile des *mecA*-Gens, das für die Methicillin-Resistenz codiert, vier andere detektieren die fünf Vancomycinresistenz-codierenden Gene *vanA*, *vanB*, *vanC1* und

vanC2/3, wobei *vanC2* und *vanC3* aufgrund ihrer engen genetischen Verwandtschaft von einem einzelnen Primer detektiert werden und somit mittels GenoType nicht differenzierbar sind. Zusätzlich zu den PCR-Tubes für die Testungen wurden in dieser Studie zwei Negativkontrollen zu jedem Reaktionsansatz beigefügt. Eine Kontaminationskontrolle, die einen kompletten PCR-Mix ohne späteren Stanzzusatz enthielt und Stanzleerkontrolle, die eine Stanzprobe aus einem nicht betropften Bereich der GenoCard zugesetzt bekam. Mit Hilfe der Kontaminationskontrolle und der Stanzleerkontrolle sollte eine Verfälschung der Ergebnisse durch Kontaminationen während der Probenaufbereitung, insbesondere während der PCR-Vorbereitung, und Verunreinigungen der GenoCard oder GenoCard-Stanze ausgeschlossen werden.

2.3.4.1.4 Ausstanzen des Materials aus der GenoCard und Einbringen in die PCR-Ansätze

Für das Ausstanzen aus der GenoCard wurden die PCR-Tubes aus dem DNA-freien Raum gebracht und unter dem Abzug weiterbearbeitet. Nun wurde aus dem beimpften Feld der GenoCard eine Stanzprobe entnommen. Zu diesem Zweck schob man eine dafür vorgesehene Stanzunterlage in den entsprechenden Slot der GenoCard. Dann setzte man die Stanze im rötlichen Teil des Spots am Rande des schwarzen, kohlehaltigen Bereiches des Filterpapiers auf der GenoCard auf und drückte, bis ein kleines Pellet des Materials in der Stanze hängen blieb. Dieses Pellet wurde nun durch Druck auf das obere Ende der Stanze von einem kleinen Metallstift aus der Stanzenspitze in das jeweilige PCR-Tube gedrückt. Hierbei war darauf zu achten, dass vor Beginn der PCR alle Pellets auf den Boden des mit PCR-Mix gefüllten Tubes gesunken sind. Bei Testung grampositiver Erreger wurden zwei Stanzproben pro Spot entnommen, um jeweils einen in beide Primer-Nukleotid-Mixes geben zu können. Nachdem ein Spot fertig gestanzt war, wurde die Stanze mit einem mit Hydrochlorit getränkten Tuch gereinigt und dreimal in einem dafür vorgesehenen unbetroffenen Filterpapierbereich der GenoCard ausgestanzt. Die jeweils letzte Leerstanzung einer Testung wurde der Stanzleerkontrolle beigefügt.

2.3.4.1.5 DNA-Amplifikation mittels PCR

Die fertig präparierten PCR-Tubes wurden nun in den Thermocycler gegeben, der ein voreingestelltes Programm ablaufen ließ.

Schritt	Dauer	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Denaturierung	5 min	95°C	1
	30 sec	95°C	10
Primerhybridisierung	2 min	58°C	
Denaturierung	25 sec	95°C	20
Primerhybridisierung	40 sec	53°C	
Elongation	40 sec	70°C	
Elongation	8 min	70°C	1
Final Hold	variabel	8°C	1

Tabelle 2.5: Programm des Thermocyclers

2.3.4.2 Reverse Hybridisierung und Line-Blot

Der Amplifikation der bakteriellen DNA folgte die reverse Hybridisierung auf den Membranstreifen mit anschließender Färbung durch eine Enzym-Substrat-Reaktion. Hierzu wurden folgende Schritte durchgeführt:

2.3.4.2.1 Erster Schritt: Denaturierung der DNA

In ein spezielles Plastikwännchen mit zwölf Kavitäten wurde in jede benötigte Kavität, was der Anzahl der zu testenden Proben entsprach, Denaturierungslösung und die PCR-Produkte pipettiert und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Das Verhältnis von Denaturierungspuffer und PCR-Produkt entsprach hierbei 1:1. Da jedem PCR-Tube 20µl PCR-Produkt dem Test zugeführt werden, entsprach das bei einer gramnegativen Testung 20µl Denaturierungspuffer, bei einer grampositiven Testung 40µl Denaturierungspuffer, da hier für jede Probe zwei PCR-Ansätze angefertigt wurden, eine Spezies- und eine Resistenzbestimmung.

2.3.4.2.2 Zweiter Schritt: Reverse Hybridisierung

Zu der denaturierten DNA wurde jeweils 1ml auf 37°C erwärmer Hybridisierungspuffer in jede Kavität gegeben. Nach Vermischen durch vorsichtiges manuelles Schaukeln des Wännchens wurde mit der Pinzette in die Pufferlösung jeder Kavität ein Membranstreifen gelegt, wobei Kreuzkontaminationen zwischen den Kavitäten zu vermeiden waren. Das Wännchen wurde nun wie vorgesehen in den Horizontal-schüttler (TwinCubator) gestellt und der erste Teil eines voreingestellten Programms lief ab, das einer Horizontalschüttelung bei 45°C für 30min entsprach, in der die Bindung der DNA der biotinmarkierten PCR-Produkte an die DNA-Sonden der Membranstreifen stattfand.

2.3.4.2.3 Dritter Schritt: Entfernen unspezifisch gebundener DNA

Nachdem der dreißigminütige Hybridisierungsvorgang abgeschlossen war, wurde der Hybridisierungspuffer per Abgießen in ein Flüssigentsorgungsgefäß und anschließendes Ausstreichen des Wännchens über saugfähigem Papier entfernt. (Dieser Arbeitsschritt galt für alle aus dem Wännchen zu entfernenden Flüssigkeiten und wird im Folgenden nicht mehr erwähnt.) Kapillarkräfte verhindern hierbei das Herausfallen der Membranstreifen aus den Kavitäten. Jetzt wurde 1ml der ebenfalls auf 37°C erwärmten Waschlösung (Stringent Solution) in jede Kavität gegeben und die Membranstreifen 15min bei 45°C im Horizontalschüttler inkubiert. In diesem Schritt wurden unspezifisch an Sonden gebundene PCR-Produkte, Mismatches, von der Sonde gelöst, um falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Danach wurde die Waschlösung aus den Kavitäten entfernt (Stringent Wash). Nach dem Ablösen der Mismatches wurde eventuell verbliebene Stringent-Waschlösung durch einminütiges Spülen jeder Kavität mit 1ml Spüllösung (Rinse Solution) im Horizontalschüttler bei Raumtemperatur entfernt, um Interaktionen der Stringent-Waschlösung mit der im Anschluss hinzugefügten Konjugatlösung zu vermeiden (Rinse Wash).

2.3.4.2.4 Vierter Schritt: Konjugatbindung

Die biotinmarkierten PCR-Produkte waren jetzt an den Sonden der verschiedenen Banden gebunden. Um das für die Substratumssetzung benötigte Konjugat, an Streptavidin gebundene alkalische Phosphatase, an das Biotin der PCR-Produkte zu bin-

den, wurden die PCR-Produkte 30min bei Raumtemperatur mit dem Konjugatkomplex inkubiert. Dabei bildete sich ein Streptavidin-Biotin-Komplex aus, der die Verbindung zwischen alkalischer Phosphatase und den PCR-Produkten auf den Sonden der Membranstreifen herstellte.

2.3.4.2.5 Fünfter Schritt: Substratreaktion

Nachdem die Konjugatlösung vollständig aus den Kavitäten entfernt worden war, hierzu wurden zusätzlich zum Abschütten zwei Waschvorgänge mit Spülösung und anschließend ein Waschvorgang mit destilliertem Wasser durchgeführt, wurde 1ml des ebenfalls im Verhältnis 1:100 mit Substratpuffer verdünnten Substrates zu den Membranstreifen in die Kavitäten pipettiert. An Banden, an deren Sonden PCR-Produkte gebunden hatten, wurde das Substrat nun durch die an die PCR-Produkte gebundene alkalische Phosphatase umgesetzt und ein Farbumschlag wurde sichtbar: Die Bande färbte sich dunkel und wurde als positiv ausgewertet. Dieser Vorgang konnte zwischen 2 und 10min dauern und sollte durch zweimaliges kurzes Spülen mit destilliertem Wasser abgeschlossen werden, um übermäßige Bandenfärbung oder unspezifische Anfärbungen zu verhindern.

Schritt	Dauer	Temperatur	
Hybridisierung	30min	45°C	horizontalgeschüttelt
Stringent-Wash	15min	45°C	
Rinse-Wash	1min	Raumtemperatur	
Konjugatbindung	30min		
Rinse-Wash	1min		
Rinse-Wash	1min		
Waschung mit Aquadest	1min		
Substratinkubation	2-10min		ungeschüttelt

Tabelle 2.6: Programm des Horizontalschüttlers (Twincubator)

2.3.4.3 Auswertung des Bandenmusters

Membranstreifen, an denen PCR-Produkte gebunden hatten, wiesen ein für ein Bakterium oder eine Bakteriengruppe spezifisches Bandenmuster auf, das mit Hilfe einer Schablone und einer Speziesabelle dem entsprechenden Keim zugeordnet werden konnte. Damit war die Speziesdiagnostik mittels GenoType abgeschlossen. Unspezifisch sind die Banden 1 und 2. Die erste Bande ist die Konjugatkontrolle, deren Einfärbung die erfolgte Konjugat-Substrat-Reaktion dokumentiert, die zweite Bande dokumentiert unspezifisch das Vorhandensein bakterieller DNA, erlaubt aber keine Rückschlüsse auf die jeweilige Spezies. Beim GenoType grampositive existieren im Gegensatz zum GenoType gramnegative zusätzlich zu den zwei Kontroll- und den speziespezifischen Banden noch eine Bande für das *mecA*-Gen (16) und 4 Banden für die verschiedenen *van*-Gene (21-24).

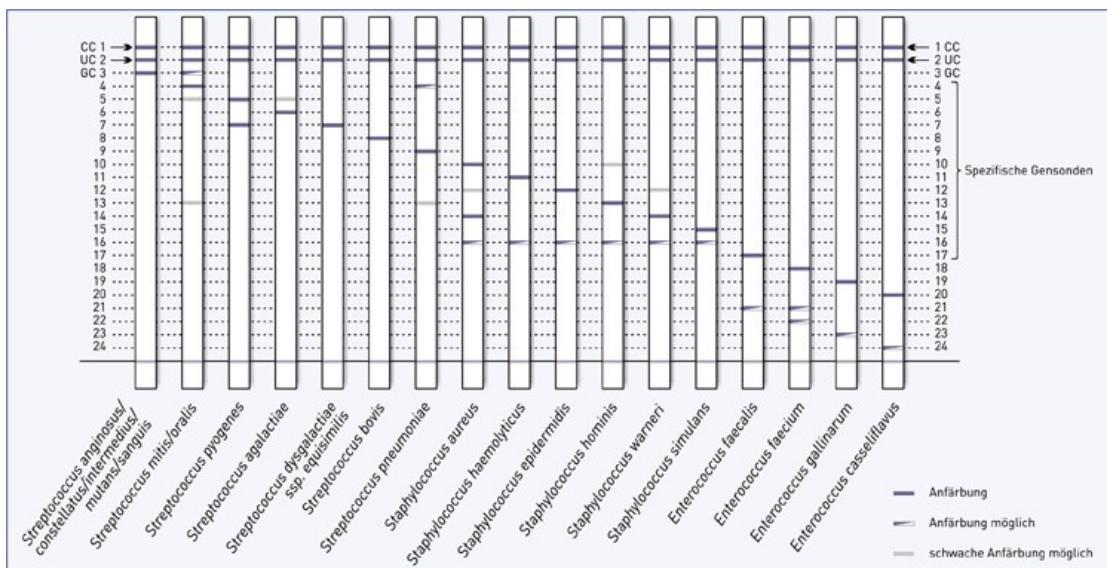


Abb. 2.3: Mögliche Bandenmuster des GenoType grampositive
Die Banden 16 und 21-24 markieren *mecA*- bzw. *van*-Resistenzgene
Quelle: Hain Lifescience

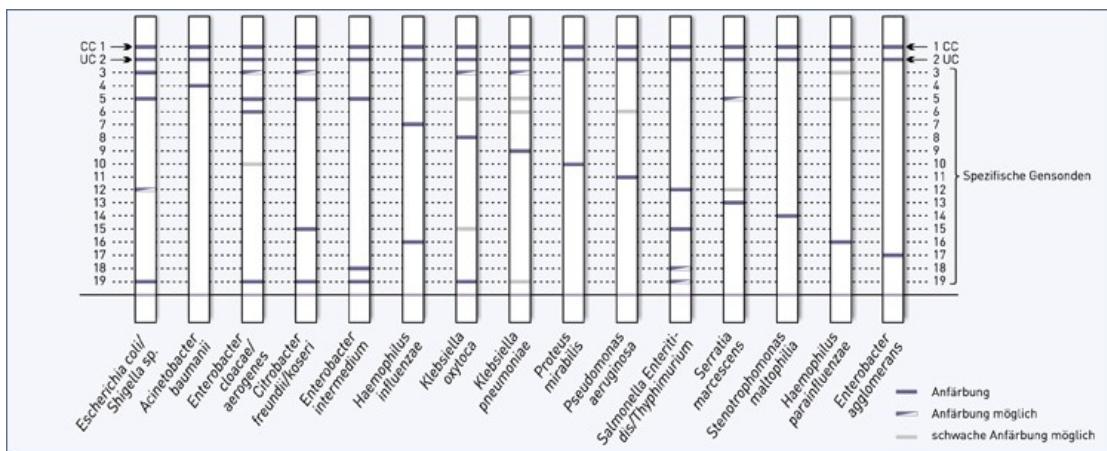


Abb. 2.4: Mögliche Bandenmuster des GenoType gramnegative
Quelle: Hain Lifescience

2.3.5 Umgang mit diskrepanten Ergebnissen

2.3.5.1 Diskrepante Spezies

Ergab die Hain-Methode ein anderes Ergebnis als die Referenzdiagnostik, so wurde bei allen Keimen, die durch Einfrieren zur Verfügung standen, weitere Diagnostik angeschlossen. Die 16s-rDNA der Keime wurde durch das Labor Dr. Limbach und Kollegen, Heidelberg, mittels PCR amplifiziert [Primer: AGAGTTGATCATGGCT CAGRWYGAACG (*E. coli* Positionen 8 bis 28) und CGTATTACCGCGGCTGCTGGCACG (*E. coli* Positionen 515 bis 528)] und die Amplifikate mit dem automatischen Sequenzanalysegerät ABI PRISM 310 (Applera GmbH, Weiterstadt, Deutschland) sequenziert. Das Ergebnis wurde mit der Datenbank Sepsitest Blast (<http://www.sepsitest-blast.de>) abgeglichen.

2.3.5.2 Diskrepante Methicillin- bzw. Vancomycinresistenz

Diskrepante Angaben der Hain-Methode bezügliche Methicillin- oder Vancomycin-Resistenzen wurden über PCR-Nachweis der *van*-, bzw. *mecA*-Resistenzgene aus Stanzproben oder abgeimpften Kolonien abgeklärt.

3 Ergebnisse

3.1 GenoType BC grampositive

Die 95 grampositiven Keime verteilten sich auf *Staphylococcus epidermidis*, 32 (33,7% der grampositiven Keime), *Staphylococcus aureus*, 26 (27,4%), davon 5 MRSA (5,3%), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, je 9 (9,5%), *Staphylococcus hominis*, 6 (6,3%), *Streptococcus pneumoniae*, 4 (4,2%), *Streptococcus mitis*, 2 (2,1%), *Streptococcus gordonaee* 1 (1,1%), *Streptococcus sanguis*, 1 (1,1%), *Enterococcus hirae* 1 (1,1%) und andere, nicht mit der Hain-Methode erkennbare grampositive Keime, 4 (4,2%). Es sei an darauf hingewiesen, dass zwei Keime, die letztendlich als ein *Streptococcus gordonaee* und ein *Enterococcus hirae* identifiziert wurden, zu den erkennbaren Keimen hinzugezählt wurden. Der GenoType identifizierte den *Streptococcus gordonaee* als einen *Streptococcus* der Gruppe *Streptococcus anginosus, constellatus, intermedius, mutans oder sanguis* (alle durch eine Bande des DNA-Strip codiert, siehe Abb. 2.3: Mögliche Bandenmuster des GenoType grampositive) und den *Enterococcus hirae* als *Enterococcus faecium*, was aufgrund der jeweils engen Verwandtschaft als korrektes Ergebnis gewertet wurde. Von den 91 nachweisbaren grampositiven Keimen wurden demzufolge 72 (79,1%) korrekt mittels Hain-Methode identifiziert. Die nicht erkennbaren Keime zeigten in 3 der 4 Fälle (75%) korrekterweise ein positives Signal in der Konjugat- und Universalkontrollbande, die erfolgreiche Konjugatbindungsreaktion bzw. den Nachweis unspezifischer bakterieller DNA anzeigen. Von den 5 MRSA wurde 3 korrekt im Sinne von korrekten Speziesbanden und korrekter *mecA*-Bande identifiziert. Einmal misslang die Spezies- und einmal die *mecA*-Identifikation. Insgesamt wurden also 75 von 95 grampositiven Keimen korrekt erkannt, was einem prozentualen Anteil von 78,9% entspricht.

Ergebnisse

Spezies	Anzahl der Isolate		
	insgesamt	korrekt identifiziert	inkorrekt identifiziert
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	7 [77,8%]	2 [22,2%]
<i>Enterococcus faecium</i>	9	8 [88,9%]	1 [11,1%]
<i>Enterococcus hirae1</i>	1	1 [100%]	0 [0%]
<i>Staphylococcus aureus</i>	26	22 [84,6%]	4 [15,4%]
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	32	25 [78,1%]	7 [21,9%]
<i>Staphylococcus hominis</i>	6	4 [66,7%]	2 [33,3%]
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4	3 [75%]	1 [25%]
<i>Streptococcus mitis</i>	2	0 [0%]	2 [100%]
<i>Streptococcus sanguis</i>	1	1 [100%]	0 [0%]
<i>Streptococcus gordonaee2</i>	1	1 [100%]	0 [0%]
Total	91	72 [79,1%]	19 [20,9%]

Tabelle 3.1: Ergebnisse der mit GenoType erkennbaren grampositiven Keime

¹Das erhaltene Bandenmuster (1, 2, 18) entspricht laut Auswertungsbogen der Firma Hain Lifescience *Enterococcus faecium*. Obwohl *E. hirae* nicht explizit aufgeführt ist, wurde er wegen der engen Verwandtschaft zu *E. faecium* als korrektes Ergebnis gewertet.

²Das erhaltene Bandenmuster (1, 2, 3) entspricht laut Auswertungsbogen der Firma Hain Lifescience *Streptococcus anginosus/constellatus/intermedius/mutans/sanguis*. Obwohl *Streptococcus gordonaee* nicht explizit aufgeführt ist, wurde er wegen der engen Verwandtschaft mit dieser Gruppe als korrektes Ergebnis gewertet.

Spezies	Anzahl der Isolate		
	insgesamt	korrekt identifiziert	inkorrekt identifiziert
<i>Streptococcus salivarius</i>	1	1 [100%]	0 [0%]
Propionibakterien	2	2 [100%]	0 [0%]
Corynebakterien	1	0 [0%]	1 [100%]
Total	4	3 [75%]	1 [25%]

Tabelle 3.2: Ergebnisse der mit GenoType nicht erkennbaren grampositiven Keime
Das Ergebnis wurde als korrekt gewertet, wenn sich die Banden der Konjugatkontrolle und der Universalkontrolle positiv zeigten

3.2 GenoType BC grampositive Resistenzgennachweis

3.2.1 MecA

In 24 der laut GenoType BC grampositive 26 *mecA*-positiven Proben wurden übereinstimmende Ergebnisse zwischen der Routinediagnostik und dem GenoType BC grampositive gefunden. 2 *mecA*-Banden waren falsch-positiv, 4 Proben waren falsch-negativ. Für diesen Parameter ergibt sich folglich eine diagnostische Sensitivität von 85,7% und eine diagnostische Spezifität von 97,2%.

3.2.2 Vancomycin-Resistenzgene

Ist der GenoType BC grampositive theoretisch in der Lage, fünf verschiedene Vancomycin-Resistenzgene nachzuweisen, namentlich *vanA*, *vanB*, *vanC1* und *vanC2* und 3 (*vanC2* und *vanC3* werden von einem Primer detektiert und können somit nicht voneinander abgegrenzt werden), so trat während der Studie nur ein Vancomycin-Resistenzgen vom Typ *vanB* auf. Dieses wurde vom GenoType BC grampositive erkannt. Da es in der Routinediagnostik nicht aufgefallen war, wurde das Ergebnis in Nachhinein mittels PCR bestätigt.

3.3 GenoType BC gramnegative

Die 94 grammnegativen Keime verteilten sich auf *Escherichia coli*, 39 (43,8% der grammnegativen Keime), *Klebsiella pneumoniae*, 20 (22,5%), *Enterobacter cloacae*, 7 (7,9%), *Pseudomonas aeruginosa*, 5 (5,6%), *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*,

Ergebnisse

je 3 (je 3,4%), *Acinetobacter baumanii*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enteritidis*, alle je 2 (je 2,2%). Hinzu kommen 3 (3,4%) von der Hain-Methode nicht erkennbare gramnegative Keime. Von den 86 nachweisbaren Keimen wurden mittels Hain-Methode 81 (94,2%) korrekt identifiziert. Bei den nicht nachweisbaren Keimen war in allen 3 Fällen korrekterweise das Signal der Konjugat- und Universal-kontrollbande positiv. Insgesamt wurden also 84 von 89 gramnegativen Keimen korrekt erkannt, was einem prozentualen Anteil von 94,4% entspricht.

Spezies	Anzahl der Isolate		
	insgesamt	korrekt identifiziert	inkorrekt identifiziert
<i>Escherichia coli</i>	39	38 [97,4%]	1 [2,6%]
<i>Acinetobacter baumanii</i>	2	1 [50%]	1 [50%]
<i>Citrobacter koseri</i>	2	2 [100%]	0 [0%]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	20 [100%]	0 [0%]
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5	4 [80%]	1 [20%]
<i>Proteus mirabilis</i>	3	3 [100%]	0 [0%]
<i>Enterobacter cloacae</i>	7	5 [71,4%]	2 [28,6%]
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	1 [100%]	0 [0%]
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2 [100%]	0 [0%]
<i>Salmonella enteritidis</i>	2	2 [100%]	0 [0%]
<i>Serratia marcescens</i>	3	3 [100%]	0 [0%]
Total	86	81 [94,2%]	5 [5,8%]

Tabelle 3.3: Ergebnisse der mit GenoType erkennbaren gramnegativen Keime

Spezies	Anzahl der Isolate		
	insgesamt	korrekt identifiziert	inkorrekt identifiziert
<i>Bacillus</i> spp. ¹	2	2 [100%]	0 [0%]
Bacteroides-Spezies	1	1 [100%]	0 [0%]
Total	3	3 [100]	0 [0%]

Tabelle 3.4: Ergebnisse der mit GenoType nicht erkennbaren gramnegativen Keime
Das Ergebnis wurde als korrekt gewertet, wenn sich die Banden der Konjugatkontrolle und der Universalkontrolle positiv zeigten

¹Die der Untersuchung mittels GenoType vorausgehende Gramfärbung zeigte vereinzelte negative Stäbe, weswegen die Probe dem Testkit für gramnegative Keime zugeführt wurde. Die phänotypische Identifizierung erbrachte das Ergebnis *Bacillus* spp..

3.4 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Insgesamt wurden 184 kulturelle Keimnachweise in dieser Studie analysiert, davon waren 95 Keime grampositiv und 89 gramnegativ. Von den 184 Keimen wurden 159 Keime korrekt mittels GenoType identifiziert. In 23 Fällen gelang der Keimnachweis nicht, obwohl der getestete Keim mit GenoType identifizierbar hätte sein müssen (falsch negativ). In 2 Fällen erkannte der GenoType einen falschen Keim (falsch positiv). Aus diesen Ergebnissen ergibt sich eine diagnostische Sensitivität von 87,4% (richtig positiv/richtig positiv + falsch negativ) und eine diagnostische Spezifität von 98,9% (richtig negativ/richtig negativ + falsch positiv).

3.5 Vergleich mit äquivalenter Methode für BACTEC-Blutkulturmiedien

Eigner et al evaluierten 2005 die GenoType-Methode für BACTEC-Blutkulturmiedien der Firma Becton Dickinson. In dieser Studie konnten 148 der 152 (97,4%) grampositiven und 89 von 91 (97,8%) der gramnegativen Keime korrekt identifiziert werden [33]. Demgegenüber konnten wir in der vorliegenden Studie bei gleicher Methode für BacT/Alert-Kulturmiedien der gleichen Firma für grampositive Keime in 75 von 95 Fällen korrekte Ergebnisse (78,9%) und für gramnegative Keime in 84 von 89 Fällen korrekte Ergebnisse (94,4%) erzielen. Die Ergebnisse der gramnegativen Testreihe sind also vergleichbar und nicht signifikant unterschiedlich ($p = 0,2753$, Fisher's Exact Test). Die Keimidentifikation für die grampositiven Testreihe für BacT/Alert-

Ergebnisse

Kulturmedien gelingt signifikant seltener als für BACTEC-Blutkulturmedien ($p < 0,0001$).

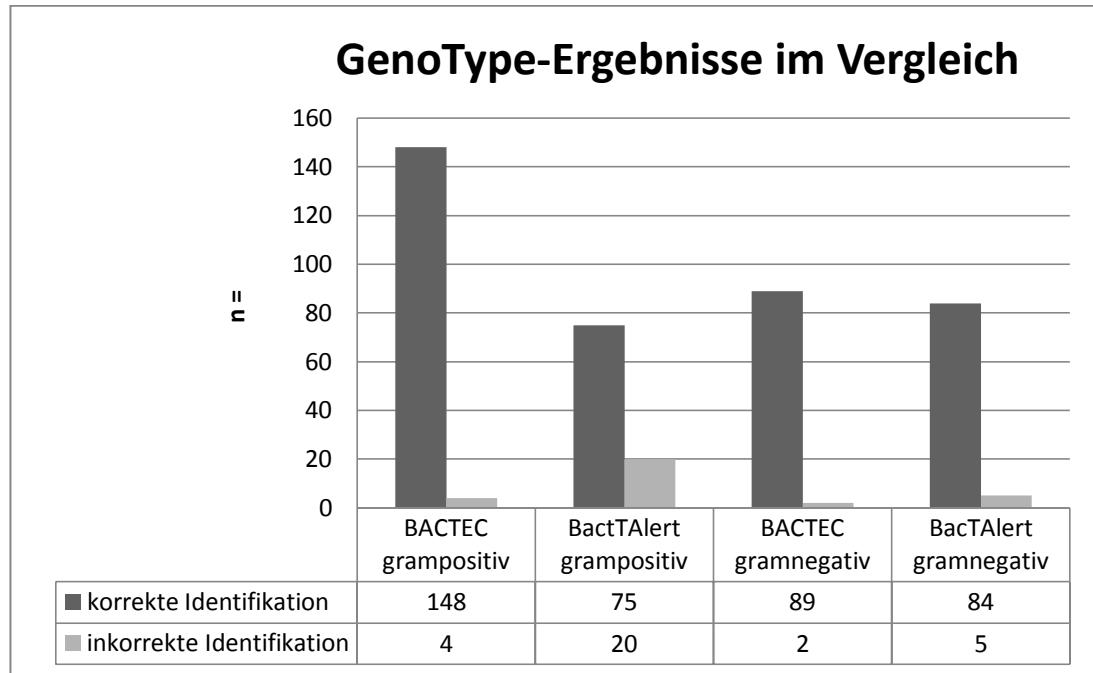


Tabelle 3.5 Ergebnisse des GenoType für Blutkulturmedien des Typs BACTEC und BacT/Alert im Vergleich

Quelle der BACTEC-Ergebnisse: [33]

4 Diskussion

4.1 Erläuterung und Einordnung der Identifizierungsergebnisse

4.1.1 Keimidentifikation

In zwei Fällen, in denen sowohl die Keimdetektion als auch –identifikation missglückte, fand sich in den entsprechenden Blutkulturen auffällig wenig Testmaterial: Bei einer Kultur mit *Staphylococcus aureus* enthielt die Blutkulturflasche nur 0,1g Probenmenge (entsprechend der Differenz aus Blutkulturflaschenleergewicht und Gewicht der positiv gemeldeten Blutkultur), bei einer Testung eines *Escherichia coli* betrug das Probengewicht 0,65g. Auf dem Hintergrund der Tatsache, dass bei beiden Blutkulturflaschen durch das automatische System Keimwachstum gemeldet wurde, muss man allerdings davon ausgehen, dass genügend bakterielles Material vorhanden gewesen sein müsste, um zu einem positiven Ergebnis bei der Testung mittels GenoType zu führen. Beide Testungen gingen in die Auswertung mit ein. Bei einer Testung einer Kultur mit nicht näher spezifizierten Corynebakterien ergab sich das Bandenmuster eines *Staphylococcus aureus*, was am ehesten als Carryover-Kontamination anzusehen ist, da im gleichen Testansatz mehrere *Staphylococcus aureus* vertreten waren.

Die Leistung des GenoType grampositive gegenüber der des GenoType gramnegative ist signifikant schlechter ($p=0,0024$, Fisher's Exact Test). Auch Eigner et al erhielten in ihrer Evaluationsstudie für das GenoType für BACTEC-Blutkultursysteme ebenfalls schlechtere Ergebnisse bei grampositiven Keimen [33]. Als mögliche Erklärung könnte man die mechanisch robustere Zellwand der grampositiven Keime hinzuziehen, die die DNA-Extraktion erschwert [91]. Allerdings dokumentiert die auch in den allermeisten Fällen nicht glückter Keimidentifikation angefärbte zweite Bande des Membranstreifens das Vorhandensein bakterieller DNA, was beweist, dass eine DNA-Extraktion der Amplifikation vorausgegangen sein muss. Die Zellwand wird also nur ein Teilespekt der Ursache zu sein. DNA-Sequenzvariationen könnten eine Möglichkeit sein, Hinweise darauf haben sich aber in den Sequenzierungen nicht ergeben. Andere Einflussfaktoren, wie die oben angesprochene in die Blutkulturflasche injizierte Blutmenge oder das unzureichende Entfernen von PCR-

Inhibitoren scheinen eine Rolle zu spielen, konnten allerdings nicht abschließend geklärt werden.

4.1.2 Resistenzidentifikation

4.1.2.1 *Methicillin-Resistenz (mecA-Gen)*

Im Laufe der Studie traten 28 Methicillin-Resistenzen im Sinne des Vorkommens eines *mecA*-Gens auf. 24 der *mecA*-Gene wurden mittels GenoType korrekt identifiziert, 4 waren falsch-negativ und 2 falsch-positiv. In drei Fällen von phänotypisch Methicillin-resistenten Keimen wurde keine Bande außer Konjugatkontrollbande positiv, so dass in diesen Fällen wahrscheinlich ein der *mecA*-Detektion übergeordnetes Problem im Sinne einer Fehlbeimpfung, eines fehlenden Stanzstückes im PCR-Gefäß oder einer PCR-Inhibition vorlag, das die Aussagekraft über *mecA*-Detektionsfähigkeit des GenoType im Speziellen in diesen drei Fällen einschränkt. Dennoch flossen auch diese drei Testungen vollwertig in die Auswertung mit ein. Die errechnete Sensitivität von 85,7% und die Spezifität von 97,2% ist mit anderen Systemen zur Identifikation Methicillin-resistenter Keime durchaus vergleichbar [64]. Allerdings erreichte zum Beispiel ein real-time PCR-Verfahren für die Detektion des *mecA*-Gens aus positiven Blutkulturen 97% bzw. 100% Sensitivität und Spezifität [109] und ein mit dem GenoType vergleichbaren Multiplex-PCR-Verfahren aus positiven Blutkulturen 100% für beide Parameter [121].

4.1.2.2 *Vancomycin-Resistenzgene*

Die GenoType-Methode erkennt Vancomycin-Resistenzgene des Typs *vanA*, *B* und *vanC1*, 2 und 3. Während der Studie trat nur ein Fall einer Vancomycin-Resistenz auf, die im phänotypischen Test allerdings nicht auffiel. Erst das Einfärben der *vanB*-Bande des GenoType und die danach durchgeführte PCR identifizierten das Resistenzgen des *Enterococcus hirae*. Die Leistungsfähigkeit des GenoType bezüglich der Detektion der Vancomycin-Resistenzgene lässt sich aus einem einzelnen positiven Fall nicht bewerten. Allerdings deutet der Ablauf der Detektion darauf hin, dass auf Gendetektion basierende molekulare Methoden auch potentielle Resistzenzen in Bakterienpopulationen mit heterogener Resistenzgenexpression aufdecken und damit Vorteile gegenüber phänotypischen Methoden haben, die eine vermeintliche Antibiotikasensitivität solcher Keimpopulationen suggerieren.

4.1.3 Beurteilung der Identifikationsergebnisse

Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass sich die GenoCards zur DNA-Extraktion aus positiven BacT/Alert-Blutkulturmedien eignen und das GenoType-Verfahren für BacT/Alert-Blutkulturmedien verlässliche Ergebnisse liefert. Das wird vor allem für den GenoType gramnegative deutlich. Im Vergleich mit dem äquivalenten Verfahren für BACTEC-Blutkultursysteme ist der GenoType gramnegative für die Keimidentifikation aus BacT/Alert-Medien mit in 94,4% der Fälle korrekter Keimidentifikation gleichwertig ($p=0,2753$ im Vergleich zu 97,8% für BACTEC-Medien [33]). Das zeigt, dass die Entfernung von PCR-Inhibitoren aus dem Blutkulturmedium suffizient funktioniert. Der GenoType grampositive gelingt für BacT/Alert-Medien im Vergleich zu BACTEC-Medien signifikant seltener ($p < 0,0001$, 78,9% gegenüber 97,4% korrekte Identifikation). Dieses schlechtere Ergebnis des GenoType grampositive lässt vermuten, dass mindestens ein Schritt des GenoType-Verfahrens für BacT/Alert-Medien mit grampositiven Keimen weniger gut funktioniert als mit gramnegativen Keimen. Die mechanisch robustere Zellwand könnte eine Rolle bei der DNA-Extraktion spielen [33, 92]. Das spiegelt sich auch in den Ergebnissen von Eigner et al [33] wider, jedoch in deutlich geringerem Maße und scheint somit keine hinreichende Erklärung zu sein. Für die Klärung weiterer Ursachen dieser Diskrepanz sind eingehendere Aufarbeitungen notwendig.

4.2 Handhabung

Die einzelnen Schritte der Keimdiagnostik mittels GenoType sind prinzipiell einfach und für jede Testung immer wieder identisch, sowohl vom Handlungs-, als auch vom zeitlichen Ablauf. Diese Tatsache vereinfacht die Einarbeitung und den Umgang mit der Methodik. Einschränkend ist aber festzuhalten, dass einzelne Schritte potentielle Fehlerquellen aufweisen. Den Anfang macht hierbei das Betropfen der GenoCards. Die Beimpfungsmenge ist auf einen frei fallenden Tropfen definiert, was sich zum Teil als etwas müßig herausstellt und im nicht gelungenen Fall zu Spots führt, die nicht die gewünschte kreisrunde Form und klar definierte Zweifarbigkeit aufweisen. Das kann die Entnahme des Stanzstückes verkomplizieren, da ein geeigneter Ort für die Entnahme aus dem Spot nicht klar ersichtlich ist und somit eher PCR-Inhibitoren des Kulturmediums in die PCR-Ansätze gelangen können. Solche

Spots, die wesentlich vom Idealbild abweichen, sollten verworfen und die Beimpfung wiederholt werden. Allerdings bleibt auch im Falle eines optimalen Spots die Entnahme des Stanzstückes immer ein manueller und somit nicht standardisierbarer, bzw. nicht maschinell durchführbarer Schritt, der stets den Einschränkungen der jeweiligen Anwender unterlegen sein wird. Als weitere mögliche Fehlerquelle ist die GenoCard-Stanze zu nennen. Sie leidet mit zunehmender Zeit vor allem unter den Desinfektionen mit Hydrochlorit, die trotz Reinigung mittels geeigneter Tücher Salzrückstände auf dem Metall der Stanze hinterlassen, die die Mechanik der Stanze behindern. Dies führt dazu, dass die in die Stanze aufgenommenen Stanzstücke zum Teil etwas unkontrolliert aus der Stanze herausspringen, wenn man sie in die PCR-Gefäße geben möchte. Hier ist zur Vermeidung von Kreuzkontaminationen und fehlendem Stanzstück im PCR-Gefäß Vorsicht geboten und die PCR-Gefäße sollten vor der PCR unbedingt auf fehlende oder doppelte Zugabe von Stanzstücken kontrolliert werden. Zudem sollte die GenoCard-Stanze regelmäßig durch eine neue ersetzt werden, oder die Methode der Desinfektion geändert werden, um Beeinträchtigungen der Stanzmechanik zu minimieren. Beim Pipettieren im Rahmen der Hybridisierungsschritte ist zu beachten, dass vor allem der angewärmte Hybridisierungspuffer, aber auch andere Reagenzien vor allem beim Pipettieren zur Schaumbildung neigen, was ein Übertreten der Reaktionsansätze von einer Wannenkavität in eine andere begünstigt. Das Plastikwännchen selbst trennt zwar die Reaktionsansätze, dennoch sollten beim Bearbeiten der Proben Erschütterungen sorgfältig vermieden werden. Das Be- und Entladen des TwinCubators stellt hierbei den größten Risikofaktor für den Übertritt von Reaktionsansätzen durch Erschütterung dar. Diese Gefahr kann allerdings eventuell durch ein automatisiertes, maschinelles Verfahren der Hybridisierungs- und Line-Blot-Schritte minimiert werden, das von der Firma Hain Lifescience GmbH angeboten wird und zu dem an dieser Stelle geraten sein sollte.

4.3 Kontaminationsanfälligkeit

Auf den wichtigen Aspekt der Kontaminationsanfälligkeit von molekularen Nachweismethoden wurde bereits mehrfach hingewiesen. Generell sind alle PCR-basierten-Verfahren für DNA-Kontamination gefährdet. So wird von vielen Autoren

immer wieder hervorgehoben, dass sowohl spezifische, als auch Breitspektrum-PCR-Verfahren aus Patientenmaterial sehr anfällig selbst für kleine Kontaminationen sind und verhältnismäßig viele falsch-positive Ergebnisse erzielt werden [8, 22, 73]. Generell werden real-time-PCR-Verfahren Vorteile bezüglich Kreuzkontaminationen zugeschrieben, da es sich um geschlossene Systeme handelt, die nach Ansetzen des PCR-Mixes und Hinzufügen des Spezimins nicht mehr geöffnet werden müssen. Hier ist es unwahrscheinlicher, dass amplifizierte DNA von einem PCR-Gefäß in ein anderes gelangt, allerdings muss auch hier beim Hantieren mit den Spezimen sorgfältig vorgegangen werden, um eine Kontamination vor der Amplifikation zu vermeiden, z.B. beim Transfer des Spezimen in das PCR- oder das DNA-Extraktionsgefäß [36]. Die Kontaminationsgefahr des GenoType als Methode zur Keimidentifizierung aus positiven Blutkulturen ist wahrscheinlich als relativ hoch anzusehen. Zwar werden kontaminationsgefährdete Schritte unter dem Abzug und der PCR-Ansatz in einer DNA-freien Kammer durchgeführt, allerdings eliminiert das die Kontaminationsgefahr nicht. Problematisch ist in diesem Zusammenhang vor allem der Transfer des fertigen PCR-Mixes in einen nicht-DNA-freien Raum zum Hinzugeben der Stanzstücke. Zu diesem Zweck müssen die bereits geschlossenen PCR-Tubes wieder geöffnet werden, wodurch kontaminierendes Material hineingelangen kann, auch wenn aerogene Kontamination mit bakterieller DNA nicht als bedeutende Kontaminationsquelle anzusehen ist [127]. Die GenoCard-Stanze muss als nächste Kontaminationsquelle aufgeführt werden. Zwar erfolgt nach jeder Stanzung aus dem probenhaltigen Bereich der GenoCard eine Reinigung mit Hydrochlorit und drei Leerstanzungen, allerdings ist dieser Schritt je nach Verwender potentiell fehlerbehaftet und die GenoCards sind nicht steril, so dass sich auch auf einem nicht-beimpften Bereich Bakterien oder anders geartetes DNA-haltiges Material befinden könnte. Für diesen Schritt ist keine maschinelle Bearbeitung zu erwarten, da zwar im Protokoll festgelegt ist, aus welchem Bereich des aufgetropften Spots das Stanzstück zu entnehmen ist, dieser Bereich allerdings in seiner Lage variiert und maschinell somit nicht immer korrekt erfasst werden dürfte. Die durch die Salzbildung des Hydrochlorits beeinträchtigte Mechanik der GenoCard-Stanze, auf die weiter oben bereits eingegangen wurde, kann Kreuzkontaminationen durch unkontrolliertes Heurausspringen der Stanzstücke begünstigen. Nach Amplifikation der Target-

Sequenzen werden die PCR-Produkte mittels Pipette in die offenen Kavitäten des Plastikwännchens transferiert. Aufgrund der hohen Anzahl der Kopien ist dieser Schritt trotz entsprechend sorgfältiger Arbeit mit einem hohen Kontaminationsrisiko behaftet. Weitere mögliche Kontaminationsquellen ergeben sich bei den Schritten der Hybridisierung. Die Ansätze befinden sich während der einzelnen Schritte in offenen Kavitäten, so dass DNA vor allem mit der Pipette oder durch Erschütterungen des Plastikwännchens von einer Kavität in eine andere gelangen kann und so das Ergebnis verfälscht. Hier sei nochmals auf das maschinelle Verfahren der Hybridisierungs- und Line-Blot-Schritte hingewiesen, dass diese Gefahr reduziert.

4.4 Zeitaufwand des GenoType und Auswirkungen auf den Patienten

Die lange Zeit bis zum Erhalt des Ergebnisses und das damit verschlechterte klinische Outcome der Sepsispatienten ist sicherlich einer der Hauptgründe für die intensive Erforschung von neuen Methoden der Keimidentifizierung bei Sepsispatienten [50, 61, 119]. Nach Keimdetektion sind 18 bis 48 Stunden zur biochemischen oder immunologischen Identifikation die Regel [17, 65]. Wie bereits in der Einleitung angesprochen, sind molekulare Nachweismethoden aus positiven Blutkulturen und direkt aus Patientenmaterial die wohl vielversprechendsten Ansätze zur Optimierung der zeitlichen Leistung der mikrobiologischen Labors. Der GenoType aus der positiven Blutkultur dauert je nach Fertigkeit des Verwenders zwischen 3,5 und 4,5 Stunden und kann potentiell durch maschinelles Hybridisieren und Line-Blotting noch ein wenig beschleunigt werden. Darin ist er vergleichbar mit ähnlichen Systemen der molekularen Keimidentifikation aus positiven Blutkulturen wie dem PNA-FISH (AdvanDX, Woburn, USA), dem Hyplex BloodScreen (BAG, Lich, Deutschland) und dem Prove-it Sepsis (Mobidiag, Helsinki, Finnland), deren Bearbeitungszeit mit etwa 3 Stunden angegeben ist [45, 46, 65, 121]. Dabei ist selbstverständlich zu beachten, dass diesen Zeitangaben die Zeit der Inkubation der Blutkultur im Blutkulturschrank hinzuzurechnen ist. In einer Evaluationsstudie von Wilson et al. für das aerobe BacT/Alert-FAN-Blutkultursystem bzw. einer Studie von Weinstein et al. zur Evaluation des anaeroben BacT/Alert-FAN-Blutkultursystems ergaben sich Durchschnittsdetektionszeiten von 16,1 bzw. 16,0 Stunden [117, 124]. Andere Autoren sprechen allerdings von einer Keimdetektionszeit durch Blutkultur-

systeme von im Durchschnitt 24 bis 48 Stunden [9, 65] und auch Wilson et al geben an, dass manche Keime erst nach 72 Stunden und mehr detektiert wurden. Addiert man nun die Zeit des GenoType mit diesen Zeiten, so wird deutlich, dass im Normalfall mindesten ein ganzer Tag vergeht, bis eine Keimidentifikation stattgefunden hat, zumal selbst ein gut organisiertes mikrobiologisches Labor nicht immer eine unmittelbare und zeitoptimierte Bearbeitung der Proben garantieren kann sondern personellen und ablaufbedingten Einschränkungen unterliegt. Ebenfalls zu beachten ist, dass der Identifizierung mittels GenoType eine Gramfärbung des Blutkulturflascheninhaltes vorausgehen muss, wenn man nicht zeit- und kostenineffizient zwei GenoType-Durchläufe (grampositiv und gramnegativ) gleichzeitig durchführen will. Die Gramfärbung ist ebenfalls mit Personal- und Zeitaufwand behaftet ist, wobei letzterer sowohl bei manueller als auch bei maschineller Anfertigung des gefärbten Ausstrichpräparates eher im einstelligen Minutenbereich anzusiedeln ist [7]. Rechnet man nun alle Arbeitsschritte [Keimdetektion im Blutkulturschrank, 24 – 72 h; (Gramfärbung, 2 min;) GenoType-Identifizierung, 3,5 – 4,5 h] zusammen, kommt man auf 27,5 – 76,5 h. Demgegenüber versprechen molekulare Nachweismethoden direkt aus Blut eine Identifikationszeit von 8-12 Stunden (SepsiTTest, Molzym, Bremen, Deutschland) [79], 8 Stunden (Vyoo, SIRS-Lab, Jena, Deutschland) [65] oder 6 Stunden (LightCycler SeptiFast Test, Roche Molecular Systems, Branchburg, USA), wobei auch hier Beschränkungen für den Laboralltag mit einzubeziehen sind [14, 113, 114, 123]. So sprechen z.B. Westh et al von einer realistischen effektiven Zeit bis zum Erhalt des Ergebnisses bei Integration des SeptiFast-Testes in den Laboralltag von 18h [123]. Als nicht Nukleinsäure-basiertes Verfahren ist die MALDI-TOF-Massenspektrometrie hervorzuheben, die eine Keimidentifikation in weniger als 2 Stunden nach kulturellem Wachstum in Blutkulturmedien ermöglicht [31].

Die übliche phänotypische Identifizierung hinkt zeitlich hinter den genannten Methoden zurück und der GenoType verspricht demgegenüber einen Zeitgewinn von mehreren Stunden. Ebenso als Vorteil hervorzuheben ist die Tatsache, dass der Zeitaufwand des GenoType planbarer ist. Die Spannbreite der biochemischen Identifizierung mittels VITEK 2 beträgt etwa 18-48 Stunden und ist im Einzelfall nicht exakt vorhersehbar, wohingegen der immer gleiche zeitliche Ablauf des GenoType unabhängig vom zu identifizierenden Keim ermöglicht, den Zeitpunkt des Erhaltens

des Ergebnisses vorauszusagen [17, 65]. Das vereinfacht zusätzlich die Zusammenarbeit zwischen Klinikern und Mikrobiologen.

5 Zusammenfassung

Sepsis ist die systemische inflammatorische Reaktion auf eine Infektion, die häufig mit einer Bakterämie einhergeht. Sepsis ist eine häufige und an Inzidenz zunehmende Krankheit mit einer Mortalität von bis zu 70%. Studien haben gezeigt, dass die schnelle und korrekte antibiotische Behandlung die Mortalität signifikant senkt. Zur Gewährleistung der korrekten antibiotischen Therapie ist eine schnelle und zuverlässige Identifikation des Erregers von großer Bedeutung. Der GenoType (Hain Lifescience, Nehren, Deutschland) ist eine molekularbiologische Methode zur Identifikation von Bakterien aus positiven Blutkulturen des Typs BacT/Alert FAN (bioMérieux, Nürtingen, Deutschland). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich das GenoType-System für Blutkulturen des Typs BacT/Alert FAN eignet. Die Ergebnisse wurden mit den Ergebnissen des äquivalenten Systems für BACTEC-Blutkulturmedien (bioMérieux) verglichen, wodurch unter anderem eruiert werden sollte, ob sich die im BacT/Alert-System enthaltene Aktivkohle, die sich in anderen Studien für NAT als problematisch erwiesen haben, gegenüber dem BACTEC-Medium hemmend auf die PCR-basierte GenoType-Diagnostik auswirken. Der GenoType identifizierte in der Studie 94,4% der gramnegativen und 78,9% der grampositiven Erreger korrekt, was einer Sensitivität und Spezifität von 87,4% bzw. 98,9% entspricht. Im Vergleich mit der äquivalenten Methode für BACTEC-Blutkulturmedien zeigte sich, dass die Identifikation gramnegativer Erreger mittels GenoType für BacT/Alert-Medien mit 94,4% gegenüber 97,8% für BACTEC-Medien gleichwertig ist, die Identifikation grampositiver Erreger mit 78,9% im Vergleich zu 97,4% aber signifikant seltener gelingt. Nach Keimwachstum in der Blutkulturflasche dauert das GenoType-System etwa 3,5 bis 4,5 Stunden bis zum Erhalt des Identifikationsergebnisses und ist damit der noch als Goldstandard geltenden phänotypischen oder immunologischen Identifikation der Erreger, die etwa 18 – 48 Stunden dauert, in zeitlicher Hinsicht deutlich überlegen. Die Kontaminationsanfälligkeit der Methode wird als relativ hoch eingeschätzt. Die Handhabung des GenoType ist simpel und gut in Routineabläufe des mikrobiologischen Labors integrierbar.

6 Literaturverzeichnis

1. **Al-Soud, W. A., L. J. Jonsson, and P. Radstrom.** 2000. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J.Clin.Microbiol.* **38**:345-350
2. **Al-Soud, W. A. and P. Radstrom.** 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. *J.Clin.Microbiol.* **39**:485-493
3. **Anas, A. A., W. J. Wiersinga, A. F. de Vos, and T. van der Poll.** 2010. Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis. *Neth.J.Med.* **68**:147-152
4. **Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo, and M. R. Pinsky.** 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med.* **29**:1303-1310
5. **Arpi, M., M. W. Bentzon, J. Jensen, and W. Frederiksen.** 1989. Importance of blood volume cultured in the detection of bacteremia. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **8**:838-842
6. **Ayres, S. M.** 1985. SCCM's new horizons conference on sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* **13**:864-866
7. **Baron, E. J., S. Mix, and W. Moradi.** 2010. Clinical utility of an automated instrument for gram staining single slides. *J.Clin.Microbiol.* **48**:2014-2015
8. **Bastien, P., E. Chabbert, and L. Lachaud.** 2003. Contamination management of broad-range or specific PCR: is there any difference? *J.Clin.Microbiol.* **41**:2272
9. **Beekmann, S. E., D. J. Diekema, K. C. Chapin, and G. V. Doern.** 2003. Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J.Clin.Microbiol.* **41**:3119-3125
10. **Berger-Bachi, B.** 1989. Genetics of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Antimicrob.Chemother.* **23**:671-673
11. **Bone, R. C., R. A. Balk, F. B. Cerra, R. P. Dellinger, A. M. Fein, W. A. Knaus, R. M. Schein, and W. J. Sibbald.** 2009. 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. 1992. *Chest* **136**:e28
12. **Bouza, E., D. Sousa, M. Rodriguez-Creixems, J. G. Lechuz, and P. Munoz.** 2007. Is the volume of blood cultured still a significant factor in the diagnosis of bloodstream infections? *J.Clin.Microbiol.* **45**:2765-2769
13. **Brown, D. F.** 2001. Detection of methicillin/oxacillin resistance in staphylococci. *J.Antimicrob.Chemother.* **48 Suppl 1**:65-70

14. **Casalta, J. P., F. Gouriet, V. Roux, F. Thuny, G. Habib, and D. Raoult.** 2009. Evaluation of the LightCycler SeptiFast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur.J.Clin.Microbiol.Infect.Dis.* **28**:569-573
15. **Cetinkaya, Y., P. Falk, and C. G. Mayhall.** 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin.Microbiol.Rev.* **13**:686-707
16. **Chambers, H. F., B. J. Hartman, and A. Tomasz.** 1985. Increased amounts of a novel penicillin-binding protein in a strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* exposed to nafcillin. *J.Clin.Invest* **76**:325-331
17. **Chen, J. R., S. Y. Lee, B. H. Yang, and J. J. Lu.** 2008. Rapid identification and susceptibility testing using the VITEK 2 system using culture fluids from positive Bact/ALERT blood cultures. *J.Microbiol.Immunol.Infect.* **41**:259-264
18. **Cinel, I. and R. P. Dellinger.** 2007. Advances in pathogenesis and management of sepsis. *Curr.Opin.Infect.Dis.* **20**:345-352
19. **Cinel, I. and S. M. Opal.** 2009. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med.* **37**:291-304
20. **Cleven, B. E., M. Palka-Santini, J. Gielen, S. Meembor, M. Kronke, and O. Krut.** 2006. Identification and characterization of bacterial pathogens causing blood-stream infections by DNA microarray. *J.Clin.Microbiol.* **44**:2389-2397
21. **Cockerill, F. R., III, J. W. Wilson, E. A. Vetter, K. M. Goodman, C. A. Torgerson, W. S. Harmsen, C. D. Schleck, D. M. Ilstrup, J. A. Washington, and W. R. Wilson.** 2004. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin.Infect.Dis.* **38**:1724-1730
22. **Corless, C. E., M. Guiver, R. Borrow, V. Edwards-Jones, E. B. Kaczmarski, and A. J. Fox.** 2000. Contamination and sensitivity issues with a real-time universal 16S rRNA PCR. *J.Clin.Microbiol.* **38**:1747-1752
23. **Cosgrove, S. E. and Y. Carmeli.** 2003. The impact of antimicrobial resistance on health and economic outcomes. *Clin.Infect.Dis.* **36**:1433-1437
24. **Cosgrove, S. E., Y. Qi, K. S. Kaye, S. Harbarth, A. W. Karchmer, and Y. Carmeli.** 2005. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect.Control Hosp.Epidemiol.* **26**:166-174
25. **Courvalin, P.** 2006. Vancomycin resistance in gram-positive cocci. *Clin.Infect.Dis.* **42 Suppl 1**:S25-S34
26. **Cuenca-Estrella, M., Y. Meije, C. Diaz-Pedroche, A. Gomez-Lopez, M. J. Buitrago, L. Bernal-Martinez, C. Grande, R. S. Juan, M. Lizasoain, J. L. Rodriguez-Tudela, and J. M. Aguado.** 2009. Value of serial quantification of fungal DNA by a real-time PCR-based technique for early diagnosis of invasive Aspergillosis in patients with febrile neutropenia. *J.Clin.Microbiol.* **47**:379-384
27. **Decousser, J. W., P. Pina, F. Picot, C. Delalande, B. Pangon, P. Courvalin, P. Allouch, and The ColBVH Study Group.** 2003. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream

- infections: a French prospective national survey. *J.Antimicrob.Chemother.* **51**:1213-1222
28. **Dellinger, R. P., M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J. F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J. J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B. T. Thompson, S. Townsend, J. S. Vender, J. L. Zimmerman, and J. L. Vincent.** 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med.* **36**:296-327
 29. **Depardieu, F., I. Podglajen, R. Leclercq, E. Collatz, and P. Courvalin.** 2007. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin.Microbiol.Rev.* **20**:79-114
 30. **Diekema, D. J., S. E. Beekmann, K. C. Chapin, K. A. Morel, E. Munson, and G. V. Doern.** 2003. Epidemiology and outcome of nosocomial and community-onset bloodstream infection. *J.Clin.Microbiol.* **41**:3655-3660
 31. **Drancourt, M.** 2010. Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin.Microbiol.Infect.* **16**:1620-1625
 32. **Eigner, U., A. Fahr, M. Weizenegger, and W. Witte.** 2005. Evaluation of a new molecular system for simultaneous identification of four *Enterococcus* species and their glycopeptide resistance genotypes. *J.Clin.Microbiol.* **43**:2920-2922
 33. **Eigner, U., M. Weizenegger, A. M. Fahr, and W. Witte.** 2005. Evaluation of a rapid direct assay for identification of bacteria and the *mec A* and *van* genes from positive-testing blood cultures. *J.Clin.Microbiol.* **43**:5256-5262
 34. **Eliopoulos, G. M.** 1997. Vancomycin-resistant enterococci. Mechanism and clinical relevance. *Infect.Dis.Clin.North Am.* **11**:851-865
 35. **Engel, C., F. M. Brunkhorst, H. G. Bone, R. Brunkhorst, H. Gerlach, S. Grond, M. Gruendling, G. Huhle, U. Jaschinski, S. John, K. Mayer, M. Oppert, D. Olthoff, M. Quintel, M. Ragaller, R. Rossaint, F. Stuber, N. Weiler, T. Welte, H. Bogatsch, C. Hartog, M. Loeffler, and K. Reinhart.** 2007. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* **33**:606-618
 36. **Espy, M. J., J. R. Uhl, L. M. Sloan, S. P. Buckwalter, M. F. Jones, E. A. Vetter, J. D. Yao, N. L. Wengenack, J. E. Rosenblatt, F. R. Cockerill, III, and T. F. Smith.** 2006. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin.Microbiol.Rev.* **19**:165-256
 37. **Farrell, J. J., L. J. Doyle, R. M. Addison, L. B. Reller, G. S. Hall, and G. W. Procop.** 2005. Broad-range (pan) *Salmonella* and *Salmonella* serotype *typhi*-specific real-time PCR assays: potential tools for the clinical microbiologist. *Am.J.Clin.Pathol.* **123**:339-345
 38. **Finch, R. and P. A. Hunter.** 2006. Antibiotic resistance--action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12-13 December 2005. *J.Antimicrob.Chemother.* **58 Suppl 1**:i3-i22
-

39. **Flayhart, D., A. P. Borek, T. Wakefield, J. Dick, and K. C. Carroll.** 2007. Comparison of BACTEC PLUS blood culture media to BacT/Alert FA blood culture media for detection of bacterial pathogens in samples containing therapeutic levels of antibiotics. *J.Clin.Microbiol.* **45**:816-821
40. **Fredricks, D. N. and D. A. Relman.** 1998. Improved amplification of microbial DNA from blood cultures by removal of the PCR inhibitor sodium polyanetholesulfonate. *J.Clin.Microbiol.* **36**:2810-2816
41. **Gebert, S., D. Siegel, and N. Wellinghausen.** 2008. Rapid detection of pathogens in blood culture bottles by real-time PCR in conjunction with the pre-analytic tool MolYsis. *J.Infect.* **57**:307-316
42. **Gould, I. M.** 2010. VRSA-doomsday superbug or damp squib? *Lancet Infect.Dis.* **10**:816-818
43. **Haynes, W. C. and L. J. Rhodes.** 1966. Spore formation by *Bacillus popilliae* in liquid medium containing activated carbon. *J.Bacteriol.* **91**:2270-2274
44. **Heininger, A., M. Binder, S. Schmidt, K. Unertl, K. Botzenhart, and G. Doring.** 1999. PCR and blood culture for detection of *Escherichia coli* bacteremia in rats. *J.Clin.Microbiol.* **37**:2479-2482
45. **Hensley, D. M., R. Tapia, and Y. Encina.** 2009. An evaluation of the advandx *Staphylococcus aureus/CNS PNA FISH* assay. *Clin.Lab Sci.* **22**:30-33
46. **Hermsen, E. D., S. S. Shull, D. G. Klepser, P. C. Iwen, A. Armbrust, J. Garrett, A. G. Freifeld, and M. E. Rupp.** 2008. Pharmacoeconomic analysis of microbiologic techniques for differentiating staphylococci directly from blood culture bottles. *J.Clin.Microbiol.* **46**:2924-2929
47. **Hotchkiss, R. S. and I. E. Karl.** 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* **348**:138-150
48. **Hugonnet, S., H. Sax, P. Eggimann, J. C. Chevrolet, and D. Pittet.** 2004. Nosocomial bloodstream infection and clinical sepsis. *Emerg.Infect.Dis.* **10**:76-81
49. **Ibrahim, E. H., G. Sherman, S. Ward, V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2000. The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* **118**:146-155
50. **Iregui, M., S. Ward, G. Sherman, V. J. Fraser, and M. H. Kollef.** 2002. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. *Chest* **122**:262-268
51. **Karmali, M. A., A. E. Simor, M. Roscoe, P. C. Fleming, S. S. Smith, and J. Lane.** 1986. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J.Clin.Microbiol.* **23**:456-459
52. **Klingspor, L. and J. Loeffler.** 2009. Aspergillus PCR formidable challenges and progress. *Med.Mycol.* **47 Suppl 1**:S241-S247

53. **Kollef, M. H., G. Sherman, S. Ward, and V. J. Fraser.** 1999. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* **115**:462-474
54. **Kumar, A., D. Roberts, K. E. Wood, B. Light, J. E. Parrillo, S. Sharma, R. Suppes, D. Feinstein, S. Zanotti, L. Taiberg, D. Gurka, A. Kumar, and M. Cheang.** 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* **34**:1589-1596
55. **Lamas, C. C. and S. J. Eykyn.** 2003. Blood culture negative endocarditis: analysis of 63 cases presenting over 25 years. *Heart* **89**:258-262
56. **Larche, J., E. Azoulay, F. Fieux, L. Mesnard, D. Moreau, G. Thiery, M. Darmon, J. R. Le Gall, and B. Schlemmer.** 2003. Improved survival of critically ill cancer patients with septic shock. *Intensive Care Med.* **29**:1688-1695
57. **Lever, A. and I. Mackenzie.** 2007. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. *BMJ* **335**:879-883
58. **Levy, M. M., M. P. Fink, J. C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S. M. Opal, J. L. Vincent, and G. Ramsay.** 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* **29**:530-538
59. **Lewis, F. A., S. Griffiths, R. Dunnincliff, M. Wells, N. Dudding, and C. C. Bird.** 1987. Sensitive *in situ* hybridisation technique using biotin-streptavidin-polyalkaline phosphatase complex. *J.Clin.Pathol.* **40**:163-166
60. **Li, Q., S. Gusarov, S. Evoy, and A. Kovalenko.** 2009. Electronic structure, binding energy, and solvation structure of the streptavidin-biotin supramolecular complex: ONIOM and 3D-RISM study. *J.Phys.Chem.B* **113**:9958-9967
61. **Lodise, T. P., P. S. McKinnon, L. Swiderski, and M. J. Rybak.** 2003. Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin.Infect.Dis.* **36**:1418-1423
62. **Louie, L., S. O. Matsumura, E. Choi, M. Louie, and A. E. Simor.** 2000. Evaluation of three rapid methods for detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Clin.Microbiol.* **38**:2170-2173
63. **Lytykainen, O., J. Lumio, H. Sarkkinen, E. Kolho, A. Kostiala, and P. Ruutu.** 2002. Nosocomial bloodstream infections in Finnish hospitals during 1999-2000. *Clin.Infect.Dis.* **35**:e14-e19
64. **Malhotra-Kumar, S., K. Haccuria, M. Michiels, M. Ieven, C. Poyart, W. Hryniwicz, and H. Goossens.** 2008. Current trends in rapid diagnostics for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and glycopeptide-resistant *enterococcus* species. *J.Clin.Microbiol.* **46**:1577-1587
65. **Mancini, N., S. Carletti, N. Ghidoli, P. Cichero, R. Burioni, and M. Clementi.** 2010. The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis. *Clin.Microbiol.Rev.* **23**:235-251

66. **Mancini, N., S. Carletti, N. Ghidoli, P. Cichero, C. M. Ossi, R. Ieri, E. Poli, R. Burioni, and M. Clementi.** 2009. Molecular diagnosis of polymicrobial sepsis. *J.Clin.Microbiol.* **47**:1274-1275
67. **Martin, G. S., D. M. Mannino, S. Eaton, and M. Moss.** 2003. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N.Engl.J.Med.* **348**:1546-1554
68. **Matot, I. and C. L. Sprung.** 2001. Definition of sepsis. *Intensive Care Med.* **27 Suppl 1**:S3-S9
69. **Matsuhashi, M., M. D. Song, F. Ishino, M. Wachi, M. Doi, M. Inoue, K. Ubukata, N. Yamashita, and M. Konno.** 1986. Molecular cloning of the gene of a penicillin-binding protein supposed to cause high resistance to beta-lactam antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **167**:975-980
70. **Merlino, J., J. Watson, B. Rose, M. Beard-Pegler, T. Gottlieb, R. Bradbury, and C. Harbour.** 2002. Detection and expression of methicillin/oxacillin resistance in multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* in Central Sydney, Australia. *J.Antimicrob.Chemother.* **49**:793-801
71. **Merquior, V. L., F. P. Goncalves Neves, R. L. Ribeiro, R. S. Duarte, M. E. de Andrade, and L. M. Teixeira.** 2008. Bacteraemia associated with a vancomycin-resistant *Enterococcus gallinarum* strain harbouring both the vanA and vanC1 genes. *J.Med.Microbiol.* **57**:244-245
72. **Millar, B. C., X. Jiru, J. E. Moore, and J. A. Earle.** 2000. A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J.Microbiol.Methods* **42**:139-147
73. **Millar, B. C., J. Xu, and J. E. Moore.** 2002. Risk assessment models and contamination management: implications for broad-range ribosomal DNA PCR as a diagnostic tool in medical bacteriology. *J.Clin.Microbiol.* **40**:1575-1580
74. **MILLER, A. K. and F. Tausig.** 1964. Biotin-binding by parenterally-administered streptavidin or avidin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **14**:210-214
75. **Mirrett, S., K. E. Hanson, and L. B. Reller.** 2007. Controlled clinical comparison of VersaTREK and BacT/ALERT blood culture systems. *J.Clin.Microbiol.* **45**:299-302
76. **Mirrett, S., C. A. Petti, C. W. Woods, R. Magadia, M. P. Weinstein, and L. B. Reller.** 2004. Controlled clinical comparison of the BacT/ALERT FN and the standard anaerobic SN blood culture medium. *J.Clin.Microbiol.* **42**:4581-4585
77. **Mirrett, S., L. B. Reller, C. A. Petti, C. W. Woods, B. Vazirani, R. Sivadas, and M. P. Weinstein.** 2003. Controlled clinical comparison of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. *J.Clin.Microbiol.* **41**:2391-2394
78. **Moussaoui, W., B. Jaulhac, A. M. Hoffmann, B. Ludes, M. Kostrzewska, P. Riegel, and G. Prevost.** 2010. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry identifies 90% of bacteria directly from blood culture vials. *Clin.Microbiol.Infect.* **16**:1631-1638

79. **Muhl, H., A. J. Kochem, C. Disque, and S. G. Sakka.** 2010. Activity and DNA contamination of commercial polymerase chain reaction reagents for the universal 16S rDNA real-time polymerase chain reaction detection of bacterial pathogens in blood. *Diagn.Microbiol.Infect.Dis.* **66**:41-49
80. **Nagano, N., Y. Nagano, K. Kimura, K. Tamai, H. Yanagisawa, and Y. Arakawa.** 2008. Genetic heterogeneity in pbp genes among clinically isolated group B Streptococci with reduced penicillin susceptibility. *Antimicrob.Agents Chemother.* **52**:4258-4267
81. **Newcombe, J., K. Cartwright, W. H. Palmer, and J. McFadden.** 1996. PCR of peripheral blood for diagnosis of meningococcal disease. *J.Clin.Microbiol.* **34**:1637-1640
82. **Niemeyer, D. M., M. J. Pucci, J. A. Thanassi, V. K. Sharma, and G. L. Archer.** 1996. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **178**:5464-5471
83. **Panaccio, M. and A. Lew.** 1991. PCR based diagnosis in the presence of 8% (v/v) blood. *Nucleic Acids Res.* **19**:1151
84. **Perichon, B. and P. Courvalin.** 2000. Update on vancomycin resistance. *Int.J.Clin.Pract.* **54**:250-254
85. **Perichon, B. and P. Courvalin.** 2009. VanA-type vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob.Agents Chemother.* **53**:4580-4587
86. **Peters, R. P., M. A. van Agtmael, S. A. Danner, P. H. Savelkoul, and C. M. Vandenbroucke-Grauls.** 2004. New developments in the diagnosis of bloodstream infections. *Lancet Infect.Dis.* **4**:751-760
87. **Petti, C. A., S. Mirrett, C. W. Woods, and L. B. Reller.** 2005. Controlled clinical comparison of plastic and glass bottles of BacT/ALERT FA medium for culturing organisms from blood of adult patients. *J.Clin.Microbiol.* **43**:1960-1962
88. **Pinho, M. G., S. R. Filipe, L. H. de, and A. Tomasz.** 2001. Complementation of the essential peptidoglycan transpeptidase function of penicillin-binding protein 2 (PBP2) by the drug resistance protein PBP2A in *Staphylococcus aureus*. *J.Bacteriol.* **183**:6525-6531
89. **POLLOCK, M. R.** 1947. The growth of *H. pertussis* on media without blood. *Br.J.Exp.Pathol.* **28**:295-307
90. **Qian, Q., Y. W. Tang, C. P. Kolbert, C. A. Torgerson, J. G. Hughes, E. A. Vetter, W. S. Harmsen, S. O. Montgomery, F. R. Cockerill, III, and D. H. Persing.** 2001. Direct identification of bacteria from positive blood cultures by amplification and sequencing of the 16S rRNA gene: evaluation of BACTEC 9240 instrument true-positive and false-positive results. *J.Clin.Microbiol.* **39**:3578-3582
91. **Rantakokko-Jalava, K. and J. Jalava.** 2002. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J.Clin.Microbiol.* **40**:4211-4217

92. **Rantakokko-Jalava, K. and J. Jalava.** 2002. Optimal DNA isolation method for detection of bacteria in clinical specimens by broad-range PCR. *J.Clin.Microbiol.* **40**:4211-4217
 93. **Raoult, D., P. E. Fournier, and M. Drancourt.** 2004. What does the future hold for clinical microbiology? *Nat.Rev.Microbiol.* **2**:151-159
 94. **Reacher, M. H., A. Shah, D. M. Livermore, M. C. Wale, C. Graham, A. P. Johnson, H. Heine, M. A. Monnickendam, K. F. Barker, D. James, and R. C. George.** 2000. Bacteraemia and antibiotic resistance of its pathogens reported in England and Wales between 1990 and 1998: trend analysis. *BMJ* **320**:213-216
 95. **Reimer, L. G., M. L. Wilson, and M. P. Weinstein.** 1997. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin.Microbiol.Rev.* **10**:444-465
 96. **Riley, J. A., B. J. Heiter, and P. P. Bourbeau.** 2003. Comparison of recovery of blood culture isolates from two BacT/ALERT FAN aerobic blood culture bottles with recovery from one FAN aerobic bottle and one FAN anaerobic bottle. *J.Clin.Microbiol.* **41**:213-217
 97. **Riley, J. A., B. J. Heiter, and P. P. Bourbeau.** 2005. Comparative recovery of micro-organisms from BacT/ALERT plastic and glass FA and FN blood culture bottles. *J.Clin.Microbiol.* **43**:3244-3246
 98. **Russell, J. A.** 2006. Management of sepsis. *N.Engl.J.Med.* **355**:1699-1713
 99. **Satake, S., N. Clark, D. Rimland, F. S. Nolte, and F. C. Tenover.** 1997. Detection of vancomycin-resistant enterococci in fecal samples by PCR. *J.Clin.Microbiol.* **35**:2325-2330
 100. **Schabereiter-Gurtner, C., M. Nehr, P. Apfaltrer, A. Makristathis, M. L. Rotter, and A. M. Hirschl.** 2008. Evaluation of a protocol for molecular broad-range diagnosis of culture-negative bacterial infections in clinical routine diagnosis. *J.Appl.Microbiol.* **104**:1228-1237
 101. **Schrier, R. W. and W. Wang.** 2004. Acute renal failure and sepsis. *N.Engl.J.Med.* **351**:159-169
 102. **Seifert, H.** 2009. The clinical importance of microbiological findings in the diagnosis and management of bloodstream infections. *Clin.Infect.Dis.* **48 Suppl 4**:S238-S245
 103. **Seng, P., M. Drancourt, F. Gouriet, S. B. La, P. E. Fournier, J. M. Rolain, and D. Raoult.** 2009. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin.Infect.Dis.* **49**:543-551
 104. **Shrestha, N. K., M. J. Tuohy, G. S. Hall, C. M. Isada, and G. W. Procop.** 2002. Rapid identification of *Staphylococcus aureus* and the *mecA* gene from BacT/ALERT blood culture bottles by using the LightCycler system. *J.Clin.Microbiol.* **40**:2659-2661
 105. **Stove, S., T. Welte, T. O. Wagner, A. Kola, A. Klos, W. Bautsch, and J. Kohl.** 1996. Circulating complement proteins in patients with sepsis or systemic inflammatory response syndrome. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* **3**:175-183
-

106. **Talmor, D., D. Greenberg, M. D. Howell, A. Lisbon, V. Novack, and N. Shapiro.** 2008. The costs and cost-effectiveness of an integrated sepsis treatment protocol. *Crit Care Med.* **36**:1168-1174
107. **Tausig, F. and F. J. Wolf.** 1964. Streptavidin--a substance with avidin-like properties produced by microorganisms. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **14**:205-209
108. **Tetta, C., V. Fonsato, C. Ronco, and G. Camussi.** 2005. Recent insights into the pathogenesis of severe sepsis. *Crit Care Resusc.* **7**:32-39
109. **Thomas, L. C., H. F. Gidding, A. N. Ginn, T. Olma, and J. Iredell.** 2007. Development of a real-time *Staphylococcus aureus* and MRSA (SAM-) PCR for routine blood culture. *J.Microbiol.Methods* **68**:296-302
110. **Thorpe, T. C., M. L. Wilson, J. E. Turner, J. L. DiGuiseppi, M. Willert, S. Mirrett, and L. B. Reller.** 1990. BacT/Alert: an automated colorimetric microbial detection system. *J.Clin.Microbiol.* **28**:1608-1612
111. **Tsalik, E. L., D. Jones, B. Nicholson, L. Waring, O. Liesenfeld, L. P. Park, S. W. Glickman, L. B. Caram, R. J. Langley, J. C. van Velkinburgh, C. B. Cairns, E. P. Rivers, R. M. Otero, S. F. Kingsmore, T. Lalani, V. G. Fowler, and C. W. Woods.** 2009. Multiplex PCR to Diagnose Blood Stream Infections in Patients Admitted from the Emergency Department with Sepsis. *J.Clin.Microbiol.*
112. **Ubukata, K., R. Nonoguchi, M. Matsuhashi, and M. Konno.** 1989. Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene, which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein. *J.Bacteriol.* **171**:2882-2885
113. **Vince, A., S. Z. Lepej, B. Barsic, D. Dusek, Z. Mitrovic, R. Serventi-Seiwerth, and B. Labar.** 2008. LightCycler SeptiFast assay as a tool for the rapid diagnosis of sepsis in patients during antimicrobial therapy. *J.Med.Microbiol.* **57**:1306-1307
114. **von Lilienfeld-Toal, M., L. E. Lehmann, A. D. Raadts, C. Hahn-Ast, K. S. Orlopp, G. Marklein, I. Purr, G. Cook, A. Hoeft, A. Glasmacher, and F. Stuber.** 2009. Utility of a commercially available multiplex real-time PCR assay to detect bacterial and fungal pathogens in febrile neutropenia. *J.Clin.Microbiol.* **47**:2405-2410
115. **Watkin, R. W., S. Lang, P. A. Lambert, W. A. Littler, and T. S. Elliott.** 2003. The microbial diagnosis of infective endocarditis. *J.Infect.* **47**:1-11
116. **Weber, P. C., D. H. Ohlendorf, J. J. Wendoloski, and F. R. Salemme.** 1989. Structural origins of high-affinity biotin binding to streptavidin. *Science* **243**:85-88
117. **Weinstein, M. P., S. Mirrett, L. G. Reimer, M. L. Wilson, S. Smith-Elekes, C. R. Chuard, K. L. Joho, and L. B. Reller.** 1995. Controlled evaluation of BacT/Alert standard aerobic and FAN aerobic blood culture bottles for detection of bacteremia and fungemia. *J.Clin.Microbiol.* **33**:978-981
118. **Weinstein, M. P., S. Mirrett, M. L. Wilson, L. G. Reimer, and L. B. Reller.** 1994. Controlled evaluation of 5 versus 10 milliliters of blood cultured in aerobic BacT/Alert blood culture bottles. *J.Clin.Microbiol.* **32**:2103-2106
119. **Weinstein, M. P., M. L. Towns, S. M. Quartey, S. Mirrett, L. G. Reimer, G. Parmigiani, and L. B. Reller.** 1997. The clinical significance of positive blood cultures

- in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin.Infect.Dis.* **24**:584-602
120. **Weinstein, M. P., M. L. Towns, S. M. Quartey, S. Mirrett, L. G. Reimer, G. Parmigiani, and L. B. Reller.** 1997. The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults. *Clin.Infect.Dis.* **24**:584-602
121. **Wellinghausen, N., B. Wirths, A. Essig, and L. Wassill.** 2004. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-linked immunosorbent assay system for direct identification of gram-positive cocci and gram-negative bacilli from positive blood cultures. *J.Clin.Microbiol.* **42**:3147-3152
122. **Wellinghausen, N., B. Wirths, A. R. Franz, L. Karolyi, R. Marre, and U. Reischl.** 2004. Algorithm for the identification of bacterial pathogens in positive blood cultures by real-time LightCycler polymerase chain reaction (PCR) with sequence-specific probes. *Diagn.Microbiol.Infect.* **48**:229-241
123. **Westh, H., G. Lisby, F. Breyses, B. Boddinhaus, M. Chomarat, V. Gant, A. Goglio, A. Raglio, H. Schuster, F. Stuber, H. Wissing, and A. Hoeft.** 2009. Multiplex real-time PCR and blood culture for identification of bloodstream pathogens in patients with suspected sepsis. *Clin.Microbiol.Infect.* **15**:544-551
124. **Wilson, M. L., M. P. Weinstein, S. Mirrett, L. G. Reimer, R. J. Feldman, C. R. Chuard, and L. B. Reller.** 1995. Controlled evaluation of BacT/alert standard anaerobic and FAN anaerobic blood culture bottles for the detection of bacteremia and fungemia. *J.Clin.Microbiol.* **33**:2265-2270
125. **Wilson, M. L., M. P. Weinstein, L. G. Reimer, S. Mirrett, and L. B. Reller.** 1992. Controlled comparison of the BacT/Alert and BACTEC 660/730 nonradiometric blood culture systems. *J.Clin.Microbiol.* **30**:323-329
126. **Winters, B. D., M. Eberlein, J. Leung, D. M. Needham, P. J. Pronovost, and J. E. Sevransky.** 2010. Long-term mortality and quality of life in sepsis: a systematic review. *Crit Care Med.* **38**:1276-1283
127. **Witt, N., G. Rodger, J. Vandesompele, V. Benes, A. Zumla, G. A. Rook, and J. F. Huggett.** 2009. An assessment of air as a source of DNA contamination encountered when performing PCR. *J.Biomol.Tech.* **20**:236-240
128. **Wu, Z., G. D. Wright, and C. T. Walsh.** 1995. Overexpression, purification, and characterization of VanX, a D-, D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. *Biochemistry* **34**:2455-2463
129. **Yang, J., D. Lee, Y. Kim, B. Kang, K. Kim, and N. Ha.** 2007. Occurrence of the van genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from clinical isolates in Korea. *Arch.Pharm.Res.* **30**:329-336
130. **Zaragoza, R., A. Artero, J. J. Camarena, S. Sancho, R. Gonzalez, and J. M. Nogueira.** 2003. The influence of inadequate empirical antimicrobial treatment on patients with bloodstream infections in an intensive care unit. *Clin.Microbiol.Infect.* **9**:412-418
-

7 Danksagungen

Ich danke allen Mitarbeitern der Hain Lifescience GmbH und des Labors Dr. Limbach & Kollegen für die unbürokratische und kollegiale Zusammenarbeit.

Allen MTAs und BTAs des mikrobiologischen Labors der Universitätsklinik Düsseldorf möchte ich dafür danken, mich vom ersten Drei-Ösen-Ausstrich bis zum letzten Line-Blot unterstützt zu haben. Ohne diese Hilfe, die ich bitter nötig hatte, wäre diese Arbeit mit Sicherheit nicht fertig geworden.

Meinem Doktorvater Colin MacKenzie danke ich für die unendliche Geduld, die ständige Verfügbarkeit und die vielen tollen Gespräche. Auch wenn du deinen Einsatz für selbstverständlich hältst, ist es ein unendlicher Luxus, solch einen Doktorvater zu haben.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Mathis Steindor

Ausbildung

11/2011	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,5)
08/2007	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)
10/2005–11/2011	Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
1995–2004	Quirinus-Gymnasium Neuss, Abschluss: Abitur (Note 1,8)
1991–1995	Ev. Friedrich-Von-Bodelschwingh-Grundschule Neuss

Praktisches Jahr

08/2010–07/2011	1. Tertia: Innere Medizin – Zürcher Höhenklinik Wald, Wald (ZH), Schweiz 2. Tertia: Chirurgie (Unfall- und Handchirurgie, Kinderchirurgie) – Universitätsklinik Düsseldorf 3. Tertia: Pädiatrie (Hämatologie und Onkologie, Allgemeine und Notfallambulanz) – Universitätsklinik Düsseldorf
-----------------	---

Zivildienst

2004–2005	Zivildienst im OP der Hals-Nasen-Ohren-Klinik – Lukaskrankenhaus Neuss
-----------	--