

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin

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

Erkennung Katheter-assoziiertes Infektionen mittels Mikrokalorimetrie

Dissertation

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

vorgelegt von:
Lena Sophie Leupold
aus Braunschweig

Hamburg 2016

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.10.2016**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Dominique Singer

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Holger Rohde

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	4
1.1 Die nosokomiale Sepsis	4
1.1.1 Epidemiologie und Klinik	4
1.1.2 Katheter-assoziierte Sepsis	6
1.1.2.1 im Erwachsenenalter	6
1.1.2.2 im Kindesalter	7
1.2 Diagnostik der Katheter-assoziierten Sepsis	9
1.2.1 Konventionelle mikrobiologische Methodik	9
1.2.2 Alternativer mikrokalorimetrischer Ansatz	9
1.3 Fragestellung der Arbeit	11
2 Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien	12
2.1.2 Chemikalien und Inkubationsmedien	12
2.2 Methoden	13
2.2.1 Entfernung und Präparation der Katheter	13
2.2.2 Funktionsweise der isothermen Wärmeflusskalorimetrie	14
2.2.3 Durchführung der mikrokalorimetrischen Messungen	16
2.2.4 Auswertung der Daten	18
2.3 Ethikvotum	18
3 Ergebnisse	19
3.1 Beispielgraphen für positive und negative Messungen	19
3.2 Aufstellung der positiven und negativen Messungen	21
4 Diskussion	24
4.1 Methodenkritik	24
4.2 Auswertung der Messergebnisse	26

4.2.1 Sensitivität und Spezifität.....	26
4.2.2 Mikrobiologisch negative und mikrokalorimetrisch positive („falsch positive“) Befunde.....	27
4.2.3 Mikrobiologisch und mikrokalorimetrisch negative („richtig negative“) Befunde.....	28
4.2.4 Mikrobiologisch und mikrokalorimetrisch positive („richtig positive“) Befunde.....	30
4.2.5 Mikrobiologisch positive und mikrokalorimetrisch negative („falsch negative“) Befunde.....	34
4.3 Vergleich mit Literaturdaten anderer Arbeitsgruppen.....	35
4.4 Vergleich mit anderen Methoden	38
4.4.1 MALDI-TOF	38
4.4.2 Real Time PCR.....	40
5 Schlussfolgerung und Ausblick	41
6 Zusammenfassung	43
7 Summary	46
Literaturverzeichnis	48
Danksagung	54
Lebenslauf	55
Eidesstattliche Erklärung.....	56

1 Einleitung

1.1 Die nosokomiale Sepsis

1.1.1 Epidemiologie und Klinik

Jährlich sterben weltweit schätzungsweise 20 bis 30 Millionen Menschen an einer Sepsis. Die Sepsis verursacht demnach mehr Todesfälle als Brustkrebs, Prostatakrebs und AIDS zusammen (Kott & Donahue, 2015).

Die Anzahl der im Krankenhaus wegen schwerer Sepsis behandelter Patienten verdoppelte sich in den letzten 15 Jahren (Kumar et al., 2011). Das ist auf das steigende Alter der Patienten und die Zunahme an großen operativen Eingriffen zurückzuführen (Angus et al., 2001).

Nur 20-40% der Menschen, die wegen einer Sepsis auf einer Intensivstation behandelt werden, haben diese außerhalb des Krankenhauses erworben (Beale et al., 2009). Das bedeutet im Umkehrschluss, dass 60-80% der Septitiden nosokomiale Infektionen sind.

Bei nosokomialen Infektionen handelt es sich um Infektionen, die sich klinisch oder laborchemisch manifestieren und im direkten Zusammenhang zu einem Krankenhausaufenthalt oder einem Aufenthalt in einer Pflegeeinrichtung stehen. Bei Aufnahme dürfen definitionsgemäß keine Hinweise auf die sich manifestierende Infektion bestanden haben (Robert Koch Institut, 2011).

In Deutschland versterben täglich 162 Menschen an einer Sepsis; das ist vergleichbar mit 175 Menschen, die an einem Myokardinfarkt versterben. Die 90-Tage-Sterblichkeit von Patienten mit schwerer Sepsis und septischen Schock beträgt 54%, von Patienten mit Sepsis 20% (Reinhart & Brunkhorst, 2010).

Neben der hohen Mortalität kann eine schwere Sepsis auch zu erheblichen Einschränkungen im Anschluss der Erkrankung führen. Kognitive Defizite und funktionelle Einschränkungen können insbesondere bei älteren Patienten zum Verlust der Selbstständigkeit führen (Iwashyna et al., 2010).

Pro Sepsispatient belaufen sich die Behandlungskosten in Deutschland auf durchschnittlich 55.000 €. Bei jährlich 20.000 nosokomialen Septitiden in Deutschland

(Gastmeier & Geffers, 2006) belaufen sich die Kosten für nosokomiale Septitiden in Deutschland auf ca. 1,1 Milliarden Euro.

Eine Sepsis ist ein SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), welches durch eine Infektion hervorgerufen wird. Um ein SIRS bei einem Patienten über 16 Jahren zu diagnostizieren, müssen folgende Kriterien erfüllt sein:

- Fieber ($\geq 38,0^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36,0^{\circ}\text{C}$), bestätigt durch eine rektale, intravasale oder intravesikale Messung;
- Tachykardie mit Herzfrequenz $\geq 90/\text{min}$;
- Tachypnoe (Frequenz $\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation (bestätigt durch Abnahme einer arteriellen Blutgasanalyse mit $\text{PaCO}_2 \leq 4,3\text{kPa}$ bzw. 33mmHg);
- Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder 10% oder mehr unreife Neutrophile im Differentialblutbild.

Bei positiver Blutkultur spricht man auch bei nur zwei erfüllten Kriterien von einem SIRS (Deutsche Sepsis-Gesellschaft, 2015).

Da die Sepsis-Kriterien im Einzelnen unspezifisch sind und anfangs sehr diskret ausfallen können, wird oftmals nicht rechtzeitig die Diagnose einer Sepsis gestellt (Global Sepsis Alliance, 2015).

Eine frühe Diagnose mit unverzüglichem Beginn einer kalkulierten Antibiotika-Therapie verbessert die Prognose erheblich (Kumar et al., 2006).

Um das richtige Antibiotikum zur kalkulierten Therapie auswählen zu können, ist die Kenntnis der Vorerkrankungen, der Risikoerkrankungen und des wahrscheinlichen Infektionsfokus hilfreich und führt somit zur Verbesserung der Prognose (Ratzinger et al., 2015).

1.1.2 Katheter-assoziierte Sepsis

1.1.2.1 im Erwachsenenalter

Während die Prävalenz nosokomialer Infektionen auf Normalstationen in Deutschland zwischen 1,5 und 3,8% liegt, erhöht sich die Prävalenz nosokomialer Infektionen auf Intensivstationen in Deutschland auf ca. 15,3% (Geffers, Gastmeier & Rüden, Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8 - Nosokomiale Infektionen, 2002).

Die deutlich erhöhte Prävalenz auf Intensivstationen ist nach Artz (2008) auf die Primär- und Sekundärerkrankungen der Patienten sowie auf die vielfache Anwendung invasiver Maßnahmen zurück zu führen.

Auf allen Arten von Intensivstationen sind im Durchschnitt 41% der Patienten beatmet, 68% mit einem zentralen Venenkatheter (ZVK) ausgestattet und 81% mit einem Harnwegskatheter versorgt. Pro 1000 Device-Tagen ergeben sich 6,53 Atemwegsinfektionen, 1,97 Harnwegsinfektionen und 1,26 ZVK-assoziierte Septitiden (Geffers & Gastmeier, Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland, 2011).

Eine Katheter-assoziierte Sepsis eines Patienten, der über ein Jahr alt ist, einen zentralen Venenkatheter trägt und keinen anderen Infektionsfokus aufweist, ist definiert als mindestens eine positive Blutkultur mit pathogenen Erregern oder klinischen Infektionszeichen mit zwei separat abgenommen positiven Blutkulturen mit dem gleichen gewöhnlichen Hautkeim (Robert Koch Institut, 2011).

Die häufigsten Erreger einer Katheter-assoziierten Sepsis sind Koagulase-negative Staphylokokken, Staphylokokkus aureus, Enterokokken, gramnegative Stäbchen und Candida spp. (Stenger, 2015).

Katheter-assoziierte Septitiden verlängern den Krankenhausaufenthalt eines Patienten im Median um 7 Tage. Die Kosten pro Katheter-assoziiierter Sepsis betragen im Durchschnitt 29.909€ (Leistner et al., 2014).

Die genaue Letalität ist schwer zu beurteilen, da häufig nicht mehr zu eruieren ist, ob der Patient an seiner Grunderkrankung oder an den Folgen der Katheter-assoziierten Sepsis verstorben ist. Laut Garcia-Martin et al. (2001) erhöht sich das Risiko eines

tödlichen Krankheitsverlaufs bei Auftreten einer nosokomialen Infektion um den Faktor 2,3. Walger, Popp & Exner (2013) gehen von einer Letalitätsrate von 10,9% für Katheter-assoziierte Septitiden aus.

Natürlich sollte das oberste Ziel sein, diese Infektionen zu vermeiden. In Deutschland ist laut Walger, Popp & Exner (2013) die Haltung weit verbreitet, dass man nosokomiale Infektionen nur begrenzt verhindern könne. Somit stelle sich eine Zufriedenheit ein, wenn eine Station oder ein Krankenhaus mit der Rate nosokomialer Infektionen nicht über dem Referenzbereich liege. In den USA gibt es dagegen mit dem Projekt „Targeting Zero“ Bestrebungen, alle Katheter-assoziierten Septitiden zu vermeiden, weil jede einzelne Infektion einen Patienten in Lebensgefahr bringt. In einzelnen Krankenhäusern ist eine Reduktion der Katheter-assoziierten Septitiden mit Hilfe von „Care Bundles“ – das heißt gebündelten, genauen Pflegeanweisungen und einer strikten Befolgung derselben – auf Null gelungen (Edwards et al., 2015).

1.1.2.2 im Kindesalter

Bei Säuglingen (unter einem Jahr) mit zentralem Venenkatheter kann die Diagnose einer Katheter-assoziierten Sepsis auch ohne positive Blutkulturen gestellt werden, wenn klinisch Infektionszeichen bestehen, kein anderer Infektionsfokus auffindbar ist und der behandelnde Arzt eine entsprechende Therapie einleitet (Robert Koch Institut, 2011).

In einer kanadischen Studie konnte kein Unterschied zwischen einem gleich nach der Geburt von Frühgeborenen (< 30 Schwangerschaftswochen) eingebrachten Einschwemmkatheter und einem Nabelvenenkatheter, der nach vier Tagen durch einen Einschwemmkatheter ersetzt wurde, hinsichtlich der Sepsis-Inzidenz in Bezug auf Kathetertage festgestellt werden. Nur die Kinder, die nach vier Tagen keinen Katheter mehr benötigten, erkrankten seltener an einer Katheter-assoziierten Sepsis (Shalabi et al., 2015). Die Indikation für einen zentralen Zugang sollte immer streng gestellt werden. Auf Pädiatrischen Intensivstationen korreliert das Risiko, an einer Katheter-assoziierten Sepsis zu erkranken, mit der Länge des Aufenthaltes auf der Intensivstation (Hatachi, Tachibana & Takeuchi, 2015). In den letzten Jahren gab es sehr viele

Veröffentlichungen zur Prävention Katheter-assoziiertes Septikämien auf Pädiatrischen und Neonatologischen Intensivstationen mittels genauer Anlage- und Pflegerichtlinien.

1.2 Diagnostik der Katheter-assoziierten Sepsis

1.2.1 Konventionelle mikrobiologische Methodik

Falls der Verdacht einer Katheter-assoziierten Infektion besteht, sollte möglichst schnell mit der Diagnostik begonnen werden, um den Patienten adäquat behandeln zu können. Bei dem mikrobiologischen Goldstandard handelt es sich um die semiquantitative Methode nach Maki: Die Spitze des gezogenen Katheters wird über eine Blutagarplatte gerollt. Diese wird anschließend bebrütet und die koloniebildenden Einheiten werden ausgezählt. Ab 15 koloniebildenden Einheiten gilt der Katheter als besiedelt. Sind zusätzlich noch positive Blutkulturen mit entsprechendem Erreger vorhanden, spricht man von einer Katheter-assoziierten Infektion. Falls der Katheter nicht entfernt werden kann, gibt es die Möglichkeit der Bestimmung der differential time to positivity. Es werden aus dem Katheter und durch eine venöse Blutentnahme jeweils die gleiche Menge an Blut zur gleichen Zeit gewonnen und in Blutkulturflaschen gegeben. Zeigt die Blutkulturflasche mit dem zentralvenösen Blut mehr als zwei Stunden vor der Flasche mit dem periphervenösen Blut ein positives Ergebnis, ist von einer Katheter-assoziierten Infektion auszugehen. (Stenger, 2015)

Da die Untersuchung des Katheters nach dem mikrobiologischen Goldstandard bis zu 72 Stunden dauern kann und es bei schwerkranken Patienten wichtig ist, schnell den Infektfokus zu finden, lohnt es sich, schnellere Untersuchungsmethoden zu entwickeln.

1.2.2 Alternativer mikrokalorimetrischer Ansatz

Schon Boling, Blanchard & Russell (1973) publizierten, dass es mittels der sogenannten Mikrokalorimetrie – einer Methode zur Messung kleinster Wärmeproduktionsraten – gelingt, nicht nur bakterielles Wachstum nachzuweisen, sondern auch die Keimspezies anhand ihres „kalorischen Fingerabdrucks“ zu identifizieren.

Als kalorischer Fingerabdruck wird die individuelle Wärmeflusskurve einer Bakterienspezies in einem bestimmten Nährmedium im Kalorimeter bezeichnet. Die gleiche Bakterienspezies wird im gleichen Nährmedium immer die gleiche Wärmeflusskurve produzieren. Wenn die Menge an koloniebildenden Einheiten sinkt, verschiebt sich der Anstieg der Wärmeproduktion auf einen etwas späteren Zeitpunkt

und die Amplitude bekommt ein niedrigeres Maximum, die Form der Kurve bleibt jedoch gleich. Jede Bakterienspezies bildet ihre eigene Kurve (Zaharia et al., 2013). Dies ist auf ein unterschiedliches Wachstumsverhalten zurückzuführen. Anhand des kalorischen Fingerabdrucks lassen sich also verschiedene Bakterienspezies gut voneinander abgrenzen. Zu beachten ist allerdings, dass eine Änderung des kalorischen Fingerabdrucks bei unterschiedlichen Nährmedien erfolgt (Belaich & Belaich 1975). Es muss also beim Vergleich unterschiedlicher Messergebnisse genau auf die Versuchsbedingungen geachtet werden.

In jüngster Zeit ist die Mikrokalorimetrie als Methode zur beschleunigten Diagnostik der Kolonisation/Infektion von Körperflüssigkeiten und Fremdmaterialien (wieder)entdeckt worden. So veröffentlichte Braissant im Jahr 2010 einen Artikel über den Einsatz der Mikrokalorimetrie zum „Monitoring“ mikrobieller Aktivität (Braissant et al., 2010). In den folgenden Jahren beschäftigte sich diese Arbeitsgruppe ausgiebig mit dem Nutzen der Mikrokalorimetrie bei der Diagnostik und Resistenzbestimmung von Harnwegsinfekten (Braissant et al., 2014). Daneben wurden Arbeiten über die Verwendung der Mikrokalorimetrie zur Detektion kontaminierter Thrombozytenkonzentrate (Trampuz et al., 2007) und zur Meningitisdiagnostik im Liquor (Trampuz et al., 2007) sowie zur Diagnostik von Implantat-Infektionen (Trampuz et al., 2010) publiziert.

In Versuchen von Weiser (2011), die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegen, konnte schließlich gezeigt werden, dass die Mikrokalorimetrie eine rasche Detektion und Identifikation von Keimen auch auf artifiziell kolonisiertem Kathetermaterial erlaubt.

1.3 Fragestellung der Arbeit

In der hier vorgelegten Pilotstudie wird geprüft, ob der mikrokalorimetrische Keimnachweis auch auf Kathetern gelingt, die zur Therapie „echter Patienten“ genutzt wurden und – im Gegensatz zu den artifiziell kolonisierten Kathetern aus der methodischen Vorarbeit von Weiser (2011) – mit Blut- und Medikamentenrückständen kontaminiert sind.

Es soll der Frage nachgegangen werden, ob Blut- und Medikamentenrückstände oder auch Hautkeime, die beim Ziehen auf den Katheter gelangen können, in der mikrokalorimetrischen Untersuchung zu viele Artefakte bilden, um eine Katheter-assoziierte Sepsis diagnostizieren oder ausschließen zu können.

Des Weiteren soll geprüft werden, ob eine Vorbehandlung der Katheter zweckmäßig ist, um ein auswertbares mikrokalorisches Signal zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Verbrauchsmaterialien benötigt:

- Sterile Röhrchen zur Aufbewahrung der Katheterspitze aus Plastik
- Sterile 5ml und 10ml Einwegspritzen mit Milliliter-Skala (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Sterican Einmalkanülen (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland)
- Kunststoffeinsätze für die Deckel der Messampullen, um diese abzudichten (TA Instruments, Eschborn, Deutschland)

Es wurde ein Mikrokalorimeter der Firma LKB (Lund, Schweden) des Typs 2277 Thermal Activity Monitor (TAM) mit den dazugehörigen 4 ml-Messampullen aus Edelstahl, welche zum Teil nachträglich bei der Firma TA Instruments (Eschborn, Deutschland) bezogen wurden, verwendet.

Zur Herstellung der Medien und Lösungen wurde eine Waage (PC4400) der Firma Mettler-Toledo (Gießen, Deutschland) benutzt.

Es wurden verschiedene zentrale Venenkatheter aus der Kinder- und Erwachsenen-Intensivmedizin sowie Einschwemmkatheter und Nabelvenenkatheter aus der Neonatologie für die Messungen verwendet.

2.1.2 Chemikalien und Inkubationsmedien

Als Lagerungsmedium für die Katheterspitze nach Entfernung aus dem Patienten wurde eine Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS; pH 7,4) mit 8 g/l NaCl, 0,20 g/l KCl, 1,44 g/l Na₂HPO₄ und 0,24 g/l KH₂PO₄ verwendet. Die Bestandteile wurden in 800 ml vollentsalztem Wasser gelöst, der pH-Wert mit HCl auf 7,4 eingestellt, mit H₂O auf 1 Liter aufgefüllt und zwanzig Minuten durch Autoklavieren sterilisiert.

Als Nährlösung im Kalorimeter wurde BBL(TM) Trypticase(TM) Soy Broth (TSB; pH 7,2±0,2) des Herstellers Becton, Dickinson & Co. (Franklin Lakes, NJ, USA) verwendet. 30 g TSB-Pulver wurden mit einem Liter vollentsalztem Wasser angesetzt und durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert.

Zum Reinigen der Messampullen des Mikrokalorimeters wurde Ethanol 70% (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwandt.

2.2 Methoden

2.2.1 Entfernung und Präparation der Katheter

Die Indikation zum Entfernen des Katheters aus dem Patienten wurde von dem behandelnden Arzt gestellt. In den meisten Fällen wurde der Katheter nicht mehr gebraucht oder ausgetauscht, um lange Liegezeiten zu vermeiden, manchmal bestand der Verdacht auf eine Katheter-assoziierten Infektion.

Die Entfernung des Katheters erfolgte mit Hilfe einer sterilen Pinzette, eines sterilen Fadenmessers, einer sterilen Schere und eines Desinfektionsmittels zum Desinfizieren der Haut. Außerdem standen zwei sterile Aufbewahrungsgefäße bereit, und sterile Kompressen sowie Pflaster lagen griffbereit. Zum Eigenschutz beim Umgang mit Körperflüssigkeiten wird generell das Tragen von Einmalhandschuhen empfohlen.

Vor dem Ziehen des Katheters wurden alle Infusionsleitungen diskonnektiert und der Katheter mit geeigneten Stopfen verschlossen. Als nächstes wurde vorsichtig das Verbandsmaterial entfernt, dann die Einstichstelle des Katheters mit Desinfektionsmittel gereinigt. Zum Ziehen der Befestigungsfäden griff man diese mit der sterilen Pinzette und trennte sie mit dem Fadenmesser durch.

Der Katheter wurde anschließend zügig gezogen. Dabei wurde darauf geachtet, dass die vorderen zwei Zentimeter des Katheters nicht berührt wurden. Sofort nach dem Ziehen wurde eine sterile Kompresse auf die verbleibende Wunde des Patienten gedrückt und mit einem Pflasterstreifen befestigt.

Von der Katheterspitze wurden zwei je ein Zentimeter große Stücke, ohne diese zu berühren, mit der sterilen Schere abgeschnitten und in die bereitstehenden sterilen Gefäße gegeben.

Eines dieser Gefäße war für den Goldstandard, die mikrobiologische Untersuchung, vorgesehen, während das andere mit zwei bis fünf Millilitern der Phosphat-gepufferten Salzlösung aufgefüllt und in einem Kühlschrank bei 4-8°C für maximal 24 Stunden aufbewahrt wurde.

2.2.2 Funktionsweise der isothermen Wärmeflusskalorimetrie

Bei dem hier verwendeten 2277 Thermal Activity Monitor (**Abb. 1**) handelt es sich um ein isothermes Wärmeflusskalorimeter. Durch die vier voneinander unabhängigen Messzylinder sind bis zu vier parallele Messungen durchführbar.



Abb. 1 Das isotherme Wärmeflusskalorimeter 2277 Thermal Activity Monitor (TAM).
(Quelle: LKB 2277 Bio Activity Monitor Instruction Manual)

Eine luft- und wasserdicht verschlossene Messampulle, welche das zu untersuchende Material beinhaltet, wird zu Beginn der Messung in eine thermische Äquilibrierungsposition gebracht, um sich der Umgebungstemperatur (bei den vorliegenden Messungen 37°C) anzupassen. Nach erfolgreicher Äquilibrierung wird sie in die Messposition des Messzylinders abgesenkt. Im gleichen Messzylinder neben der Messampulle befindet sich eine Referenzampulle, welche mit steriler Nährlösung (ohne Probe) bzw. mit Aqua dest. gefüllt ist (**Abb. 2**). Der Vergleich des Wärmeflusses der Messampulle mit dem Wärmefluss der Referenzampulle sorgt dafür, dass Messfehler durch äußere Einflüsse kompensiert werden. Ein nach außen isoliertes Wasserbad von 25 Litern umgibt den Messzylinder; die Temperaturstabilität des Wasserbades wird vom Hersteller mit $\pm 0,0002^{\circ}\text{C}$ angegeben.

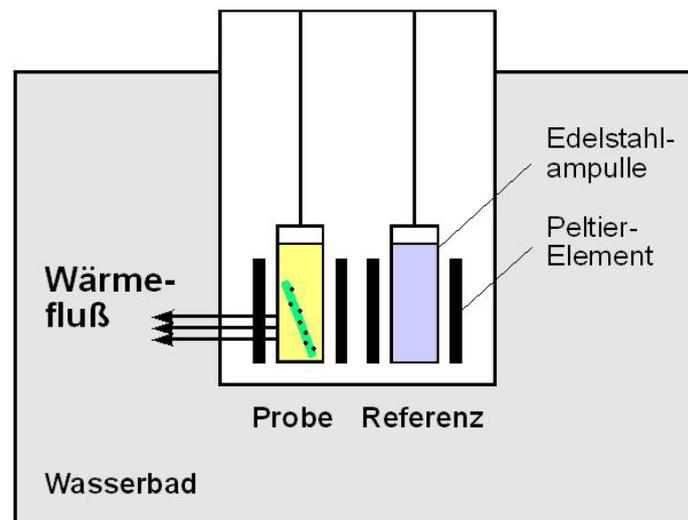


Abb. 2 Funktionsprinzip des Mikrokalorimeters
 (Quelle: Mikrokalorimetrische Detektion von Katheterinfektionen in der neonatologisch-pädiatrischen Intensivmedizin, 2011 [Julian O. Weiser])

Die bei der Messung entstehende Wärme in der Messampulle fließt nach außen in das Wasserbad ab (Wärmeflusskalorimeter). Da das Wasserbad eine deutlich größeres Volumen und somit eine höhere Wärmekapazität hat, erfolgt ein nahezu unmittelbarer Wärmeabfluss von der Messampulle (Wärmequelle) in das Wasserbad (Wärmesenke) möglich; da sich die Probe dadurch praktisch nicht erwärmt, wird das System als isotherm bezeichnet. Es bildet sich lediglich ein minimaler Temperaturgradient zwischen Messampulle und Wasserbad aus, der von einem zwischengeschalteten Peltier-Element erfasst wird. Ein Peltier-Element besteht aus zwei Halbleitern und kann eine Temperaturdifferenz in Spannung konvertieren. Diese Spannung ist proportional zum Wärmefluss und wird vom an das Mikrokalorimeter angeschlossenen Computer erfasst und aufgezeichnet (Weiser, 2011).

2.2.3 Durchführung der mikrokalorimetrischen Messungen

Zur Kalibrierung des Mikrokalorimeters wurde eine Ampulle mit sterilem Inkubationsmedium gefüllt und in die Messkammer abgesenkt. Eine stabile Baseline wurde abgewartet, der Eichstrom eingeschaltet, und bei stabilem Wärmeflussignal wurde der Messbereich auf 1000 μW geeicht. Die Eichung erfolgte über einen am Boden des Messzylinders eingebauten elektrischen Widerstand.

Zur Vorbereitung der Messung im Mikrokalorimeter wurden Einmalhandschuhe getragen, weil Fett- oder Schweißrückstände auf den Messampullen das Ergebnis verfälschen können.

Der Katheter wurde mit einer Pinzette aus dem Lagerungsmedium (PBS) genommen und in eine Messampulle gegeben. Diese wurde mit Hilfe einer Einwegspritze mit 4 ml Nährmedium (TSB) aufgefüllt. Der Deckel der Messampulle wurde mit einem Kunststoffeinsatz zum Abdichten versehen. Dabei war zu beachten, dass sich keine Lufteinschlüsse zwischen Kunststoffeinsatz und Deckel befanden, auch das kann die Messung stören.

Bevor die Ampulle verschlossen wurde, wurde das Gewinde sorgfältig mit einem in Ethanol getränkten Tuch abgewischt. Der Deckel wurde fest verschlossen. Dabei wurde die Ampulle jederzeit gerade gehalten. Nun wurde die gesamte Ampulle wiederholt von außen mit einem in Ethanol getränkten Tuch abgewischt.

Anschließend wurde die Ampulle ins Mikrokalorimeter eingeführt und für zwanzig Minuten in der thermischen Äquilibrierungsposition auf 37°C erwärmt.

Diese Zeit konnte genutzt werden, um die zugehörige Software auf dem mit dem Mikrokalorimeter verbundenen Computer zu starten.

Nach zwanzig Minuten erfolgte das langsame und vorsichtige Absenken der Messampulle; wurde dabei zu viel Reibung und damit auch Wärme erzeugt, konnte die Messung erheblich gestört werden.

Nun konnte die Messung am Computer gestartet werden.

Bei der mikrokolorimetrischen Messung der „Bakteriensuspension“ ging man genauso vor; wie bei der Messung des Katheters, nur wurde an Stelle des Katheters 1 ml des Lagerungsmediums in die Messampulle gegeben und diese mit 3 ml Nährmedium aufgefüllt.

Nach der Messung wurden die Messampullen gründlich gereinigt, um Störungen der nachfolgenden Messungen vorzubeugen. Dazu wurde der Inhalt der Ampulle in den Abfall gegeben. Danach wurde es erst mit Leitungswasser und dann mit Ethanol

ausgespült. Der Deckel und das Gewinde wurden mit einem Papiertuch und Ethanol poliert. Nach dem Trocknen wurden die Ampullen bei 121°C autoklaviert.

2.2.4 Auswertung der Daten

Die Messdaten wurden mit Hilfe der zum Mikrokalorimeter zugehörigen Software (Digitam, Version 1.0) online registriert. Es wurden zwei Graphen, zum einen der Wärmefluss in μWatt und zum anderen die freigesetzte Wärmemenge (in mJoule) über die Zeit (in Minuten) aufgezeichnet, wobei zur Auswertung die Wärmeflussdaten verwendet wurden. Nach der Messung standen die Messergebnisse als Excel-Datei zur Verfügung.

2.3 Ethikvotum

Die mikrokalorimetrische Studie an gezogenem Kathetermaterial wurde seitens der Ethik-Kommission der Ärztekammer Hamburg als unbedenklich eingestuft (WF-052/11).

3 Ergebnisse

3.1 Beispielgraphen für positive und negative Messungen

Die beiden Graphen in **Abb. 3** und **Abb. 4** verdeutlichen den Unterschied zwischen einem bakteriell besiedelten Katheter, also einer positiven Messung, und einem nicht besiedelten Katheter, also einer negativen Messung, im Mikrokalorimeter. **Abb. 3** entspricht der Messung Nummer 8 aus **Tab. 1**; es lag eine Besiedelung mit *Staphylococcus aureus* vor. **Abb. 4** entspricht der Messung Nummer 17, dieser Katheter war nicht bakteriell besiedelt.

Beide Graphen stellen den Wärmefluss (in μWatt) über die Zeit (in Minuten) dar. Die Messdauer wurde auf 600 Minuten festgelegt. Zu beachten ist, dass bei der negativen Messung in **Abb. 4** der Maßstab auf der Ordinate bis 50 μWatt geht, bei der positiven Messung in **Abb. 3** der Ordinaten-Maßstab hingegen bis 500 μWatt reicht. Die negative Messung (**Abb. 4**) zeigt sowohl bei der Messung des Katheters im Nährmedium als auch bei der Messung der Mischung aus Lagerungs- und Nährmedium einen leichten Wärmefluss bis 20 μWatt , welcher aber in den ersten zwanzig Minuten rasch abfällt. Der rasch abfallende positive Wärmefluss zu Beginn der Messung reflektiert die Reibungswärme beim Absenken der Edstahlampulle in die Messkammer. Nach zwanzig Minuten ergibt sich eine mehr oder weniger stabile Baseline mit einem Wärmefluss von maximal 5 μWatt . Die positive Messung (**Abb. 3**) zeigt zu Beginn der Messung des Katheters im Nährmedium bzw. der Bakteriensuspension aus Lagerungs- und Nährmedium ebenfalls einen leichten Wärmefluss, welcher schnell abfällt. Danach fallen auch diese beiden Kurven auf eine zunächst mehr oder weniger stabile Baseline ab. Nur steigt die Kurve des Katheters bei Minute 150 der Messung wieder ganz leicht an. Die Bakteriensuspension zeigt ab Minute 250 einen leichten Anstieg des Wärmeflusses. Ab Minute 250 steigt die Kurve des Katheters deutlich an, die der Bakteriensuspension zieht bei Minute 300 nach. Bei Minute 400 fallen sowohl die Kurve des Katheters (leicht) als auch die Kurve der Bakteriensuspension aus Nährmedium und Inkubationsmedium (stark) ab, um dann wieder sehr steil anzusteigen. Die Kurve des Katheters steigt bis auf einen maximalen Wärmefluss von ca. 470 μWatt und fällt gegen Ende der Messung leicht ab. Die Kurve der Bakteriensuspension hat am Ende des Messintervalls ihren Maximalwert bei 350 μWatt .

In der direkten Gegenüberstellung ist ein deutlicher Unterschied zwischen einem besiedelten und einem nicht besiedelten Katheter in der mikrokalorimetrischen Messung zu erkennen.

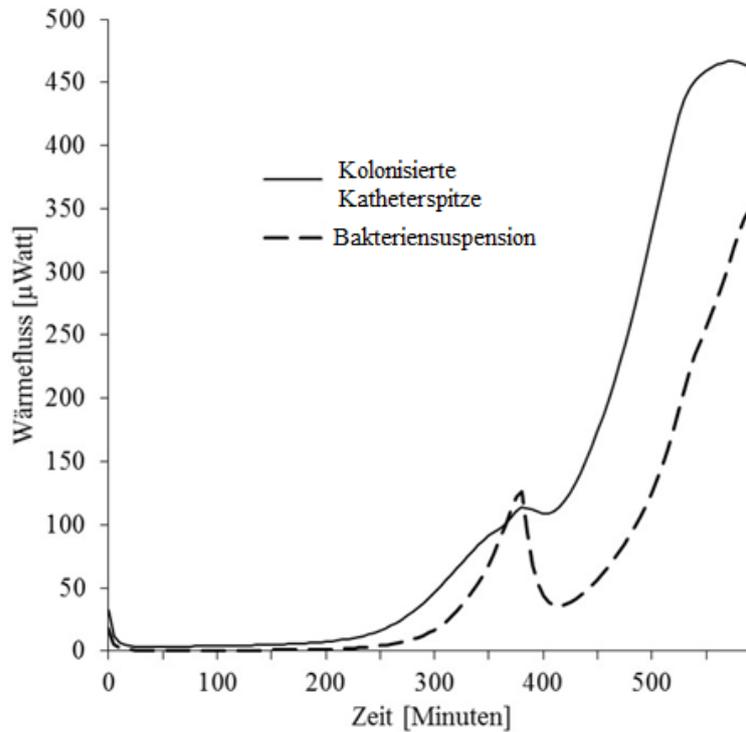


Abb. 3 Beispielgraph für eine positive Messung

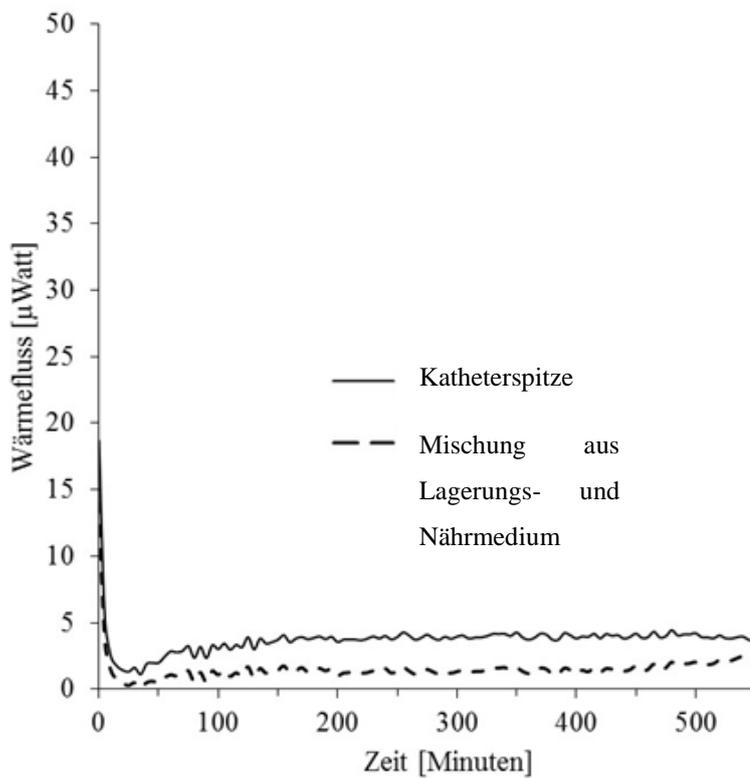


Abb. 4 Beispielgraph für eine negative Messung

3.2 Aufstellung der positiven und negativen Messungen

Die Messergebnisse sind in **Tab. 1** zusammengefasst. Ist das Ergebnis negativ, heißt das, dass es mit der angewandten Messmethode keinen Hinweis auf eine Besiedelung des Katheters gab. Ein positives Messergebnis ergab einen Hinweis auf eine Katheterbesiedelung. Die Identifikation der Bakterienspezies erfolgte anhand der mikrobiologischen Diagnostik. Die Messungen 1 bis 21 sind Katheter von pädiatrischen Patienten, die Messungen 22 bis 35 stammen von erwachsenen Patienten.

Messung	Ergebnis Mikrobiologie	Ergebnis Mikrokalorimetrie	Bakterienspezies
1	negativ	negativ	keine
2	negativ	negativ	keine
3	negativ	negativ	keine
4	negativ	negativ	keine
5	negativ	negativ	keine
6	negativ	negativ	keine
7	negativ	negativ	keine
8	positiv	positiv	Staphylococcus aureus
9	negativ	negativ	keine
10	negativ	negativ	keine
11	negativ	negativ	keine
12	negativ	negativ	keine

13	negativ	negativ	keine
14	negativ	negativ	keine
15	negativ	negativ	keine
16	negativ	negativ	keine
17	negativ	negativ	keine
18	negativ	negativ	keine
19	negativ	negativ	keine
20	negativ	negativ	keine
21	positiv	positiv	Staphylococcus epidermidis und Staphylococcus haemolyticus
22	negativ	negativ	keine
23	positiv	negativ	Staphylococcus epidermidis
24	negativ	negativ	keine
25	negativ	negativ	keine
26	positiv	negativ	Staphylococcus epidermidis
27	negativ	negativ	keine
28	positiv	negativ	Staphylococcus epidermidis
29	positiv	negativ	Staphylococcus epidermidis
30	negativ	negativ	keine
31	positiv	positiv	Enterobacter aerogenes, Enterococcus faecium, Staphylococcus epidermidis und

			Candida glabrata
32	negativ	negativ	keine
33	negativ	negativ	keine
34	negativ	negativ	keine
35	positiv	positiv	Acinetobacter baumannii

Tab. 1 Aufstellung der Messergebnisse

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

Einige Schwächen im Versuchsaufbau sind bei der Auswertung der Messungen zu beachten:

- In dieser Messreihe gibt es nur 35 Messungen. Um eine genaue Aussage zur Sensitivität und Spezifität geben zu können, sind weitere Versuchsreihen nötig. Für eine höhere Signifikanz werden insbesondere noch mehr Messungen mit bakteriell besiedelten Kathetern benötigt. Vier positive Messergebnisse im Mikrokalorimeter sind nicht repräsentativ genug.
- Außerdem ist die Auswahl der Proben willkürlich. Es wurden Stichproben von zur mikrobiologischen Untersuchung geschickten Kathetern genommen. Nach dem Ziehen werden nicht alle Katheter mikrobiologisch untersucht. Die Entscheidung, ob eine mikrobiologische Untersuchung notwendig ist, liegt beim behandelnden Arzt.
- Nach dem Ziehen des Katheters gab es einen großen Unterschied zwischen der Behandlung des mikrobiologischen und des mikrokalorimetrischen Abschnitts der Katheterspitze. Der Teil, der in der Mikrobiologie untersucht wurde, wurde sofort dorthin gesendet und bearbeitet. Der andere Teil der Katheterspitze wurde für maximal 24 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt, bis es möglich war, diesen zu bearbeiten.
- Es wurde willkürlich entschieden, welcher Teil des Katheters in der Mikrobiologie und welcher in der Mikrokalorimetrie untersucht wurde. Es wäre denkbar, dass sich die Besiedelung an der Katheterspitze und einen Zentimeter hinter der Spitze unterscheidet.
- Die Phosphat-gepufferte Salzlösung wurde als Lagerungsmedium gewählt, weil sie isoton ist und einen physiologischen pH-Wert hat und somit den Bakterien ein dem menschlichen Körper möglichst ähnliches Umfeld zur Verfügung stellen soll. Allerdings wird das physiologische Umfeld durch die (aus logistischen Gründen dazwischengeschaltete) Lagerung bei 4-8°C (um die Vermehrung der Bakterienstämme zu bremsen) gestört, wobei sich vor allem der bei ca. 20°C eingestellte pH-Wert verschiebt.

- TSB wurde als Nährmedium genutzt, weil es für sehr viele Mikroorganismen akzeptable Wachstumsbedingungen herstellt. Es ist jedoch zu beachten, dass ein anderes Nährmedium wahrscheinlich andere Wärmeflusskurven produzieren würde (Weiser, 2011). Es ist also wichtig, bei Vergleichen mit anderen Messungen auf eine Übereinstimmung der Nährmedien zu achten.
- Es wäre prinzipiell denkbar, dass Verunreinigungen des „mikrokalorimetrischen“ Katheterabschnitts nach dem Ziehen, des Lagerungs- und des Nährmediums die Besiedelung nachträglich beeinflusst haben.
- Um einen Unterschied zwischen der Besiedelung der beiden Katheterspitzenanteile herauszufinden, hätte man nach der mikrokalorimetrischen Messung einen Drei-Ösen-Ausstrich auf einer Blutagarplatte anfertigen und diesen inkubieren können.
- Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den beiden Untersuchungsmethoden besteht auch darin, dass es sich beim Messverfahren im Mikrokalorimeter um ein geschlossenes System in einer Edstahllampulle handelt. Es werden von außen nach Beginn der Messung weder Sauerstoff noch Nährstoffe hinzugefügt, wogegen die mikrobiologische Bebrütung mittels Schüttelkultur ein schnelles Bakterienwachstum begünstigt (Weiser, 2011).
- Am Anfang der mikrokalorimetrischen Messungen sind häufig Störungen durch die Reibungswärme beim Absenken der Messampulle oder durch Verdunstungsartefakte aufgetreten, weshalb die erste Viertelstunde einer Messung häufig nicht auswertbar ist.
- Darüber hinaus ist die Messdauer von zehn Stunden (600 Minuten) im Mikrokalorimeter willkürlich gewählt. Die Zeit wurde festgelegt, um eine deutlich kürzere Messdauer als die Mikrobiologie zu beanspruchen und trotzdem eine aussagekräftige Wärmeflusskurve zu erhalten. Es wäre jedoch vorstellbar, die Messdauer versuchsweise zu verlängern, um damit die Ansprechwahrscheinlichkeit zu erhöhen, oder sie zu verkürzen, um ein noch schnelleres Messergebnis zu erzielen.

4.2 Auswertung der Messergebnisse

4.2.1 Sensitivität und Spezifität

Anhand der Vierfeldertafel (**Abb. 5**) lassen sich Sensitivität und Spezifität ausrechnen:

Die Sensitivität gibt an, bei wieviel Prozent der tatsächlich (mikrobiologisch) besiedelten Katheter eine Besiedelung zutreffend erkannt wird (richtig positive mikrokalorimetrische Messungen). Es ergibt sich in dieser Versuchsreihe eine Sensitivität von:

$$\frac{\text{Anzahl der richtig positiven Messungen}}{\text{Anzahl der tatsächlich besiedelten Katheter}} = \frac{4}{8} = 0,5 = 50\%$$

Die Spezifität gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein tatsächlich (mikrobiologisch) nicht besiedelter Katheter zutreffend als nicht besiedelt erkannt wird (richtig negative mikrokalorimetrische Messungen). Es ergibt sich in dieser Versuchsreihe eine Spezifität von:

$$\frac{\text{Anzahl der richtig negativen Messungen}}{\text{Anzahl der tatsächlich nicht besiedelter Katheter}} = \frac{27}{27} = 1,0 = 100\%$$

Der positive prädiktive Wert sagt aus, wie groß der Anteil der richtig positiven Messungen, also zutreffend als besiedelt erkannten Kathetern, an allen (richtig und falsch) positiven Messergebnissen ist. Sie beträgt in dieser Versuchsreihe:

$$\frac{\text{Anzahl der richtig positiven Messungen}}{\text{Anzahl der richtig und falsch positiven Messungen}} = \frac{4}{4} = 1,0 = 100\%$$

Der negative prädiktive Wert gibt schließlich den Anteil der richtig negativen Messungen, also zutreffend als nicht besiedelt erkannten Kathetern, an der Gesamtzahl der (richtig und falsch) negativen Messungen an. Er beträgt im vorliegenden Fall:

$$\frac{\text{Anzahl der richtig negativen Messungen}}{\text{Anzahl der richtig und falsch negativen Messungen}} = \frac{27}{31} = 0,871 \approx 87\%$$

Wie im Kapitel Methodenkritik schon beschrieben, ist die Anzahl der untersuchten Katheter nicht groß genug, um eine statistisch signifikante Aussage zur Sensitivität und

zur Spezifität dieses Verfahrens machen zu können. Die Zahlen geben deshalb nur eine Tendenz an, die im Folgenden genauer diskutiert werden soll.

Mikrokalorimetrie

		Positiv	Negativ	
Mikrobiologie	Positiv	4	4	8
	Negativ	0	27	27
		4	31	

Abb. 5 Zusammenfassung der Messergebnisse in einer Vierfeldertafel

4.2.2 Mikrobiologisch negative und mikrokalorimetrisch positive („falsch positive“) Befunde

Besonders bemerkenswert ist, dass bei keinem mikrobiologisch sterilen Katheter in der mikrokalorimetrischen Messung ein Wärmeflussignal gemessen werden konnte. Es gab also keine „falsch positiven“ Befunde, wie sie aufgrund der Blut- und Medikamentenrückstände hätten erwartet werden können.

4.2.3 Mikrobiologisch und mikrokalorimetrisch negative („richtig negative“) Befunde

Umgekehrt ergaben die 27 Katheter, die in der Mikrobiologie nicht besiedelt waren, auch in der Mikrokalorimetrie eine Baseline, die zwischen ca. -5 und 7 μ Watt schwankte, ohne einen relevanten Anstieg des Wärmeflusses zu zeigen (**Abb. 6** und **Abb. 7**). Auch hier erkennt man zu Beginn der Messungen meist einen positiven Wärmefluss, bedingt durch die Reibungswärme beim Einführen der Edelstahlampullen in die Messkammern, gelegentlich auch einen negativen Wärmefluss, bedingt durch minimale Verdunstungsartefakte oder eine noch nicht restlos abgeschlossene thermische Äquilibration. Das zu beobachtende „Rauschen im Mikrowattbereich“ ist in etwas wechselnder Ausprägung typisch für die „high resolution microcalorimetry“ und hat nichts mit einer „echten“ Wärmeproduktion der Proben zu tun. Ein wesentlicher Anstieg der Wärmeflusskurve ist davon deutlich zu unterscheiden, da diese Anstiege in allen Fällen über 100 μ Watt hinausgehen und somit von Schwankungen mit einer maximalen Amplitude von 10 μ Watt abgrenzbar sind.

Wie bereits betont, ist das Auftreten der Baseline erstaunlich, weil die Katheter von „echten Patienten“ stammten und somit mit Blut- und Medikamentenrückständen kontaminiert waren. Sogar bei Patienten, die klinisch an einer Infektion litten, welche aber einen anderen Fokus hatte, zeigten die Katheter keinen Anstieg des Wärmeflusses.

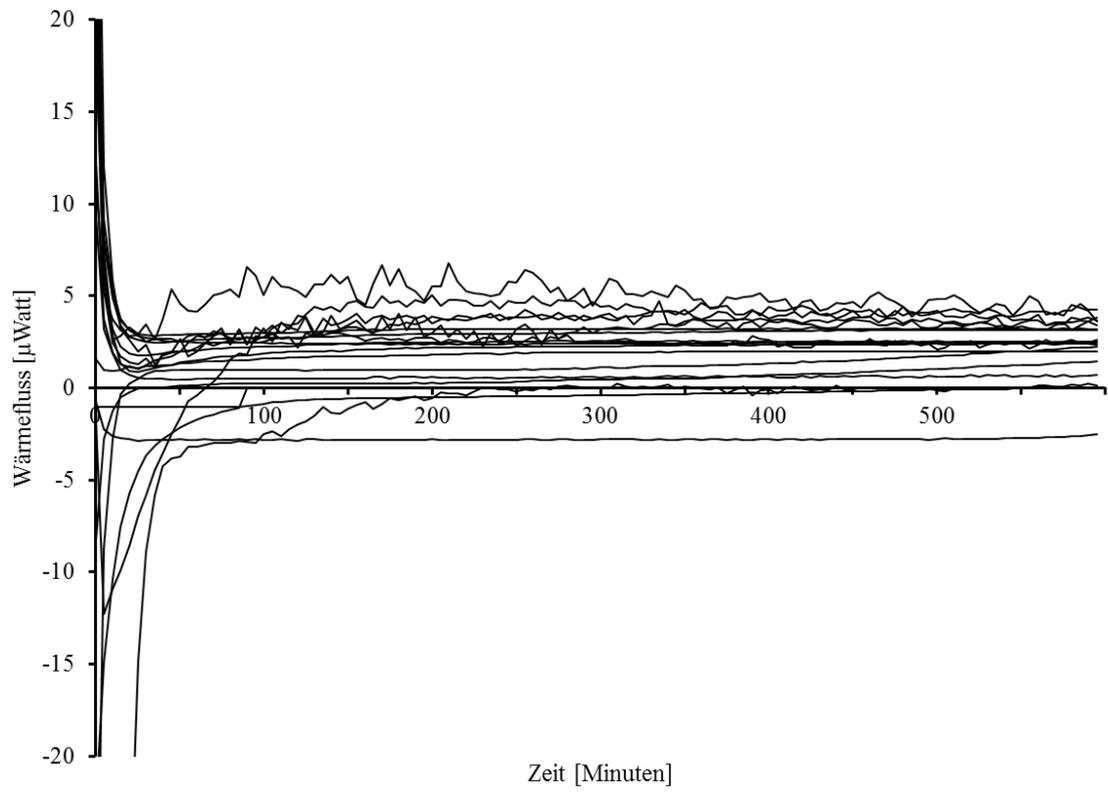


Abb. 6 Die Baseline der 19 nicht besiedelten Katheter aus der pädiatrischen Intensivmedizin

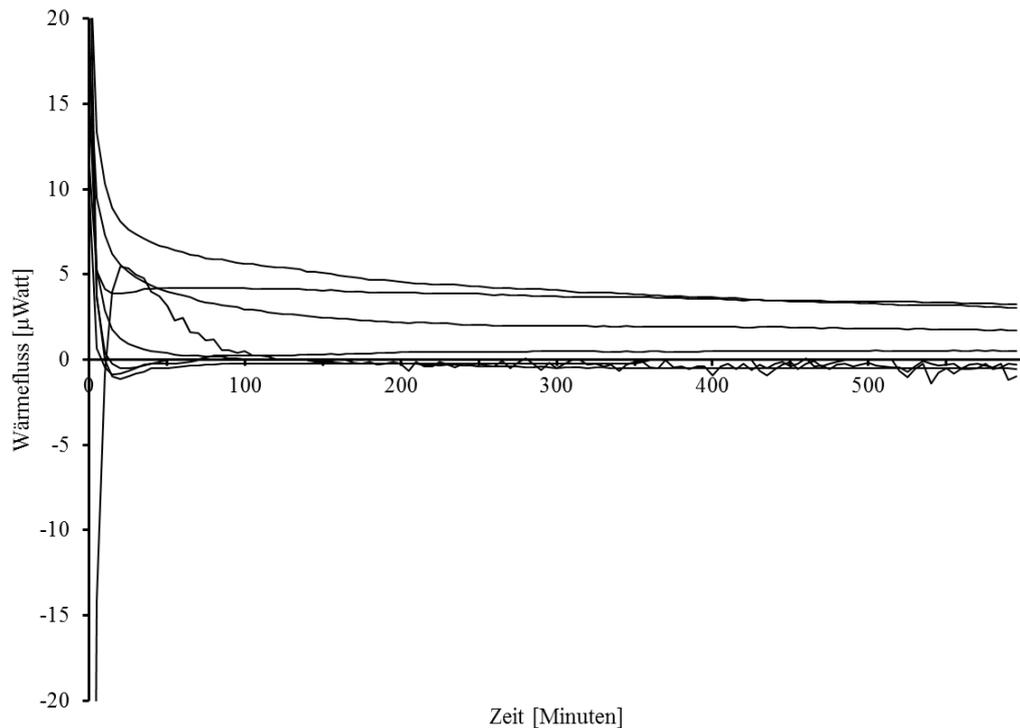


Abb. 7 Die Baseline der 8 nicht besiedelten Katheter aus der Intensivmedizin für Erwachsene

4.2.4 Mikrobiologisch und mikrokalorimetrisch positive („richtig positive“) Befunde

In der Versuchsreihe zeigten vier Katheter in der Mikrokalorimetrie einen signifikanten Wärmefluss. In der mikrobiologischen Untersuchung wurde bei allen diesen Kathetern der Verdacht auf eine bakterielle Besiedelung bestätigt und eine Bestimmung des Erregers durchgeführt.

Der Katheter aus Messung 8 (**Abb. 3**) war ein Katheter aus der pädiatrischen Intensivmedizin. Es zeigt sich nach ca. 200 Minuten ein deutlicher Anstieg des Wärmeflusses. Besonders bemerkenswert ist bei dieser Messung die Wärmeflusskurve der Bakteriensuspension. Sie entspricht genau derjenigen Wärmeflusskurve, die in der Arbeit von Weiser, 2011 für *Staphylococcus aureus* im Nährmedium TSB ermittelt wurde (**Abb. 8**). Im Einzelnen kommt es zunächst zu einem Anstieg bis ca. 140 µWatt, danach folgt ein Abfall auf unter 50µWatt, bevor der Wärmefluss erneut steil ansteigt. Tatsächlich konnte in der mikrobiologischen Untersuchung *Staphylococcus aureus* als verantwortlicher Erreger identifiziert werden. Somit konnte gezeigt werden, dass der „kalorische Fingerabdruck“, das heißt die replizierbare Wärmeflusskurve eines

Erregers in einem bestimmten Nährmedium, auch bei ex vivo gewonnenen Kathetern nachvollzogen werden kann.

Allerdings erfolgt der Anstieg des Wärmeflusses in Messung 8 deutlich langsamer als in dem experimentellen Setting, sodass nach 10 Stunden erst der Gipfel der Wärmeflusses erreicht ist, während diese bei den artifiziell besiedelten Kathetern nach der gleichen Zeit bereits wieder abgefallen war. Die „Verlangsamung“ der Wärmeflusskurve kann entweder durch die zwischenzeitliche Lagerung im Kühlschrank und eine damit verbundene Regenerationszeit der Kolonien bis zum Wachstum oder durch eine geringere Keimzahl als auf Weisers artifiziell besiedelten Kathetern bedingt sein. Im Gegensatz zu der Bakteriensuspension kommt der artspezifische „kalorische Fingerabdruck“ auf dem Kathetermaterial selbst weniger markant zur Darstellung.

S. aureus

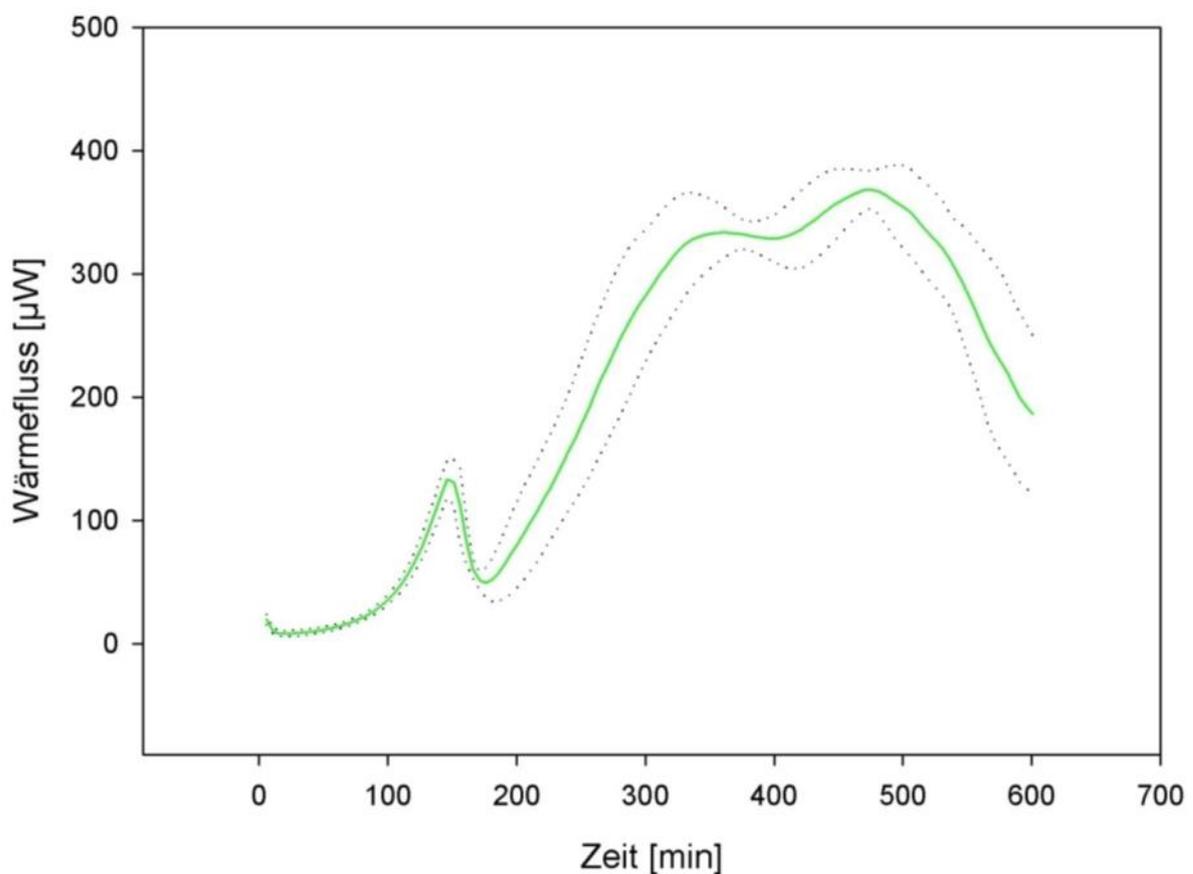


Abb. 8 „Kalorischer Fingerabdruck“ von *Staphylococcus aureus* [Weiser 2011]

In Messung 35, bezogen auf einen Katheter aus der Erwachsenenintensivmedizin, konnte ein bemerkenswert hoher Wärmefluss in der Bakteriensuspension aus Lager- und Nährmedium nachgewiesen werden, bei einem nur mäßigen Wärmefluss des eigentlichen Katheters (**Abb. 9**). Laut mikrobiologischer Untersuchung war der Katheter mit *Acinetobacter baumannii* besiedelt.

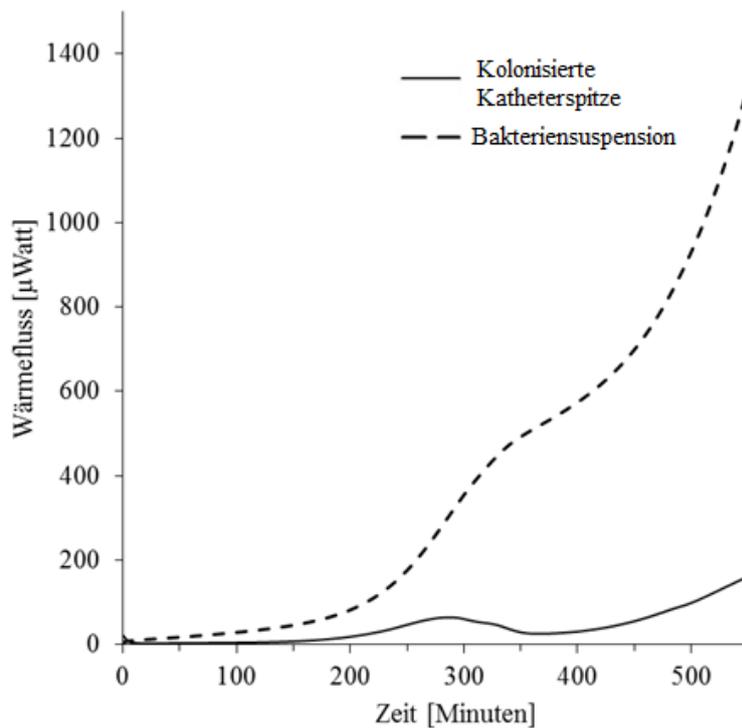


Abb. 9 Messung 35: Katheter aus der Erwachsenenintensivmedizin mit einer Besiedelung von *Acinetobacter baumannii*

Die Grenzen der Erregerdiagnostik durch die Mikrokalorimetrie zeigen Messung 21 (**Abb. 10**) und Messung 31 (**Abb. 11**). In beiden Fällen handelt es sich um Mischinfektionen. Die Diagnose einer Katheterbesiedelung ist in beiden Fällen anhand eines signifikanten Wärmeflusses sehr eindeutig zu stellen. Jedoch ergeben sich offensichtlich „Überlagerungseffekte“, die die Zuordnung zu einem bestimmten „kalorischen Fingerabdruck“ erschweren. In Messung 31 (**Abb.11**), wo ein exorbitanter Anstieg des Wärmeflusses zu verzeichnen war, zeigte sich dieser wiederum – wie schon in Messung 35 (**Abb. 9**) hauptsächlich in der Bakteriensuspension. Auch diese Messung deutet somit darauf hin, dass die Inkubation des Lagerungsmediums in Nährmedium, im Vergleich zur Katheterspitze selbst, zu einem höheren Wärmefluss führt -

möglicherweise durch eine höhere Wärmeproduktion von Bakteriensuspensionen gegenüber Biofilmen.

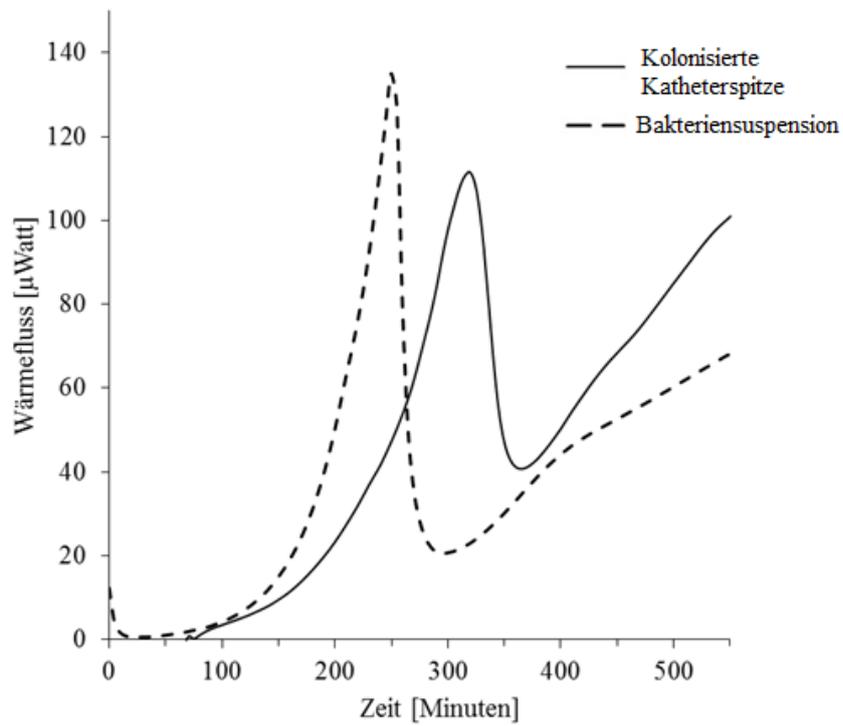


Abb. 10 Messung 21: Pädiatrischer Katheter mit einer Mischinfektion von *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus haemolyticus*

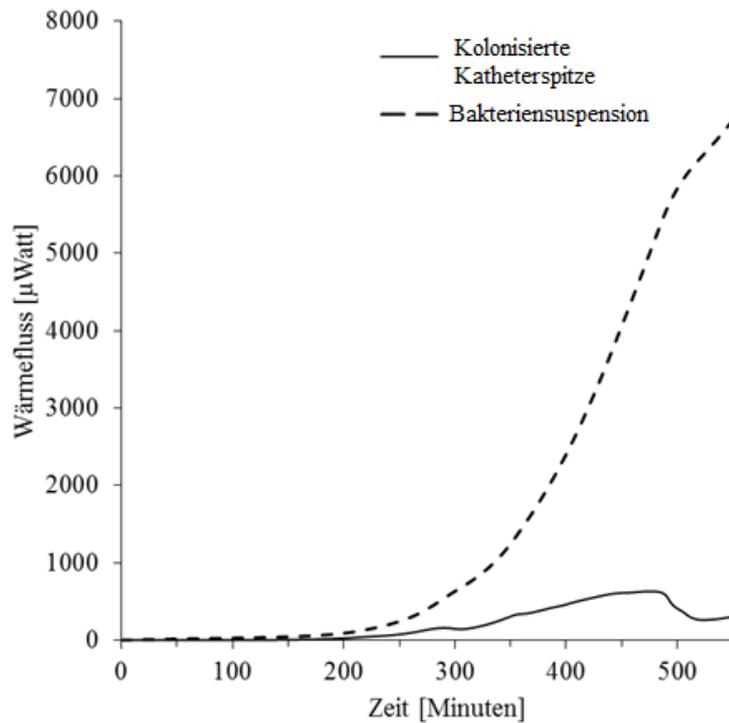


Abb. 11 Messung 31: Katheter aus der Erwachsenenmedizin mit einer Mischinfektion von *Enterobacter aerogenes*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus epidermidis* und *Candida glabrata*; man beachte den extrem hohen Wärmefluss der Bakteriensuspension.

4.2.5 Mikrobiologisch positive und mikrokalorimetrisch negative („falsch negative“) Befunde

In dieser Messreihe gibt es vier Katheter (aus der Erwachsenen-Intensivmedizin), die in der Mikrobiologie eine Besiedelung mit *Staphylococcus epidermidis* zeigten, in der Mikrokalorimetrie jedoch keinen Anstieg des Wärmeflusses erkennen ließen.

Bei genauerem Hinsehen fallen allerdings einige Details auf:

- Alle vier Katheter waren auch in der Mikrobiologie erst nach 48 Stunden positiv. Ein negatives Bebrütungsergebnis nach 24 Stunden und eine Besiedelung nach 48 Stunden spricht für eine sehr geringe Keimzahl. Es ist somit davon auszugehen, dass bei einer längeren Messdauer im Mikrokalorimeter wahrscheinlich ebenfalls ein Anstieg des Wärmeflusses zu verzeichnen gewesen wäre.
- Die Patienten hatten alle keine positive Blutkultur und keine Infektionszeichen. Alle vier Katheter wurden nicht aus Infektionsgründen entfernt. Bei einer negativen Blutkultur und fehlenden Infektionszeichen liegt definitionsgemäß keine Katheter-assoziierte Sepsis vor. Allenfalls handelt es sich um eine Besiedelung des Katheters.
- Bei *Staphylococcus epidermidis* handelt es sich um einen „residenten Hautkeim“, der wegen seiner Eigenschaft, Filme zu bilden, häufig zu nosokomialen Infektionen an Kathetern, Endoprothesen oder Herzklappen (Holtmann & Bobkowski, 2008) führt. Eine Besiedelung des Katheters durch *Staphylococcus epidermidis* ist deshalb zwar nicht unwahrscheinlich, kann aber dadurch, dass es sich um einen „residenten Hautkeim“ handelt, durch eine Kontamination beim Ziehen des Katheters zustande gekommen sein.

Unter Berücksichtigung dieser Details schneidet die Mikrokalorimetrie hier möglicherweise besser ab, als es zunächst scheint. Wenn ein Patient eine manifeste Katheter-assoziierte Sepsis hat, ist nach allen vorliegenden Messergebnissen davon auszugehen, dass ein Anstieg des Wärmeflusses im Mikrokalorimeter zu beobachten ist.

4.3 Vergleich mit Literaturdaten anderer Arbeitsgruppen

Verschiedene Arbeitsgruppen befassen sich mit der Forschung und Anwendung der Mikrokalorimetrie zur Detektion mikrobiologischen Wachstums. Während eine Arbeitsgruppe sich vorrangig mit der Diagnostik von Harnwegsinfekten und der Resistenztestung der Erreger, aber auch mit dem Wachstum von Mykobakterien und mit der Biofilmbildung auf Zahnimplantaten beschäftigt, forscht eine andere an ganz unterschiedlichen Projekten, wie zum Beispiel der Diagnostik von verschiedenen Pilzarten, der Infektionsdiagnostik von Blutprodukten oder orthopädischen/unfallchirurgischen Implantaten.

Insgesamt bestätigt diese Versuchsreihe die bisherige Datenlage aus der Literatur, auch wenn ein Vergleich nur eingeschränkt möglich ist, weil eine mikrokalorimetrische Untersuchung Katheter-assoziiierter Infektionen bisher noch nicht durchgeführt wurde. Trotzdem gibt es einige Parallelen zwischen dieser und den bisher durchgeführten Versuchsreihen, welche am anschaulichsten anhand der folgenden Grafik (**Abb. 12**) aus dem Jahr 2012 verdeutlicht wird:

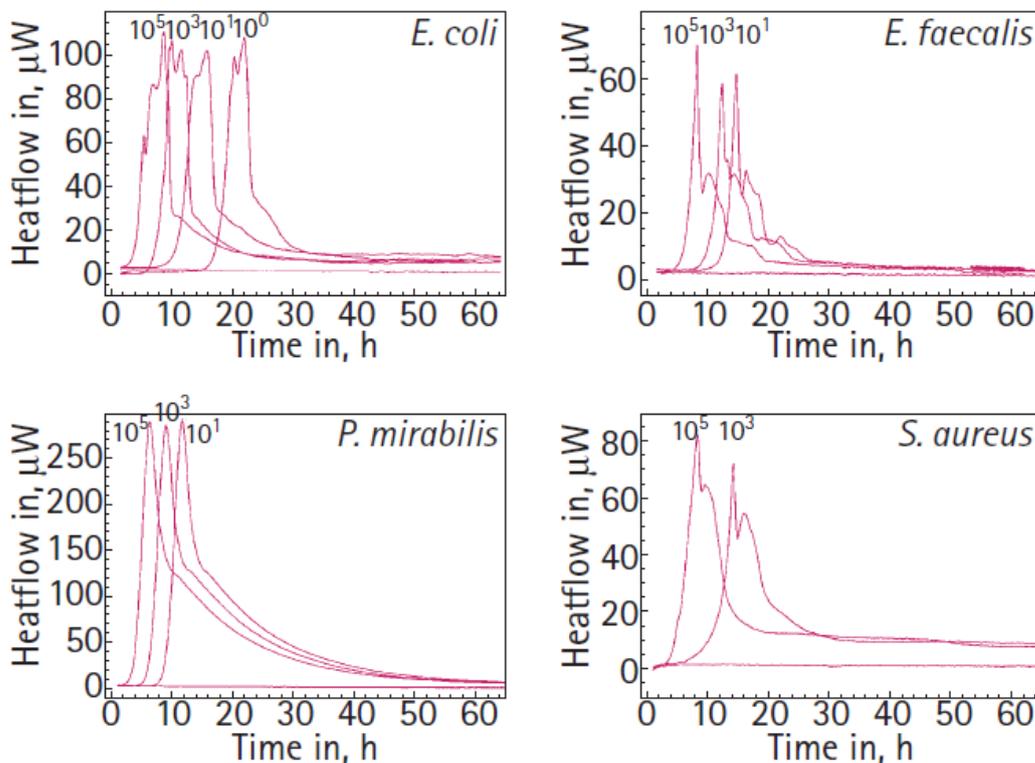


Abb. 12 Wärmeflusskurven aus der Arbeit: "Rapid detection of urinary tract pathogens using microcalorimetry: principle, technique and first results" (Bonkat, et al., 2012)

In dieser Abbildung ist zu erkennen, dass auch in anderen Arbeiten die Möglichkeit der Detektion mikrobiologischen Wachstums mittels Mikrokalorimetrie belegt werden konnte. Ein deutlicher Anstieg der Wärmeflusskurve bei bakterieller Besiedelung ist gegenüber einer Baseline bei fehlender Kontamination erkennbar. Auch ein „kalorischer Fingerabdruck“ ist sichtbar. Die Wärmeflusskurven der verschiedenen Bakterienspezies unterscheiden sich in Form und Höhe des Wärmeflusses. Die Kurve des gleichen Erregers ist reproduzierbar, auch wenn die Menge der koloniebildenden Einheiten über den Zeitpunkt des Wärmeflussanstiegs und je nach Erreger auch über die Höhe des Wärmeflusses entscheidet. Die Form der Kurven ist ähnlich. Nicht nur die Menge der koloniebildenden Einheiten ist allerdings für die Variabilität der „kalorischen Fingerabdrücke“ entscheidend, sondern auch die Wahl des Nährmediums (Belaich & Belaich, 1976) und die Zugabe von Zusatzstoffen wie zum Beispiel Glucose (Wernli et al., 2013).

Bei bisherigen Versuchen, in denen Flüssigkeiten im Mikrokalorimeter gemessen wurden, war sowohl die Detektion als auch die Identifikation unterschiedlicher Keime mit hoher Sensitivität und Spezifität möglich. Bis jetzt wurden unter anderem Messungen zur Erregerdiagnostik im Urin (Bonkat et al., 2012), Liquor (Trampuz et al., 2007) und in Thrombozytenkonzentraten (Trampuz et al., 2007) durchgeführt. Sogar die Detektion und Identifikation von sehr langsam wachsenden Keimen wie *P. acnes* (Trampuz et al., 2007), Pilzen (Furustrand Tafin et al., 2012) und Mycobakterien (Rodriguez et al., 2011) ist mit Hilfe der Mikrokalorimetrie im Laborversuch gelungen.

Jedoch ist für eine höhere Empfindlichkeit im Allgemeinen eine deutlich längere Messdauer nötig, was den Zeitvorteil gegenüber der mikrobiologischen Diagnostik teilweise relativiert. Um den Zeitvorteil zu wahren und dennoch eine höhere Empfindlichkeit zu erzielen, könnten je zwei parallele Messungen des Katheters und des Inkubationsmediums angesetzt werden. Die erste Messung könnte wie in der vorliegenden Untersuchung wenige Stunden dauern, da ein Anstieg der Wärmeflusskurve bei einem stark besiedelten Katheter schon häufig nach maximal fünf Stunden erkennbar ist. Die zweite Messung sollte länger dauern, zum Beispiel 60 Stunden (Bonkat et al., 2012), um auch langsam wachsende Keime zu detektieren und eine vollständige Wärmeflusskurve zu erhalten, die die Keimidentifikation einfacher machen könnte.

Ein weiterer Grund für die höhere Empfindlichkeit in vielen Studien ist, dass meistens künstlich im Labor kolonisierte Medien gemessen wurden. Das heißt, dass das Keimspektrum, mit welchem die Medien kontaminiert sind, vor der Messung festgelegt ist, dass es keine Mischinfektionen gibt und dass es zu keiner nachträglichen Kontamination bei der Gewinnung des Versuchsmaterials kommen kann.

Da die Kurven von infizierten Kathetern und Bakteriensuspensionen in dieser Arbeit nicht gleich sind, scheint auch die Biofilmbildung (auf dem Katheter, im Gegensatz zu der Bakteriensuspension) einen Einfluss auf den Wärmefluss zu haben. Ein guter Vergleich zu dieser Versuchsreihe ist die klinische Studie von Borens et al. (2013); hier wurden infizierte orthopädische Implantate „echter Patienten“ explantiert, mit Ultraschall bearbeitet, um die Keime in Lösung zu bringen, und sowohl im Mikrokalorimeter als auch in der Mikrobiologie untersucht. Das Ergebnis ist wie in dieser Versuchsreihe sehr vielversprechend, da in den meisten Fällen eine schnelle Bestätigung oder ein zügiger Ausschluss (innerhalb von 21 Stunden) einer Implantatinfektion gelang. Allerdings gibt es hier bei vorheriger hoch dosierter Antibiotikagabe eine Einschränkung der Empfindlichkeit. Eine Bearbeitung mit Ultraschall zur Keimgewinnung könnte auch bei Kathetern in einer nächsten Versuchsreihe getestet werden, um das Problem der Biofilmbildung lösen. Die Notwendigkeit besteht allerdings nicht zwingend, da Katheterspitzen im Gegensatz zu orthopädischen Implantaten in die mikrokalorimetrischen Messampullen hineinpassen und die Messung der Bakteriensuspension aus Lager- und Nährmedium – auch ohne „Sonication“ – vielversprechende „kalorische Fingerabdrücke“ liefert.

Neben der Erregerdiagnostik ist für den klinischen Alltag die Resistenztestung von Bedeutung. In der bisherigen Literatur ist mehrfach beschrieben, dass Resistenztestungen, zum Beispiel bei der Diagnostik von MRSA (Baldoni et al., 2009), im Mikrokalorimeter erfolgreich sind. Auch die Ermittlung der Wirksamkeit von desinfizierenden Mundspülungen (Astasov-Frauenhoffer M. et al., 2011), der minimalen inhibitorischen Antibiotikakonzentration (von Ah, Wirz & Daniels, 2009) und der angemessenen Antibiotikadosis, um in vitro Biofilme zu inhibieren (Astasov-Frauenhoffer M. et al., 2014), erscheint möglich. Sogar Resistenztestungen bei Pilzinfektionen (Furustrand Tabin, Meis & Trampuz, 2013) und Mykobakterien (Howell et al., 2012) sind bereits im Mikrokalorimeter erfolgreich durchgeführt worden. Braissant et al. (2014) zeigen im Laborversuch mit kolonisiertem Urin, dass eine

Resistenztestung in innerhalb von sieben Stunden recht genau möglich ist. Dies ist ein interessanter Ansatz für weitere Versuchsreihen. Selbst wenn es in der klinischen Diagnostik wegen einer fehlenden Datenbank zur Erkennung des Keims anhand seines „kalorischen Fingerabdrucks“ oder wegen einer Mischinfektion nicht zuverlässig gelingen sollte, den Erreger zu identifizieren, wäre die zügige Erstellung eines AntibioGRAMMS sehr hilfreich. Wenn im Mikrokalorimeter beispielsweise nachgewiesen werden könnte, dass das Antibiotikum, welches für die kalkulierte Therapie verwendet wurde, das Wachstum des Keims wirksam inhibiert, hätte man auch ohne genaue Kenntnis der Keimspezies eine erste wichtige Information für die Fortführung der Antibiotikatherapie gewonnen.

4.4 Vergleich mit anderen Methoden

4.4.1 MALDI-TOF

Die Matrix-unterstützte Laserdesorptions-/Ionisations-Flugzeit-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ist ein junges Verfahren zur mikrobiologischen Diagnostik, welches sich durch sehr kurze Analysezeiten, einfache Bedienung und Automatisierbarkeit sowie eine hohe Empfindlichkeit (10^4 bis 10^6 koloniebildende Einheiten) auszeichnet. Nach vorheriger Kultivierung wird die Bakterienkultur auf eine Analyseplatte des MALDI-TOF-Geräts gegeben und mit circa einem Mikroliter einer Matrixlösung vermischt. Im MALDI-TOF-Gerät wird die Matrixlösung im Hochvakuum durch einen fokussierten Laserstrahl verdampft, dadurch kommt es zur Ionisation der Erregerproteine. In einem elektrischen Feld, welches von einer Hochspannungsquelle aufgebaut wird, werden diese Ionen beschleunigt. Je nach Masse und Ionisierungsgrad unterscheidet sich das Flugverhalten der Proteine. Die Masse der einzelnen Proteine wird bestimmt und als Gesamtspektrum dargestellt. In einer MALDI-TOF-Datenbank erfolgt ein Software-gesteuerter Abgleich der Messergebnisse (Schubert & Wieser, 2010).

MALDI-TOF und die Mikrokalorimetrie unterscheiden sich im Wesentlichen dadurch, dass MALDI-TOF die vorhandenen ribosomalen Proteine misst, die Mikrokalorimetrie dagegen den beim bakteriellen Wachstum entstehenden Wärmefluss. Daraus ergeben sich folgende Vor- und Nachteile der beiden Methoden:

Da sich die Spektren verschiedener Proteine überlagern, ist mittels MALDI-TOF in der Regel keine direkte Messung aus Patientenproben möglich. Eine Ausnahme stellen Urinproben dar, da Urin in der Regel steril und frei von Proteinen ist. Außerdem ist eine direkte Messung aus Blutkulturen durch vorherige Bearbeitung gelungen (Christner et al., 2010). Im Gegensatz dazu wurde schon mehrfach direkt aus Patientenmaterial eine Kolonisation durch Bakterien mittels Mikrokalorimetrie nachgewiesen (Harris et al., 2010). Bei Mischinfektionen kommen beide Verfahren an ihre Grenzen, da sich sowohl die Wärmeflusskurven als auch die Proteinspektren überlagern.

MALDI-TOF kann in einer Messung die Besiedelung von Pilzen und Bakterien messen. Das heißt, dass eine Pilzinfektion vor der Messung nicht ausgeschlossen werden muss. Maiolo, Furustrand Tabin, Borens & Trampuz (2014) zeigten, dass *Candida species* in einem geeigneten Nährmedium im Mikrokalorimeter ebenso spezifische Wärmeflusskurven bilden wie Bakterien. Es wäre also darauf zu achten, mindestens eine mikrokalorimetrische Messung mit einem passenden Nährmedium auch für Pilze durchzuführen. Außerdem konnten Maiolo et al. (2014) die Wirksamkeit verschiedener Antimykotika auf *Candida species* mittels Mikrokalorimetrie testen. Auch andere Autoren wie zum Beispiel Braissant et al. (2014) oder Astasov-Frauenhoffer et al. (2014) haben, wie bereits erwähnt, mittels Mikrokalorimetrie eine Resistenztestung vorgenommen, was mittels MALDI-TOF aufgrund der Messmethodik nicht möglich ist.

Da bei MALDI-TOF eine Vorkultivierung notwendig ist, liegen die Ergebnisse erst nach 12-24 Stunden vor. Die Mikrokalorimetrie ist mit 10 Stunden etwas schneller. Außerdem können mittels Mikrokalorimetrie Bakterienstämme ab 10 KBE detektiert werden, wogegen MALDI-TOF eine geringere Empfindlichkeit hat und erst ab 10^4 KBE detektiert. Durch die geringere Sensitivität und dadurch, dass MALDI-TOF von kleinen Änderungen der Stoffwechseleigenschaften unbeeinflusst bleibt, ist das System weniger störanfällig als die Mikrokalorimetrie und kann eher automatisiert werden. Beide Methoden benötigen eine Datenbank zum Abgleich der Messergebnisse. Die Erstellung einer solchen benötigt viel Zeit, Sorgfalt und eine gute Organisation. Beide Methoden sind, was die Verbrauchsmaterialien anbelangt, vergleichsweise kostengünstig

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Mikrokalorimetrie der MALDI-TOF in einigen Punkten überlegen, aber deutlich störanfälliger ist. Unter optimalen

Bedingungen kann man mehr Erkenntnisse aus der Mikrokalorimetrie ziehen. Dafür braucht es aber sehr sorgfältig arbeitendes, gut ausgebildetes Personal und deutlich mehr Erfahrung mit dieser Methode. Für den klinischen Alltag scheint MALDI-TOF die praktischere Methode zu sein.

4.4.2 Real Time PCR

Die Real Time PCR (Echtzeit Polymerase-Ketten-Reaktion) ist ein molekulares Verfahren in der mikrobiologischen Infektionsdiagnostik. Sie basiert auf der Amplifikation erregerspezifischer DNA-Abschnitte mit Hilfe von speziellen Primern. Zur Amplifikationsdetektion werden fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet, sodass die Amplifikation in Echtzeit, das heißt während des laufenden Verfahrens, sichtbar gemacht werden kann. Eine Gelelektrophorese wie bei der Endpunkt-PCR wird somit überflüssig, womit die Real-Time-PCR zu einem extrem schnellen Verfahren der Erregerdiagnostik wird (Schubert & Wieser, 2013). In der Diagnostik werden zunehmend vollautomatische PCR-Systeme eingesetzt. Diese zeichnen sich durch geringen Personalaufwand und sehr schnelle Ergebnisse in unter vier Stunden (Czilwik et al., 2015) aus.

Genau wie bei der MALDI-TOF werden bei der PCR tote Moleküle detektiert, die Mikrokalorimetrie gibt dagegen Auskunft über den Wärmefluss und damit über das Wachstumsverhalten der Erreger. Außerdem zeigt die PCR den Genotyp des Erregers. Durch Erfahrungen kann man zwar Hinweise auf mögliche Resistenzen erlangen, eine mikrobiologische Resistenztestung des Phänotyps bleibt jedoch weiterhin notwendig, die bei der Mikrokalorimetrie zumindest theoretisch mit der gleichen Methode erfolgen könnte.

Einen deutlichen Vorteil gegenüber der mikrokalorimetrischen und der mikrobiologischen Diagnostik bietet die PCR in der Geschwindigkeit und bei der Detektion von schwer kultivierbaren Erregern. Da die Real Time PCR wegen hoher Materialkosten ein sehr teures Verfahren ist, bleibt im Einzelfall dennoch abzuwägen, ob eine Diagnostik mittels PCR notwendig und zielführend ist, oder ob nicht ein kostengünstigeres Verfahren mit gleichem Erfolg eingesetzt werden kann.

5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Mikrokalorimetrie ist als diagnostisches Verfahren für Katheter-assoziierte Infektionen bis jetzt wenig untersucht worden. Auch in dieser Messreihe gibt es nur 35 Messungen. Um eine genaue Aussage zur Sensitivität und Spezifität geben zu können, sind weitere Versuchsreihen nötig. Für eine höhere Signifikanz werden insbesondere noch mehr Messungen mit bakteriell besiedelten Kathetern benötigt. Vier positive Messergebnisse im Mikrokalorimeter sind nicht repräsentativ genug.

Dennoch wird anhand der hier vorgelegten Messungen eine Diskrepanz zwischen den mikrokalorimetrischen und den mikrobiologischen Messungen deutlich. So gibt es in dieser Versuchsreihe vier Katheter, die in der Mikrokalorimetrie ein negatives Messergebnis zeigten, in der Mikrobiologie jedoch besiedelt waren. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der Messzeitraum in der Mikrobiologie mit 48 Stunden deutlich länger ist als der in dieser Messreihe festgelegte Zeitraum von 10 Stunden. Für die Mikrokalorimetrie spricht allerdings, dass bei allen mikrobiologisch besiedelten Kathetern mit negativem mikrokalorimetrischen Ergebnis keine klinisch manifeste Infektion der Patienten vorlag und davon auszugehen ist, dass der Katheter beim Ziehen mit Hautkeimen kontaminiert wurde.

Bemerkenswert ist auch, dass alle nicht besiedelten Katheter ausnahmslos als negativ erkannt wurden und es zu keiner Artefaktentwicklung durch Blut- oder Medikamentenrückstände kam. Umgekehrt lag immer dann, wenn ein deutlicher Anstieg der Wärmeffusses zu verzeichnen war, auch tatsächlich eine Infektion vor. Dabei ist die Mikrokalorimetrie zwar eine gut funktionierende, aber auch sehr störanfällige Messmethode. Ist eine Edeltstahlampulle nicht gründlich gereinigt, nicht fest genug verschlossen oder erfolgt die Absenkung, bevor die Probe auf genau 37°C äquilibriert wurde, kann es erhebliche Störungen geben, die die Messung unbrauchbar machen können.

Aufgrund der Wärmeffusskurven konnte in einzelnen Fällen ein Rückschluss auf die verantwortliche Keimspezies gezogen werden, wobei hierzu die Bakteriensuspension besser geeignet war als die Katheterspitze selbst. Allerdings gibt es für eine verlässliche Identifikation der Keimspezies noch zu wenig Vergleichsmuster „kalorischer Fingerabdrücke“. Das heißt, es sind erst sehr viele Messungen durchzuführen, um

genügend keimspezifische Kurven zu kennen und so anhand des Kurvenverlaufs eine genaue Erregerdiagnose stellen zu können. Da ein anderes Nährmedium andere „kalorische Fingerabdrücke“ produzieren würde (Weiser, 2011), wäre es zudem wichtig, falls die Mikrokalorimetrie im klinischen Alltag benutzt würde, sich auf ein einheitliches Nährmedium zu einigen. Für Mischinfektionen wären ggf. besondere Algorithmen erforderlich, um die Überlagerung mehrerer typischer „kalorischer Fingerabdrücke“ zu erkennen und zu analysieren.

In der mikrobiologischen Diagnostik wird nicht nur die Diagnose einer Katheter-assoziierten Infektion gestellt und der Erreger identifiziert, sondern auch ein Antibiotogramm erstellt, um Therapieoptionen aufzeigen zu können. Dies ist in der Mikrokalorimetrie zwar vorstellbar, bis jetzt jedoch wenig untersucht.

Im Unterschied zur konventionellen mikrobiologischen Diagnostik ist die Mikrokalorimetrie zwar schneller, im Vergleich zu modernen Messverfahren wie der Real Time PCR benötigt sie mit mindestens 10 Stunden Messzeit zur Infektionsdiagnostik hingegen verhältnismäßig lange.

Insgesamt kann die Mikrokalorimetrie somit nicht als Konkurrenz zur Mikrobiologie, wohl aber als ein mögliches zusätzliches Verfahren zum schnellen Screening von entferntem Kathetermaterial auf bakterielle Besiedelung angesehen werden. Um die Einsatzmöglichkeiten der Mikrokalorimetrie bei der Diagnostik Katheter-assoziiierter Infektionen weiter zu prüfen, wäre als nächstes eine klinische Testreihe mit höherer Stückzahl mit dem Versuch antibiotischer Resistenztestungen im Mikrokalorimeter sinnvoll. Die Arbeiten von Braissant et al. (2014), von Ah, Wirz & Daniels (2009) und vielen anderen deuten darauf hin, dass eine solche Weiterentwicklung der Mikrokalorimetrie als schnelles diagnostisches Werkzeug vorstellbar ist.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

In Deutschland versterben täglich 162 Menschen an einer Sepsis. Bei 60-80% der Septitiden handelt es sich um nosokomiale Infektionen. Pro 1000 Kathetertage ergeben sich 1,26 Katheter-assoziierte Infektionen. Die Letalitätsrate für Katheter-assoziierte Septitiden liegt bei ca. 10,9%. Insbesondere im Kindesalter muss die Indikation für einen zentralvenösen Katheter streng gestellt werden, da sich das Risiko einer Katheter-assoziierten Sepsis mit der Liegedauer stetig erhöht. Die Diagnostik einer Katheter-assoziierten Sepsis dauert mit der Roll-Plate Methode, dem mikrobiologischen Goldstandard, bis zu 72 Stunden.

Fragestellung

Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass die Mikrokalorimetrie sich als schnelle Methode zur Detektion und Identifikation von Mikroorganismen eignet. Zur Identifikation der Keimspezies trägt der „kalorische Fingerabdruck“ bei: Eine Bakterienspezies zeigt im gleichen Nährmedium wiederholt die gleiche, individuelle Form einer Wärmeflusskurve. In einer experimentellen Voruntersuchung von Weiser (2011) konnte gezeigt werden, dass die mikrokalorimetrische Detektion artifiziiell besiedelter Katheter in einem Zeitraum von 10 Stunden möglich ist. In der vorliegenden Untersuchung sollte geklärt werden, ob sich die Mikrokalorimetrie auch zur Diagnostik Katheter-assoziiierter Infektionen „echter Patienten“ eignet.

Material und Methoden

Hierzu wurden von gezogenen Kathetern aus der neonatologisch-pädiatrischen und der Erwachsenen-Intensivmedizin je zwei ca. 1 cm lange Teilstücke unter sterilen Kautelen abgeschnitten und konventionell-mikrobiologisch sowie mikrokalorimetrisch untersucht. Die mikrokalorimetrischen Messungen erfolgten in einem isothermen Wärmeflusskalorimeter (2277 Thermal Activity Monitor, ThermoMetric AB, Lund, Schweden) bei einer Inkubationstemperatur von 37°C über einen Zeitraum von 10 Stunden; dabei wurden jeweils parallel die Katheterspitze selbst und das Lagerungsmedium, in dem diese Katheterspitze aufbewahrt worden war, in einer Nährlösung inkubiert.

Ergebnisse

Es konnten 35 Katheter untersucht werden, 21 aus der neonatologisch-pädiatrischen und 14 aus der Erwachsenen-Intensivmedizin. Davon erwiesen sich 8 mikrobiologisch als besiedelt; von diesen ergaben 4 einen positiven mikrokalorimetrischen Befund (Sensitivität 50%). Die übrigen 27 waren mikrobiologisch nicht besiedelt, alle diese ergaben auch mikrokalorimetrisch einen negativen Befund (Spezifität 100%). Alle 4 mikrokalorimetrisch positiven Befunde wurden auch mikrobiologisch bestätigt, waren also „richtig positiv“ (positiver prädiktiver Wert 100%). Von den 31 negativen mikrokalorimetrischen Befunden wurden 27 mikrobiologisch bestätigt, waren also „richtig negativ“ (negativer prädiktiver Wert 87%). Unter den mikrokalorimetrisch positiven Befunden ergab eine Probe ein Wärmeflussignal, welches für die später identifizierte Keimspezies (*Staphylococcus aureus*) im Sinne eines „kalorischen Fingerabdrucks“ charakteristisch war. Eine weitere Probe zeigte einen mikrokalorimetrisch bisher unbekanntem Keim (*Acinetobacter baumannii*). Bei zwei weiteren Proben handelte es sich um Mischinfektionen. In zwei Fällen resultierte bei Inkubation des Lagerungsmediums ein höheres Wärmeflussignal als bei Inkubation der Katheterspitze.

Diskussion

Bemerkenswerterweise ergaben sich keine „falsch positiven“ mikrokalorimetrischen Befunde, wie sie infolge von Blut- und Medikamentenrückständen an Kathetern von „echten Patienten“ zu erwarten gewesen wären. Die vier mikrokalorimetrisch „falsch negativen“ Katheter erwiesen sich auch mikrobiologisch erst nach 48-stündiger Bebrütung als bewachsen; die Blutkulturen dieser Patienten waren steril, sodass keine Sepsis im engeren Sinne vorlag. Die teilweise wesentlich niedrigeren Wärmeflussraten bei Inkubation der Katheterspitze könnten auf Biofilmbildung zurückzuführen sein; die Messung von Bakteriensuspensionen (Lagerungsmedium in Nährlösung) scheint zu höheren Wärmeflussraten zu führen.

Schlussfolgerung

Die Mikrokalorimetrie ist zur Detektion von Katheter-assoziierten Infektionen auch bei „echten Patienten“ in der Lage und könnte den mikrobiologischen Goldstandard als

schnelleres Screeningverfahren ergänzen. Hierzu wären jedoch weitere methodische Standardisierungen und größere klinische Studien erforderlich.

7 Summary

Background

On average there are 162 deaths of sepsis per day in Germany, with 60-80% of all cases being nosocomial infections. The incidence of catheter-related or central line-associated bloodstream infections (CRBSIs, CLABSIs) amounts to 1.26 per 1000 catheter days, their mortality rate is 10.9 %. As the risk of catheter-related sepsis increases with ongoing duration of catheterization, the indication of central-venous catheters has to be carefully determined. If the conventional roll-plate method is used, the microbiological diagnosis of a catheter-related sepsis takes about 72 hours.

Aim of the Study

As has been shown by other authors, microcalorimetry is a quick method to detect and identify microorganisms. Under comparable incubation conditions, every bacterial species repeatedly shows the same, individual time course of heat flow (“caloric fingerprint”). During a preliminary study in 2011, Weiser found out that under laboratory conditions, the microcalorimetric detection of bacterial species, being artificially grown on catheters, is possible in just 10 hours. The aim of the present study was to analyse if microcalorimetry is eligible for the diagnosis of catheter-related infections under clinical conditions, as well.

Materials and Methods

Central venous catheters that had been removed from patients of the neonatological, pediatric, or adult intensive care unit, respectively, were cut into two pieces to be analysed both in the conventional microbiological and in the microcalorimetric way. The microcalorimetric measurements were carried out in a isothermal heat flow calorimeter (2277 Thermal Activity Monitor, ThermoMetric AB, Lund, Sweden) for 10 hours at 37 °C. The catheter tips themselves and the storage media were independently studied in an incubation solution.

Results

21 out of the 35 catheters studied came from the neonatological or pediatric and 14 from the adult intensive care unit. It turned out that 8 of those catheters were microbiologically overgrown, 4 of those showed positive results when being analysed microcalorimetrically. Thus, the microcalorimetric method revealed a sensitivity of

50%. Furthermore, all of the other 27 sterile catheters showed negative results when being analysed microcalorimetrically. Therefore, the specificity of the microcalorimetric method is 100%. Moreover, all of the 4 microcalorimetric positive results were proven right by the microbiological method (positive predictive value 100%). Of the 31 microcalorimetric negative results there were 27 proven right and 4 proven wrong by the microbiological method (negative predictive value 87%). One of the 4 positive microcalorimetric record was typical of the identified germinal species (*Staphylococcus aureus*). Another positive sample turned out to be a microcalorimetrically unprecedented species (*Acinetobacter baumannii*). The two remaining samples with microcalorimetrically positive results reflected multiple infections with more than one pathogen. In two cases, the heat flow signal was higher with the incubation of the storage media than with the incubation of the catheter tips themselves.

Discussion

Unexpectedly, the microcalorimetric method never showed any false positive results that could have happened as a consequence of any blood or drug residues on the catheters. The 4 catheters that were incorrectly analysed negative by the microcalorimetric method, also needed 48 hours of incubation time to show positive results, using the microbiological method. Furthermore, the blood cultures of those patients were sterile, thus there was no sepsis in a narrower sense. The notably lower heat flow rates of the catheter tips themselves (as compared to the storage media) could be the consequence of biofilm formation. The heat flow rates of the storage media in incubation solutions seem to be higher.

Conclusion

Microcalorimetry appears as a promising method to detect catheter-related bloodstream infections not only under laboratory, but also under clinical conditions and could complement the microbiological gold standard as a quicker screening tool. However, to validate microcalorimetry in intensive care medicine, more extensive clinical studies with highly standardized measuring procedures would be needed.

Literaturverzeichnis

- Angus, D. C., Linde-Zwirble, W. T., Lidicker, J., Clermont, G., Carcillo, J., Pinsky, M. R. (2001) Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Critical Care Medicine*, S. 1303-1310.
- Artz, S. (2008) *Nosokomiale Infektionen auf einer interdisziplinären Intensivstation in einem Klinikum der Schwerpunktversorgung - Ein prospektiver Vergleich zweier Patientenpopulationen anhand des Krankenhaus-Infektions-Surveillance-Systems (KISS)*. Berlin, Berlin, Deutschland.
- Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Daniels, A. U., Wirz, D., Weiger, R., Waltimo, T. (2011) Quantification of vital adherent *Streptococcus sanguinis* cells on protein-coated titanium after disinfectant treatment. *Journal of materials science. Materials in medicine.*, S. 2045-2051.
- Astasov-Frauenhoffer, M., Braissant, O., Hauser-Gerspach, I., Weiger, R., Walter, C., Zitzmann, N. U., Waltimo, T. (2014) Microcalorimetric Determination of the Effects of Amoxicillin, Metronidazole and Their Combination on In Vitro Biofilm. *Journal of Periodontology*, S. 349-357.
- Baldoni, A., Hermann, H., Frei, R., Trampuz, A., Steinhuber, A. (2009) Performance of Microcalorimetry for Early Detection of methicillin Resistance in Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of clinical microbiology*, S. 774-776.
- Beale, R., Reinhart, K., Brunkhorst, F. M., Dobb, G., Levy, M., Martin, G., Martin, C; Ramsey, G; Silva, E; Vallet, B; Vincent, J L; Janes, J M; Sarwat, S., Williams, M. D. (2009) Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. *Infection*, S. 222-232.
- Belaich, J. P., Belaich, A. (1976) Microcalorimetric study of the anaerobic growth of *Escherichia coli*: measurements of the affinity of whole cells for various energy substrates. *Journal of Bacteriology*, S. 19-24.
- Boling, E. A., Blanchard, G. C., Russell, W. J. (1973) Bacterial identification by Microcalorimetry. *Nature*, S. 472-473.

- Bonkat, G., Braissant, O., Widmer, A. F., Frei, R., Rieken, M., Wyler, S., Gasser, T. C., Wirz, D., Daniels, A.U., Bachmann, A. (2012) Rapid detection of urinary tract pathogens using microcalorimetry: principle, technique and first results. *BJU International*, S. 892-897.
- Borens, O., Erlangga, Y., Steinrücken, J., Trampuz, A. (2013) Accurate and Early Diagnosis of Orthopedic Device-Related Infection by Microbial Heat Production and Sonication. *Journal of Orthopaedic Research*, S. 1700-1703.
- Braissant, O., Müller, G., Egli, A., Widmer, A., Frei, R., Haller, A., Wirz, D., Gasser, T. C., Bachmann, A., Wagenlehner, F., Bonkat, G. (2014). Seven Hours to Adequate Antimicrobial Therapy in Urosepsis Using Isothermal Microcalorimetry. *Journal of Clinical Microbiology*, S. 624-626.
- Braissant, O., Wirz, D., Goepfert, B., Daniels, A. U. (2010) Use of isothermal microcalorimetry to monitor microbial activities . *Sensors*, S. 9369-9383.
- Christner, M., Rohde, H., Wolters, M., Sobottka, I., Wegscheider, K., Aepfelbacher, M. (2010) Rapid identification of bacteria from positive blood culture bottles by use of matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight mass spectrometry fingerprinting. *Journal of clinical microbiology*, S. 1584-1591.
- Czilwik, G., Messinger, T., Strohmeier, O., Wadle, S., von Stetten, F., Paust, N., Roth, G., Zengerle, R., Saarinen, P., Niittymäki, J., McAllister, K., Sheils, O., O'Leary, J., Mark, D. (2015) Rapid and fully automated bacterial pathogen detection on a centrifugal-microfluidic LabDisk using highly sensitive nested PCR with integrated sample preparation. *Lab on a chip*, S. 3749-3759.
- Deutsche Sepsis-Gesellschaft, e. V. (2015) *Kriterienkatalog SIRS*.
- Edwards, J., Herzig, C., Liu, H., Pogorzelska-Maziarz, M., Zachariah, P., Dick, A., Saiman, L., Stone, P.W., Furuya, E.Y., Furuya, E. (2015) Central line-associated blood stream infections in pediatric intensive care units: Longitudinal trends and compliance with bundle strategies. *American journal of infection control*, S. 489-493.
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2013) *ECDC point prevalence survey: healthcare-associated infections still a major public health problem, one*

in 18 patients in European hospitals affected. Solna, Schweden: European Centre for Disease Prevention and Control.

Furustrand Tabin, U., Clauss, M., Hauser, P. M., Bille, J., Meis, J. F., Trampuz, A. (2012) Isothermal microcalorimetry: a novel method for real-time determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* species. *Clinical Microbiology and Infection*, S. 241-245.

Furustrand Tabin, U., Meis, J. F., Trampuz, A. (2013) Microcalorimetry Assay for Rapid Detection of Voriconazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, S. 5704-5706.

Garcia-Martin, M., Lardelli-Claret, P., Jiménez-Moleón, J. J., Bueno-Cavanillas, A., Luna-del-Castillo, J. D., Gálvez-Vargas, R. (2001) Proportion of hospital deaths potentially attributable to nosocomial infection. *Infection control and hospital epidemiology*, S. 708-714.

Gastmeier, P., Geffers, C. (2006) *Nosokomiale Infektionen in Deutschland: Wie viele gibt es wirklich?*

Geffers, C., Gastmeier, P. (2011) Nosokomiale Infektionen und multiresistente Erreger in Deutschland. *Deutsches Ärzteblatt*, S. 87-93.

Geffers, C., Gastmeier, P., Rüden, H. (2002) *Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 8 - Nosokomiale Infektionen.* Berlin: Robert-Koch-Institut.

Global Sepsis Alliance (2015) *stop sepsis save lives.* Von http://www.world-sepsis-day.org/CONTENTPIC/2015_WSD_FactSheet_DE.pdf abgerufen

Harris, L. G., El-Bouri, K., Johnston, S., Rees, E., Frommelt, L., Siemssen, N., Christner, M., Davies, A. P., Rohde, H., Mack, A. P. (2010) Rapid identification of staphylococci from prosthetic joint infections using MALDI-TOF mass-spectrometry. *The International journal of artificial organs*, S. 568-574.

Hatachi, T., Tachibana, K., Takeuchi, M. (2015) Incidences and influences of device-associated healthcare-associated infections in a pediatric intensive care unit in Japan: a retrospective surveillance study. *Journal of intensive care.*

- Holtmann, H., Bobkowski, M. (2008) Kokken I, Kokken II, Kokken III. In H. Holtmann & M. Bobkowski, *Basics Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene* (S. 32-40). München: Elsevier GmbH.
- Howell, M., Wirz, D., Daniels, A. U., Braissant, O. (2012) Application of a Microcalorimetric Method for Determining Drug Susceptibility in Mycobacterium Species. *Journal of clinical microbiology*, S. 16-20.
- Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M., Langa, K. M. (2010) Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA*, S. 1787-1794.
- Kott, A., Donahue, M. (2015) *PR Newswire*. Von <http://www.prnewswire.com/news-releases/international-organizations-declare-sepsis-a-global-medical-emergency-104142073.html> abgerufen
- Kumar, A., Roberts, D., Wood, K. E., Light, B., Parrillo, J. E., Sharma, S., Suppes, R., Feinstein, D., Zanotti, S., Taiberg, L., Gurka, D., Kumar, A., Cheang, M. (2006) Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Critical Care Medicine*, S. 1589-1596.
- Kumar, G., Kumar, N., Kaleekal, T., Tarima, S., McGinley, E., Jimenez, E., Mohan, A., Khan, R. A., Whittle, J., Jacobs, E., Nanchal, R. (2011). Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). *Chest*, S. 1223-1231.
- Leistner, R., Hirsemann, E., Bloch, A., Gastmeier, P., Geffers, C. (2014). Costs and prolonged length of stay of central venous catheter-associated bloodstream infections (CVC BSI): a matched prospective cohort study. *Infection*, S. 31-36.
- Maiolo, E. M., Furustrand Tabin, U., Borens, O., Trampuz, A. (2014). Activities of Fluconazole, Caspofungin, Anidulafungin and Amphotericin B on Planktonic and Biofilm Candida Species Determined by Microcalorimetry. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, S. 2709-2717.
- Ratzinger, F., Eichbichler, K., Schuardt, M., Tsirkinidou, I., Mitteregger, D., Haslacher, H., Perkmann, T., Schmetterer, K. G., Doffner, G., Burgmann, H. (2015) Sepsis in standard care: patients' characteristics, effectiveness of antimicrobial therapy and patient outcome--a cohort study. *Infection*, S. 345-352.

- Reinhart, K., Brunkhorst, F. M. (2010) *1. Revision der S 2k Leitlinie: Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis; Methodenreport*. Deutsche Sepsis Gesellschaft e.V. und die Deutsche Interdisziplinäre Vereinigung für Intensivmedizin und Notfallmedizin (DIVI).
- Reinhart, K., Brunkhorst, F. M., Bone, H.-G., Bardutzky, J., Dempfle, C.-E., Forst, H., Gastmeier, P., Gerlach, H., Gründling, M., John, S.; Kern, W., Kreymann, G., Krüger, W., Kujath, P., Marggraf, G., Martin, J., Mayer, K., Meier-Hellmann, A., Oppert, M., Putensen, C., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Seifert, H., Spies, C., Stüber, F., Weiler, N., Weimann, A., Werdan, K.; Welte, T. (2010) *Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis: 1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI). Deutschland.*
- Robert Koch Institut. (2011) *Definitionen nosokomialer Infektionen (CDC-Definitionen)*. Berlin: Robert Koch Institut, 7. Auflage.
- Rodriguez, D., Daniels, A. U., Urrusti, J. L., Wirz, D., Braissant, O. (2011) Evaluation of a low-cost calorimetric approach for rapid detection of tuberculosis and other mycobacteria in culture. *Journal of Applied Microbiology*, S. 1016-1024.
- Schubert, S., Wieser, A. (2010) MALDI-TOF-MS in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum*, S. 760-762.
- Schubert, S., Wieser, A. (2013) Molekulare Methoden in der mikrobiologischen Diagnostik. *Biospektrum*, S. 743-748.
- Shalabi, M., Adel, M., Yoon, E., Aziz, K., Lee, S., Shah, P. S. (2015) Risk of Infection Using Peripherally Inserted Central and Umbilical Catheters in Preterm Neonates. *Pediatrics*, S. 1073-1076.
- Stenger, S. (2015) *Uniklinik-ulm.de*. Von <http://www.uniklinik-ulm.de/struktur/institute/medizinische-mikrobiologie-und-hygiene/home/diagnostik/leistungen/leistungsverzeichnis-infektionskrankheiten/fremdkoerper-assozierte-infektionen.html> abgerufen

- Trampuz, A., Salzmann, S., Antheaume, J., Daniels, A. U. (2007). Microcalorimetry: a novel method for detection of microbial contamination in platelet products. *Transfusion*, S. 1643-1653.
- Trampuz, A., Steinhuber, A., Wittwer, M., Leib, S. L. (2007) Rapid diagnosis of experimental meningitis by bacterial heat production in cerebrospinal fluid. *BMC Infectious Diseases*.
- Trampuz, A., Steinrücken, J., Clauss, M., Bizzini, A., Furustrand, U., Uckay, I., Peter, R., Bille, J., Borens, O. (2010) New methods for the diagnosis of implant-associated infections. *Revue médicale suisse*, S. 731-734.
- von Ah, U., Wirz, D., Daniels, A. U. (2009) Isothermal micro calorimetry- a new method for MIC determinations: results for 12 antibiotics and reference strains of *E. coli* and *S. aureus*. *BMC Microbiology*.
- Walger, P., Popp, W., & Exner, M. (2013) *Stellungnahme der DGKH zu Prävalenz, Letalität und Präventionspotenzial nosokomialer Infektionen in Deutschland*. Berlin: Deutsche Gesellschaft für Krankenhaushygiene e.V.
- Watson, C. M., & Al-Hasan, M. N. (2014) Bloodstream infections and central line-associated bloodstream infections. *The surgical clinics of north america*, S. 1233-1244.
- Weiser, J. O. (2011) *Mikrokalorimetrische Detektion von Katheterinfektionen*. Hamburg, Hamburg, Deutschland.
- Wernli, L., Bonkat, G., Gasser, T. C., Bachmann, A., Braissant, O. (2013) Use of isothermal microcalorimetry to quantify the influence of glucose and antifungals on the growth of *Candida albicans* in urine. *Journal of Applied Microbiology*, S. 1186-1193.
- Zaharia, D. C., Popa, M. G., Steriade, A. T., Muntean, A. A., Balint, O., Micuț, R., Popa, V. T., Popa, M. I., Bogdan, M. A. (2013) Microcalorimetry - a new method for bacterial characterization. *Pneumologia*, S. 232-235.

Danksagung

Ich danke

Herrn Prof. Dr.med. Dominique Singer für die geduldige, ausführliche und gründliche Betreuung meiner Dissertation;

Herrn Prof. Dr.med. Holger Rohde und Herrn Dr.med. Martin Christner für die mikrobiologische Beratung, das Beantworten vieler Fragen und die Bereitstellung von Räumlichkeiten und Arbeitsmaterial;

dem Personal der Mikrobiologie und der Kinderintensivstation und den neonatologischen Stationen für das Bereitstellen des Kathetermaterials;

meinem Schwiegervater für das Korrekturlesen;

meinen Eltern für ihre Unterstützung;

meinem Mann für seine Geduld, den technischen Service und das Kaffee kochen.

Lebenslauf

Lena Sophie Leupold
geboren am 10.12.1988 in Braunschweig
verheiratet mit Benedikt Leupold, eine Tochter (07/14)

Husarenstraße 37
38102 Braunschweig
0151/20765266
Lena.Leupold@web.de

Schulbildung

1995-2008 Schulausbildung mit Allgemeiner Hochschulreife (Note 1,7) am
Gymnasium Raabeschule in Braunschweig

Fremdsprachenkenntnisse

Englisch – fließend, Italienisch – Grundkenntnisse

Hochschulausbildung

10/2008 - 06/2015 Medizinstudium am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Herbst 2010 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Note 3)
04/2015 Schriftlicher Teil des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
(Note 3)
06/2015 Mündlicher Teil des zweiten Abschnitts der ärztlichen Prüfung
(Note 2)

Famulaturen

2011 Drei Famulaturen auf der Kinderintensivstation und der Neonatologie des
 Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf
2012 Famulatur bei KinderPaCT und Delfin-Kids in Hamburg

Klinisches Wahlfach

Anästhesiologie (Note 2)

Praktisches Jahr

08/2013 - 12/2013 Unfall- und Viszeralchirurgie im Asklepios Klinikum Barmbek,
Hamburg
12/2013 - 03/2014 Gynäkologie und Geburtshilfe im Asklepios Klinikum Harburg,
Hamburg
03/2014 - 06/2014 Gastroenterologie im Asklepios Klinikum Barmbek, Hamburg

Berufstätigkeit

Seit November 2015: Assistenzärztin für Anästhesiologie am Städtischen Klinikum
Braunschweig

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: