

# **UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF**

Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

Sektion Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin  
Prof. Dr. med. Dominique Singer

## **Mikrokalorimetrische Detektion von Katheterinfektionen in der neonatologisch-pädiatrischen Intensivmedizin**

### **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin  
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Julian O. Weiser  
aus Frankfurt am Main

Hamburg 2011

**Angenommen von der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 18.07.2011**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

**Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. D. Singer**

**Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. H. Rohde**

**Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. S. Kluge**

# Inhaltsverzeichnis

1	Arbeitshypothese und Fragestellung .....	1
2	Einleitung .....	2
2.1	Katheterassoziierte Infektionen .....	2
2.1.1	Verbreitung und Keimspektrum .....	2
2.1.2	Pathogenese .....	5
2.1.3	Diagnostik.....	7
2.1.3.1	Methoden mit Katheterentfernung .....	7
2.1.3.2	Methoden ohne Katheterentfernung .....	9
2.1.3.3	Zeitaufwand .....	11
2.2	Die isotherme Wärmeflusskalorimetrie.....	11
2.2.1	Funktionsprinzip des verwendeten Mikrokalorimeters (2277 BioActivity Monitor) .....	12
2.2.2	Anwendungsgebiete der Mikrokalorimetrie.....	14
3	Material und Methoden .....	17
3.1	Material.....	17
3.1.1	Chemikalien und Einwegmaterialien .....	17
3.1.2	Laborgeräte.....	17
3.1.3	Medien und Lösungen .....	18
3.1.4	Bakterienstämme .....	19
3.1.5	Katheter .....	19

3.2	Methoden .....	20
3.2.1	Bakterienkultur und mikrokalorimetrische Messung .....	20
3.2.2	Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen .....	21
3.2.2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457 .....	21
3.2.2.2	Verschiedene Bakterienspezies .....	21
3.2.3	Wärmeflussmessung an Kathetern .....	22
3.2.3.1	Kontrolliert kolonisierte Katheter.....	22
3.2.3.2	<i>Ex vivo</i> gewonnene Katheter .....	23
4	Ergebnisse.....	25
4.1	Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen .....	26
4.1.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457 .....	26
4.1.2	Verschiedene Bakterienspezies .....	27
4.2	Wärmeflussmessung an Kathetern .....	32
4.2.1	Kontrolliert kolonisierte Katheter.....	32
4.2.2	<i>Ex vivo</i> gewonnene Katheter .....	34
5	Diskussion .....	37
5.1	Methodenkritik .....	37
5.2	Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen .....	39
5.2.1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457 .....	39
5.2.2	Verschiedene Bakterienspezies .....	42
5.3	Wärmeflussmessung an Kathetern .....	45

5.3.1	Kontrolliert kolonisierte Katheter.....	45
5.3.2	<i>Ex vivo</i> gewonnene Katheter .....	49
5.4	Sensitivität der Mikrokalorimetrie.....	51
5.5	Möglicher Stellenwert der Mikrokalorimetrie in der klinischen Infektionsdiagnostik .....	52
6	Zusammenfassung .....	55
7	Literaturverzeichnis .....	57
8	Anhang .....	69
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	69
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	70
8.3	Lebenslauf .....	71
8.4	Danksagung .....	72
8.5	Eidesstattliche Versicherung .....	73

# 1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Nosokomiale Infektionen sind ein Problem von allgemein anerkannter medizinischer und ökonomischer Relevanz. Jährlich erkranken in Europa 3 Millionen Menschen an einer Infektion, die sie sich während eines Klinikaufenthaltes zugezogen haben. Die Zahl dieser Infektionen steigt weiterhin. Eine der häufigsten Formen stellen Septikämien dar, welche aus der Besiedlung von intravasalen Kathetern mit Bakterien resultieren. Eine Katheterbesiedlung kann mit derzeitigen Methoden erst nach 24 bis 48 Stunden nachgewiesen werden. Die Entwicklung innovativer Methoden zur Beschleunigung der Diagnose und Identifizierung des Infektionsherdes sind somit von großer klinischer Bedeutung.

Jede lebende Zelle produziert Wärme. Bereits in früheren Studien mit einem Mikrokalorimeter wurde eine neue Möglichkeit gezeigt, Mikroorganismen anhand ihrer Wärmeabgabe nachzuweisen. Der erfolgreiche Einsatz der Mikrokalorimetrie in der Medizin zum Nachweis von Bakterien könnte eine schnellere, kosteneffektive und leicht handhabbare Nachweismethode darstellen. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung von bakteriell kolonisiertem Gefäßkathetermaterial mittels Mikrokalorimetrie in der Pädiatrischen und Neonatologischen Intensivmedizin.

Zentrale Fragen der vorliegenden Arbeit bestehen darin, ob

- die Mikrokalorimetrie eine Keimdetektion an Venenkathetern ermöglicht,
- die Wärmeflussmessungen schneller ein Ergebnis liefern als konventionelle mikrobiologische Methoden und
- diese Methodik sogar eine Keimidentifikation erlaubt.

## 2 Einleitung

### 2.1 Katheterassoziierte Infektionen

#### 2.1.1 Verbreitung und Keimspektrum

Da für eine Vielzahl von medizinischen Maßnahmen intravasale Zugänge benötigt werden, ist der Einsatz von Venenkathetern unverzichtbar geworden (Raad and Hanna, 2002). Dies gilt uneingeschränkt auch oder gerade für die Behandlung von neonatologischen und pädiatrischen Intensivpatienten. Die Terminologie zur Unterscheidung verschiedener Katheter kann sich nach dem Gefäß richten (z.B. periphervenös, zentralvenös oder arteriell); der vorgesehenen Einsatzdauer (z.B. vorübergehend oder kurzzeitig gegenüber dauerhaft oder langfristig); der Insertionsstelle (z.B. subklavikulär, femoral, jugulär und Einschwemmkatheter); dem Weg von der Haut zu dem Gefäß (z.B. getunnelt gegenüber nicht getunnelt); der physischen Länge (z.B. kurz gegenüber lang); oder nach speziellen Charakteristiken (z.B. Vorhandensein oder Fehlen einer Manschette, Imprägnierung mit Heparin, Antibiotika oder Antiseptika, und die Anzahl an Lumen).

Als im Krankenhaus erworbene oder auch nosokomiale Infektionen betrachtet man solche Infektionen, die nicht zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits manifest oder aber in der Inkubation waren (Garner et al., 1988). Nosokomiale Infektionen stellen eine der bedeutendsten Herausforderungen der modernen Medizin dar. Ihre Bedeutung lässt sich bei Blick auf eine der größten Datensammlungen bezüglich nosokomialer Infektionen, der EPIC Studie aus dem Jahr 1992, abschätzen. In dieser 1-Tages-Punkt-Analyse (28.04.1992) wurden aus 2.064 Intensivstationen in Westeuropa 10.038 Patienten beurteilt. 4.501 Patienten litten an einer Infektion und 21% davon an einer im Krankenhaus erworbenen Infektion (Vincent et al., 1995). Die katheterassoziierten Septikämien sind nach Harnwegsinfektionen, Wundinfektionen und Pneumonien die häufigsten nosokomialen Infektionen. Auf

Kinderintensivstationen stehen sie sogar an erster Stelle (National Nosocomial Infections Surveillance, 2004; Richards MJ, 1999). Jährlich treten in den USA schätzungsweise 250.000 bis 500.000 katheterassoziierte Blutstrom - Infektionsepisoden auf (Maki, 1981; Banerjee et al., 1991; Heiselman, 1994; Raad, 1998; Mermel, 2000). In einer Untersuchung des National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS)-Systems bei der die Krankenakten von 498.998 Patienten beurteilt wurden, sind 87% der Fälle von Sepsis mit einem zentralen Venenkatheter assoziiert (National Nosocomial Infections Surveillance, 2002). Zentrale Venenkatheter sind somit die häufigste Ursache nosokomialer Blutstrominfektionen (Maki, 1981; Banerjee et al., 1991; Raad, 1998). Diese katheterassoziierten Infektionen (KAI) haben signifikanten Einfluss auf Morbidität und Mortalität hospitalisierter Patienten (Siempos et al., 2009; Geffers et al., 2010; Vincent et al., 1995). Die den KAI zurechenbare Mortalität variiert in verschiedenen Studien von keinem Anstieg (Soufir et al., 1999; DiGiovine et al., 1999; Rello et al., 2000) bis zu 35% Anstieg (Collignon, 1994; Pittet et al., 1994). Der Krankenhausaufenthalt wird durch eine KAI um 10 bis 40 Tage verlängert (DiGiovine et al., 1999; Pittet et al., 1994). Die entstehenden Kosten pro Infektion belaufen sich schätzungsweise auf 34.508\$ - 56.000\$ (Dimick et al., 2001; Rello et al., 2000) und die jährlich anfallenden Kosten der Behandlung von Patienten mit Kathetersepsis reichen von 296 Millionen Dollar bis 2,3 Milliarden Dollar.

Die Inzidenz katheterassoziiierter Infektionen variiert je nach untersuchtem Patientengut und medizinischer Einrichtung. Für die USA liegt die Inzidenz bei 5,3 pro 1000 Kathetertagen in Pädiatrischen Intensivstationen (PICUs) und bei 3,1 - 6,4 pro 1000 Kathetertagen in Neonatologischen Intensivstationen (NICUs) (Smith, 2008). In Europa liegt die Inzidenz in Intensivstationen (ICUs) bei 1,1 - 4,2 pro 1000 Kathetertagen (Tacconelli et al., 2009).

Bei nicht getunnelten Kurzzeitkathetern ohne Manschette stellt die Hautflora im Bereich der Punktionsstelle den Hauptursprung einer Kolonisierung mit Bakterien

dar. Mikroorganismen wandern auf der äußeren Katheteroberfläche durch intrakutane und subkutane Bereiche und führen letztendlich zu einer Kolonisierung der intravaskulären Katheterspitze (Maki et al., 1997; Mermel et al., 1991; Raad et al., 1993). Prädilektionsstelle für eine Kolonisation von Langzeitkathetern, wie getunnelte Silikonkatheter mit Manschette oder implantierbaren Ports, ist das Lumen des Anschlussstücks (Hub) oder die Kammer des Ports. Diese Orte können von medizinischem Personal durch Arbeiten am Katheter kontaminiert werden (Raad et al., 1993; Sitgesserra et al., 1984). Hämatogene Besiedelung des Katheters durch Bakteriämie anderen Ursprungs und Kontamination der infundierten Medikamente stellen weitere Infektionswege dar (Eggimann et al., 2004; Elliott, 2000). Entsprechend der Pathogenese von katheterassoziierten Infektionen können die am häufigsten nachgewiesenen Erreger der humanen Hautflora zugerechnet werden. Es handelt sich dementsprechend formal um endogene Infektionen. Die häufigsten von KAI isolierten Mikroorganismen sind: Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) (34%), *Staphylococcus aureus* (17%), *Enterobacter spp.* (9%), *Candida spp.* (9%), *Klebsiella spp.* (6%), *Pseudomonas spp.* (6%) und *Enterococcus spp.* (6%) (Munoz et al., 2004). Bei Neugeborenen hingegen sind Koagulase negative Staphylokokken für 51% der KAI verantwortlich, gefolgt von *Candida spezies*, Enterokokken und gram-negativen Stäbchenbakterien (Gaynes et al., 1996; Baltimore, 1998).

Bei dringendem Verdacht oder Diagnose einer KAI wird eine kalkulierte antibiotische Therapie eingeleitet. Außerdem wird empfohlen, einen infizierten Katheter zu entfernen, da ansonsten ein hohes Risiko eines Rezidivs der KAI besteht. Die Entfernung des Katheters ist obligatorisch bei komplizierten oder schweren Infektionen wie Schock, persistierendem Fieber oder Bakteriämie, oder bei bestimmten Mikroorganismen wie *S. aureus* oder *Candida spp.* (Mermel et al., 2001). Die Prävention von KAI basiert wie die anderer nosokomialer Infektionen auf den Grundregeln der Hygiene, von welchen die Händedesinfektion die Wichtigste ist (Eggimann et al., 2000).

## 2.1.2 Pathogenese

Wesentliches Merkmal von katheterassoziierten Infektionen ist der Nachweis von Oberfläche-adhärenten Bakterien. Diese sind festhaftend, in mehreren Lagen, eingebettet in eine extrazelluläre Matrix auf der Katheteroberfläche organisiert. Diese Organisationsform wird auch als Biofilmbildung bezeichnet. Gerade Koagulase-negative Staphylokokken zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Biofilmbildung aus. Daher ist dieses Phänomen bei diesen Erregern und vor allem *Staphylococcus epidermidis* besonders detailliert untersucht worden und soll hier näher beschrieben werden.

Biofilme definiert Costerton et al. als sesshafte Gemeinschaft mikrobiellen Ursprungs, die reversibel an ein Substrat oder einer Oberfläche anheftet, die in einer eigens produzierten Matrix aus polymeren Substanzen eingelagert sind und einen veränderten Phänotyp in Bezug auf Wachstumsrate und Gentranskription aufweisen (Costerton et al., 1999; Donlan and Costerton, 2002). In Biofilmen entwickeln Bakterien vollständig unterschiedliche Charakteristika als in Suspensionen, sogenannten planktonischen Formen. Im Hinblick auf intravasale Zugänge haben Biofilme verheerende Auswirkungen auf die Virulenz der KAI (O'Toole and Kolter, 1998). Aber auch bei vielen anderen Infektionen wie Karies, zystische Fibrose, Osteonekrose, Harnwegs- und Augeninfektionen erhöhen Biofilme die Virulenz.

Mikroorganismen kolonisieren Katheter, indem sie, begünstigt durch an der Katheteroberfläche angelagerte Wirtproteine wie Fibronektin und Fibrinogen, am Katheter haften und einen Biofilm bilden, der sie sowohl vor dem angeborenen Immunsystem als auch vor Antibiotika schützt (Raad and Bodey, 1992; Bisognano et al., 2000; Stewart et al., 2001). Diese Resistenz eines bakteriellen Biofilmes beruht nicht auf klassischen genetischen Mechanismen, wie Genaustausch oder Mutation. Die Annahme, dass die extrazelluläre Matrix eines Biofilmes das Eindringen eines antimikrobiellen Wirkstoffes verhindere, konnte widerlegt werden. Bei

verschiedenen Erreger/Wirkstoff-Kombinationen konnte eine Penetration nachgewiesen werden, so dass eine eingeschränkte Durchdringung keine signifikante Rolle für die Biofilmresistenz zu spielen scheint (Anderl et al., 2000; Vraný et al., 1997; Stone et al., 2002; Darouiche et al., 1994). Der ruhende Metabolismus einiger Bakterien in einem Biofilm (dormant persister cells) setzt die Angriffsorte von antibiotischen Wirkstoffen außer Betrieb und erhöht somit die Resistenz der Bakterienpopulation (Lewis, 2008). Subinhibitorische Antibiotikakonzentrationen hingegen können die Biofilmbildung auslösen (Hoffman et al., 2005; Anderson and O'Toole, 2008; Nucleo et al., 2009). Da pathogene Bakterien während antimikrobieller Therapie meistens subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen ausgesetzt sind (Odenholt, 2001), können durch die somit begünstigte Biofilmbildung ernsthafte Schwierigkeiten bezüglich der Eradikation von bakteriellen Infektionen entstehen.

Wird ein Fremdkörper (z.B. Katheter) in den Körper eingebracht, interagieren Wirtmoleküle wie Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Glykoproteine, Proteoglykane, Polysaccharide, Lipide und anorganische Ionen mit der Oberfläche und überziehen diese als vorbereitenden Film (Padera, 2006). Dieser Film hat Einfluss auf die Bindung von Mikroorganismen an Fremdmaterial, einige haben hingegen Oberflächenmoleküle, welche eine direkte Bindung an „nackte“ Polymeroberflächen ermöglicht, wie zum Beispiel das Autolysin E (AtlE) von *S. epidermidis* (Heilmann et al., 1997; Padera, 2006).

Der Adhäsionsmechanismus planktonischer Bakterien an Oberflächen verläuft in zwei Schritten, welche die initiale reversible physische Phase und die darauffolgende molekulare und zelluläre Phase beinhaltet (Katsikogianni and Missirlis, 2004). Zunächst bewegen sich Bakterien in Richtung Materialoberfläche aufgrund von physischen Kräften und chemischen Faktoren wie Brownsche Bewegung, Van der Waals Kräfte, Gravitationskraft, elektrostatische Oberflächenladung und hydrophobe Wechselwirkung (Cerca et al., 2005; Harris et al., 2004). Die Ausbildung eines Biofilmes und die Freisetzung einzelner Zellen werden durch die Genexpression

reguliert, welche von der Populationsdichte abhängig ist (*quorum sensing*). Signalmoleküle zur Regulation der Genexpression, beinhalten für gram-negative Bakterien Acyl-Homoserinlactone (AHL) und für gram-positive Bakterien spezifische Peptide (Van Houdt and Michiels, 2005).

In der zweiten Phase kommt es zur Reifung des Biofilmes, indem sich die Mikroorganismen vermehren oder weitere Organismen derselben oder anderer Art rekrutieren und koaggregieren. Gleichzeitig produzieren die meisten Biofilmbakterien extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), welche die Struktur des Filmes stabilisieren (Rohde et al., 2010).

### **2.1.3 Diagnostik**

Die frühe und akkurate Diagnose einer KAI ist für eine optimale Behandlung notwendig. Basierend auf dem gegenwärtigen Verständnis der Pathogenese katheterassoziierter Sepsis wurde eine Vielfalt an diagnostischen Methoden entwickelt (Calfee and Farr, 1999; Farr, 2001; Johnson and Oppenheim, 1992; Raad and Bodey, 1992; Mermel et al., 2001). Die Kulturmethoden zum Nachweis einer KAI können in Methoden mit bzw. ohne Katheterentfernung unterteilt werden.

#### **2.1.3.1 Methoden mit Katheterentfernung**

Schon 1963 beschrieben Druskin und Siegel eine quantitative Kulturmethode, die das Eintauchen der aseptisch abgetrennten Katheterspitze in flüssiges Nährmedium beinhaltet. Jedes Wachstum nach Inkubation über Nacht gilt als klinisch signifikant (Druskin and Siegel, 1963). Die am weitesten verbreitete Methode, um KAI zu diagnostizieren, ist die von Maki beschriebene semiquantitative Kultur (Roll-Plate-Method) (Maki et al., 1977). Dabei wird ein 5 cm langer Katheterabschnitt (oder bei kurzen peripheren Kathetern der komplette Katheter) auf der Oberfläche einer

Blutagarplatte mindestens 4-mal vor und zurück gerollt. Sind nach 24 Stunden mehr als 15 koloniebildende Einheiten (KBE) gewachsen, gilt der Katheter als kolonisiert (gleichbedeutend mit einer lokalen Infektion des Katheters), einer Vorstufe der katheterassoziierten Blutstrominfektion. Diese Methode wird zurzeit als Standard angesehen, obwohl sie eine ungenügende Sensitivität aufweist, da nur die äußere Oberfläche des Katheters untersucht wird und endoluminale Keime somit nicht erfasst werden können. Alternative Techniken mittels quantitativer Kultur bei welchen die Katheterabschnitte nach Durchspülung oder Zentrifugation in flüssigem Nährmedium mit Ultraschall behandelt werden, liefern Ansätze zur Erfassung der endoluminalen Keime. Cleri und Kollegen beschrieben eine solche quantitative Methode für die Katheterabschnittkultur, bei der intravaskuläre und intradermale Kathetersegmente entfernt, in 2 bis 10 ml Trypticase-Soja-Brühe (TSB) eingetaucht und 3-mal durchspült werden. Die Brühe wird über eine Verdünnungsreihe 100-fach verdünnt und 0,1 ml jeder Verdünnung werden ausplattiert. Ein cut-off Wert von 1000 oder mehr KBE wird als positiv angesehen (Cleri et al., 1980). Brun-Buisson und Kollegen modifizierten die quantitative Kulturmethode von Cleri und Kollegen insofern, dass der Katheterabschnitt in einem trockenen sterilen Röhrchen mit 1 ml sterilem Wasser übergossen wird. Daraufhin wird das Röhrchen für 1 Minute mit Ultraschall behandelt und 0,1 ml der Flüssigkeit werden dann auf einer Blutagarplatte ausplattiert. Auch hier gelten 1000 oder mehr KBE als positives Ergebnis (Brunbuisson et al., 1987). Sherertz und Kollegen beschrieben eine weitere Modifikation der von Cleri und Kollegen definierten Technik, bei der Katheterabschnitte in 1 ml Brühe eingetaucht, für 1 Minute mit Ultraschall behandelt und Subkulturen fortlaufender Verdünnungen angefertigt werden (Sherertz et al., 1990). Um eine schnelle Diagnose von KAI zu ermöglichen, wurde eine Vielzahl von mikrobiellen Anfärbemethoden untersucht. Dazu gehören die direkte Gram-Färbung des Katheters (Cooper and Hopkins, 1985), des Ultraschallmediums (Kelly et al., 1996) oder die Gram-Färbung bzw. Acridinorange-Färbung eines Katheterabstrichs (Collignon et al., 1987; Coutlee et al., 1988). In einer Studie leistete die Gram-Färbung eines entfernten Katheterabschnitts hilfreichen Beitrag für

die Diagnose lokaler Infektionen, wies aber eine wesentlich geringere Sensitivität als semi-quantitative oder quantitative Kulturmethode zur Diagnose katheterassoziierter Blutstrominfektionen auf (Cooper and Hopkins, 1985). Die technisch anspruchsvolle Anfärbung von Katheterabschnitten und der hohe Zeitaufwand der Begutachtung unter einem Lichtmikroskop (>30 Minuten) haben die Akzeptanz dieser Technik begrenzt.

### **2.1.3.2 Methoden ohne Katheterentfernung**

Besonders bei Langzeitkathetern oder Patienten mit schwierigen Gefäßbedingungen ist es in manchen Situationen ratsam, den Zugang erst zu entfernen, nachdem ein Zusammenhang der Symptome mit dem Katheter bewiesen ist. Einige prospektive Studien haben gezeigt, dass nur 25 % bis 45 % der Fieber- oder Sepsisepisoden von Patienten mit einem zentralvenösen Katheter echte katheterassozierte Sepsis repräsentieren (Tacconelli et al., 1997; Gowardman et al., 1998).

Durch den Katheter gewonnene qualitative Blutkulturen in Abwesenheit entsprechender peripherer Blutkulturen sind aufgrund der Schwierigkeiten bei der Unterscheidung einer isolierten endoluminalen Kolonisation von einer katheterassozierten Sepsis von begrenztem Nutzen (DesJardin et al., 1999; Juste et al., 2000; Martinez et al., 2002). Es gibt allerdings Hinweise, dass eine einzelne aus einem Langzeitzugang gewonnene quantitative Blutkultur, selbst ohne begleitende positive Blutkultur aus der Peripherie, katheterassozierte Blutstrominfektionen verlässlich erkennen kann, wenn mehr als 100 KBE/ml gefunden werden (Capdevila et al., 1992; Siegman-Igra et al., 1997). Ein Vergleich zweier quantitativer Blutkulturen, genauer einer zentralen Blutkultur aus einem evtl. infizierten Katheter mit einer peripheren, durch Punktion peripherer Venen oder aus einem anderen Zugang gewonnenen Blutkultur, kann zur Diagnose von katheterassozierten Bakteriämien oder Fungämien herangezogen werden, wenn noch keine antimikrobielle Therapie eingeleitet wurde. Verschiedene Studien zur Untersuchung des diagnostischen Wertes dieser Methode haben unterschiedliche Trenngrenzen für die gepaarten quantitativen Blutkulturen ermittelt. Diese reichen von 3-fachem

(Douard et al., 1994) über 4-fachen (Douard et al., 1999) bis zu 5-fachen Unterschied (Flynn et al., 1988) der Keimkonzentration aus dem Katheter bzw. der Peripherie. Gepaarte Blutkulturen sind besonders für die Diagnose von KAI in Bezug auf Langzeitkatheter interessant, durch ihren hohen finanziellen Aufwand für Kurzzeitkatheter hingegen von geringerem Nutzen. Die gute Verfügbarkeit von automatisierten Blutkultursystemen (BACTEC™ System), welche Blutkulturen kontinuierlich auf mikrobielles Wachstum überwachen, hat zu einer innovativen Anwendung dieses Systems zur Detektion von KAI geführt: Der Differential Time to Positivity (DTP) welche die Zeit bis zur Positivität einer zentralen mit einer peripheren Blutkultur vergleicht. Ein positives Ergebnis der zentralen Blutkultur aus dem Katheter mehr als 2 Stunden vor Positivität der Blutkultur der peripheren Vene weist ebenso wie der wiederholte Nachweis von Keimwachstum einer zentralen Blutkultur bei negativer peripherer Blutkultur mit großer Sicherheit auf eine katheterassoziierte Blutstrominfektion hin (Blot et al., 1999; Seifert et al., 2003). Als eine weitere Alternative zur Katheterentfernung und Kultur wurde die in-situ Untersuchung von Kathetern mittels einer Kultur-Bürste, welche luminalen Biofilm und kolonisiertes Fibrin und Thromben aus dem Inneren von Langzeitkathetern aufgreifen kann. Die wenigen Studien über diese Technik haben kontroverse Ergebnisse erzielt, außerdem wurde von iatrogenen verfahrensabhängigen Bakteriämien in Zusammenhang mit der Kultur-Bürste berichtet (Tighe et al., 1996). Auch der Acridine-Orange Leucocyten Cytospin Test setzt keine Katheterentfernung für die Diagnose einer KAI voraus. Bei dieser Direktmethode wird 1 ml Blut am Katheter abgenommen. Nach Lyse in sterilem Wasser und Zentrifugation wird die Probe mit Acridine-Orange gefärbt und mikroskopisch untersucht. Jeglicher Nachweis von Mikroorganismen bedeutet ein positives Ergebnis (Darouiche, 1999). Einige Studien haben andere Färbemethoden an Blut aus zentralen Venenkathetern untersucht, wie z.B. die Gram-Färbung (Moonens et al., 1994; Alvarez et al., 2001), die Quinacrin-Färbung (Alvarez et al., 2001) oder die Nitroblau-Tetrazolium-Färbung (Rushforth et al., 1993), aber es werden weitere Ergebnisse benötigt, um valide Aussagen über den Nutzen dieser Methoden zu treffen.

### **2.1.3.3 Zeitaufwand**

Ein allgemeines Problem der gegenwärtigen Diagnostik von KAI stellt der trotz moderner Medizin benötigte hohe Zeitbedarf dar, denn die Gesamtheit der genannten Methoden liefert durch die zeitaufwendige Kultivierung der Proben erst nach 24 bis 48 Stunden ein Ergebnis. Ein Antibiotogramm ist in der Regel erst nach weiteren 24 Stunden verfügbar, da auch in diesem Fall erhebliches Keimwachstum abgewartet werden muss, um Hemmhöfe erkennen und ausmessen zu können. Diese Zeitspanne kann sowohl Patienten als auch Behandler in kritische Situationen bei der Fokussuche bringen. Somit ist es von großer klinischer Bedeutung, diagnostische Methoden zu erforschen, die mit geringem finanziellem Aufwand schneller ein Ergebnis liefern und einfach zu handhaben sind.

## **2.2 Die isotherme Wärmeflusskalorimetrie**

Kalorimetrie ist eine vielseitige, quantitative und kostengünstige Methode, um Wärmeproduktion zu messen. Das erste isotherme Kalorimeter wurde im 18. Jahrhundert von Lavoisier und Laplace zur Bestimmung von Wärme bei chemischen Reaktionen erfunden. Sie hielten die Temperatur im sogenannten „Eis-Kalorimeter“ mit Eis konstant und bemerkten, dass die Masse des flüssigen Wassers, welches durch das Schmelzen des Eises entsteht, direkt proportional zu der freigesetzten Wärme der Reaktion ist, die in dem Kalorimeter stattfindet (Lavoisier and Laplace, 1780). Die ständige Weiterentwicklung dieses Systems seit den ersten Versuchen führte zu den heutigen Mikrokalorimetern mit den Messtechniken Batchkalorimetrie, Durchflusskalorimetrie, Titrationskalorimetrie und Lösungskalorimetrie, die schon kleinste Wärmeflüsse im Mikrowatt ( $\mu\text{W}$ )-Bereich bzw. Wärmemengen im Millijoule (mJ)-Bereich messen können. Da alle chemischen, biologischen und

physikalischen Prozesse Wärme abgeben oder aufnehmen, bestehen nahezu unbegrenzte Anwendungsmöglichkeiten für die Mikrokalorimetrie.

### **2.2.1 Funktionsprinzip des verwendeten Mikrokalorimeters (2277 BioActivity Monitor)**

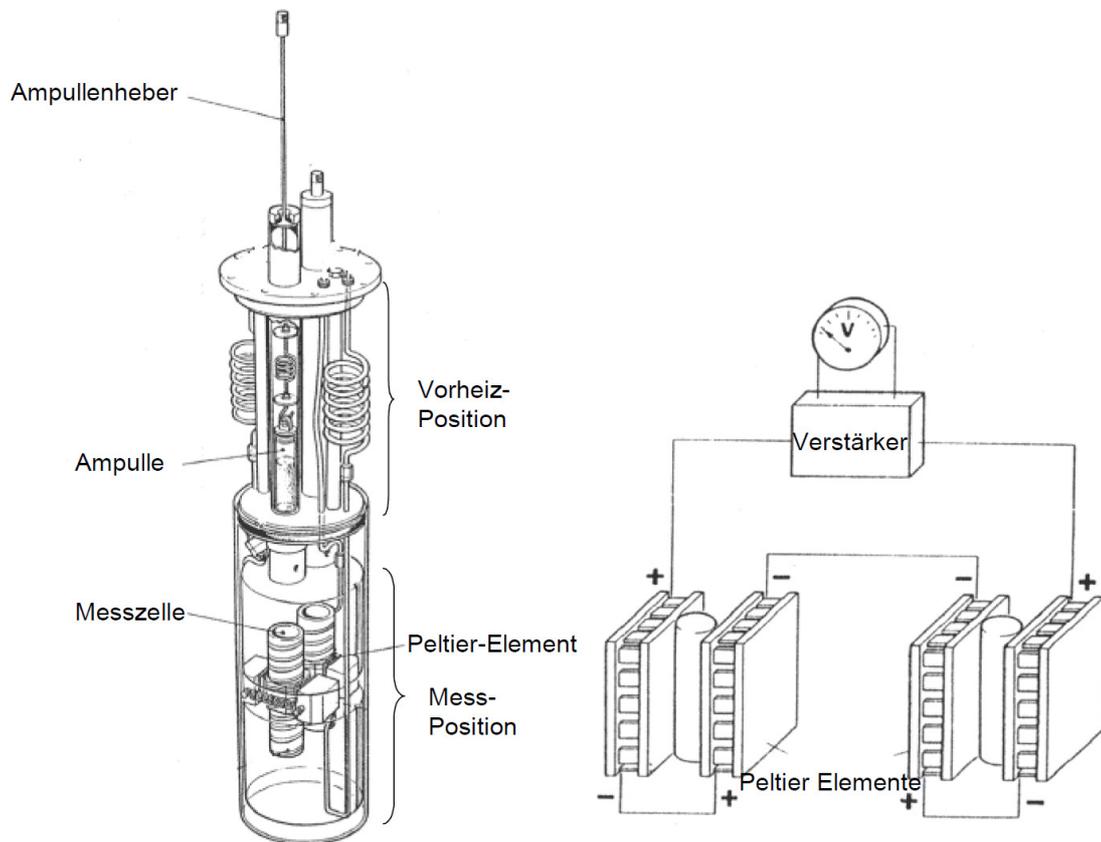
Das in vorliegender Arbeit eingesetzte Batchkalorimeter LKB – 2277 BioActivity Monitor ist ein isothermes Wärmeflusskalorimetriesystem, welches kontinuierlich den Wärmefluss in einem Temperaturbereich von 20-80 °C ermittelt. Es beinhaltet 4 voneinander unabhängige Messzylinder, die simultan verwendet werden können. Ein solcher Messzylinder unterteilt sich in eine thermische Äquilibrierungs- und eine Messposition und umschließt eine Messampulle, welche das zu untersuchende Objekt beinhaltet, sowie eine Referenzampulle, welche ähnliches jedoch inertes Material enthält. Um Genauigkeit und Sensitivität zu erhöhen, findet ein Zwillingssystem Anwendung, indem der Wärmefluss der Messampulle mit dem der Referenzampulle verglichen wird. Die Messposition des Messzylinders ist von einem exakt temperierten, gegen außen isolierten Wasserbad von 25 Litern umgeben. Die Stabilität der Temperatur des Wasserbades wird vom Hersteller mit  $\pm 0,0002$  °C angegeben. Entsteht Wärme in der Messampulle („Wärmequelle“), fließt diese in dem Bestreben einen Temperatúrausgleich mit der Umgebung zu schaffen, an das Wasserbad ab. Dieses fungiert mit seiner erheblich höheren Wärmekapazität und konstanten Temperatur als ein unendlicher Wärmeabfluss („Wärmesenke“), daher wird das System als isotherm bezeichnet. Durch die Differenz zwischen der geringfügig gesteigerten Temperatur der Messampulle, in welcher der zu untersuchende Prozess stattfindet, und der konstanten Temperatur des Wasserbades, entsteht ein Temperaturgradient über einem zwischengeschalteten Peltier-Element. Ein Peltier-Element ist ein Bimetall aus Halbleiter-Material und ein ausgesprochen sensibler Detektor, der den Gradienten in eine Spannung konvertiert, die proportional zum Wärmefluss und dem Vorgang in der Messampulle ist.



**Abbildung 1: Das Mikrokalorimeter 2277 BioActivity Monitor.**

Dieses Batchkalorimetriesystem ermöglicht die kontinuierliche Messung des Wärmeflusses in 4 voneinander unabhängig verwendbaren Messzylindern.

*Quelle: LKB 2277 Bioactivity Monitor - Instruction Manual*



**Abbildung 2: Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters.**

Links dargestellt ist ein Messzylinder, in dessen oberen Bereich sich die Vorheizposition für Messampullen zur Äquilibration der Temperatur auf 37°C befindet. Im unteren Bereich befindet sich die Messposition, welche rechts im Bild mit den umgebenden Peltier-Elementen noch einmal vergrößert abgebildet ist.

Quelle: LKB 2277 Bioactivity Monitor - Instruction Manual

## 2.2.2 Anwendungsgebiete der Mikrokalorimetrie

Die Mikrokalorimetrie kann dazu verwendet werden, die Wärme von chemischen und biochemischen Prozessen zu messen (Chowdhry et al., 1983; Buckton et al., 1991) und hat sich als nützliches Instrument zur Untersuchung diverser zellulärer Aktivitäten unterschiedlichster Organismen erwiesen (Beezer et al., 1977; Criddle et al., 1991; Kemp, 1991). Praktikable Einsatzbereiche umfassen die Analyse biologischer Makromoleküle (Privalov and Dragan, 2007), die Erforschung von Enzymreaktionen (Debord et al., 2005), die Untersuchung des Zellmetabolismus (Liu

et al., 2000), die Bestimmung der freigesetzten Energie von Mitochondrien (Zhou et al., 2001) und die Ermittlung der Stabilität von polymerem Implantatmaterial (Charlebois et al., 2003). Außerdem kann die Mikrokalorimetrie in der synthetischen Medikamentenentwicklung (Huang et al., 1998), für die Beschreibung quantitativer Struktur-Wirkungsbeziehungen (Montanari et al., 1999) oder für die Gewinnung von Erkenntnissen über Abwasser (Dziejowski, 1995) ebenfalls vorteilhaft eingesetzt werden. Die Mikrokalorimetrie wurde auch im Rahmen verschiedener biomedizinischer Fragestellungen erfolgreich eingesetzt, so zur Untersuchung der Toleranz gegenüber Hypoxie/Ischämie (Singer et al., 1991), des Zusammenhangs zwischen Körpergröße und Energieumsatz (Singer et al., 1995) und der Stoffwechsellumstellungen nach der Geburt (Mühlfeld et al., 2005).

Eine weitere vielversprechende Anwendungsmöglichkeit stellt die Untersuchung von Mikroorganismen dar. Einzelne Mikroorganismen produzieren im Durchschnitt 1-3 pW Wärme pro Zelle (James, 1987). Aufgrund ihrer exponentiellen Replikation entstehen Veränderungen der produzierten Wärme einer Probe, die anhand der Mikrokalorimetrie in Echtzeit dokumentiert werden können. So wurden bereits umfangreiche Erkenntnisse in der Bodenkunde gesammelt, wie z.B. der Abbau von Zucker durch Bodenmikroben (Ljungholm et al., 1979; Yamano and Takahashi, 1983). Es stellte sich heraus, dass die Mikrokalorimetrie sowohl qualitative (Critter et al., 2002a; Critter et al., 2002b; Barros et al., 2003) als auch quantitative (Prado and Airoidi, 2002; Barros and Feijoo, 2003) Hinweise auf Aktivität von Bodenmikroben liefern kann und der gemessene Wärmefluss in signifikantem Zusammenhang mit der Zellanzahl von Bakterien oder Pilzen steht. Auf ähnliche Weise wurde auch die mikrobielle Biomasse im Erdboden bestimmt (Sparling, 1983; Raubuch and Beese, 1999).

Des Weiteren fand die Mikrokalorimetrie durch die Korrelation von bakterieller Zellanzahl mit dem Wärmefluss auch in der Hygiene Anwendung, z.B. zur Darstellung der Wirkung von Antiseptika auf Mikroorganismen (Allerberger and Dierich, 1988). Auch zur Detektion und Erforschung von Bakterien in

Nahrungsmitteln wie sterilisierte Milch (Berridge et al., 1974) oder vakuumverpackte Nahrung (Lampi et al., 1974) wurde diese Methode bereits erfolgreich eingesetzt. Darüber hinaus ist die Mikrokalorimetrie in der Lage, Details über die zeitliche Abfolge von Prozessen darzustellen, die von keiner anderen Methode erfasst werden (Miles et al., 1986).

Auch die medizinische Mikrobiologie hat diese Methode bereits frühzeitig für die Untersuchung von Mikroorganismen eingesetzt, so konnten verschiedene Mycoplasmatales durch mikrokalorimetrische Messungen detektiert und anhand ihrer Wärmeflusskurven gegeneinander abgegrenzt werden (Ljungholm et al., 1976). In den letzten Jahren wurde die Mikrokalorimetrie in der Mikrobiologischen Forschung wieder aufgegriffen. Sowohl die mikrokalorimetrische Untersuchung mikrobieller Kontamination von Thrombozytenkonzentraten (Trampuz et al., 2007a), als auch die Diagnostik einer experimentellen Meningitis anhand von Wärmeproduktionsraten in Liquor cerebrospinalis (Trampuz et al., 2007b) zeigte, dass diese Methode nach kurzer Zeit einen Keimnachweis liefert und eine Korrelation zwischen dem gemessenen Wärmefluss und der Bakterienanzahl gegeben ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Chemikalien und Einwegmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien und Einwegmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA), B. Braun (Melsungen), Brand (Wertheim), Ecolab (Düsseldorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner bio-one (Nürtingen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

#### 3.1.2 Laborgeräte

**Tabelle 1**

	Gerätebezeichnung	Hersteller
Schüttelinkubator		New Brunswick Scientific Co. Inc. (New Brunswick, USA)
Photometer	SmartSpec™ 3000	Bio Rad (Hercules, USA)
Ultraschallzerkleinerer	Digital Sonifier®	Branson (Danbury, USA)
Waage	PC4400	Mettler-Toledo (Giessen)
Sterilwerkbank	Biological Safety Cabinets Model No. NU-440-400E	NuAire (Plymouth, USA)
Massenspektrometer	Mikroflex™LT	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
MALDI Auswertungssoftware	MALDI-Biotyper 2.0	Bruker Daltonics (Billerica, USA)
Mikrokalorimeter	2277 BioActivity Monitor	LKB (Bromma, Schweden; jetzt: TA Instruments, Eschborn)

### 3.1.3 Medien und Lösungen

- **BBL™ Trypticase™ Soy Broth (TSB; pH 7,3 ± 0,2)**

Hersteller: Becton, Dickinson and Company

(Franklin Lakes, NJ, USA)

30 g TSB-Pulver wurden mit einem Liter

vollentionisiertem Wasser angesetzt und durch 20-  
minütiges Autoklavieren bei 121 °C sterilisiert.

- **Columbia Agar with Sheep Blood Plus (Blutagar; pH 7,0)**

Hersteller: Oxoid Deutschland GmbH

(Wesel, Deutschland)

- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4)**

8 g/l NaCl

0,20 g/l KCl

1,44 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

0,24 g/l  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

Die Bestandteile wurden in 800 ml vollentionisiertem  
Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4  
eingestellt, mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 Liter aufgefüllt und 20 min  
durch autoklavieren sterilisiert.

### 3.1.4 Bakterienstämme

Tabelle 2

Stamm	Charakteristika	Referenz
<i>Staphylococcus epidermidis</i> 1457	Blutkultur-Isolat, biofilmpositiv	[Mack et al., 1992]
<i>S. epidermidis</i> 1457-M10	Isogene Mutante des Stammes 1457, biofilmnegativ	[Mack et al., 1994]
<i>Escherichia coli</i> TOP 10		Invitrogen (Carlsbad, USA)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 29213	
<i>Serratia marcescens</i>	Klinisches Isolat	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des UKE

### 3.1.5 Katheter

Folgende Katheter wurden verwendet:

- **Pediatric Multi-Lumen Central Venous Catheterization Set with Blue FlexTip<sup>®</sup> Catheter for Femoral Vein Insertion der Firma Arrow-Howes<sup>TM</sup>**
- **Premicath Verweilkatheter mit spaltbarer Nadel der Firma Vygon GmbH & Co.KG**

Sofern Patienten-inkubiertes Material verwendet wurde, handelte es sich hierbei ausschließlich um Abfallmaterial und es wurden keinerlei Verbindungen zu Patientendaten hergestellt. Diese Katheter waren ebenfalls von der oben aufgeführten Art.

## **3.2 Methoden**

### **3.2.1 Bakterienkultur und mikrokolorimetrische Messung**

Zur Vorkultivierung wurde jeweils eine Kolonie des Bakterienstammes in ein steriles Glasgefäß mit 2 ml TSB gegeben und, soweit nicht anders erwähnt, über Nacht bei 37 °C als Schüttelkultur bei 200 Umdrehungen pro Minute (U/Min) inkubiert. Eine sterile TSB Kontrolle wurde unter denselben Bedingungen bebrütet.

Nach photometrischer Bestimmung der Bakterienkonzentration in den Vorkulturen bei einer Wellenlänge von 600 nm wurde für die Untersuchung eine Verdünnungsreihe hergestellt. Von diesen Hauptkulturen wurden dann 3,5 ml in eine sterilisierte Edelstahllampulle mit Teflondichtung gegeben und für 20 Minuten in der Vorheizposition des Mikrokolorimeters äquilibriert. Danach wurde die Messampulle in die Messposition abgesenkt und eine 10-stündige Messung des Wärmeflusses begonnen, wobei alle 5 Minuten ein Messwert in Mikrowatt mit der Digitam Software (Thermometric AB und Scitech Software AB, Schweden) aufgezeichnet wurde. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Microsoft® Office Excel® 2007 SP2 (Microsoft Corp., Redmond, USA) und SigmaPlot® 2004 Version 9.01 (Systat Software Inc., San Jose, USA)

Für eine Stammhaltung wurden die Bakterien auf Blutagarplatten ausgestrichen, 24 Stunden bei 37 °C inkubiert, anschließend bei 4 °C gelagert und in regelmäßigen Abständen subkultiviert.

## 3.2.2 Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen

### 3.2.2.1 *Staphylococcus epidermidis* 1457

In einer ersten Versuchsreihe galt es zunächst einmal darzustellen, wie sich Mikroorganismen in Suspensionen in dem angewandten Messsystem verhalten und vor allem, ob die Möglichkeit einer Detektion beziehungsweise sogar einer quantitativen Abstufung der Keimkonzentration besteht. Zu diesem Zweck wurden 2 ml steriles TSB, sowie 2 ml mit einer KBE *S. epidermidis* 1457 beimpftes TSB für 10 Stunden bei 37 °C als Schüttelkultur bei 200 U/Min inkubiert. Daraufhin wurden mittels photometrischer Bestimmung der OD600 einer 1:6 Verdünnung mit gleichem Medium und durch konsekutive Verdünnungen folgende Konzentrationen eingestellt: 0 (steriles TSB),  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml. Für die mikrokalorimetrischen Messungen wurden Edelstahlampullen mit 3,5 ml der Kulturen befüllt, 20 Minuten im Gerät äquilibriert und daraufhin eine Messung über 10 Stunden durchgeführt.

### 3.2.2.2 Verschiedene Bakterienspezies

Um herauszufinden ob anhand mikrokalorimetrischer Wärmeflussmessungen eine Differenzierung unterschiedlicher Keimspezies realisierbar ist, wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Serratia marcescens* untersucht und zunächst wie in Kap. 3.2.2.1 beschrieben vorkultiviert. In diesem Versuch wurden jedoch ausschließlich  $10^5$  KBE/ml eingestellt. Diese Hauptkultur oder Kalorimeterkultur wurde mit den zuvor beschriebenen Parametern im Mikrokalorimeter gemessen.

Zur Vergleichsdarstellung des mikrobiellen Wachstums in mikrobiologischen Schüttelkulturen mit dem in geschlossenen statischen Messampullen wurde eine

zweite (identische) Hauptkultur, welche derselben Vorkultur entstammte und ebenfalls  $10^5$  KBE/ml aufwies, für 10 Stunden als Schüttelkultur bei 37 °C und 200 U/Min inkubiert.

Sowohl Kalorimeterkultur, als auch Schüttelkultur wurden in der Folge mit 1,5 ml sterilem TSB auf 5 ml aufgefüllt und um die Faktoren  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  und  $10^{-8}$  mit demselben Medium verdünnt. Zur Bestimmung der Anzahl an koloniebildenden Einheiten in den Proben wurden jeweils 100 µl mit einem sterilen Glasspatel auf Blutagarplatten ausplattiert und nach 24-stündiger Bebrütung bei 37 °C ausgezählt.

### **3.2.3 Wärmeflussmessung an Kathetern**

#### **3.2.3.1 Kontrolliert kolonisierte Katheter**

Dieser Versuch dient der Überprüfung, ob sich die Erkenntnisse aus Wärmeflussmessungen mit planktonischen Bakterien nun auch auf Bakterien, die an Polymeroberflächen adhären, übertragen lassen. Dafür wurden Kathetersegmente *in vitro* kontrolliert kolonisiert. Zur Vorkultivierung wurde eine KBE *S. epidermidis* 1457-M10, welcher nicht zur Biofilmbildung befähigt ist, in 2 ml TSB suspendiert und über Nacht bei 37 °C und 200 U/Min inkubiert. Mittels photometrischer Bestimmung der OD600 einer 1:6 Verdünnung mit gleichem Medium wurden durch konsekutive Verdünnungen folgende Konzentrationen eingestellt:  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^7$  und  $10^8$  KBE/ml.

Um die reine Bakterienadhäsion zu untersuchen wurden je 1 ml dieser Hauptkulturen zusammen mit jeweils einem 1 cm langen Stück Multi-Lumen Katheter in 1,5 ml Eppendorf® Reaktionsgefäßen für 1 Stunde ohne Bewegung bei 37 °C bebrütet. Dann wurde die Kultur dekantiert, das Katheterstück durch Schwenken in 1 ml PBS gewaschen und dieses dann mit 3,5 ml sterilem TSB in eine Edelstahl Meßampulle

des Mikrokalorimeters gefüllt. Nach 20-minütiger Äquilibration wurde eine Messung über 10 Stunden begonnen.

Mit der Zielsetzung, die gewonnenen Wärmeflusskurven aus Messungen mit kontrolliert bewachsenen Kathetersegmenten einer Keimzahl zuzuordnen, wurden in weiteren Versuchsreihen die Bakterien direkt nach Kolonisation der Katheter von diesem abgelöst und ausplattiert. In diesem Fall wurden jedoch nur Hauptkulturen der Konzentrationen  $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  KBE/ml zur Adhäsion verwendet, da die Keimkonzentration an der Sensitivitätsgrenze des mikrokalorimetrischen Messsystems von besonderem Interesse war.

Um die Bakterien von der Katheteroberfläche zu lösen, wurden diese in sterile Falcon<sup>®</sup> Tubes mit 1 ml sterilem TSB gegeben und viermal für 10 Sekunden mit jeweils 10 Sekunden Pause unter Verwendung eines Ultraschallgerätes bei 30 % der Maximalleistung behandelt. Zur Hemmung des Bakterienwachstums sowie zur Stabilisierung der Bakterien während der Vorbereitungen wurden die Proben mit Eis gekühlt. Dann wurden 100 µl der Kultur unverdünnt mit einem sterilen Glasspatel auf Blutagarplatten ausplattiert, über Nacht bei 37 °C bebrütet und anschließend die KBE ausgezählt.

### **3.2.3.2 *Ex vivo* gewonnene Katheter**

Nach intensiven Laborversuchen sollte die mikrokalorimetrische Methodik zum Abschluss nun an reellen Patientenproben angewandt werden. Es wurden sowohl mehr- als auch einlumige Katheter von ca. 1 cm Länge verwendet. Hierbei handelte es sich um den Abschnitt hinter der Katheterspitze, da die Spitze regulär im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mikrobiologisch untersucht wurde. Die Katheterstücke wurden

nach Entfernung aus dem Patienten in sterile Röhrchen ohne Medium verbracht und wurden innerhalb von 30 Minuten in 4 ml steriles TSB transferiert und für 3 Stunden bei 37 °C und 200 U/Min inkubiert. 3,5 ml der Kultur wurden dann zusammen mit dem Katheterstück in eine Edelstahllampulle des Kalorimeters gefüllt und nach 20 Minuten Aquilibrierung wurde für 10 Stunden der Wärmefluss gemessen.

Nach Beendigung der Messung wurde eine Öse der Kultur auf einer Blutagarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Bei Anzeichen mikrobiellen Wachstums, wurden MALDI-TOF-Spektren der zu identifizierenden Mikroorganismen nach direktem Probenauftrag und Überschichtung mit 1µl Matrixlösung (alpha-HCCA in 50 % Acetonitril mit 2,5 % TFA) nach Herstellerangaben auf einem MicroflexLT Massenspektrometer generiert und mit der MALDI-Biotyper 2.0 Software ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, stellen Katheterinfektionen eine häufige nosokomiale Infektion in der Pädiatrischen Intensivmedizin dar. Besondere Schwierigkeiten bereitet der hohe Zeitaufwand einer Diagnose. Demzufolge galt es in dieser Arbeit herauszufinden, ob die mikrokalorimetrische Methodik eine Keimdetektion und –identifikation ermöglicht, wobei es von besonderem Interesse war, ob die Ergebnisse schneller als bei derzeit etablierten Verfahren vorliegen.

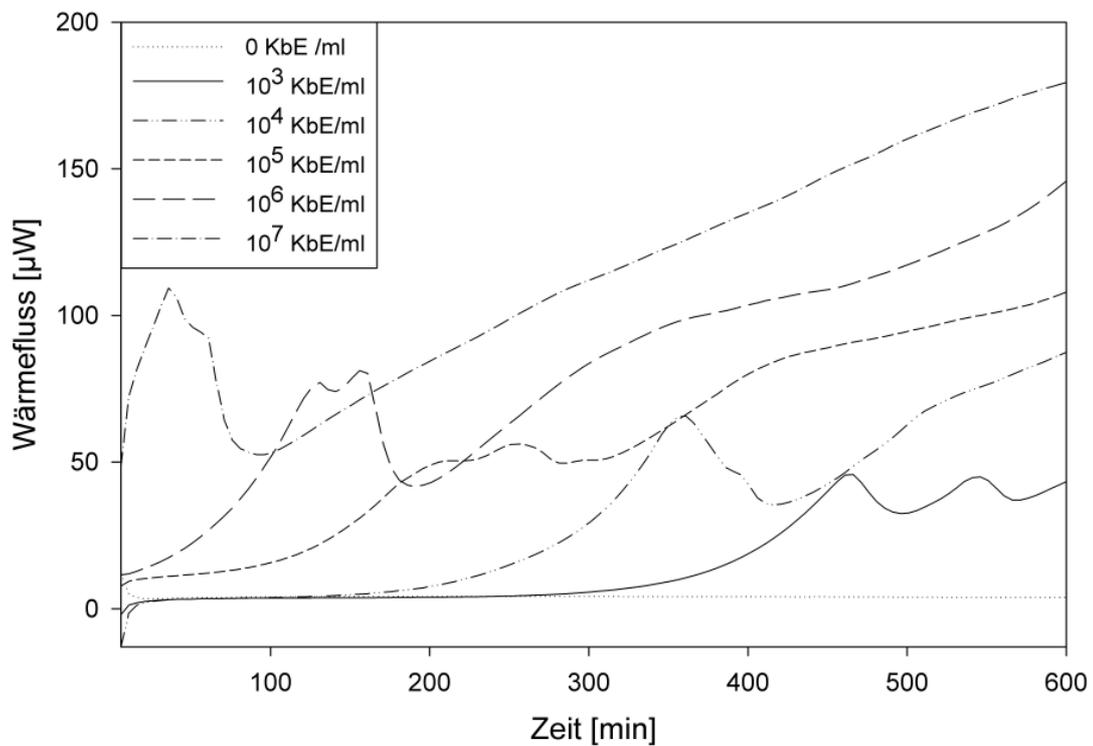
## 4.1 Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen

Im ersten Abschnitt der Arbeit sollte gezeigt werden, dass die verwendete mikrokolorimetrische Methodik generell bakterielles Wachstum und möglicherweise eine Speziesidentifikation ermöglicht. Um dieses Ziel zu erreichen wurden zunächst planktonisch wachsende Bakterien mittels Mikrokolorimetrie untersucht.

### 4.1.1 *Staphylococcus epidermidis* 1457

Aufgrund der hohen Relevanz von *Staphylococcus epidermidis* im Rahmen katheterassoziiertes Infektionen, wurden zunächst unterschiedliche Konzentrationen dieses Stammes auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Ein gemeinsames Merkmal der Wärmeflusskurven bei unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen war der Nachweis eines initialen Spitzenwertes, welcher von einem Abfall des Wärmeflusses sowie einem darauf folgenden, erneuten Anstieg der Wärmeflusskurve gekennzeichnet war (Abb. 3). Wesentlicher Unterschied der Wärmeflusskurven bei Einsatz unterschiedlicher Bakterienkonzentrationen war die Zeitspanne vom Beginn des Experiments und dem initialen Anstieg des Wärmeflusses. Für Untersuchungen mit niedrigen Bakterienkonzentrationen verhält sich der Kurvenverlauf zunächst relativ lange Zeit ebenso wie bei sterilem TSB, bevor es zu einem Anstieg des Wärmeflusses kommt. So liegt der Wärmefluss für  $10^3$  KBE/ml die ersten 5 Stunden (300 Min.) am initial gemessenen Ausgangswert, ehe sich eine Wärmeflusskurve ausbildet. Bei höheren Anfangskonzentrationen verändert sich die Wärmeflusskurve nicht grundlegend, es kommt lediglich immer früher zu dem Anstieg des Wärmeflusses und die Kurve nimmt einen zunehmend höheren Verlauf (Abb. 3).

Die negative Kontrolle (steriles, unbeimpftes Nährmedium (TSB)) zeigte kein positives Signal. Es konnte eine stabile „Baseline“ nachgewiesen werden (Mittelwert  $4,1 \pm 2,0 \mu\text{W}$ ; Anzahl der Versuche  $n=8$ ).

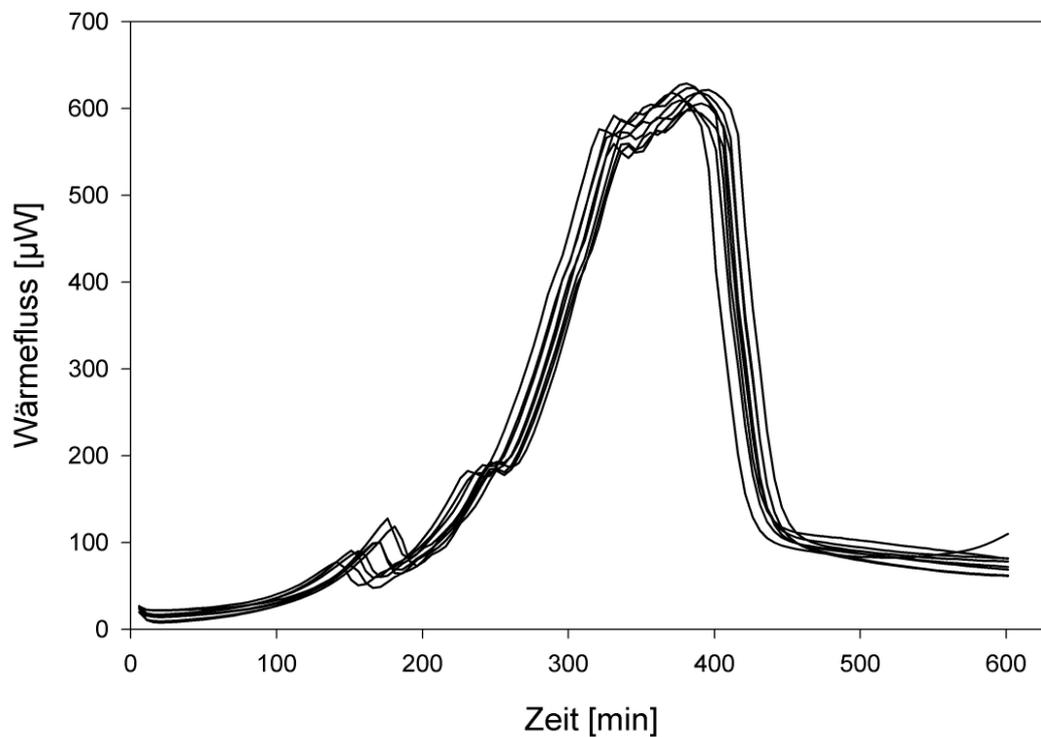


**Abbildung 3:** Wärmeflusskurven verschiedener Konzentrationen von *Staphylococcus epidermidis* 1457.

Dargestellt sind die Mittelwerte mehrerer Wärmeflussmessungen der untersuchten Bakterienkonzentrationen. Der Zusammenhang zwischen schnellerer bzw. größerer Wärmeabgabe und Bakterienkonzentration ist deutlich erkennbar.

#### 4.1.2 Verschiedene Bakterienspezies

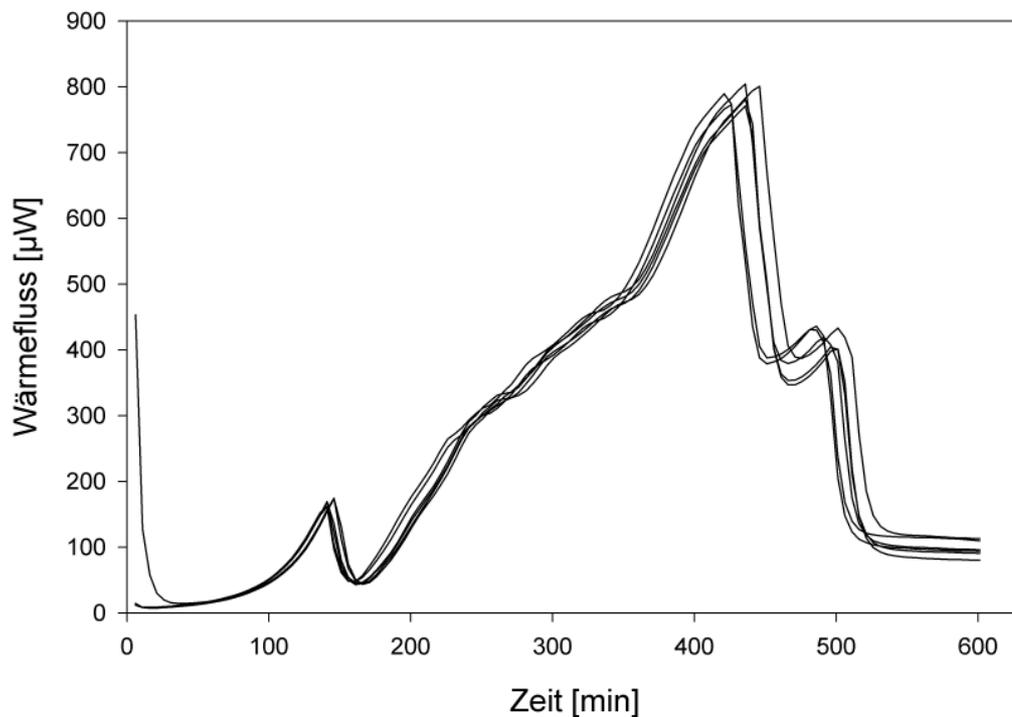
Um die Möglichkeit einer Keimidentifikation zu untersuchen wurden die Stämme *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Serratia marcescens* bei konstanter Konzentration ( $10^5$  KBE/ml) auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Es entstanden hochreproduzierbare Wärmeflusskurven, die sich bezogen auf die einzelne Bakterienspezies lediglich aufgrund eines Zeitversatzes voneinander unterscheiden.



**Abbildung 4: Wärmeflusskurven von *Escherichia coli*.**

Dargestellt sind die übereinandergelegten Wärmeflusskurven aus 8 Messungen mit *Escherichia coli*.

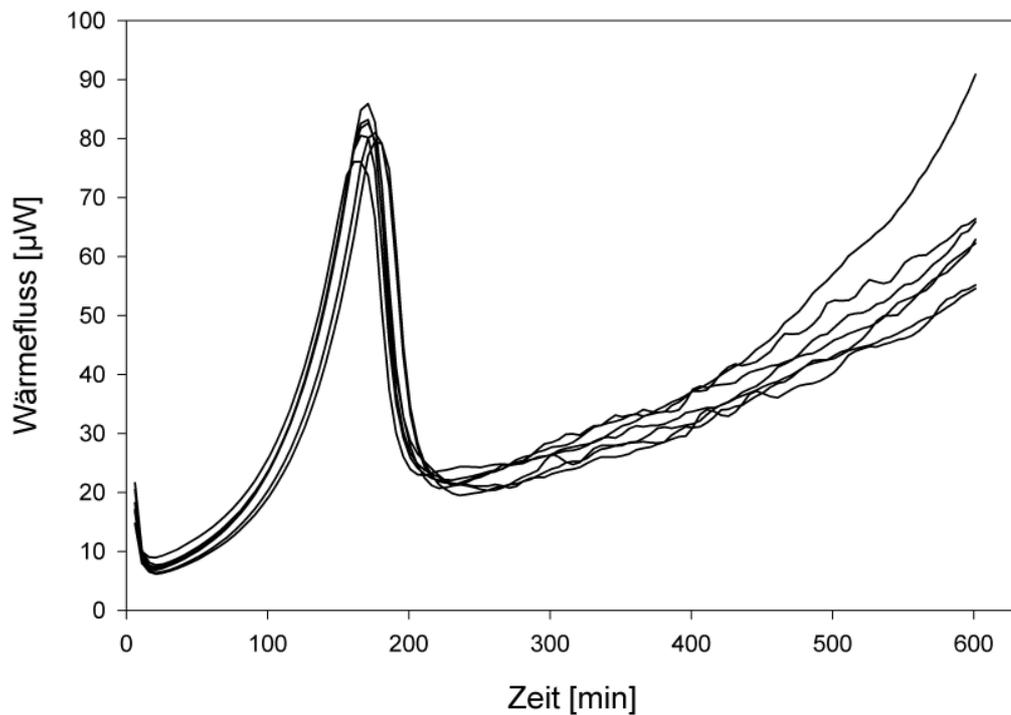
Die in unabhängigen Experimenten mikrokalorimetrisch gemessenen Wärmeflusskurven von *Escherichia coli* weisen allesamt einen gleichförmigen Kurvenverlauf auf. Der zunächst gemächliche Anstieg und die erneute Abnahme des Wärmeflusses, sowie die anschließende rapide Zunahme mit darauffolgendem Absinken des Wärmeflusses spiegeln sich in jeder einzelnen Kurve, bis zum kleinsten markanten Knick hin, wieder. Sie wirken nahezu identisch und sind ausschließlich jeweils um einige Minuten auf der x-Achse verschoben zu sein (Abb. 4).



**Abbildung 5: Wärmeflusskurven von *Serratia marcescens*.**

Dargestellt sind die übereinandergelegten Wärmeflusskurven aus 6 Messungen mit *Serratia marcescens*.

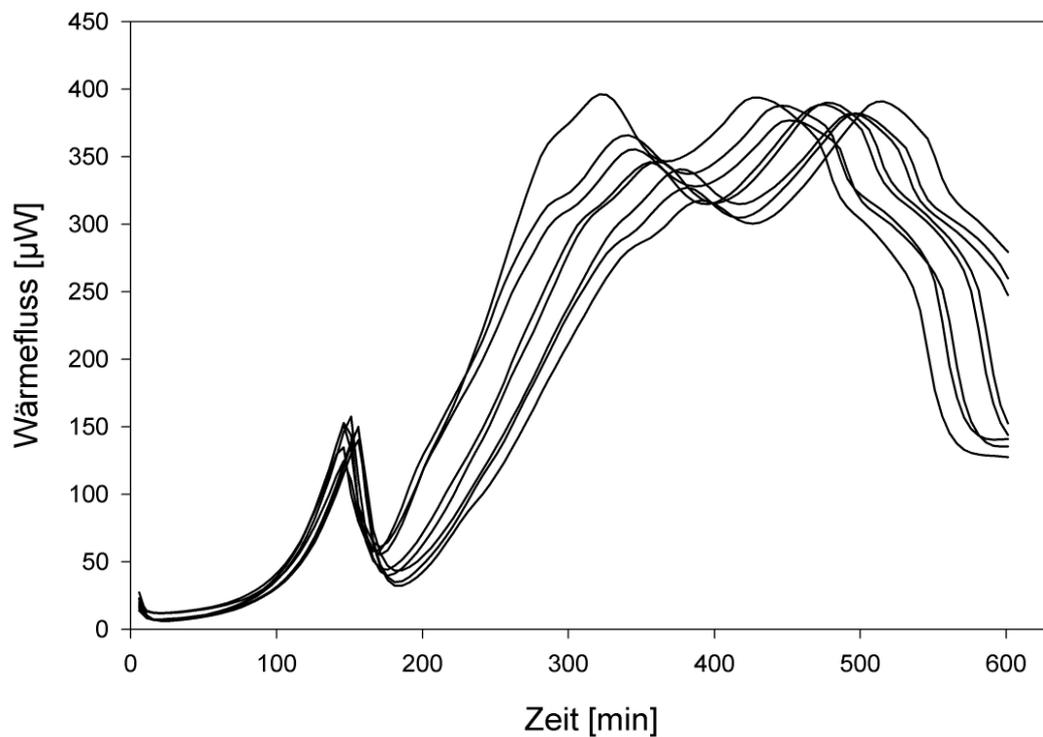
Die Wärmeflusskurven der mikrokalorimetrischen Messungen mit *Serratia marcescens* sind, wie die von *Escherichia coli*, in unabhängigen Experimenten gleichermaßen gut wiederholbar. Auch hier fällt der zeitliche Versatz der Kurven auf. Beachtet man die unterschiedlichen y-Achsenformatierungen der Abbildungen 4 bis 7, so wird deutlich dass sich die Keime auch im Hinblick auf den maximal erreichten Wärmefluss deutlich unterscheiden. Was diesen Aspekt des Versuches betrifft, ist *Serratia marcescens* unter den 4 in dieser Arbeit verglichenen Mikroorganismen der Erreger, bei welchem die höchsten maximalen Wärmeflüsse gemessen werden konnten (Abb. 5).



**Abbildung 6: Wärmeflusskurven von *Pseudomonas aeruginosa*.**

Dargestellt sind die übereinandergelegten Wärmeflusskurven aus 7 Messungen mit *Pseudomonas aeruginosa*.

Ebenso zeigen die Ergebnisse der Messungen mit *Pseudomonas aeruginosa* hochreproduzierbare Wärmeflusskurven, die lediglich einen zeitlichen Versatz aufweisen. Auch dieser Keim ist anhand des Kurvenverlaufs deutlich von den anderen untersuchten Bakterien zu differenzieren. Im Hinblick auf die produzierte Wärme, zeigt *Pseudomonas aeruginosa* vergleichsweise niedrige Werte (Abb. 6).



**Abbildung 7: Wärmeflusskurven von *Staphylococcus aureus*.**

Dargestellt die übereinandergelegten Wärmeflusskurven aus 8 Messungen mit *Staphylococcus aureus*.

*Staphylococcus aureus* ist unter den 4 verglichenen Bakterienspezies der einzige Gram-positive Keim. Das Ergebnis der mikrokalorimetrischen Wärmeflussmessungen zeigt jedoch ebenso wie bei den zuvor untersuchten Gram-negativen Keimen homogene Kurvenverläufe, welche sich von den zuvor betrachteten wesentlich unterscheiden (Abb. 7).

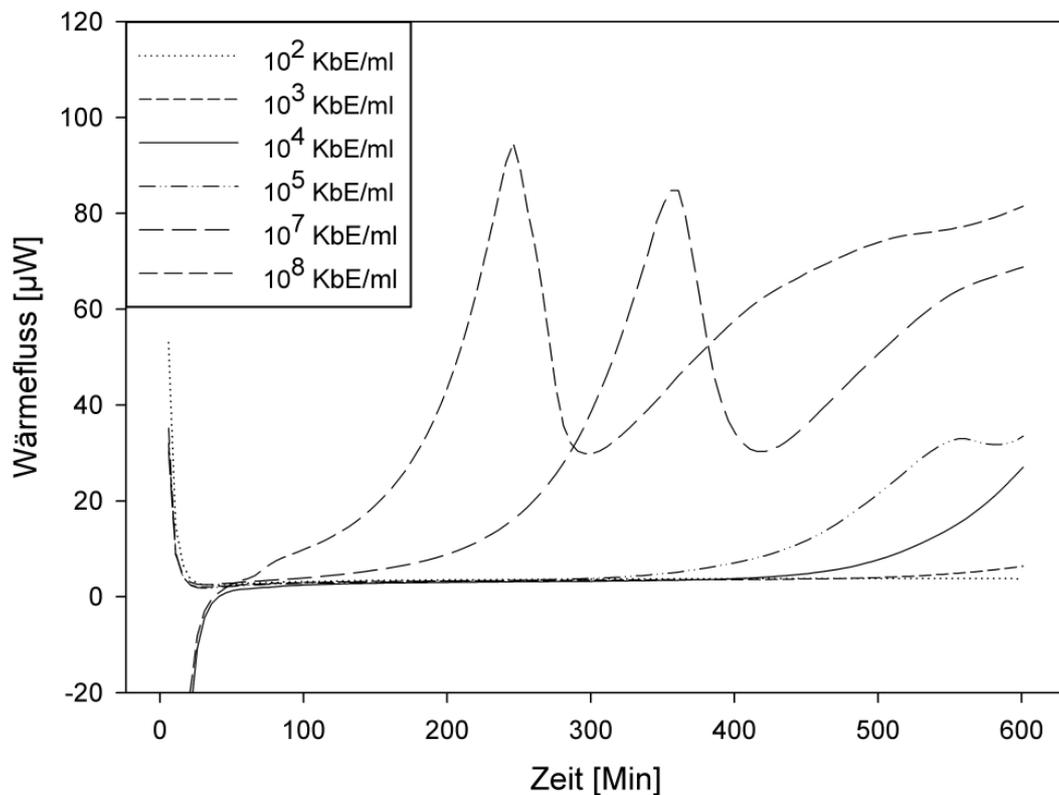
## 4.2 Wärmeflussmessung an Kathetern

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Wärmeflussmessungen sowohl eine Detektion von bakteriellem Wachstum als auch näherungsweise eine Keimidentifikation ermöglichen, sollte nun der Frage nachgegangen werden, ob die Kalorimetrie grundsätzlich in der Lage ist, an der Oberfläche von Kathetern adhärente Bakterien zu identifizieren. Dies wurde an kontrolliert *in vitro* bakteriell kolonisierten Kathetersegmenten untersucht. Zudem wurden Katheter von neonatologischen beziehungsweise pädiatrischen Intensivpatienten mikrokalorimetrisch untersucht um sie später mit den Ergebnissen der konventionellen kulturellen Untersuchung zu vergleichen.

### 4.2.1 Kontrolliert kolonisierte Katheter

Um standardisierte Bedingungen zu schaffen, wurden Katheterabschnitte gleicher Länge und gleichen Fabrikats für eine Stunde in definierte *S. epidermidis* 1457-M10 Bakteriensuspensionen inkubiert und daraufhin auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Die Mutante 1457-M10 kann an Kunststoffoberflächen adhären, bildet jedoch keinen Biofilm aus. Somit kann davon ausgegangen werden, dass keine Bakterienaggregate respektive -biofilme auf dem Katheter ausgebildet werden und hierdurch die Keimzahl besser zu kontrollieren ist.

Die in niedrigen Bakterienkonzentrationen ( $10^2$ ,  $10^3$  und  $10^4$  KBE/ml) inkubierten Katheter bewirkten keinen oder erst gegen Ende des 10-stündigen Messintervalls einen geringen Anstieg des Wärmeflusses. Katheter, die mit höheren Bakterienkonzentrationen inkubiert wurden erreichten diesen Anstieg, konzentrationsabhängig immer früher und es wurden höhere Maximalwerte sowie spezifische Wärmeflusskurven erreicht (Abb. 8).



**Abbildung 8: Wärmeflusskurven unterschiedlich stark bewachsener Kathetersegmente.**

Einzelne Kurven stellen jeweils die Mittelwerte von Messungen mit kolonisierten Katheterabschnitten aus Inkubationskulturen einer Konzentration dar. Wie in Versuchen mit planktonischen Bakterien korrelieren auch hier der gemessene Wärmefluss und die Geschwindigkeit der Wärmeentwicklung mit der Keimexposition.

Um herauszufinden, wie viele Bakterien an dem definierten Kathetersegment adhären müssen, um diese in der Mikrokalorimetrie nachweisen zu können, wurden am Katheter adhärenente Bakterien nach der Besiedlung mittels Ultraschall abgelöst und durch Ausplattierung auf Agarplatten quantifiziert. In Abhängigkeit von der zur Besiedlung eingesetzten Bakterienzahl ( $10^2$  –  $10^4$  KBE/ml) konnten unterschiedliche Bakterienzahlen am Katheter nachgewiesen werden. Die in einer Suspension mit  $10^2$  KBE/ml besiedelten Katheterabschnitte lieferten einen Wert von  $0,71 \pm 0,45$  KBE ( $n=7$ ), die der  $10^3$  KBE/ml – Kultur einen Wert von  $1,14 \pm 0,64$  KBE

(n=7) und der entsprechende Wert für  $10^4$  KBE/ml liegt bei  $10,29 \pm 6,54$  KBE (n=7) (Tabelle 3).

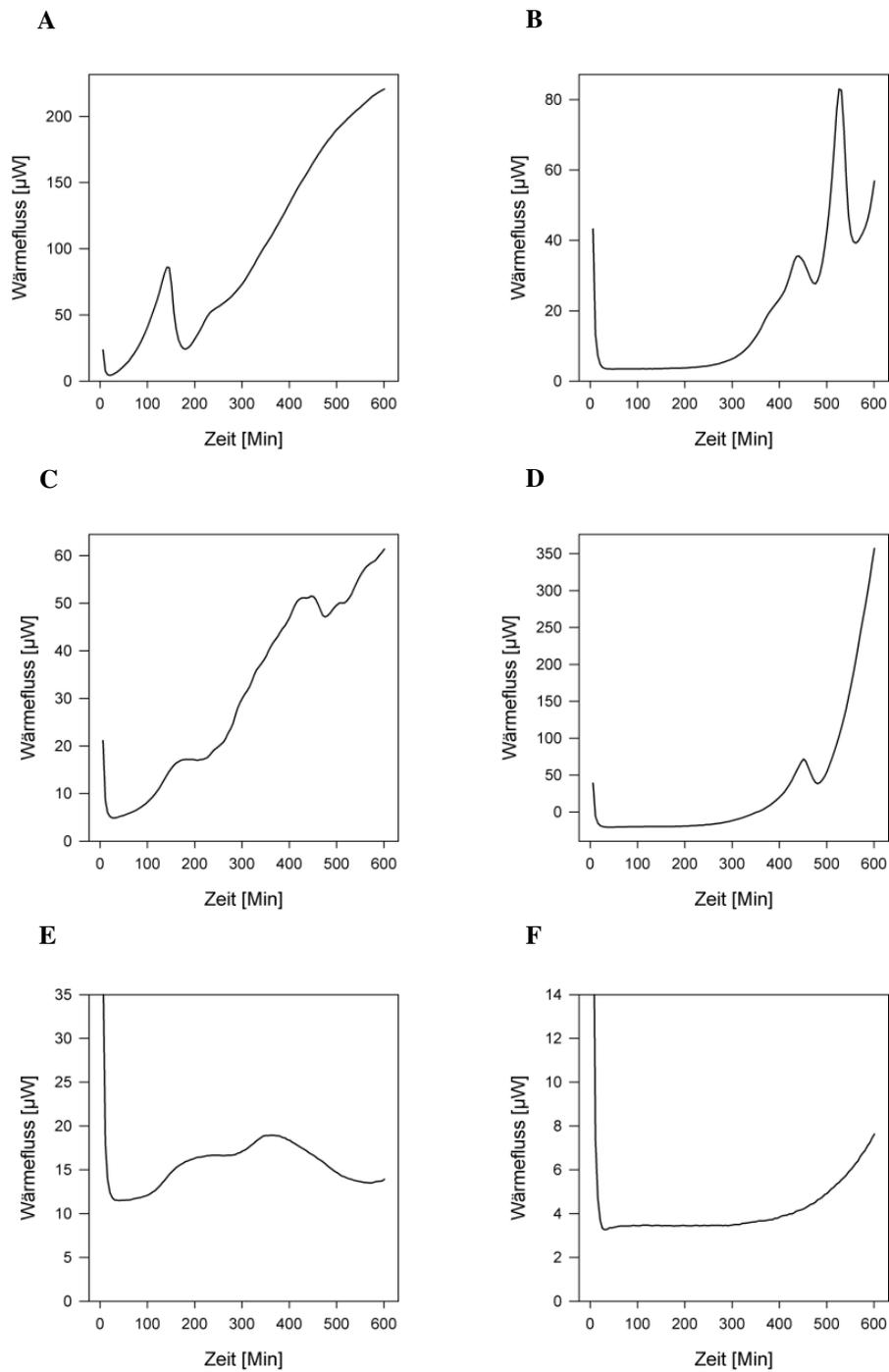
**Tabelle 3**

Keimexposition [KBE/ml]	n (Anzahl der Versuche)	Adhärente Keime [KBE]
$10^2$	7	$0,71 \pm 0,45$
$10^3$	7	$1,14 \pm 0,64$
$10^4$	7	$10,29 \pm 6,54$

#### 4.2.2 *Ex vivo* gewonnene Katheter

In den vorangegangenen Versuchen hat sich gezeigt, dass die Mikrokalorimetrie unter Laborbedingungen nicht nur bakterielles Wachstum an Katheteroberflächen detektieren und quantifizieren kann, sondern darüber hinaus auch zwischen unterschiedlichen Bakterienspezies differenzieren kann. Daher war es von großem Interesse, ob sich die im Labor gewonnenen Erkenntnisse nun auch auf Patientenkatheter der Klinik übertragen lassen. Zu diesem Zweck wurden *ex vivo* gewonnene Katheter in zwei Teile geschnitten, wobei die Spitze konventionell mikrobiologisch untersucht wurde, während der andere Teil dieses Katheterpaares, der ansonsten Abfallmaterial darstellt, mikrokalorimetrisch untersucht wurde. Nach Abschluss der Wärmeflussmessungen wurden die Kalorimeterkulturen massenspektrometrisch analysiert, um später eine Übereinstimmung der Keimspezies mit den Ergebnissen der mikrobiologischen Routineuntersuchung zu verifizieren (Kap. 5.3.2).

Untersucht wurden 29 aus Patienten entfernte Katheter, wobei keinerlei Verknüpfung zu Patientendaten hergestellt wurde. 21 Katheter zeigten in der mikrokalorimetrischen Wärmeflussmessung während des 10-stündigen Messintervalls keinen Anstieg des Wärmeflusses, sondern den konstant niedrigen Wert, der auch schon zuvor bei sterilem Nährmedium allein beobachtet wurde. Bei 8 Kathetern konnten Wärmeflusskurven unterschiedlichster Form und Intensität aufgezeichnet werden. Von insgesamt 29 Untersuchungen wichen in zwei Fällen die mikrokalorimetrischen Ergebnisse von den mikrobiologischen Kontrollen ab, während in 27 Fällen die Ergebnisse übereinstimmten. 6 exemplarische Beispiele dieser Messungen sind in Abbildung 9 dargestellt. Betrachtet man die unterschiedliche Skalierung der y-Achse, so fällt auf dass die Höhe des gemessenen Wärmeflusses stark variiert. Abbildung 9a zeigt eine Kurve, die nach einem ersten Höhepunkt (86,0  $\mu\text{W}$ ) wieder absinkt und daraufhin kontinuierlich ansteigt. Der dargestellte Wärmefluss in Abbildung 9b erreicht zwei Spitzenwerte, der zweite (83,0  $\mu\text{W}$ ) ist etwa doppelt so hoch wie der erste (35,6  $\mu\text{W}$ ). Die Keime beider Abbildungen wurden durch Untersuchung der Katheter im Massenspektrometer der Bakterienspezies *Staphylococcus epidermidis* zugeordnet. Besonders der Kurvenverlauf in Abbildung 9a zeigt Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der vorangegangenen Laboruntersuchungen mit *Staphylococcus epidermidis* 1457. Der Wärmefluss *Koagulase-negativer Staphylokokken* (Abb. 9c) steigt, mit einigen geringfügigen Abweichungen, kontinuierlich fast linear an. *Staphylococcus haemolyticus* (Abb. 9d) hingegen weist zunächst keinen Wärmefluss auf. Erst nach ungefähr 300 Minuten steigt der Wärmefluss langsam auf einen ersten Maximalwert von 71,7  $\mu\text{W}$ . Nach einem darauf folgendem geringfügigen Absinken des Wärmeflusses steigt dieser binnen 100 Minuten auf über 350  $\mu\text{W}$  an. Die Kurvenverläufe der Abbildungen 9e und 9f wurden der Pilzspezies *Candida albicans* zugeordnet und zeigen besonders geringfügige Veränderungen des Wärmeflusses, sowie insgesamt eine geringe Wärmeabgabe, die 20  $\mu\text{W}$  innerhalb des 10-stündigen Messintervalls nicht überschreitet.



**Abbildung 9: Wärmeflusskurven *ex vivo* gewonnener Katheter.**

Durch Untersuchung der Katheter im Massenspektrometer konnte den Wärmeflusskurven die entsprechende Bakterien- beziehungsweise Pilzspezies zugeordnet werden.

**A** und **B** *Staphylococcus epidermidis*

**C** Koagulase-negative Staphylokokken

**D** *Staphylococcus haemolyticus*

**E** und **F** *Candida albicans*

## 5 Diskussion

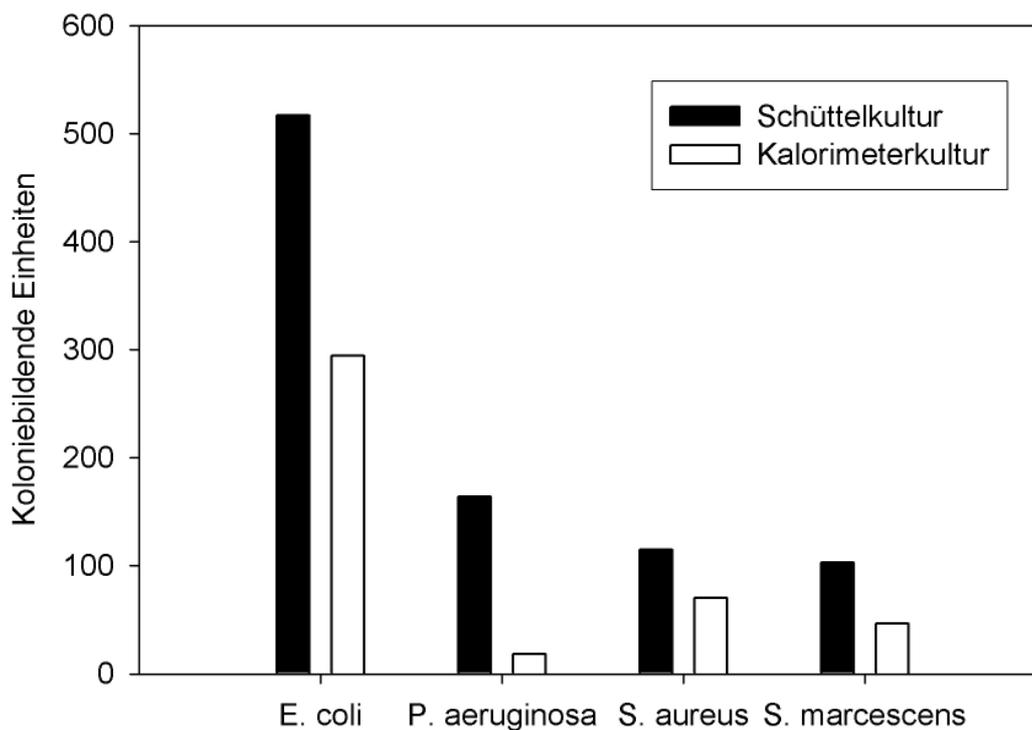
Die Verwendung von zentralen Venenkathetern ist integraler Bestandteil der modernen Medizin, birgt allerdings ein hohes Infektionsrisiko. In Deutschland erkranken jährlich ca. 20.000 Patienten an einer nosokomialen Sepsis, welche vor allem durch intravasale Katheter verursacht werden (Gastmeier and Geffers, 2008). Dies hat Auswirkungen auf die Genesung der Patienten, verlängert den Krankenhausaufenthalt und verursacht zusätzliche Kosten (Pittet et al., 1994). Trotz enormer Fortschritte in der medizinischen Forschung liefern die gegenwärtig zur Verfügung stehenden diagnostischen Methoden der KAI erst nach 24 bis 48 Stunden ein valides Ergebnis. Die Mikrokalorimetrie ist eine schnelle Methode zur Darstellung kleinster Wärmeproduktionsraten und bereits an Bodenproben (Crittter et al., 2002a) und Nahrungsmitteln (Lampi et al., 1974) für die Detektion von Mikroorganismen erfolgreich eingesetzt worden. Ein wesentliches zentrales Ziel der vorliegenden Arbeit war es herauszufinden inwiefern die Mikrokalorimetrie eine Detektion von katheterassoziierten Infektionen ermöglicht.

### 5.1 Methodenkritik

Bei der Bewertung der Ergebnisse dieser Arbeit ist stets zu berücksichtigen, dass jegliche mikrokalorimetrischen Wärmeflussmessungen mit geschlossenen Messampullen durchgeführt wurden. Demzufolge waren sowohl Sauerstoff als auch Nährmedium für die untersuchten Bakterien nur in streng limitiertem Ausmaß verfügbar.

Ein quantitativer Vergleich des bakteriellen Wachstums in den mikrobiologischen Schüttelkulturen mit dem in kalorimetrischen Kulturen zeigte ausnahmslos höhere Keimzahlen in den Schüttelkulturen. Dies deutet darauf hin, dass die

charakteristischen Kurvenverläufe auf den artspezifischen Stoffwechselumschaltungen bei der zunehmenden Substratverarmung in den geschlossenen mikrokalorimetrischen Messampullen beruhen könnten (Abb. 10). Allerdings ist dies nicht ausschließlich als Nachteil zu sehen, eventuell unterscheiden sich verschiedene Bakterienspezies stärker im Umgang mit ungünstigen Nährstoffsituationen als im ungehemmten Wachstum. Somit könnte eben gerade das endliche Nährmedium die Differenzierung der Bakterienspezies anhand ihrer Wärmeflusskurven ermöglichen. In der KAI Diagnostik ist eine Imitation der natürlichen Lebensbedingungen schließlich irrelevant.



**Abbildung 10: Quantitativer Vergleich des Bakterienwachstums verschiedener Arten in Schüttelkultur und Kalorimeterkultur.**

Das Keimwachstum in mikrobiologischen Schüttelkulturen liegt deutlich über dem in Kalorimeterkulturen. Dies könnte Ausdruck der verstärkten Substratverarmung in den geschlossenen mikrokalorimetrischen Messampullen sein.

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass sämtliche Untersuchungen von Mikroorganismen lediglich in einem Nährmedium (TSB) durchgeführt wurden. TSB wurde bewusst ausgewählt, da es für eine große Vielfalt unterschiedlicher Mikroorganismen adäquate Wachstumsbedingungen bereitstellt. Die Verwendung nur eines Nährmediums ermöglicht die Vergleichbarkeit der Ergebnisse untereinander. Man sollte sich allerdings bei der Betrachtung der Wärmeflusskurven stets vergegenwärtigen, dass diese spezifisch für das Nährmedium sind. Andere Medien sind vermutlich auch mit veränderten Wärmeflusskurven assoziiert. Zwar wurden für KAI typische Bakterien verwendet, jedoch wurde jeder Keim einzeln untersucht und das Szenario einer Mischinfektion somit ignoriert.

## **5.2 Wärmeflussmessung an Bakteriensuspensionen**

### **5.2.1 *Staphylococcus epidermidis* 1457**

Koagulase-negative Staphylokokken (KNS) sind die häufigsten Erreger von KAI. Aus diesem Grund untersucht die erste Versuchsreihe den prototypischen *Staphylococcus epidermidis* Stamm 1457, welcher der Gruppe der KNS angehört und ubiquitär auf der Haut vorkommt.

Die Ergebnisse der mikrokalorimetrischen Wärmeflussmessungen des planktonisch in TSB kultivierten *Staphylococcus epidermidis* 1457 zeigen, dass mit ansteigender Bakterienkonzentration auch der gemessene Wärmefluss signifikant zunimmt. Das sterile Nährmedium TSB alleine erzeugt hingegen eine Baseline von  $4,1 \pm 2,0 \mu\text{W}$  ( $n=8$ ), die sich als Summationseffekt aus Sedimentations-, Aggregations- und Zersetzungsphänomenen in den Bestandteilen des Mediums erklären lässt. Die Versuchsgruppe mit  $10^3$  KBE/ml erreichte nach 466 Minuten einen maximalen Wärmefluss von  $45,8 \pm 4,8 \mu\text{W}$  ( $n=2$ ). Dieser Wert wurde bei  $10^4$  KBE/ml schon nach

331 min (n=2), bei  $10^5$  KBE/ml nach 191 min (n=7), bei  $10^6$  KBE/ml nach 96 min (n=3) und bei  $10^7$  KBE/ml (n=3) bereits zu Beginn der Messung erreicht (Abb. 3 und Tabelle 4).

Tabelle 4

Keimexposition [KBE/ml]	n	45,8 $\mu$ W nach...	Wärmefluss des initialen Peak [ $\mu$ W]
$10^3$	2	466 min	45,8 $\pm$ 4,8 (nach 466min)
$10^4$	2	331 min	65,7 $\pm$ 0,6 (nach 361 min)
$10^5$	7	191 min	56,2 $\pm$ 14,8 (nach 256 min)
$10^6$	3	96 min	77,2 $\pm$ 12,7 (nach 131 min)
$10^7$	3	sofort	109,4 $\pm$ 23,7 (nach 36 min)

Wurden  $10^8$  KBE/ml (n=2) eingesetzt, stellten die Wärmeflusskurven eine Art Plateau dar und variierten stark. Vermutlich ist dies auf den Crowding-Effekt zurückzuführen, diese Daten sind nicht dargestellt. Der Crowding-Effekt beschreibt das Phänomen, dass mit zunehmender (Bakterien-) Zellzahl in einer Kultur die Stoffwechselrate einer Zelle, und damit auch die Wärmefreisetzung je Zelle, abnimmt (Esmann, 1964). Dieser Begriff wurde erstmals von Esmann und Kollegen geprägt, die bei der Messung des Sauerstoffverbrauchs von Lymphozyten feststellten, dass dieser je Zelle umso niedriger ausfiel, je höher die Zellzahl im Messansatz war (Esmann, 1964).

Auffällig für alle Konzentrationen dieses Versuches ist, dass der Wärmefluss zunächst stetig ansteigt, dann etwas absinkt um in der Folge dann kontinuierlich, beinahe Proportional zu steigen. Der Maximalwert dieses ersten Anstiegs („initialer

Peak“) beträgt für  $10^3$  KBE/ml  $45,8 \pm 4,8 \mu\text{W}$  (nach 466 min), für  $10^4$  KBE/ml  $65,7 \pm 0,6 \mu\text{W}$  (nach 361 min), für  $10^5$  KBE/ml  $56,2 \pm 14,8 \mu\text{W}$  (nach 256 min), für  $10^6$  KBE/ml  $77,2 \pm 12,7 \mu\text{W}$  (nach 131 min) und für  $10^7$  KBE/ml  $109,4 \pm 23,7 \mu\text{W}$  (nach 36 min) (Tabelle 4).

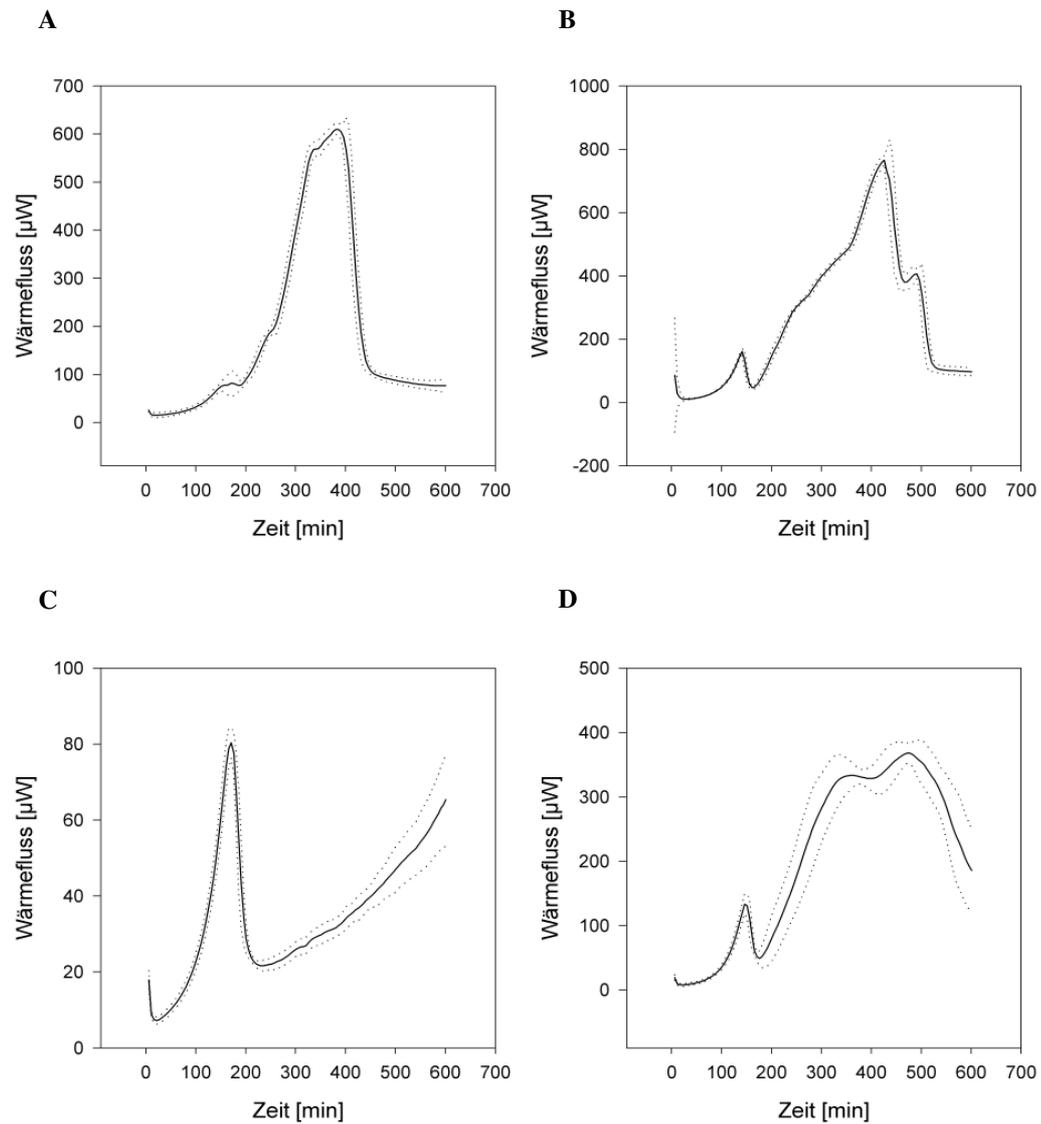
Bei höheren Bakterienzellzahlen steigt auch der gemessene Wärmefluss, der „initiale Peak“ erreicht einen höheren Wert und tritt früher auf. Die Geschwindigkeit der Wärmeentwicklung und die Höhe der Wärmeabgabe steigen demnach mit wachsender Keimzahl an.

Folglich ist es möglich durch Messung der Wärme einer Probe die Frage einer eventuellen Kontamination eindeutig zu klären. Dies deckt sich auch mit den Erkenntnissen anderer Autoren. Trampuz und Kollegen haben bereits an Thrombozytenprodukten gezeigt, dass die Mikrokalorimetrie eine mikrobielle Kontamination verlässlich detektieren kann (Trampuz et al., 2007a). Darüber hinaus lässt die Korrelation der Keimzahl mit dem gemessenen Wärmefluss die Vermutung zu, dass diese Methodik auch quantitative Aussagen über eine Kontamination treffen kann. Auch dazu gibt es in der Literatur übereinstimmende Ergebnisse. Trampuz und Kollegen haben die Mikrokalorimetrie erfolgreich für die Diagnose einer bakteriellen Meningitis an Liquor cerebrospinalis eingesetzt und dabei ebenso einen Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration und der freigesetzten Wärme beobachtet (Trampuz et al., 2007b). Dieser Umstand eröffnet die Möglichkeit durch weitere Untersuchungen cut-off Werte zu bestimmen, welche eine Katheterbesiedlung von einer klinisch relevanten Infektion abgrenzen. Ähnlich wie es für die semiquantitative Abrollmethode nach Maki definiert ist, dass bis zu 15 nachgewiesene KBE eine Kolonisation des Katheters und über 15 KBE eine Infektion anzeigen (Maki et al., 1977), könnte diese Abgrenzung in der Mikrokalorimetrie möglicherweise bei Überschreiten des Wärmeflusses eines bestimmten Wertes definiert werden. Aufgrund der unterschiedlichen

Kurvenverläufe müsste für jede Bakterienspezies ein spezieller Grenzwert definiert werden.

### **5.2.2 Verschiedene Bakterienspezies**

In der vorliegenden Arbeit wurden Wärmeflussmessungen bisher nur an einem Bakterium betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass es mit Hilfe der Mikrokolorimetrie möglich ist, bakterielles Wachstum eindeutig und schnell zu detektieren und sogar ein Zusammenhang zwischen Bakteriendichte und dem gemessenen Wärmefluss besteht. Um nun dem dritten Punkt der Fragestellung dieser Arbeit nachzugehen, also herauszufinden ob diese Methodik auch eine Keimidentifikation erlaubt, wurden 4 verschiedene Bakterienspezies betrachtet. Zu diesem Zweck wurden *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* und *Serratia marcescens* bei konstanter Anfangskonzentration von  $10^5$  KBE/ml für 10 Stunden im Mikrokolorimeter auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Die dabei gemessenen Wärmeflusskurven waren für die jeweilige Bakterienspezies hochreproduzierbar und unterschieden sich von den Kurven anderer Spezies nicht nur in der Höhe der Wärmeabgabe, sondern auch in der Form der Wärmeflusskurven so deutlich, dass sie eine „Blickdiagnose“ erlaubten (Abb. 11). Die Wärmeflusskurven scheinen also für die jeweiligen Keimspezies charakteristisch zu sein. Diese Erkenntnis und die dadurch resultierende Möglichkeit einer Identifikation von Mikroorganismen stimmt mit den Aussagen anderer Publikationen überein, so können verschiedene Enterobacteriaceae anhand von Wärmeflussmessungen ebenfalls gegeneinander abgegrenzt werden (Boling et al., 1973).



**Abbildung 11: Wärmeflusskurven infektiöser Bakterienarten.**

**A** *Escherichia coli*

**B** *Serratia marcescens*

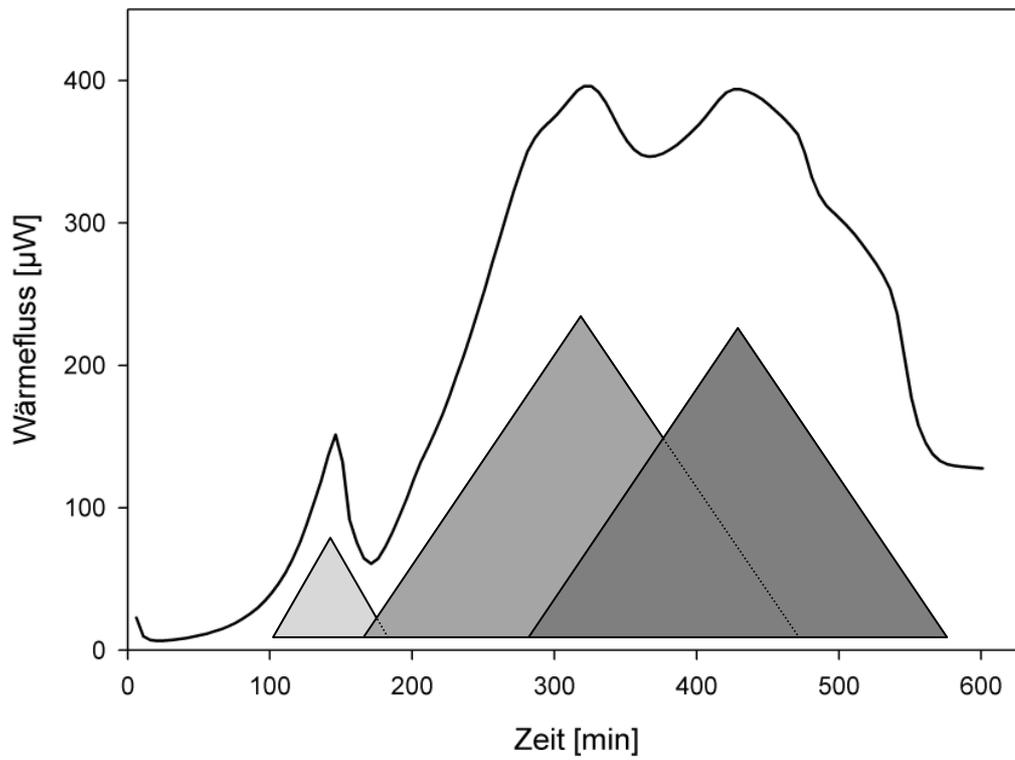
**C** *Pseudomonas aeruginosa*

**D** *Staphylococcus aureus*

Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte (durchgezogene Linie) und die Standardabweichung (gepunktete Linie) der Ergebnisse mehrerer Wärmeflussmessungen. Es sind für die jeweilige Bakterienspezies charakteristische Wärmeflusskurven entstanden, wodurch anhand einer „Blickdiagnose“ die Keimdifferenzierung ermöglicht wird.

(Beachte: Unterschiedliche Y-Achsenkalibrierung)

Die Frage welcher Mechanismus den spezifischen Wärmeflusskurven zugrunde liegt, beziehungsweise was genau das Mikrokolorimeter bei Untersuchungen mit Mikroorganismen eigentlich misst ist nach derzeitigem Forschungsstand noch nicht abschließend geklärt. Braissant und Kollegen sehen die Diauxie als Ursache der spezifischen Wärmeflusskurven (Braissant et al., 2010). Diauxie ist eine Eigenschaft von Mikroorganismen die mehrere Substrate verwerten können. Meist sind sie nicht in der Lage mehrere Kohlenstoffquellen gleichzeitig abzubauen, so dass der Metabolismus zum Abbau weiterer Substrate so lange ausgeschaltet bleibt, bis die erste Nahrungsquelle vollständig degradiert ist. Charakteristisch ist ein kurzzeitiger Abbruch des Wachstums nach vollständigem Abbau des ersten Substrats. Während dieser Pause werden die Enzyme für den Abbau des zweiten Substrats produziert, bevor dessen Metabolismus beginnen kann (Abb. 12).



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Diauxie.**

Eine mögliche Ursache für die spezifische Form der Wärmeflusskurven könnte die Diauxie, also der sukzessive Abbau von Kohlenstoffquellen darstellen. Unter einer Wärmeflusskurve von *Staphylococcus aureus* ist die Nutzung verschiedener Kohlenstoffquellen und der dabei entstehende Wärmefluss durch graue Dreiecke exemplarisch dargestellt. Beispielsweise könnte eine solche Abfolge folgendermaßen verlaufen: 1. oxidativer Glukoseabbau (hellgrau), 2. Glukose Fermentation (mittelgrau) und 3. Laktose Fermentation (dunkelgrau).

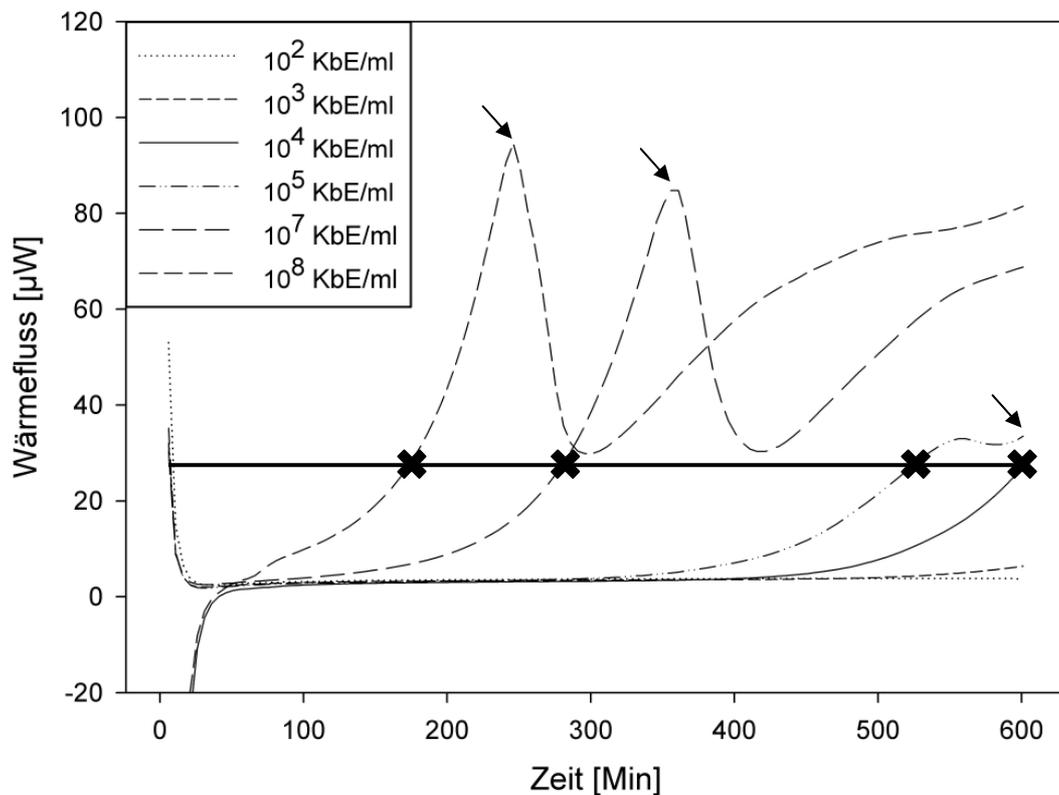
## 5.3 Wärmeflussmessung an Kathetern

### 5.3.1 Kontrolliert kolonisierte Katheter

Die bisher gesammelten Erkenntnisse wurden ausschließlich in Versuchen mit planktonischen Bakterien gesammelt. Methoden zur Diagnostik von KAI haben allerdings die Aufgabe Mikroorganismen, die an Polymeroberflächen haften zu detektieren. Um dieses Szenario unter Laborbedingungen zu untersuchen, wurden Katheterabschnitte *in vitro* kontrolliert mit *Staphylococcus epidermidis* 1457 M10

kolonisiert. M10 ist eine Biofilm-negative Mutante: das bedeutet, dass der Stamm nicht in der Lage ist, sich in mehreren Lagen an Oberflächen zu organisieren, sondern lediglich eine einlagige Bakterienzellschicht auf einem Katheter ausbildet. Dies hat zur Folge, dass die Anzahl an Bakterien, die am Katheterabschnitt haften in diesem Versuch besser unter Kontrolle gehalten werden konnte.

Auch diese künstlich kolonisierten Katheter wurden im Mikrokalorimeter 10 Stunden auf ihre Wärmeabgabe untersucht. Die Versuchsgruppe mit  $10^2$  KBE/ml und  $10^3$  KBE/ml ergab während des Messintervalls, abgesehen vom basalen Wärmefluss des Nährmediums, keine signifikante Wärmeabgabe. Katheterabschnitte, die in einer  $10^4$  KBE/ml - Kultur besiedelt wurden, zeigten am Ende der 10-stündigen (600 min) Inkubation des Katheters im Mikrokalorimeter einen signifikanten Anstieg des Wärmeflusses auf maximal  $27,1 \pm 8,4 \mu\text{W}$  (n=3). Derselbe Wert wurde bei  $10^5$  KBE/ml bereits nach 526 min (n=3), bei  $10^7$  KBE/ml nach 281 min (n=4) und bei  $10^8$  KBE/ml nach 176 min (n=3) erreicht (Abb. 13 und Tabelle 5).



**Abbildung 13: Die Geschwindigkeit und Maxima der Wärmeentwicklung.**

Dargestellt sind die mittelwertigen Wärmeflusskurven von kolonisierten Kathetern aus unterschiedlichen Inkubationskonzentrationen.

In  $10^4$  KBE/ml bewachsene Katheter erreichten nach 600 Minuten einen Wärmefluss von  $27,1 \pm 8,4$   $\mu\text{W}$  (rechtes Kreuz und horizontale Linie). Dieser Wert wurde von Kathetern, die in höher konzentrierten Bakteriensuspensionen inkubiert wurden, entsprechend früher erreicht.

Der Maximalwert des Wärmeflusses ist für diese Kurven mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Katheter aus höheren Bakterienkonzentrationen bewirken innerhalb des Messintervalls auch einen höheren Wärmefluss und erreichen früher ihren Maximalwert.

Tabelle 5

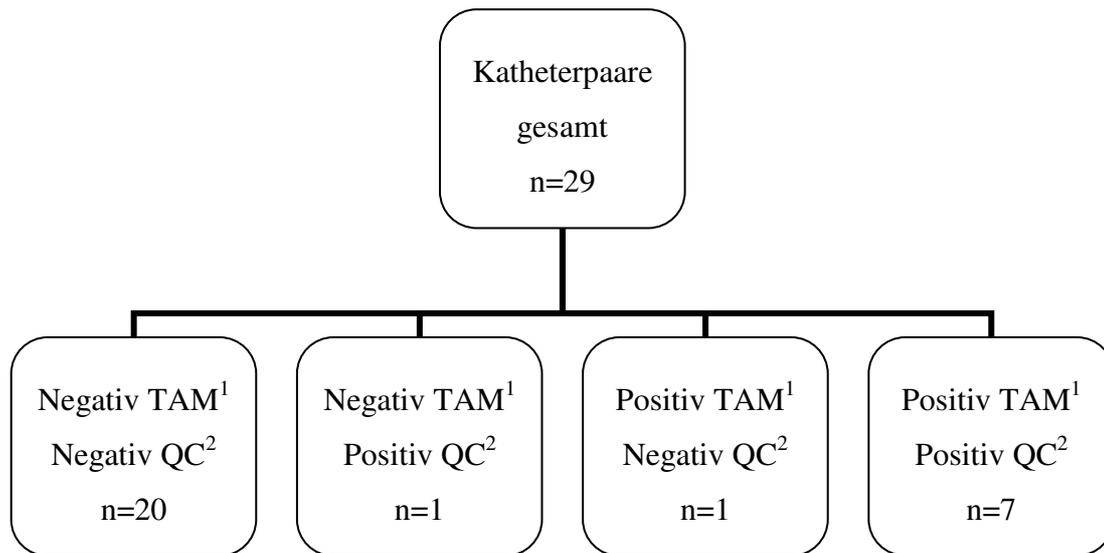
Keimexposition [KBE/ml]	n	27,1 $\mu$ W nach...	Max. Wärmefluss [ $\mu$ W]
$10^4$	3	600 min	27,1 $\pm$ 8,4 (nach 600min)
$10^5$	3	526 min	33,5 $\pm$ 4,7 (nach 600 min)
$10^7$	4	281 min	84,8 $\pm$ 49,4 (nach 356 min)
$10^8$	3	176 min	94,6 $\pm$ 16,7 (nach 246 min)

Der maximale Wärmefluss betrug bei  $10^5$  KBE/ml 33,5 $\pm$ 4,7  $\mu$ W (nach 600 min), bei  $10^7$  KBE/ml 84,8 $\pm$ 49,4  $\mu$ W (nach 356 min) und bei  $10^8$  KBE/ml 94,6 $\pm$ 16,7  $\mu$ W (nach 246 min) (Tabelle 5). Der Anstieg des Wärmeflusses tritt also ab einer Inkubation in  $10^4$  KBE/ml bei steigender Keimexposition immer früher auf und erreicht einen größeren Maximalwert (Abb. 13). Wie in Kap. 5.2 für Bakteriensuspensionen beschrieben, steigen auch hier die Geschwindigkeit der Wärmeentwicklung und die Höhe der Wärmeabgabe mit wachsender Keimzahl an. Diese Daten bestätigen, dass die Mikrokolorimetrie eine rasche Detektion der bakteriellen Besiedlung von Gefäßkathetermaterial ermöglicht, sowie das Ausmaß der Besiedlung beschreiben kann. Das Potential der Mikrokolorimetrie, bakterielle Adhäsion an Oberflächen zu beurteilen, konnte bereits in einer zahnmedizinischen Studie, welche die Adhäsion von *Streptococcus sanguinis* an Glasoberflächen untersuchte, gezeigt werden (Hauser-Gerspach et al., 2008).

### 5.3.2 *Ex vivo* gewonnene Katheter

Nachdem gezeigt wurde, dass mittels Messungen des Wärmeflusses unter Laborbedingungen kolonisierte Katheter frühzeitig und hochsensitiv detektiert werden, sowie eine quantitative Differenzierung des Grades der Besiedlung anhand von Vergleichsdaten möglich ist, galt es im nächsten Schritt zu prüfen, wie sich das Verfahren nun an Patientenmaterial verhält.

Von insgesamt 29 untersuchten klinischen Katheterpaaren zeigten 93 % (27 Fälle) eine Übereinstimmung zwischen den mikrokalorimetrischen und den mikrobiologischen Ergebnissen. Und zwar zeigten 20 Katheterpaare weder in der mikrokalorimetrischen noch in der mikrobiologischen Untersuchung bakterielles Wachstum. Weitere 7 Katheterpaare zeigten in beiden Untersuchungsmethoden positive Befunde. In 7 % (2 Fälle) der Untersuchungen wichen die Resultate voneinander ab. Jeweils ein Katheterpaar zeigte mikrokalorimetrisch/mikrobiologisch ein [negativ/positiv]-Ergebnis bzw. [positiv/negativ]-Ergebnis (Abb. 14). Die abweichende Katheterprobe ohne Anstieg des Wärmeflusses im Kalorimeter, zeigte auch nach Ausplattierung der Kalorimeterkultur kein Wachstum, so dass das positive Ergebnis der mikrobiologischen Untersuchung (Koagulase negative Staphylokokken) eventuell Folge einer Kontamination ist. Möglich ist auch dass der mikrobiologisch untersuchte Katheterabschnitt tatsächlich adhärente Keime aufwies, während der mikrokalorimetrisch untersuchte Abschnitt keimfrei war. Die andere Probe mit abweichendem Ergebnis stand mit der klinischen Diagnose Pneumonie und Pilzsepsis in Verbindung. Dementsprechend ist in diesem Fall das positive Ergebnis der Mikrokalorimetrie mit darauf folgendem massenspektrometrischen Nachweis einer *Candida albicans* plausibel.



**Abbildung 14:** Darstellung von Übereinstimmung und Abweichung der mikrobiologischen und mikrokolorimetrischen Ergebnisse.

Von insgesamt 29 untersuchten *ex vivo* gewonnenen Kathetern lieferten in beiden Untersuchungsmethoden 20 Katheter einheitlich negative und 7 Katheter einheitlich positive Ergebnisse. In 2 Fällen variierten die Ergebnisse der diagnostischen Verfahren voneinander.

<sup>1</sup>TAM, Mikrokolorimetrische Messung des Wärmeflusses (Thermal Activity Monitor)

<sup>2</sup>QC, Mikrobiologische Diagnostik mittels quantitativer Kultur

Um anhand von Wärmeflusskurven Rückschlüsse auf die Keimspezies ziehen zu können, müssten Referenzkurven der einzelnen Mikroorganismen bekannt sein. Positive mikrokolorimetrische Messungen wurden in dieser Arbeit nach massenspektrometrischer Untersuchung einer Keimspezies zugeordnet. Die massenspektrometrische Bestimmung der positiven Kalorimeterkulturen mittels MALDI-TOF stimmte, mit Ausnahme des zuvor genannten Falles, mit den Ergebnissen der mikrobiologischen Auswertung überein. Ein Bezug zu anderen Publikationen lässt sich hier nicht stellen, da die vorliegende Arbeit die erste ist, die sich mit der mikrokolorimetrischen Untersuchung kolonisierter Katheter befasst.

## 5.4 Sensitivität der Mikrokalorimetrie

Zu den Anforderungen einer neuen Methode der KAI Diagnostik zählen nicht nur die Fähigkeiten der Keimdetektion, -quantifizierung und -identifikation, sondern auch die Sensitivität ist von essentieller Bedeutung. Es galt die geringste an einem Kathetersegment haftende Bakterienanzahl zu finden, die während der 10-stündigen mikrokalorimetrischen Messungen ein positives Ergebnis hervorruft. Daraufhin war es ebenso von Interesse, wie sich die Mikrokalorimetrie, im Hinblick auf die minimale Nachweisgrenze, in einem Vergleich mit anderen diagnostischen Methoden verhält.

Ab einer Inkubation in mindestens  $10^4$  KBE/ml lieferten die besiedelten Katheterabschnitte innerhalb der 10-stündigen mikrokalorimetrischen Messungen einen signifikanten Anstieg des Wärmeflusses. An diesen Kathetersegmenten wurden im Mittelwert 10,29 Koloniebildende Einheiten nachgewiesen. Somit lässt sich bezüglich der unteren Messgrenze schlussfolgern, dass Katheter mit etwa 10 Koloniebildenden Einheiten besiedelt sein müssen, um bei einer 10 Stunden Inkubation im Mikrokalorimeter ein positives Ergebnis zu produzieren. Diese Daten verdeutlichen die hohe Sensitivität der Mikrokalorimetrie. Das 10-stündige Messintervall der vorliegenden Arbeit war willkürlich festgelegt und ist keine zeitliche Mindestanforderung dieser Methode. Wie bereits gezeigt wurde, ist bei höherer Keimlast eine Detektion der Bakterien weit vor Ablauf der 10 Stunden möglich, der Zeitbedarf dieses Verfahrens ist somit äußerst gering.

Trampuz und Kollegen ermittelten mikrokalorimetrische Messgrenzen von 2 KBE für *Streptococcus pneumoniae*, 4 KBE für *Neisseria meningitidis* und 7 KBE für *Listeria monocytogenes*, allerdings liefen die Messungen weit über 10 Stunden hinaus und es wurden keine Fremdkörper-assoziierte Infektionen untersucht (Trampuz et al., 2007b). Da niedrige Keimkonzentrationen länger benötigen, um einen definierten Schwellenwärmefluss zu erreichen, stehen die Ergebnisse nicht im

Kontrast mit den Erkenntnissen dieser Arbeit, zumal deutlich geworden ist, dass sich unterschiedliche Bakterienspezies bezüglich ihrer Wärmeproduktion nicht vergleichen lassen. Die Detektionszeit ist abhängig von der initialen Anzahl an Mikroorganismen, ihrer Replikationsrate und der Wärmeproduktion pro Zelle.

Eine weitere neue Methode zur Detektion von Sepsis ist der PCR-basierte LightCycler<sup>®</sup> SeptiFast Test (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) (Lehmann et al., 2010). Dieses Verfahren liefert nach ungefähr 6 Stunden ein Ergebnis (Louie et al., 2008) und hat somit ebenso wie die Mikrokalorimetrie einen sehr geringen Zeitbedarf. Allerdings ist der PCR-Schnelltest im Vergleich mit der Mikrokalorimetrie kostenintensiver, weist eine geringe Sensitivität auf und erlaubt keine Quantifizierung (Casalta et al., 2009; Lehmann et al., 2011; Wallet et al., 2010).

Aufgrund der höheren Sensitivität und des kontinuierlichen Messprinzips der Mikrokalorimetrie ist der Zeitraum bis zu einer Diagnose deutlich geringer als bei konventionellen Kulturen, die auf der Detektion von Wachstum auf Agarplatten oder in Brühe beruhen. Die Ergebnisse verdeutlichen, dass die Mikrokalorimetrie eine hochsensitive Methode zum Keimnachweis auf Kathetermaterial darstellt.

## **5.5 Möglicher Stellenwert der Mikrokalorimetrie in der klinischen Infektionsdiagnostik**

Die Mikrokalorimetrie ist kein Ersatz für die mikrobiologische Erregerdiagnostik und Resistenztestung, erlaubt aber einen beschleunigten und akkuraten Keimnachweis. Zu den weiteren Vorteilen dieser Methode zählen der geringe Arbeitsaufwand, die wenigen Arbeitsschritte, das Potential zur vollständigen Automatisierung sowie das minimale Risiko einer Kontamination oder biologischen

Gefährdung aufgrund der geschlossenen Ampullen. Des Weiteren stehen die untersuchten Proben nach Abschluss der mikrokalorimetrischen Messung, aufgrund der Passivität des Verfahrens unverändert weiteren Analysen zur Verfügung. Die mikrokalorimetrische Untersuchung erfordert zwar eine Katheterentfernung, ermöglicht jedoch die Erfassung von endoluminalen Keimen und Biofilmen sowie eine Keimidentifikation. Außerdem ist die Bestimmung inhibitorischer Effekte oder der minimalen Hemmkonzentration für verschiedene antimikrobielle Wirkstoffe und Mikroorganismen anhand der Mikrokalorimetrie innerhalb Stunden realisierbar (Li et al., 2002; von Ah et al., 2009; Yang et al., 2008). Bei subinhibitorischen Konzentrationen liefern die Wärmeflusskurven darüber hinaus Hinweise auf die Art der Hemmung (bakterizid oder bakteriostatisch) (von Ah et al., 2009).

Die Mikrokalorimetrie ist bezüglich der Diagnostik katheterassoziierter Infektionen durchaus eine Konkurrenz zu neuen PCR-basierten Methoden, zumal diese sich durch die Auswahl der Primer nur auf den Nachweis vorher festgelegter Pathogene beschränkt. Klinische Studien müssen allerdings noch zeigen, ob sich die mikrokalorimetrische Diagnostik von KAI auch in der Klinik bewährt, da die vorliegende Arbeit nur methodisch und nicht Patienten orientiert war. Die schnelle Verfügbarkeit eines positiven Befundes hat einen hohen Stellenwert im klinischen Alltag, da in diesem Fall die Fokussuche abgeschlossen werden kann. Im Hinblick auf die Mikrokalorimetrie als Bestandteil der zukünftigen mikrobiologischen Routinediagnostik sind vereinfachte Geräte, die einen höheren Probendurchsatz ermöglichen, erforderlich. Ein kommerziell erhältliches Gerät beinhaltet bereits 48 Messzylinder für die gleichzeitige Untersuchung mehrerer Proben. Zudem wäre es möglich, mit einer begrenzten Anzahl an Messzylindern ein Vielfaches an Proben auf mikrobielles Wachstum zu untersuchen, indem diese überwiegend in einem Brutschrank kultiviert werden und jeweils nur kurzzeitig, zur Überprüfung des Wärmeflusses, in das Mikrokalorimeter gebracht werden. Mit der Verfügbarkeit Chip-basierter Sensoren und Kalorimeter wird die Methode wahrscheinlich

vielseitiger, kosteneffizienter und eventuell bald essentieller Bestandteil der klinischen Mikrobiologie sein.

## 6 Zusammenfassung

Die nosokomiale Sepsis ist ein Problem der Intensivmedizin, speziell im besonders infektionsanfälligen Kindesalter. Eine Eintrittspforte für Bakterien sind die zur Blutentnahme und Medikamentengabe dienenden Gefäßkatheter. Bei Infektionsverdacht werden sie entfernt und mikrobiologisch untersucht, das Resultat ist jedoch oft erst nach Tagen verfügbar. Deshalb werden gegenwärtig Methoden zur rascheren Diagnostik gesucht. Nachdem schon früher der Nachweis von Bakterien anhand ihrer Wärmeabgabe beschrieben worden war, hat sich auch in neueren Studien aus der Erwachsenenmedizin die Kalorimetrie als schnelles Verfahren zum Erregernachweis in Körperflüssigkeiten oder auf Fremdmaterialien erwiesen. Darum sollte nun geprüft werden, inwieweit sie sich auch zur Diagnostik von Katheterinfektionen in der Neugeborenen- und Kinderintensivmedizin eignen würde. Hierzu wurden 1 cm lange Stücke von pädiatrischen Doppellumenkathetern in Kulturen des nicht zur Biofilmbildung befähigten *S. epidermidis* 1457-M10 bebrütet und in 3,5 ml TSB-Medium über 10 Stunden bei 37°C in einem Mikrokalorimeter inkubiert. Aufgrund einer Vorstudie zur Relation von Bakteriendichte und Wärmeproduktion wurden zur Vorbebrütung der Katheter Keimzahlen von  $10^2$  bis  $10^8$  KBE/ml verwandt. Zur Quantifizierung der adhärenenten Bakterien wurden bei einzelnen bebrüteten Kathetern die Keime mittels Ultraschall abgelöst, die entstandene Suspension auf Blutagarplatten ausgestrichen und die resultierenden KBE ausgezählt. Ferner wurden von den Bakterienspezies *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *S. marcescens* Kulturen mit einer Keimzahl von  $10^5$  KBE/ml hergestellt und diese parallel als Kalorimeterkultur und als mikrobiologische Schüttelkultur inkubiert.

Die bewachsenen Katheter zeigten einen mit zunehmender Keimzahl rascher ansteigenden und höhere Maxima erreichenden Wärmefluss, wobei die Nachweisgrenze bei 10 KBE (in der  $10^4$  KBE/ml-Gruppe) lag. Aus den definierten Kulturen unterschiedlicher Bakterienspezies ergaben sich hochreproduzierbare

Wärmeflusskurven, die sich zwischen den Bakterienspezies nicht nur in der Höhe der Wärmeabgabe, sondern auch im Kurvenverlauf so deutlich unterscheiden, dass sie eine „Blickdiagnose“ erlaubten. Dabei erbrachten die Mikrokalorimeterkulturen geringere Keimzahlen als die mikrobiologischen Schüttelkulturen, so dass die charakteristischen Kurvenverläufe auf artspezifischen Stoffwechsellumstellungen bei der zunehmenden Sedimentation beziehungsweise Substratverarmung in den kalorimetrischen Messampullen beruhen dürften. Erste Erfahrungen mit klinischen Proben scheinen die Ergebnisse der methodischen Untersuchungen zu bestätigen, weisen aber auch auf die Notwendigkeit geeigneter präparativer Schritte zur Standardisierung der Diagnostik hin.

**Schlussfolgerungen:** Die Kalorimetrie erlaubt nicht nur eine empfindliche Detektion, sondern offenbar auch eine näherungsweise Identifikation von Bakterien und kann damit – standardisiertes Vorgehen vorausgesetzt – eine raschere Diagnostik von Katheterinfektionen in der Kinderintensivmedizin ermöglichen.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALLERBERGER, F, DIERICH, MP (1988) Effects of disinfectants on bacterial metabolism evaluated by microcalorimetric investigations. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene Serie B-Umwelthygiene Krankenhaushygiene Arbeitshygiene Präventive Medizin* 187(2):166-179.
- ALVAREZ, CA, GONGORA, G, GARCIA, M, ARROYO, C, QUEVEDO, R (2001) Assessment of the gram and quinacrine techniques for diagnosis of catheter related bacteremia (crb) in patients at the national cancer institute of colombia. *Clin Infect Dis* 33(7):1128-1128.
- ANDERL, JN, FRANKLIN, MJ, STEWART, PS (2000) Role of antibiotic penetration limitation in klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44(7):1818-1824.
- ANDERSON, GG, O'TOOLE, GA (2008) Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Bacterial Biofilms* 32285-105.
- BALTIMORE, RS (1998) Neonatal nosocomial infections. *Semin Perinatol* 22(1):25-32.
- BANERJEE, SN, EMORI, TG, CULVER, DH, GAYNES, RP, JARVIS, WR, HORAN, T, EDWARDS, JR, TOLSON, J, HENDERSON, T, MARTONE, WJ (1991) Secular trends in nosocomial primary bloodstream infections in the united states, 1980-1989. National nosocomial infections surveillance system. *Am J Med* 91(3B):86S-89S.
- BARROS, N, FEIJOO, S (2003) A combined mass and energy balance to provide bioindicators of soil microbiological quality. *Biophys Chem* 104(3):561-572.
- BARROS, N, FEIJOO, S, FERNANDEZ, S (2003) Microcalorimetric determination of the cell specific heat rate in soils: Relationship with the soil microbial population and biophysical significance. *Thermochimica Acta* 406(1-2):161-170.
- BEEZER, AE, CHOWDHRY, BZ, NEWELL, RD, TYRRELL, HJV (1977) Bioassay of antifungal antibiotics by flow microcalorimetry. *Anal Chem* 49(12):1781-1784.
- BERRIDGE, NJ, COUSINS, CM, CLIFFE, AJ (1974) Microcalorimetry applied to certain species of bacteria growing in sterilized separated milk. *J Dairy Res* 41(2):203-215.

- BISOGNANO, C, VAUDAUX, P, ROHNER, P, LEW, DP, HOOPER, DC (2000) Induction of fibronectin-binding proteins and increased adhesion of quinolone-resistant staphylococcus aureus by subinhibitory levels of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6):1428-1437.
- BLOT, F, NITENBERG, G, CHACHATY, E, RAYNARD, B, GERMANN, N, ANTOUN, S, LAPLANCHE, A, BRUN-BUISSON, C, TANCREDE, C (1999) Diagnosis of catheter-related bacteraemia: A prospective comparison of the time to positivity of hub-blood versus peripheral-blood cultures. *Lancet* 354(9184):1071-1077.
- BOLING, EA, BLANCHARD, GC, RUSSELL, WJ (1973) Bacterial identification by microcalorimetry. *Nature* 241(5390):472-473.
- BRAISSANT, O, WIRZ, D, GOPFERT, B, DANIELS, AU (2010) Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities. *FEMS Microbiol Lett* 303(1):1-8.
- BRUNBUISSON, C, ABROUK, F, LEGRAND, P, HUET, Y, LARABI, S, RAPIN, M (1987) Diagnosis of central venous catheter-related sepsis - critical-level of quantitative tip cultures. *Arch Intern Med* 147(5):873-877.
- BUCKTON, G, RUSSELL, SJ, BEEZER, AE (1991) Pharmaceutical calorimetry - a selective review. *Thermochimica Acta* 193:195-214.
- CALFEE, DP, FARR, BM (1999) Catheter-related bloodstream infection. *Curr Infect Dis Rep* 1(3):238-244.
- CAPDEVILA, JA, PLANES, AM, PALOMAR, M, GASSER, I, ALMIRANTE, B, PAHISSA, A, CRESPO, E, MARTINEZ-VAZQUEZ, JM (1992) Value of differential quantitative blood cultures in the diagnosis of catheter-related sepsis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 11(5):403-407.
- CASALTA, JP, GOURIET, F, ROUX, V, THUNY, F, HABIB, G, RAOULT, D (2009) Evaluation of the lightcyclera (r) septifast test in the rapid etiologic diagnostic of infectious endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28(6):569-573.
- CERCA, N, PIER, GB, VILANOVA, M, OLIVEIRA, R, AZEREDO, J (2005) Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of staphylococcus epidermidis. *Res Microbiol* 156(4):506-514.
- CHARLEBOIS, SJ, DANIELS, AU, LEWIS, G (2003) Isothermal microcalorimetry: An analytical technique for assessing the dynamic chemical stability of uhmwpe. *Biomaterials* 24(2):291-296.

- CHOWDHRY, BZ, BEEZER, AE, GREENHOW, EJ (1983) Analysis of drugs by micro-calorimetry - isothermal power-conduction calorimetry and thermometric titrimetry. *Talanta* 30(4):209-243.
- CLERI, DJ, CORRADO, ML, SELIGMAN, SJ (1980) Quantitative culture of intravenous catheters and other intravascular inserts. *J Infect Dis* 141(6):781-786.
- COLLIGNON, P, CHAN, R, MUNRO, R (1987) Rapid diagnosis of intravascular catheter-related sepsis. *Arch Intern Med* 147(9):1609-1612.
- COLLIGNON, PJ (1994) Intravascular catheter-associated sepsis - a common problem. *Med J Aust* 161(6):374-378.
- COOPER, GL, HOPKINS, CC (1985) Rapid diagnosis of intravascular catheter-associated infection by direct gram staining of catheter segments. *N Engl J Med* 312(18):1142-1147.
- COSTERTON, JW, STEWART, PS, GREENBERG, EP (1999) Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science* 284(5418):1318-1322.
- COUTLEE, F, LEMIEUX, C, PARADIS, JF (1988) Value of direct catheter staining in the diagnosis of intravascular-catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 26(6):1088-1090.
- CRIDDLE, RS, BREIDENBACH, RW, HANSEN, LD (1991) Plant calorimetry - how to quantitatively compare apples and oranges. *Thermochimica Acta* 193:67-90.
- CRITTER, SAM, FREITAS, SS, AIROLDI, C (2002a) Comparison between microorganism counting and a calorimetric method applied to tropical soils. *Thermochimica Acta* 394(1-2):133-144.
- CRITTER, SAM, FREITAS, SS, AIROLDI, C (2002b) Microbial biomass and microcalorimetric methods in tropical soils. *Thermochimica Acta* 394(1-2):145-154.
- DAROUICHE, RO (1999) Prevention of vascular catheter-related infections. *Neth J Med* 55(3):92-99.
- DAROUICHE, RO, DHIR, A, MILLER, AJ, LANDON, GC, RAAD, II, MUSHER, DM (1994) Vancomycin penetration into biofilm covering infected prostheses and effect on bacteria. *J Infect Dis* 170(3):720-723.
- DEBORD, J, HAREL, M, BOLLINGER, JC, VERNEUIL, B, MERLE, L, DANTOINE, T (2005) Flow microcalorimetric study of enzyme reactions -

- application to arylesterase from human serum. *Thermochimica Acta* 427(1-2):85-91.
- DESJARDIN, JA, FALAGAS, ME, RUTHAZER, R, GRIFFITH, J, WAWROSE, D, SCHENKEIN, D, MILLER, K, SNYDMAN, DR (1999) Clinical utility of blood cultures drawn from indwelling central venous catheters in hospitalized patients with cancer. *Ann Intern Med* 131(9):641-647.
- DIGIOVINE, B, CHENOWETH, C, WATTS, C, HIGGINS, M (1999) The attributable mortality and costs of primary nosocomial bloodstream infections in the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 160(3):976-981.
- DIMICK, JB, PELZ, RK, CONSUNJI, R, SWOBODA, SM, HENDRIX, CW, LIPSETT, PA (2001) Increased resource use associated with catheter-related bloodstream infection in the surgical intensive care unit. *Arch Surg* 136(2):229-234.
- DONLAN, RM, COSTERTON, JW (2002) Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15(2):167-193.
- DOUARD, MC, ARLET, G, LONGUET, P, TROJE, C, ROUVEAU, M, PONSCARME, D, EURIN, B (1999) Diagnosis of venous access port-related infections. *Clin Infect Dis* 29(5):1197-1202.
- DOUARD, MC, CLEMENTI, E, ARLET, G, MARIE, O, JACOB, L, SCHREMMER, B, ROUVEAU, M, GARROUSTE, MT, EURIN, B (1994) Negative catheter-tip culture and diagnosis of catheter-related bacteremia. *Nutrition* 10(5):397-404.
- DRUSKIN, MS, SIEGEL, PD (1963) Bacterial contamination of indwelling intravenous polyethylene catheters. *JAMA* 185:966-968.
- DZIEJOWSKI, JE (1995) Calorimetric and respirometric characteristics of the decomposition of animal wastewaters in soil. *Thermochimica Acta* 251:37-43.
- EGGIMANN, P, HARBARTH, S, CONSTANTIN, MN, TOUVENEAU, S, CHEVROLET, JC, PITTET, D (2000) Impact of a prevention strategy targeted at vascular-access care on incidence of infections acquired in intensive care. *Lancet* 355(9218):1864-1868.
- EGGIMANN, P, SAX, H, PITTET, D (2004) Catheter-related infections. *Microbes Infect* 6(11):1033-1042.
- ELLIOTT, T (2000) Intravascular catheter-related sepsis novel methods of prevention. *Intensive Care Med* 26:S45-S50.

- ESMANN, V (1964) Effect of cell concentration on the metabolism of normal and diabetic leucocytes in vitro. *Metabolism* 13:354-360.
- FARR, BM (2001) Preventing vascular catheter-related infections: Current controversies. *Clin Infect Dis* 33(10):1733-1738.
- FLYNN, PM, SHENEP, JL, BARRETT, FF (1988) Differential quantitation with a commercial blood culture tube for diagnosis of catheter-related infection. *J Clin Microbiol* 26(5):1045-1046.
- GARNER, JS, JARVIS, WR, EMORI, TG, HORAN, TC, HUGHES, JM (1988) Cdc definitions for nosocomial infections, 1988. *Am J Infect Control* 16(3):128-140.
- GASTMEIER, P, GEFFERS, C (2008) Nosokomiale infektionen in deutschland: Wie viele gibt es wirklich? *Dtsch Med Wochenschr* 133(21):1111-1115.
- GAYNES, RP, EDWARDS, JR, JARVIS, WR, CULVER, DH, TOLSON, JS, MARTONE, WJ (1996) Nosocomial infections among neonates in high-risk nurseries in the united states. *Pediatrics* 98(3):357-361.
- GEFFERS, C, GASTMEIER, A, SCHWAB, F, GRONEBERG, K, RUDEN, H, GASTMEIER, P (2010) Use of central venous catheter and peripheral venous catheter as risk factors for nosocomial bloodstream infection in very-low-birth-weight infants. *Infect Control Hosp Epidemiol* 31(4):395-401.
- GOWARDMAN, JR, MONTGOMERY, C, THIRLWELL, S, SHEWAN, J, IDEMA, A, LARSEN, PD, HAVILL, JH (1998) Central venous catheter-related bloodstream infections: An analysis of incidence and risk factors in a cohort of 400 patients. *Intensive Care Med* 24(10):1034-1039.
- HARRIS, LG, TOSATTI, S, WIELAND, M, TEXTOR, M, RICHARDS, RG (2004) Staphylococcus aureus adhesion to titanium oxide surfaces coated with non-functionalized and peptide-functionalized poly(L-lysine)-grafted-poly(ethylene glycol) copolymers. *Biomaterials* 25(18):4135-4148.
- HAUSER-GERSPACH, I, DE FREITAS, PS, DANIELS, AUD, MEYER, J (2008) Adhesion of streptococcus sanguinis to glass surfaces measured by isothermal microcalorimetry (imc). *Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials* 85B(1):42-49.
- HEILMANN, C, HUSSAIN, M, PETERS, G, GOTZ, F (1997) Evidence for autolysin-mediated primary attachment of staphylococcus epidermidis to a polystyrene surface. *Mol Microbiol* 24(5):1013-1024.
- HEISELMAN, D (1994) Nosocomial bloodstream infections in the critically ill. *JAMA* 272(23):1819-1820.

- HOFFMAN, LR, D'ARGENIO, DA, MACCOSS, MJ, ZHANG, ZY, JONES, RA, MILLER, SI (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature* 436(7054):1171-1175.
- HUANG, ZY, YI, L, QU, SH, FENG, Y (1998) Comparative study on half-inhibitory concentration of schiff base-metal complexes reacting with bacterial. *Thermochimica Acta* 320(1-2):121-126.
- JAMES, AM (ed.) 1987. *Thermal and energetic studies of cellular biological systems*, Bristol, UK: John Wright.
- JOHNSON, A, OPPENHEIM, BA (1992) Vascular catheter-related sepsis: Diagnosis and prevention. *J Hosp Infect* 20(2):67-78.
- JUSTE, RN, HANNAN, M, GLENDENNING, A, AZADIAN, B, SONI, N (2000) Central venous blood culture: A useful test for catheter colonisation? *Intensive Care Med* 26(9):1373-1375.
- KATSIKOIANNI, M, MISSIRLIS, YF (2004) Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterials and of techniques used in estimating bacteria-material interactions. *Eur Cell Mater* 837-57.
- KELLY, M, WCIORKA, LR, MCCONICO, S, PETERSON, LR (1996) Sonicated vascular catheter tip cultures. Quantitative association with catheter-related sepsis and the non-utility of an adjuvant cytocentrifuge gram stain. *Am J Clin Pathol* 105(2):210-215.
- KEMP, RB (1991) Calorimetric studies of heat-flux in animal-cells. *Thermochimica Acta* 193253-267.
- LAMPI, RA, MIKELSON, DA, ROWLEY, DB, PREVITE, JJ, WELLS, RE (1974) Radiometry and microcalorimetry - techniques for rapid detection of foodborne microorganisms. *Food Technology* 28(10):52-55.
- LAVOISIER, AL, LAPLACE, PS (1780) Mémoire sur la chaleur. *Mémoires de l'Académie des sciences* 355-408.
- LEHMANN, LE, HAUSER, S, MALINKA, T, KLASCHIK, S, WEBER, SU, SCHEWE, JC, STUBER, F, BOOK, M (2011) Rapid qualitative urinary tract infection pathogen identification by septifast (r) real-time pcr. *PLoS ONE* 6(2):-.
- LEHMANN, LE, HUNFELD, KP, STEINBRUCKER, M, BRADE, V, BOOK, M, SEIFERT, H, BINGOLD, T, HOEFT, A, WISSING, H, STUBER, F (2010) Improved detection of blood stream pathogens by real-time pcr in severe sepsis. *Intensive Care Med* 36(1):49-56.

- LEWIS, K (2008) Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Bacterial Biofilms* 322107-131.
- LI, X, LIU, Y, WU, J, LIANG, HG, QU, SS (2002) Microcalorimetric study of staphylococcus aureus growth affected by selenium compounds. *Thermochimica Acta* 387(1):57-61.
- LIU, Y, LI, X, QU, SS, SHEN, P (2000) Microcalorimetric investigation of the toxic action of cd2+ on rhizopus nigricans growth. *J Biochem Biophys Methods* 45(2):231-239.
- LJUNGHOLM, K, NOREN, B, SKOLD, R, WADSO, I (1979) Use of microcalorimetry for the characterization of microbial activity in soil. *Oikos* 33(1):15-23.
- LJUNGHOLM, K, WADSO, I, MARDH, PA (1976) Microcalorimetric detection of growth of mycoplasmatales. *J Gen Microbiol* 96(Oct):283-288.
- LOUIE, RF, TANG, ZP, ALBERTSON, TE, COHEN, S, TRAN, NK, KOST, GJ (2008) Multiplex polymerase chain reaction detection enhancement of bacteremia and fungemia. *Crit Care Med* 36(5):1487-1492.
- MAKI, DG (1981) Nosocomial bacteremia. An epidemiologic overview. *Am J Med* 70(3):719-732.
- MAKI, DG, STOLZ, SM, WHEELER, S, MERMEL, LA (1997) Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection by use of an antiseptic-impregnated catheter - a randomized, controlled trial. *Ann Intern Med* 127(4):257-266.
- MAKI, DG, WEISE, CE, SARAFIN, HW (1977) Semiquantitative culture method for identifying intravenous-catheter-related infection. *N Engl J Med* 296(23):1305-1309.
- MARTINEZ, JA, DESJARDIN, JA, ARONOFF, M, SUPRAN, S, NASRAWAY, SA, SNYDMAN, DR (2002) Clinical utility of blood cultures drawn from central venous or arterial catheters in critically ill surgical patients. *Crit Care Med* 30(1):7-13.
- MERMEL, LA (2000) Prevention of intravascular catheter-related infections. *Ann Intern Med* 132(5):391-402.
- MERMEL, LA, FARR, BM, SHERERTZ, RJ, RAAD, II, O'GRADY, N, HARRIS, JS, CRAVEN, DE (2001) Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Clin Infect Dis* 32(9):1249-1272.

- MERMEL, LA, MCCORMICK, RD, SPRINGMAN, SR, MAKI, DG (1991) The pathogenesis and epidemiology of catheter-related infection with pulmonary-artery swan-ganz catheters - a prospective-study utilizing molecular subtyping. *Am J Med* 91:197-205.
- MILES, RJ, BEEZER, AE, LEE, DH (1986) Growth of mycoplasma-mycoides subspecies mycoides on media containing various sugars and amino-sugars - an ampoule microcalorimetric study. *Microbios* 45(182):7-19.
- MONTANARI, MLC, BEEZER, AE, MONTANARIC, CA (1999) Qsar based on biological microcalorimetry - the interaction of saccharomyces cerevisiae with hydrazides. *Thermochimica Acta* 328(1-2):91-97.
- MOONENS, F, EL ALAMI, S, VAN GOSSUM, A, STRUELENS, MJ, SERRUYS, E (1994) Usefulness of gram staining of blood collected from total parenteral nutrition catheter for rapid diagnosis of catheter-related sepsis. *J Clin Microbiol* 32(6):1578-1579.
- MÜHLFELD, C, SINGER, D, ENGELHARDT, N, RICHTER, J, SCHMIEDL, A (2005) Electron microscopy and microcalorimetry of the postnatal rat heart (rattus norvegicus). *Comparative Biochemistry and Physiology A - Molecular & Integrative Physiology* 141(3):310-318.
- MUNOZ, P, BOUZA, E, SAN JUAN, R, VOSS, A, PASCAU, J, DESCO, M (2004) Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in europe (esgni-006 study). *Clin Microbiol Infect* 10(9):843-845.
- NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE, S (2002) National nosocomial infections surveillance (nnis) system report, data summary from january 1992 to june 2002, issued august 2002. *Am J Infect Control* 30(8):458-475.
- NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE, S (2004) National nosocomial infections surveillance (nnis) system report, data summary from january 1992 through june 2004, issued october 2004. *Am J Infect Control* 32(8):470-485.
- NUCLEO, E, STEFFANONI, L, FUGAZZA, G, MIGLIAVACCA, R, GIACOBONE, E, NAVARRA, A, PAGANI, L, LANDINI, P (2009) Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in a multidrug-resistant clinical isolate of acinetobacter baumannii. *BMC Microbiol* 9:270.

- O'TOOLE, GA, KOLTER, R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* wcs365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: A genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461.
- ODENHOLT, I (2001) Pharmacodynamic effects of subinhibitory antibiotic concentrations. *Int J Antimicrob Agents* 17(1):1-8.
- PADERA, RF (2006) Infection in ventricular assist devices: The role of biofilm. *Cardiovascular Pathology* 15(5):264-270.
- PITTET, D, TARARA, D, WENZEL, RP (1994) Nosocomial blood-stream infection in critically ill patients - excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* 271(20):1598-1601.
- PRADO, AGS, AIROLDI, C (2002) The toxic effect on soil microbial activity caused by the free or immobilized pesticide diuron. *Thermochimica Acta* 394(1-2):155-162.
- PRIVALOV, PL, DRAGAN, AI (2007) Microcalorimetry of biological macromolecules. *Biophys Chem* 126(1-3):16-24.
- RAAD, II, BODEY, GP (1992) Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clin Infect Dis* 15(2):197-208.
- RAAD, II, HANNA, HA (2002) Intravascular catheter-related infections - new horizons and recent advances. *Arch Intern Med* 162(8):871-878.
- RAAD, I (1998) Intravascular-catheter-related infections. *Lancet* 351(9106):893-898.
- RAAD, I, COSTERTON, W, SABHARWAL, U, SACILOWSKI, M, ANAISSIE, E, BODEY, GP (1993) Ultrastructural analysis of indwelling vascular catheters: A quantitative relationship between luminal colonization and duration of placement. *J Infect Dis* 168(2):400-407.
- RAUBUCH, M, BEESE, F (1999) Comparison of microbial properties measured by  $\text{O}_2$  consumption and microcalorimetry as bioindicators in forest soils. *Soil Biology & Biochemistry* 31(7):949-956.
- RELLO, J, OCHAGAVIA, A, SABANES, E, ROQUE, M, MARISCAL, D, REYNAGA, E, VALLES, J (2000) Evaluation of outcome of intravenous catheter-related infections in critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med* 162(3):1027-1030.
- RICHARDS MJ, EJ, CULVER DH, GAYNES R, NATIONAL NOSOCOMIAL SURVEILLANCE SYSTEM (1999) Nosocomial infections in pediatric intensive care units in the United States. *Pediatrics* 103(4):e39.

- ROHDE, H, FRANKENBERGER, S, ZAHRINGER, U, MACK, D (2010) Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular adhesin (pia) to staphylococcus epidermidis biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *Eur J Cell Biol* 89(1):103-111.
- RUSHFORTH, JA, HOY, CM, KITE, P, PUNTIS, JW (1993) Rapid diagnosis of central venous catheter sepsis. *Lancet* 342(8868):402-403.
- SEIFERT, H, CORNELLY, O, SEGGEWISS, K, DECKER, M, STEFANIK, D, WISPLINGHOFF, H, FATKENHEUER, G (2003) Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* 41(1):118-123.
- SHERERTZ, RJ, RAAD, II, BELANI, A, KOO, LC, RAND, KH, PICKETT, DL, STRAUB, SA, FAUERBACH, LL (1990) 3-year experience with sonicated vascular catheter cultures in a clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol* 28(1):76-82.
- SIEGMAN-IGRA, Y, ANGLIM, AM, SHAPIRO, DE, ADAL, KA, STRAIN, BA, FARR, BM (1997) Diagnosis of vascular catheter-related bloodstream infection: A meta-analysis. *J Clin Microbiol* 35(4):928-936.
- SIEMPOS, II, KOPTERIDES, P, TSANGARIS, I, DIMOPOULOU, I, ARMAGANIDIS, AE (2009) Impact of catheter-related bloodstream infections on the mortality of critically ill patients: A meta-analysis. *Crit Care Med* 37(7):2283-2289.
- SINGER, D, BACH, F, BRETSCHEIDER, HJ, KUHN, HJ (1991) Microcalorimetric monitoring of ischemic tissue metabolism - influence of incubation conditions and experimental animal species. *Thermochimica Acta* 18755-69.
- SINGER, D, SCHUNCK, O, BACH, F, KUHN, HJ (1995) Size effects on metabolic-rate in cell, tissue, and body calorimetry. *Thermochimica Acta* 251227-240.
- SITGESSERRA, A, PUIG, P, LINARES, J, PEREZ, JL, FARRERO, N, JAURRIETA, E, GARAU, J (1984) Hub colonization as the initial step in an outbreak of catheter-related sepsis due to coagulase negative staphylococci during parenteral-nutrition. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 8(6):668-672.
- SMITH, MJ (2008) Catheter-related bloodstream infections in children. *Am J Infect Control* 36(10):S173.e171-173.

- SOUFIR, L, TIMSIT, JF, MAHE, C, CARLET, J, REGNIER, B, CHEVRET, S (1999) Attributable morbidity and mortality of catheter-related septicemia in critically ill patients: A matched, risk-adjusted, cohort study. *Infect Control Hosp Epidemiol* 20(6):396-401.
- SPARLING, GP (1983) Estimation of microbial biomass and activity in soil using micro-calorimetry. *Journal of Soil Science* 34(2):381-390.
- STEWART, PS, RAYNER, J, ROE, F, REES, WM (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* 91(3):525-532.
- STONE, G, WOOD, P, DIXON, L, KEYHAN, M, MATIN, A (2002) Tetracycline rapidly reaches all the constituent cells of uropathogenic escherichia coli biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 46(8):2458-2461.
- TACCONELLI, E, SMITH, G, HIEKE, K, LAFUMA, A, BASTIDE, P (2009) Epidemiology, medical outcomes and costs of catheter-related bloodstream infections in intensive care units of four european countries: Literature- and registry-based estimates. *J Hosp Infect* 72(2):97-103.
- TACCONELLI, E, TUMBARELLO, M, PITTIRUTI, M, LEONE, F, LUCIA, MB, CAUDA, R, ORTONA, L (1997) Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16(3):203-209.
- TIGHE, MJ, KITE, P, FAWLEY, WN, THOMAS, D, MCMAHON, MJ (1996) An endoluminal brush to detect the infected central venous catheter in situ: A pilot study. *BMJ* 313(7071):1528-1529.
- TRAMPUZ, A, SALZMANN, S, ANTHEAUME, J, DANIELS, AU (2007a) Microcalorimetry: A novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion (Paris)* 47(9):1643-1650.
- TRAMPUZ, A, STEINHUBER, A, WITTWER, M, LEIB, SL (2007b) Rapid diagnosis of experimental meningitis by bacterial heat production in cerebrospinal fluid. *BMC Infect Dis* 7116.
- VAN HOUDT, R, MICHIELS, CW (2005) Role of bacterial cell surface structures in escherichia coli biofilm formation. *Res Microbiol* 156(5-6):626-633.
- VINCENT, JL, BIHARI, DJ, SUTER, PM, BRUINING, HA, WHITE, J, NICOLAS-CHANOIN, MH, WOLFF, M, SPENCER, RC, HEMMER, M (1995) The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in europe. Results of the european prevalence of infection in intensive care (epic) study. Epic international advisory committee. *JAMA* 274(8):639-644.

- VON AH, U, WIRZ, D, DANIELS, A (2009) Isothermal micro calorimetry - a new method for mic determinations: Results for 12 antibiotics and reference strains of e. Coli and s. Aureus. *BMC Microbiol* 9:14.
- VRANY, JD, STEWART, PS, SUCI, PA (1997) Comparison of recalcitrance to ciprofloxacin and levofloxacin exhibited by pseudomonas aeruginosa biofilms displaying rapid-transport characteristics. *Antimicrob Agents Chemother* 41(6):1352-1358.
- WALLET, F, NSEIR, S, BAUMANN, L, HERWEGH, S, SENDID, B, BOULO, M, ROUSSEL-DELVALLEZ, M, DUROCHER, AV, COURCOL, RJ (2010) Preliminary clinical study using a multiplex real-time pcr test for the detection of bacterial and fungal DNA directly in blood. *Clin Microbiol Infect* 16(6):774-779.
- YAMANO, H, TAKAHASHI, K (1983) Temperature effect on the activity of soil microbes measured from heat evolution during the degradation of several carbon-sources. *Agric Biol Chem* 47(7):1493-1499.
- YANG, LN, XU, F, SUN, XN, ZHAO, ZB, SONG, GC (2008) Microcalorimetric studies on the action of different cephalosporins. *J Therm Anal Calorim* 93: 417-421.
- ZHOU, PJ, ZHOU, HT, LIU, Y, QU, SS, ZHU, YG, WU, ZB (2001) Studies on the energy release of rice mitochondria under different conditions by means of microcalorimetry. *J Biochem Biophys Methods* 48(1):1-11.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATTC	American Type Culture Collection
KAI	Katheterassoziierte Infektionen (englisch: CRBSI)
KBE	Koloniebildende Einheit (englisch: CFU)
MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laser Desorptions-Ionisations-Massenspektroskopie (englisch: <i>Matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass spectrometry</i> )
$\mu$ W	Mikrowatt
mJ	Millijoule
n	Anzahl der Proben
OD600	optische Dichte bei 600 nm
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
spp.	species
TSB	Trypticase-Soja-Brühe
U/Min	Umdrehungen pro Minute
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Das Mikrokalorimeter 2277 BioActivity Monitor. (Seite 13)
- Abbildung 2:** Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters. (Seite 14)
- Abbildung 3:** Wärmeflusskurven verschiedener Konzentrationen von *Staphylococcus epidermidis* 1457. (Seite 27)
- Abbildung 4:** Wärmeflusskurven von *Escherichia coli*. (Seite 28)
- Abbildung 5:** Wärmeflusskurven von *Serratia marcescens*. (Seite 29)
- Abbildung 6:** Wärmeflusskurven von *Pseudomonas aeruginosa*. (Seite 30)
- Abbildung 7:** Wärmeflusskurven von *Staphylococcus aureus*. (Seite 31)
- Abbildung 8:** Wärmeflusskurven unterschiedlich stark bewachsener Kathetersegmente. (Seite 33)
- Abbildung 9:** Wärmeflusskurven *ex vivo* gewonnener Katheter. (Seite 36)
- Abbildung 10:** Quantitativer Vergleich des Bakterienwachstums verschiedener Arten in Schüttelkultur und Kalorimeterkultur. (Seite 38)
- Abbildung 11:** Wärmeflusskurven infektionsrelevanter Bakterienarten. (Seite 45)
- Abbildung 12:** Schematische Darstellung der Diauxie. (Seite 43)
- Abbildung 13:** Die Geschwindigkeit und Maxima der Wärmeentwicklung. (Seite 47)
- Abbildung 14:** Darstellung von Übereinstimmung und Abweichung der mikrobiologischen und mikrokalorimetrischen Ergebnisse. (Seite 50)

## **8.3 Lebenslauf**

Aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

## 8.4 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben. Insbesondere geht mein Dank an:

Herrn Prof. Dr. D. Singer danke ich für die Bereitstellung des interessanten Themas und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Arbeit als mein Doktorvater. Seine fachlichen Ratschläge waren maßgeblich für das Zustandekommen dieser Arbeit.

Herrn PD Dr. H. Rohde danke ich für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit aus mikrobiologischer Sicht. Seine ständige Bereitschaft zu Anregungen und Motivation waren mir eine große Hilfe.

Herrn M. Christner danke ich für die Einweisung in die mikrobiologische Labor-Routine und seine erhebliche Unterstützung bei Fragen und Problemen.

Herrn Prof. Dr. M. Aepfelbacher danke ich für diese Arbeit die Räume und Geräte des Instituts für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene am UKE nutzen zu dürfen.

Ebenfalls möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Pädiatrischen und Neonatologischen Intensivstationen für das Sammeln und Bereitstellen der Katheter bedanken.

Meiner Familie, insbesondere meiner Mutter und meinem Großvater, möchte ich für die Universitätsausbildung und die Unterstützung und Bestärkung zu dieser Arbeit danken.

## **8.5 Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....