
UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

Prof. Dr. med. Martin Aepfelbacher

Systematischer Vergleich von Methoden zur schnellen Identifizierung von Bakterien aus Blutkulturproben mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Dissertation

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

vorgelegt von:

Laura Verena Stalling
aus Hamburg

Hamburg 2018

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.05.2019**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Holger Rohde

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. Moritz Hentschke

Inhaltsverzeichnis

1	Zielsetzung.....	1
2	Einleitung	2
2.1	Bakteriämie	2
2.2	Bedeutung der zeitnahen Erregeridentifikation	4
2.3	Erregernachweis bei Bakteriämie.....	5
2.4	Direkte Identifizierung von Bakterien in positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie	6
3	Material und Methoden.....	11
3.1	Material	11
3.2	Methoden	14
4	Ergebnisse	22
4.1	Korrelation von optischer Dichte und Bakterienkonzentration	22
4.2	Überprüfung der Bakterienkonzentration in den hergestellten Blutkulturproben	23
4.3	Übersicht über die Ergebnisse der MALDI-TOF Messungen	24
4.4	Deskriptive Statistik.....	27
4.5	Einfluss der Probeneigenschaften - Univariate Analyse.....	31
4.6	Einfluss der Probeneigenschaften - Nichtlineare Regression.....	33
4.7	Einfluss der Probeneigenschaften - Nichtlineares gemischtes Model	46
4.8	Analytische Sensitivität.....	56
4.9	Bearbeitungsaufwand und Kosten	57
5	Diskussion.....	60
5.1	Eignung künstlicher Blutkulturproben zur Beurteilung der Qualität verschiedener Extraktionsverfahren	60
5.2	Einfluss der verwendeten Extraktionsmethode auf den Identifikationsscore.....	61

Inhaltsverzeichnis

5.3	Einfluss von Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore..	64
5.4	Bearbeitungsaufwand und Kosten	67
5.5	Fazit	70
6	Zusammenfassung.....	71
6.1	Zusammenfassung deutsch	71
6.2	Zusammenfassung englisch.....	72
7	Abkürzungsverzeichnis	74
8	Abbildungsverzeichnis.....	75
9	Tabellenverzeichnis.....	77
10	Literaturverzeichnis	79
11	Danksagung	88
12	Curriculum Vitae.....	89
13	Eidesstattliche Versicherung	90

1 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist der exemplarische Vergleich ausgewählter, auf unterschiedlichen Prinzipien beruhender, Methoden für die Direktidentifizierung von Erregern aus positiven Blutkulturflaschen mittels Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie. Im Mittelpunkt steht dabei eine detaillierte Analyse der analytischen Sensitivität. Darüber hinaus sollen die untersuchten Verfahren orientierend hinsichtlich des erforderlichen Arbeitsaufwandes und des Verbrauchsmittelbedarfs verglichen werden. Anhand der ermittelten Ergebnisse soll die Einsetzbarkeit der Verfahren in der mikrobiologischen Routinediagnostik beurteilt werden.

2 Einleitung

2.1 Bakteriämie

Eine Bakteriämie ist definiert als das Auftreten von Mikroorganismen in der Blutbahn und ist häufig Ausdruck einer schweren Infektion (Reimer et al. 1997). Zu den prädisponierenden Faktoren gehören u. a. medizinische Maßnahmen wie die Anlage eines zentralvenösen Katheters oder Blasen-katheters, künstliche Beatmung, zuvor stattgefundene operative Eingriffe, sowie vorhergegangene Krankenhausaufenthalte und eine antimikrobielle bzw. immunsuppressive Therapie (Warren et al. 2001; Marra et al. 2011; Marín et al. 2014). Auch das Vorliegen von Erkrankungen, die mit einer Immunschwäche einhergehen (z. B. HIV) oder das Eindringen von Erregern erleichtern (z. B. Verbrennungen), begünstigt das Auftreten einer Bakteriämie (Reimer et al. 1997; Endimiani et al. 2003; Rodríguez-Baño et al. 2009). Die Inzidenz der Bakteriämie liegt in den Industrienationen bei ca. 166 Erkrankungen pro 100.000 Einwohnern pro Jahr (Søgaard et al. 2011). Etwa 60 % der Bakteriämien gelten als nosokomial erworben (Ibrahim et al. 2000).

Von 1960 bis 1970 wurden Bakteriämien am häufigsten durch gramnegative Bakterien hervorgerufen; in den folgenden Jahrzehnten verschob sich das Erregerspektrum jedoch zunehmend in Richtung grampositiver Organismen (Martin et al. 2003; Wisplinghoff et al. 2004; Bearman und Wenzel 2005; Naber 2009).

Unter den grampositiven Erregern dominieren koagulasenegative Staphylokokken (KNS), *Staphylococcus aureus* und Enterokokken; die gramnegativen Bakterien werden vor allem durch die Enterobakterienarten *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* und *Enterobacter spp.* sowie durch *Pseudomonas aeruginosa* repräsentiert (Ibrahim et al. 2000; Warren et al. 2001; Beekmann et al. 2003; Wisplinghoff et al. 2004; Naber 2009; Kollef et al. 2011; Søgaard et al. 2011). Dabei variiert die in einzelnen Studien

gefundene Erregerverteilung (Tabelle 1) in Abhängigkeit vom untersuchten Fachbereich und dem jeweiligen Patientenkollektiv zum Teil erheblich (Beerman und Wenzel 2005).

Tabelle 1: Prozentualer Erregeranteil bei Bakteriämien (Seifert et al. 2007)

	Rosenthal 1986 (1983-1985)	Geerdes-Fenge 1992 (1979-1989)	Schaberg 1991 ¹ (1986-1989)	Rosenthal 1993 (1991-1992)	Rosenthal 2002 (2000-2001)	Wisplinghoff 2004 (1995-2002)
<i>Staphylococcus aureus</i>	19,9	17,4	16,3	20,4	21,6	20,2
KNS	10,4	9,5	27,7	9,3	9,2	31,3
Enterokokken	5,5	7,1	8,5	5,5	8,1	9,4
<i>Escherichia coli</i>	22,0	24,2	6,0	23,9	22,6	5,6
<i>Klebsiella spp.</i>	5,9	3,3	4,5	5,4	6,2	4,8
<i>Enterobacter spp.</i>	4,6	3,8	5,0	3,6	4,2	3,9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4,8	3,8	4,4	4,2	3,4	4,3

1) nur nosokomiale Bakteriämien

KNS: Koagulasenegative Staphylokokken

Seit 1995 vergrößerte sich der Anteil resistenter Keime wie Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA), Vancomycin-resistenter Enterokokken (VRE) und *Pseudomonas aeruginosa* kontinuierlich (Cohen 1992; Allard et al. 2008; Laupland et al. 2008; Shorr et al. 2008; Tumbarello et al. 2008; Naber 2009; Meyer et al. 2010). Dieser Anstieg konnte sowohl im stationären, als auch im ambulanten Bereich beobachtet werden (Cohen 1992; Steinberg et al. 1996; Wisplinghoff et al. 2004; Shorr et al. 2008; Tumbarello et al. 2008; Naber 2009; Ortega et al. 2009; del Rio et al. 2009).

Die Gesamtmortalität der Bakteriämie liegt, je nach Erreger, Grunderkrankung und Patientenkollektiv in den Industrienationen im Bereich von 15 %

bis 67 %. Die 30-Tage-Mortalität liegt bei 8 % bis 33 % (Lark et al. 2000; Warren et al. 2001; Martin et al. 2003; Osmon et al. 2004; Wisplinghoff et al. 2004; Kang et al. 2005; Khatib et al. 2006b; Muñoz et al. 2008; Wareham et al. 2008; Ammerlaan et al. 2009; Paul et al. 2010; Vitkauskiene et al. 2010; Kollef et al. 2011). Bei nosokomialen und katheterassoziierten Bakteriämien ist die Mortalität im Vergleich zu ambulant erworbenen Bakteriämien erhöht (Ibrahim et al. 2000; Khatib et al. 2006a; Laupland et al. 2008; Robinson et al. 2009).

2.2 Bedeutung der zeitnahen Erregeridentifikation

Mehrere Studien konnten zeigen, dass eine adäquate Antibiotikatherapie bei Bakteriämie zu einem signifikanten Rückgang der Mortalität um den Faktor 1,3 bis 11,1 führt (Leibovici et al. 1998; Ibrahim et al. 2000; Lodise et al. 2003; Kang et al. 2005; Khatib et al. 2006a; Tumbarello et al. 2007; Tumbarello et al. 2008; Kumar et al. 2009; Robinson et al. 2009; Paul et al. 2010; Vitkauskiene et al. 2010; Retamar et al. 2012; Gasch et al. 2013). Darüber hinaus konnte die Stärke dieses Effekts mit dem Zeitverzug zwischen Symptom- und Therapiebeginn in Zusammenhang gebracht werden. Der positive Effekt einer adäquaten Therapie war dabei umso ausgeprägter, je früher die Behandlung eingeleitet wurde (MacArthur et al. 2004; Kumar et al. 2009; Gaieski et al. 2010).

Durch eine beschleunigte Erregeridentifizierung im mikrobiologischen Labor kann, je nach Ausmaß der erreichten Verkürzung und dem vorherrschenden Erregerspektrum, der Anteil der Patienten unter adäquater antibakterieller Behandlung in der Frühphase der Infektion erhöht werden (Barenfanger et al. 1999; Kerremans et al. 2008). In Patientenkollektiven mit einem signifikanten Anteil empirisch nicht adäquat behandelter Patienten konnte in der Folge ein Rückgang der Mortalität beobachtet werden (Doern et al. 1994).

In Patientenkollektiven mit einem hohen Anteil empirisch adäquat behandelter Patienten zeigte sich der Vorteil einer beschleunigten Erregeridentifizierung im Rückgang des Antibiotikaverbrauchs, einer Verkürzung der

Liegedauer oder einer allgemeinen Kostenreduktion (Leibovici et al. 1998; Barenfanger et al. 1999; Beekmann et al. 2003; Kerremans et al. 2008; Leone und Martin 2008; Shorr et al. 2008; Rodríguez-Baño et al. 2009; Wolkewitz et al. 2011).

Allerdings scheinen systematische Verbesserungen in der Betreuung bakteriämischer Patienten, z. B. im Rahmen von Antibiotic-Stewardship-Programmen, sowohl das Ausmaß des Nutzens als auch den Anteil profitierender Patienten bei beschleunigter Erregeridentifizierung zu reduzieren (Osthoff et al. 2017).

2.3 Erregernachweis bei Bakteriämie

Das schnellste Verfahren zum direkten Erregernachweis bei Bakteriämie ist die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Kommerziell verfügbare Testsysteme erlauben damit die Identifizierung von Bakteriämieerregern innerhalb von 6 bis 8 Stunden. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes und der beträchtlichen Kosten konnte sich die Technik bisher jedoch nicht in der mikrobiologischen Routinediagnostik etablieren. In der Mehrzahl der Fälle erfolgt der Erregernachweis daher durch Anzucht in Blutkulturen. Dabei werden aerob und anaerob zu bebrütende Flüssigmedien mit einer definierten Menge Blut inokuliert und bei 35-37 °C inkubiert. Durch die kontinuierliche Überwachung des Bakterienwachstums in modernen automatisierten Blutkultursystemen konnte die durchschnittliche Zeit bis zur Detektion von Erregerwachstum inzwischen auf nur noch ca. 15 h (Klouche und Schröder 2008) reduziert werden. In mehr als 90 % der Fälle gelingt die Erregeranzucht innerhalb der ersten 48 Stunden nach Probenentnahme (Reisner und Woods 1999). Zum Zeitpunkt der Positivität wird zunächst eine orientierende morphologische Charakterisierung der angezüchteten Erreger anhand eines Grampräparats vorgenommen. Anschließend erfolgt eine Subkultur auf Festnährmedien zur weiteren Differenzierung und Empfindlichkeitsprüfung (Seifert et al. 2007). In Abhängigkeit von den dabei eingesetzten Verfahren (MALDI-TOF Massenspektrometrie, Biochemische Typisierung, Sequenzierung) beansprucht die endgültige Erregeridentifizierung 1

bis 3 Tage. Als Folge dieser zeitlichen Verzögerung zwischen primärer Anzucht in der Flüssigkultur und endgültiger Erregerdifferenzierung hat daher im klinischen Alltag vor allem das wenig differenzierte Ergebnis des unmittelbar zum Zeitpunkt der Positivität durchgeführten Grampräparats einen relevanten Einfluss auf das therapeutische Vorgehen, während die mit erheblich größerem Aufwand gewonnenen Informationen zu Speziesidentität und Empfindlichkeit nur selten zu Umstellungen der Therapie führen (Munson et al. 2003).

2.4 Direkte Identifizierung von Bakterien in positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie

Durch Anwendung molekularbiologischer Verfahren zur Direktidentifizierung von Mikroorganismen in positiven Blutkulturen kann die Zeit bis zum Vorliegen der Erregeridentifizierung bei positiven Blutkulturen im Vergleich zur konventionellen Identifizierung nach Subkultur auf Festnährmedien um mindestens einen Tag verkürzt werden. Dadurch stehen in der Frühphase der Infektion wesentlich detailliertere Informationen zum auslösenden Erreger zur Verfügung als durch die zu diesem Zeitpunkt sonst übliche mikromorphologische Charakterisierung durch Gramfärbung von Blutkulturausstrichen. Allerdings ist die Mehrzahl der zu diesem Zweck erprobten Verfahren, wie PCR, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder DNA-Microarrays, kostenintensiv, arbeitsaufwändig oder nicht für die Identifikation eines breiten Erregerspektrums geeignet (Schrenzel 2007; Klouche und Schröder 2008).

Mit dem Aufkommen entsprechender kommerzieller Systeme hat der Einsatz der MALDI-TOF Massenspektrometrie zur Identifizierung von Mikroorganismen in der mikrobiologischen Routinediagnostik in den letzten Jahren stetig zugenommen und in den meisten Laboren die biochemische Differenzierung als Standardverfahren zur Speziesidentifizierung angezüchteter Bakterien und Hefen abgelöst (Seng et al. 2009). Das Prinzip des Verfahrens wurde bereits 1996 beschrieben (Claydon et al. 1996; Holland et al.

1996): Intakte Bakterien oder Proteinextrakte werden auf einem geeigneten Probenträger in eine niedermolekulare Matrix eingebettet und mit Laserimpulsen beschossen. Durch den Beschuss werden Proben- und Matrixmoleküle in die Gasphase überführt und zum Teil ionisiert. Die geladenen Moleküle werden in einem elektrostatischen Feld in Richtung auf einen Detektor beschleunigt, mit dessen Hilfe Flugzeit und Signalintensität registriert werden (Abbildung 1).

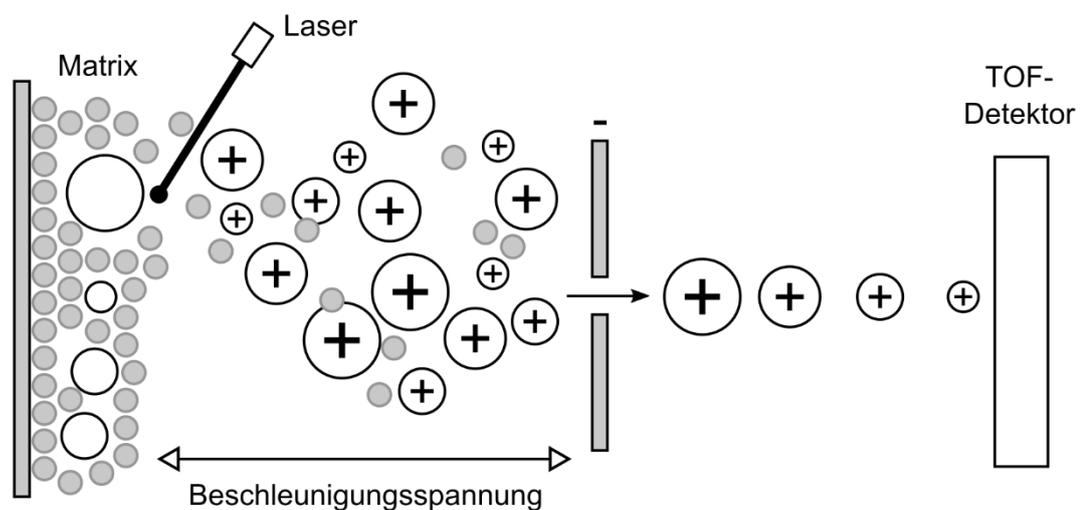


Abbildung 1: Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie (nach Sauer 2010).

Die Probe wird auf den Probenträger aufgebracht und mit Matrixlösung fixiert. Durch Laserbeschuss werden Proben- (weiß) und Matrixmoleküle (grau) als Gas aus dem Matrixkristall gelöst (Desorption) und ionisiert. Die Ionen werden mittels Hochspannung in Richtung des Detektors beschleunigt. Aus der registrierten Flugzeit (Time of Flight, TOF) kann das Masse-Ladungs-Verhältnis einzelner Molekülspezies abgeleitet werden.

Aus der gemessenen Flugzeit können über die bekannten Verhältnisse von Teilchenladung, kinetischer Energie und Teilchenmasse die Masse-Ladungsverhältnisse der einzelnen Molekülspezies abgeleitet werden. Der Auftrag von Signalintensität über das Masse-Ladungsverhältnis ergibt ein Probenspezifisches Massenspektrum, in dem einzelne Molekülspezies durch umschriebene Spitzen (Peaks) repräsentiert sind (Abbildung 2). Durch Abgleich dieses Massenspektrums mit Referenzspektrums in einer

Datenbank ist in der Regel eine eindeutige Spezieszuordnung des getesteten Erregers möglich (Drancourt 2010; Sauer und Kliem 2010).

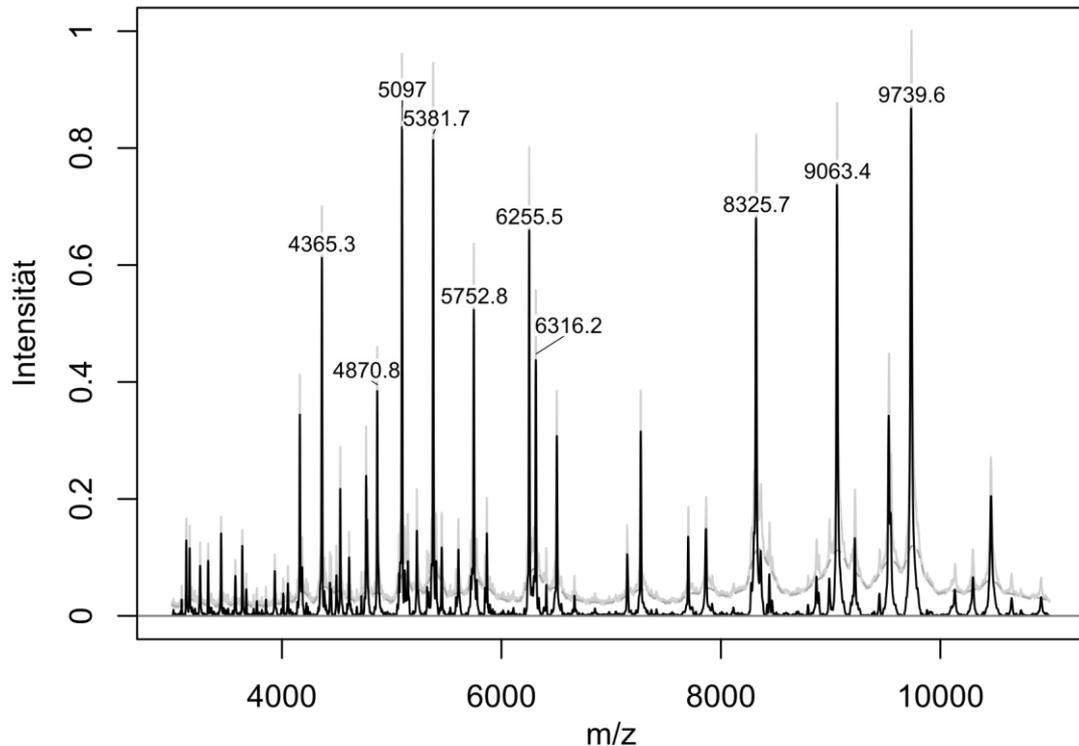


Abbildung 2: Massenspektrum von *E. coli* nach Probenvorbereitung durch Ameisensäureextraktion.

Rohspektrum in hellgrau, Grundlinie (gestrichelt) in dunkelgrau, prozessiertes Spektrum (geglättet, Grundlinie subtrahiert) in schwarz. Die zehn Peaks mit der höchsten Intensität sind mit dem jeweiligen m/z-Wert (Verhältnis aus Teilchenmasse und Teilchenladung) beschriftet.

Im Vergleich zu biochemischen oder sequenzbasierten Verfahren ermöglicht die MALDI-TOF Massenspektrometrie eine schnellere Identifizierung bei deutlich niedrigeren Verbrauchsmittelkosten (Emonet et al. 2010). Im Rahmen der Blutkulturdiagnostik kann durch den Einsatz der Technologie zur Erregeridentifizierung nach Subkultur die Zeit bis zum Vorliegen der endgültigen Speziesidentifizierung im Vergleich zur biochemischen Typisierung in der Regel bereits um einen Tag verkürzt werden. Verfahren zur Aufreinigung von Mikroorganismen aus Flüssigkulturen ermöglichen darüber

hinaus die direkte massenspektrometrische Erregeridentifizierung aus positiven Blutkulturen unter Verzicht auf die zeitintensive Subkultivierung.

Die für diesen Zweck entwickelten Protokolle zur Probenvorbereitung nutzen unterschiedliche chemische oder physikalische Methoden mit dem Ziel, Probenbestandteile, die das bakterielle Spektrum stören oder überlagern, zu entfernen. Erfolgreich erprobt wurden Lysiszentrifugation (LZ) (Kok et al. 2011; Schubert et al. 2011; Buchan et al. 2012; Klein et al. 2012; Lagacé-Wiens et al. 2012; Loonen et al. 2012; Saffert et al. 2012), differentielles Zentrifugieren (DZ) (La Scola und Raoult 2009; Christner et al. 2010) und Verfahren, die die Grundprinzipien der vorgenannten Ansätze kombinieren (DLZ) (Prod'hom et al. 2010; Stevenson et al. 2010). Bei der Lysiszentrifugation werden durch den Zusatz von Detergenzien Zellen in der Blutkulturflüssigkeit zerstört, um ihre Bestandteile nach Zentrifugation mit dem Überstand entfernen zu können. Das differentielle Zentrifugieren nutzt die unterschiedlichen Massen von Mikroorganismen und Blutzellen zur Trennung durch die Kombination mehrerer Zentrifugationsschritte mit unterschiedlicher Geschwindigkeit. Bei der differentiellen Lysiszentrifugation werden beide Prinzipien hintereinander angewendet. Alle Verfahren ermöglichen eine Erregeridentifikation binnen maximal zwei Stunden; zur Durchführung der Lysiszentrifugation ist mittlerweile ein CE-zertifizierter Reagenziensatz verfügbar (Bruker MBT Sepsityper).

In Studien wurden für die verschiedenen Verfahren Identifikationsraten zwischen 61 % und 87 % ermittelt (Tabelle 2). Aktuelle Übersichtsarbeiten berichten, je nach Studiauswahl und Bewertungskriterien, Identifikationsraten zwischen 74 und 93 % (Morgenthaler und Kostrzewa 2015; Scott et al. 2016). Nur in wenigen Arbeiten wurden dabei mehrere Verfahren zur Probenvorbereitung direkt verglichen (Loonen et al. 2012). Wegen der geringen Anzahl an Veröffentlichungen zu einzelnen in-house-Protokollen und der zum Teil beträchtlichen Heterogenität der Arbeiten im Hinblick auf die verwendeten Bewertungskriterien und das untersuchte Probenkollektiv erscheinen vergleichende Aussagen im Hinblick auf Effektivität der einzelnen Protokolle schwierig.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher drei Verfahren zur direkten Identifikation von Bakterien aus positiven Blutkulturen, die den unterschiedlichen Extraktionsprinzipien (DZ, DLZ, LZ) zugeordnet werden können, unter Verwendung eines standardisierten Testprotokolls verglichen werden.

Tabelle 2: Studien zur Direktidentifizierung von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen

Referenz	Methode	Untersuchte Proben	ID-Rate¹
La Scola und Raoult 2009	DZ	240	75 %
Christner et al. 2010	DZ	277	87 %
Stevenson et al. 2009	DLZ	212	76 %
Prod'hom et al. 2010	DLZ	122	79 %
Loonen et al. 2011	LZ	101	78 %
Schubert et al. 2011	LZ	456	61 %
Kok et al. 2011	LZ	472	75 %
Saffert et al. 2012	LZ	101	76 %
Klein et al. 2012	LZ	123	81 %
Lagace-Wiens et al. 2012	LZ	62	79 %
Buchan et al. 2012	LZ	145	84 %

1) Anteil der Proben mit korrekter Identifizierung bei Verwendung eines Identifikations-score-Cutoffs von 1,7 (außer bei La Scola und Raoult 2009).

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Bakterienstämme

Stamm	WDCM-Nummer
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	00025
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	-
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	00087

3.1.2 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller/Lieferant
Bactec Plus Aerobic/F Blutkulturflasche ¹	Becton Dickinson
Columbia Blutagar mit Schafblut ¹	Oxoid
BHI-Agar ²	Oxoid

1) Gebrauchsfertiges Medium

2) Fertigmischung, nach Herstellerangaben zubereitet

3.1.3 Laborgeräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Blutkultursystem	Bactec 9240	Becton Dickinson
Brutschrank	keine Angabe	Heraeus
Massenspektrometer	Microflex LT	Bruker Daltonik
Photometer	Ultrospec 3100 pro	Amersham Bioscience
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex-Mixer	keine Angabe	Heidolph
Wasserbad	keine Angabe.	keine Angabe
Zentrifugen	Biofuge pico	Heraeus
	Centrifuge 5417 R	Eppendorf
	Megafuge 3.0 R	Heraeus
	Multifuge 1 s-R	Heraeus

3.1.4 Zubehör und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
1,5 ml Reaktionsgefäß	Eppendorf
12 ml PS-Zentrifugenröhrchen	Greiner bio-one
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt
Einwegpasteurpipette	Assistent
Safety-Multifly Set	Sarstedt
BD Eclipse Needle 21 G*11/2 TW (0,8 mm*40 mm)	Becton Dickinson
Vacuette 8 ml	Greiner bio-one
Z Serum Sep Clot Activator	
B/Braun Injekt 10 ml Spritzen	B. Braun
MSP 96 Probenträger (ground steel)	Bruker Daltonik

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien und Chemikalien lagen, wenn nicht anders bezeichnet, als analysereine Substanzen vor.

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Acetonitril	Sigma-Aldrich
Ameisensäure	Sigma-Aldrich
α -4-Cyano-hydroxycinnamic acid	Bruker Daltonik
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth
Ethanol	Sigma-Aldrich
KCl	Merck
KH_2PO_4	Merck
NaCl	J.T. Baker
NaHCO_3	Merck
Na_2HPO_4	Merck
NH_4Cl	Merck
Trifluoressigsäure	Sigma-Aldrich
Wasser	Sigma-Aldrich

3.1.6 Reagenziensätze

Reagenziensatz	Hersteller/Lieferant
MALDI Sepsityper Kit	Buker Daltonik

3.1.7 Lösungen

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 121 °C und 214 kPa für 20 min autoklaviert.

Phosphatgepufferte Salzlösung, pH 7,3-7,4 (PBS)

8 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

0,2 g KCl

Zweifach destilliertes Wasser ad 1 l

RBC-Lysis-Lösung

0,186 g EDTA Dinatriumsalz Dihydrat

4,15 g NH₄Cl

0,84 g NaHCO₃

495 ml zweifach destilliertes Wasser

HCCA-Matrixlösung (nicht autoklaviert)

475 µl Wasser

25 µl Trifluoroessigsäure

500 µl Acetonitril

4-α-Cyano-hydroxycinnamic-acid (bis Lösung gesättigt ist)

3.1.8 Software

R 3.0.3 (R Core Team 2014)

MALDI Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Billerica, MA)

3.2 Methoden

3.2.1 Studienaufbau

Sterile Blutkulturflaschen (BD Bactec Plus Aerobic/F) wurden mit 10 ml Blut beimpft und einen Tag bzw. sieben Tage im BACTEC 9240 Blutkultursystem bei 36 ± 1 °C bebrütet. Die präinkubierten Blutkulturen wurden anschließend mit 10^6 bis 10^9 koloniebildenden Einheiten (KBE)/ml verschiedener Referenzstämmen versetzt. Die so erzeugten Blutkulturen mit definierter Erregerlast wurden mit verschiedenen Probenaufbereitungsverfahren zum Erregerdirektnachweis mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie untersucht.

3.2.2 Gewinnung und Vorbereitung des Untersuchungsmaterials

Je 10 ml Blut wurden direkt nach der Gewinnung durch Venenpunktion unter sterilen Bedingungen in BD Bactec Plus Aerobic/F-Flaschen überführt und bei 36 ± 1 °C in einem Bactec 9240 Blutkultursystem für einen bzw. sieben Tage inkubiert. Vom Inkubator als bewachsen gemeldete Blutkulturflaschen wurden als kontaminiert aussortiert, zusätzlich wurden zur Sterilkontrolle von jeder verarbeiteten Blutkulturflasche 50 µl auf Columbia-Agar mit Schafblut im Dreiösenausstrich aufgetragen und 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen bebrütet. Das vorbebrütete Blutkulturmedium wurde unmittelbar vor Durchführung der weiteren Experimente mit sterilen Kanülen und Spritzen in 50 ml-Polypropylen-Teströhrchen überführt.

3.2.3 Stammhaltung und Kultur der verwendeten Bakterienstämme

Die für die Versuchsreihen verwendeten Referenzstämmen *Staphylococcus aureus* Newman, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Escherichia coli* DH5α und *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 wurden bei -80 °C in Cryobank-Röhrchen gelagert. Die eingefrorenen Proben wurden zur Herstellung von Primärkulturen auf Columbia Agar mit Schafblut verwendet. Für die experimentellen Arbeiten wurden ausgehend von dieser Primärkultur zunächst Stammkulturen durch Subkultivierung auf Columbia-Agar mit

Schafblut angelegt. Diese Stammkulturen wurden für 24 h bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert und anschließend bei 4 °C im Kühlschrank für maximal sieben Tage aufbewahrt. Nach dieser Zeit wurden Stammkulturen bei Bedarf durch Passage auf Columbia-Agar mit Schafblut erneuert. Spätestens nach vier Passagen wurde mit einer neu angefertigten Primärkultur fortgefahren. Für die Herstellung von Blutkulturen mit definierter Bakterienkonzentration wurden jeweils frische Subkulturen der Stammkultur auf Columbia Agar mit Schafsblut angelegt und bei 37 °C unter aeroben Bedingungen inkubiert (Abbildung 3). Die Inkubationszeit für diese Kulturen betrug $18 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ für *S. aureus*, *E. coli* und *P. aeruginosa* und $24 \text{ h} \pm 2 \text{ h}$ für *E. faecalis*.

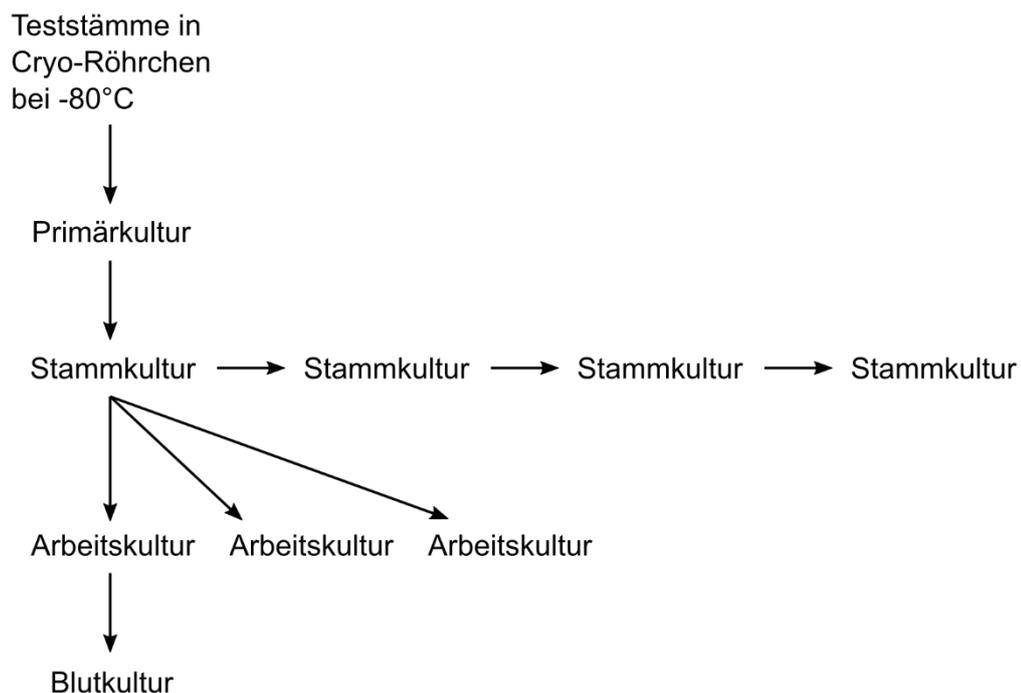


Abbildung 3: Kultivierung der Referenzstämmen.

Die Subkultur der aufgetauten Primärkultur (Stammkultur) wurde alle sieben Tage passagiert und bei 4 °C gelagert. Zur Erstellung der Blutkulturen mit definierter Bakterienkonzentration wurden diese Stammkulturen erneut passagiert (Arbeitskultur) und 18 bzw. 24 Stunden (je nach Spezies, siehe Text) unter aeroben Bedingungen bebrütet.

3.2.4 Korrelation zwischen optischer Dichte und Bakterienkonzentration

Anhand von quantitativen Kulturen im Plattengussverfahren wurde für jeden Studienstamm die Bakterienkonzentration, die bei einer bestimmten optischen Dichte in einer Bakterien-PBS-Suspension vorliegt, ermittelt. Hierfür wurden Bakteriensuspensionen erstellt, deren optische Dichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm, im linearen Messbereich des Photometers zwischen 0,1 A bis 0,5 A lag. Diese Bakteriensuspensionen wurde in dreistufigen Verdünnungsreihen mit dem Verdünnungsfaktor 1:100 je Verdünnungsstufe (400 µl ad 39,6 ml) verdünnt. Jeweils viermal 1 ml der Bakteriensuspension der letzten Verdünnungsstufe ($1:1 \times 10^6$) wurden mit 15 ml 48 °C warmem BHI-Agar vermischt in 90 mm Petrischalen ausplattiert und nach dem Erhärten des Agars bei 37 °C für 48 h inkubiert. Unter Berücksichtigung der Verdünnungsfaktoren wurde die Zahl der gewachsenen Kolonien ins Verhältnis zur optischen Dichte der Ausgangssuspension gesetzt. Dabei wurden nur quantitative Kulturansätze mit einer Koloniezahl zwischen 30 und 300 Kolonien pro Platte berücksichtigt. Für jeden Bakterienstamm wurden die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen gemittelt.

3.2.5 Herstellung von Blutkulturproben mit definierter Bakterienkonzentration

Unter Berücksichtigung der zuvor ermittelten Korrelation von optischer Dichte und Bakterienkonzentration (siehe Abschnitt 3.2.4) wurden zunächst Suspensionen der verschiedenen Teststämme in PBS mit einer Bakterienkonzentration von ca. 1×10^{10} KBE/ml hergestellt. Dazu wurden 2 ml eiskühles PBS-Medium solange mit Bakterien von einer frischen Kultur auf Columbia Blutagar versetzt, bis die optische Dichte der 50-fach verdünnten Suspension (100 µl ad 4,9 ml) bei einer Wellenlänge von 600 nm im Bereich von 0,3 A bis 0,5 A lag. Mit dieser Suspension wurden Blutkulturproben mit Bakterienkonzentrationen von ca. 1×10^6 KBE/ml bis 1×10^9 KBE/ml angefertigt. Dazu wurde die Ausgangssuspension in einer vierstufigen Verdünnungsreihe mit einem Verdünnungsfaktor von 1:10 je Verdünnungsstufe (900 µl ad 8,1 ml) mit vorbebrütetem Blutkulturmedium vermischt. Nach

jedem Verdünnungsschritt wurde die Probe für mindestens 7 Sekunden auf dem Vortexmixer gemischt. Zur Kontrolle der tatsächlich erreichten Bakterienkonzentration wurde, nach entsprechender Vorverdünnung der Proben, eine Keimzahlbestimmung im Plattengussverfahren wie in Abschnitt 3.2.4 beschrieben durchgeführt.

3.2.6 Extraktion von Bakterien aus positiven Blutkulturen

Die drei im Folgenden beschriebenen Verfahren zur Extraktion von Bakterien aus positiven Blutkulturen wurden jeweils mit 24 h bzw. sieben Tage bei 35 °C präinkubierten Blutkulturen und vier Referenzstämmen durchgeführt. Jedes Protokoll wurde für jede Bakterienart mit mindestens sechs für 24 h präinkubierten und mindestens drei für sieben Tage präinkubierten Blutkulturproben angewendet. Alle Arbeitsschritte der folgenden Protokolle wurden, sofern nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.2.6.1 Differentielles Zentrifugieren

Zur Extraktion von Bakterien aus Blutkulturproben unter Ausnutzung der unterschiedlichen Sedimentationskoeffizienten von Bakterien und Probenbestandteilen wurde das von Christner et al. adaptierte Verfahren benutzt (Christner et al. 2010). Sechs ml Blutkulturmedium wurden in ein 12 ml PS-Zentrifugenröhrchen gefüllt und 10 min bei 140 g in einer Megafuge 3.0 R zentrifugiert. Bei diesem Zentrifugationsschritt werden die in der Probe enthaltenen Erythrozyten pelletiert, während ein Großteil der Bakterien im Überstand verbleibt. 4 ml des bakterienhaltigen Überstands wurden mit einer Plastikeinwegpipette in ein neues 12 ml PS-Röhrchen überführt. Der Überstand wurde mit 2 ml destilliertem Wasser versetzt, um eine hypotone Lyse der restlichen Erythrozyten zu erreichen. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugieren für 5 min bei 1000 g (Megafuge 3.0 R) pelletiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Bakterienpellet in 1 ml destilliertem Wasser suspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 2 min bei 12000 g (Biofuge pico) zentrifugiert. Der Überstand mit den restlichen Blutkulturbestandteilen wurde verworfen. Für die weitere Aufarbeitung mittels Ethanol-Ameisensäure-Extraktion wurde das

Bakterienpellet in 300 µl destilliertem Wasser suspendiert und mit 900 µl Ethanol vermischt. Durch Zentrifugieren für 2 min bei 12000 g in einer Biofuge pico wurden die Bakterien erneut pelletiert und der Überstand abpipettiert. Um verbliebene Ethanolrückstände zu beseitigen, wurde ein zweites Mal zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Probe mit geöffnetem Deckel für 5 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Pellet vollständig in 50 µl 70-prozentiger Ameisensäure suspendiert. Nach 5 Minuten wurden 50 µl Acetonitril zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Nach weiteren 5 Minuten wurden die Extrakte für 2 min bei 12000 g (Biofuge pico) zentrifugiert. Fünfzig µl Überstand wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für die anschließende Messung im Massenspektrometer verwendet.

3.2.6.2 Lysiszentrifugation

Zur Extraktion von Bakterien aus Blutkulturproben durch Lyse der in den Proben enthaltenen Blutzellen wurde das Sepsityper-Kit der Firma Bruker gemäß Herstellerangaben eingesetzt. 1 ml Blutkulturmedium wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Probe wurde zum Lysieren der Erythrozyten mit 200 µl Lösung 1 versetzt und 10 s im Vortexmischer gemischt. Die in der Probe enthaltenen Bakterien wurden durch Zentrifugieren für 1 min bei 12000 g in einer Biofuge pico pelletiert und der Überstand mit den zerstörten Erythrozyten abpipettiert. Das Pellet wurde zum Lysieren der verbliebenen Blutzellen in 1 ml Lösung 2 suspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 12000 g für 1 min (Biofuge pico) wurde der Überstand mit den restlichen Blutkulturbestandteilen verworfen. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte durch Ethanol-Ameisensäure-Extraktion wie in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben.

3.2.6.3 Differentielle Lysiszentrifugation

Die differentielle Lysiszentrifugation in der Version von Stevenson et al. kombiniert die Prinzipien der beiden vorbeschriebenen Ansätze (Stevenson et al. 2010). Je 3,5 ml der Probe wurden in zwei VACUETTE 8 ml Z Serum Sep Clot Activator Röhrchen gefüllt und für 2 min bei 4400 g (MULTIFUGE 1 s-R) zentrifugiert um die die Erythrozyten unterhalb des in

den Röhrcchen enthaltenen Polymergels zu pelletieren. Die Bakterien setzten sich dabei in einer dünnen Schicht auf der Oberfläche des Gels ab. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette aus Polyäthylen ohne Beschädigung des Gels entfernt. Dabei wurden je 0,5 ml Überstand in den Röhrcchen belassen. Diese wurden anschließend genutzt, um das Bakterienpellet zu resuspendieren. Die Bakteriensuspensionen aus beiden VACUETTE 8 ml Z Serum Sep Clot Activator Röhrcchen einer Probe wurden in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß zusammengeführt. Danach erfolgte ein langsamer Zentrifugationsschritt für 1 min bei 106 g (Eppendorf Centrifuge 5417 R), um verbliebene Erythrozyten zu pelletieren. Der Bakterien enthaltende Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und für 1 min bei 12000 g zentrifugiert (Biofuge pico). Nach Entfernen des Überstands wurde das Pellet in 1 ml RBC-Lysis-Lösung resuspendiert und für 10 min bei 35 °C in einem Thermomixer comfort inkubiert, um verbliebene Erythrozyten zu lysieren. Nach erneuter Zentrifugation für 1 min bei 12000 g (Biofuge pico) wurde der Überstand entfernt. Danach wurde das Pellet in 1 ml destilliertem Wasser resuspendiert, 1 min bei 12000 g zentrifugiert (Biofuge pico) und der Überstand verworfen. Die weitere Aufarbeitung der Proben erfolgte, wie in Abschnitt 3.2.6.1 beschrieben, durch Ethanol-Ameisensäure-Extraktion.

3.2.7 MALDI-TOF Massenspektrometrie

3.2.7.1 Probenträgervorbereitung und -beschickung

Die Messung der Proben mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie wurde jeweils am Tag der Extraktion vorgenommen. Die für die Messung verwendeten Probenträger wurden vor der Beschickung mit Probenmaterial für 3 min im Ultraschallbad mit Desinfektionslösung gereinigt, wiederholt mit destilliertem Wasser gewaschen und abschließend mit 1 ml Methanol von möglichen Fettrückständen befreit. Jede Probe wurde auf fünf Feldern eines Edelstahl-Probenträgers gemessen (technische Replikate). Dazu wurde je 1 µl Probe ins Zentrum der Messfelder pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss daran wurden die vollständig getrockneten Proben mit jeweils 1,5 µl Matrixlösung (4- α -Cyano-

hydroxycinnamic-acid) überschichtet. Auch diese Schicht wurde für 10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Der Ort an dem der Träger zum Trocknen platziert wurde, wurde für alle Messungen beibehalten, um störende Einflüsse durch wechselnde klimatische Verhältnisse (z. B. Temperatur, Luftströmungen, Luftfeuchtigkeit etc.) möglichst gering zu halten.

3.2.7.2 MALDI-TOF-Messung und Datenverarbeitung

Die Messung erfolgte in einem Bruker Microflex LT Massenspektrometer im linear positiven Modus bei einer Laserimpulsfrequenz von 20 Hz, einer Beschleunigungsspannung von 20 kV und einer Pulsdauer von jeweils 250 ns. Erfasst wurden Signale mit einem Masse-Ladungsverhältnis im Bereich von 2000 bis 20000 m/z. Für die Kalibrierung des Massenspektrometers wurde ein Proteingemisch im entsprechenden Massebereich verwendet (Bruker Bacterial Test Standard). Von jedem Messfeld wurde ein Summenspektrum aus 280 Einzelspektren akquiriert. Die Weiterverarbeitung der Summenspektren erfolgte mit der MALDI-Biotyper 2.0 Software. Unter Verwendung der Standardeinstellungen für die Identifizierung von Mikroorganismen wurde für jedes Summenspektrum die Biotyper-ID mit zugehörigem Identifikationsscore ermittelt. Die Biotyper-ID entspricht der Speziesbezeichnung Referenzspektrums in der Biotyper-Datenbank mit der größten Ähnlichkeit zum Testspektrum. Der Identifikationsscore ist ein logarithmisch skaliertes Ähnlichkeitswert zwischen 0 und 3, der den Grad spektraler Übereinstimmung mit dem jeweiligen Referenzspektrum bemisst (Sauer et al. 2008). Als Biotyper-ID und Identifikationsscore einer Probe wurden ID und Identifikationsscore der Replikatmessung mit dem höchsten Identifikationsscore verwendet.

3.2.8 Datenauswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit R 3.0.3 (R Core Team 2014). Unter Verwendung des Programmpakets nlme 3.1-117 (Pinheiro et al. 2014) wurden verschiedene nicht-lineare Regressionsmodelle zur Beschreibung und Interpretation der experimentellen Daten generiert (Pinheiro und Bates 2000; Ritz und Streibig 2008; Zuur 2009). Die Validierung der Modelle

erfolgte im Wesentlichen mit Hilfe von Residualplots, die mit dem Programmpaket car 2.0-20 (Fox et al. 2011) erzeugt wurden. Zur Berechnung von Konfidenzintervallen für die Vorhersagen aus nicht-linearen Regressionsmodellen wurde das Programmpaket propagate 1.0-4 (Spiess 2014) verwendet.

4 Ergebnisse

4.1 Korrelation von optischer Dichte und Bakterienkonzentration

Als Inokulum zur Herstellung von Blutproben mit definierter Keimzahl wurde eine Bakteriensuspension in PBS über die Messung der Absorption bei 600 nm (A_{600}) auf eine definierte Bakterienkonzentration eingestellt. Die dafür erforderliche Korrelation von Absorption und Bakterienkonzentration wurde durch quantitative Kultur im Plattengussverfahren ermittelt. Im Absorptionsbereich $A_{600} = 0,05$ bis $0,5$ zeigte sich ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Bakterienkonzentration. Tabelle 3 zeigt die in diesem Bereich gültigen Umrechnungsfaktoren zwischen Absorption und Bakterienkonzentration für die in der Arbeit verwendeten Stämme.

Tabelle 3: Korrelation von optischer Dichte und Bakterienkonzentration für PBS-Suspensionen der in der Studie verwendeten Stämme.

Stamm	A_{600} [AU]	Keimzahl [KBE]	Keimzahl/ A_{600} [KBE/ml/AU]
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	0,23	126 \pm 12	$5,6 \times 10^8$
	0,24	153 \pm 15	
	0,26	128 \pm 18	
<i>Staphylococcus aureus</i> Newman	0,20	72 \pm 25	$3,6 \times 10^8$
	0,23	104 \pm 20	
	0,31	81 \pm 20	
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0,24	48 \pm 7	$2,0 \times 10^8$
	0,25	52 \pm 14	
	0,30	55 \pm 12	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	0,14	225 \pm 27	$1,4 \times 10^8$
	0,15	198 \pm 4	
	0,14	180 \pm 13	

KBE: Koloniebildende; AU: arbitrary unit (englisch), willkürliche Einheit

4.2 Überprüfung der Bakterienkonzentration in den hergestellten Blutkulturproben

Um systematische Fehler durch falsch eingestellte Bakterienkonzentrationen beim Vergleich der verschiedenen Aufbereitungsverfahren auszuschließen, wurde die tatsächliche Bakterienkonzentration in den untersuchten Proben mittels quantitativer Kultur im Plattengussverfahren ermittelt. Die Verteilung der Bakterienkonzentrationen in den mit unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren untersuchten Blutkulturproben war jeweils näherungsweise symmetrisch (Schiefe -0,09 bis 0,31) ohne Anhalt für signifikante Varianzunterschiede zwischen den Verteilungen (Bartlett's B = 0,097; df = 2; p = 0,95). Im einfaktoriellen ANOVA zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den mittleren Bakterienkonzentrationen der mit unterschiedlichen Aufbereitungsverfahren untersuchten Proben (F = 0,975; df = 2; p = 0,38). Allerdings waren die Unterschiede im Logarithmus der gemessenen Bakterienkonzentration zwischen den unterschiedlichen Stämmen (Abbildung 4, Tabelle 4) statistisch signifikant (Kruskal-Wallis-Test; H = 63,8; df = 3; p < 0,0001).

Tabelle 4: Betrag der Differenz im Median der logarithmierten Bakterienkonzentration zwischen Blutproben mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen.

	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
<i>E. coli</i>	0	--	--	--
<i>E. faecalis</i>	0,503	0	--	--
<i>P. aeruginosa</i>	0,352	0,855	0	--
<i>S. aureus</i>	0,259	0,245	0,611	0

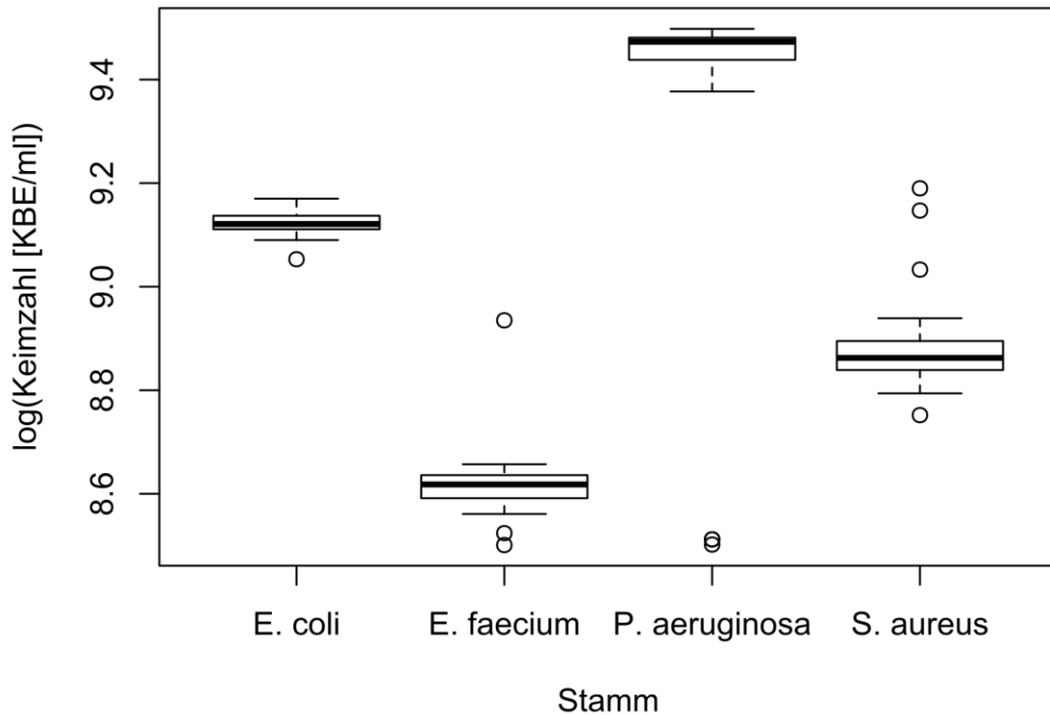


Abbildung 4: Bakterienkonzentration in den präparierten Blutproben.

Median (Linie) und Interquartilabstand IQR (Box) sowie $1,5 \times$ IQR (Antennen) der Bakterienkonzentration in den Blutproben mit der jeweils höchsten Bakterienkonzentration einer Verdünnungsreihe für alle untersuchten Stämme. Werte außerhalb des $1,5 \times$ IQR sind als separate Datenpunkte dargestellt. Die Anzahl der analysierten Proben betrug 103 (*E. coli*), 103 (*E. faecium*), 104 (*P. aeruginosa*), 101 (*S. aureus*).

Wegen der deutlichen Unterschiede der untersuchten Bakterienkonzentrationen zwischen den verschiedenen Spezies wurden die erzielten Identifikationsscores nicht direkt miteinander verglichen, sondern zur Modellierung des allgemeinen Zusammenhangs zwischen Bakterienkonzentration und Identifikationsscore unter den jeweiligen experimentellen Bedingungen genutzt.

4.3 Übersicht über die Ergebnisse der MALDI-TOF Messungen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden in 104 unabhängigen Experimenten insgesamt 416 Blutkulturproben untersucht. In jedem Experiment

Ergebnisse

wurden vier Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen (10-fache Verdünnungsreihe im Bereich zwischen 5×10^6 bis 5×10^9 KBE/ml) eines einzelnen Bakterienstammes in Blutkulturflüssigkeit eines bestimmten Alters (1 oder 7 Tage) mit einer der getesteten Methoden aufgearbeitet. Fünf Proben wurden nachträglich von der Analyse ausgeschlossen, da sich die gemessene Bakterienkonzentration außerhalb des vorgesehenen Zielbereichs befand. Die 411 eingeschlossenen Proben verteilten sich wie in Tabelle 5 angegeben auf die verschiedenen Bakterienstämme und Testmethoden.

Tabelle 5: Übersicht über die untersuchten Proben.

	DZ		LZ		DLZ	
	1 Tag	7 Tage	1 Tag	7 Tage	1 Tag	7 Tage
<i>E. coli</i>	24	11	20	12	24	12
<i>E. faecalis</i>	24	11	20	12	24	12
<i>P. aeruginosa</i>	24	12	20	12	24	12
<i>S. aureus</i>	24	9	20	12	24	12
Summe	96	43	80	48	96	48

DZ: Differentielles Zentrifugieren; LZ: Lysiszentrifugation; DLZ Differentielle Lysiszentrifugation

Von jeder aufgearbeiteten Probe wurden fünf Replikatspektren akquiriert. Die Gesamtzahl der ausgewerteten Spektren betrug 2055. In Abbildung 5 sind die Identifikationsscores aller Proben in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration dargestellt.

Ergebnisse

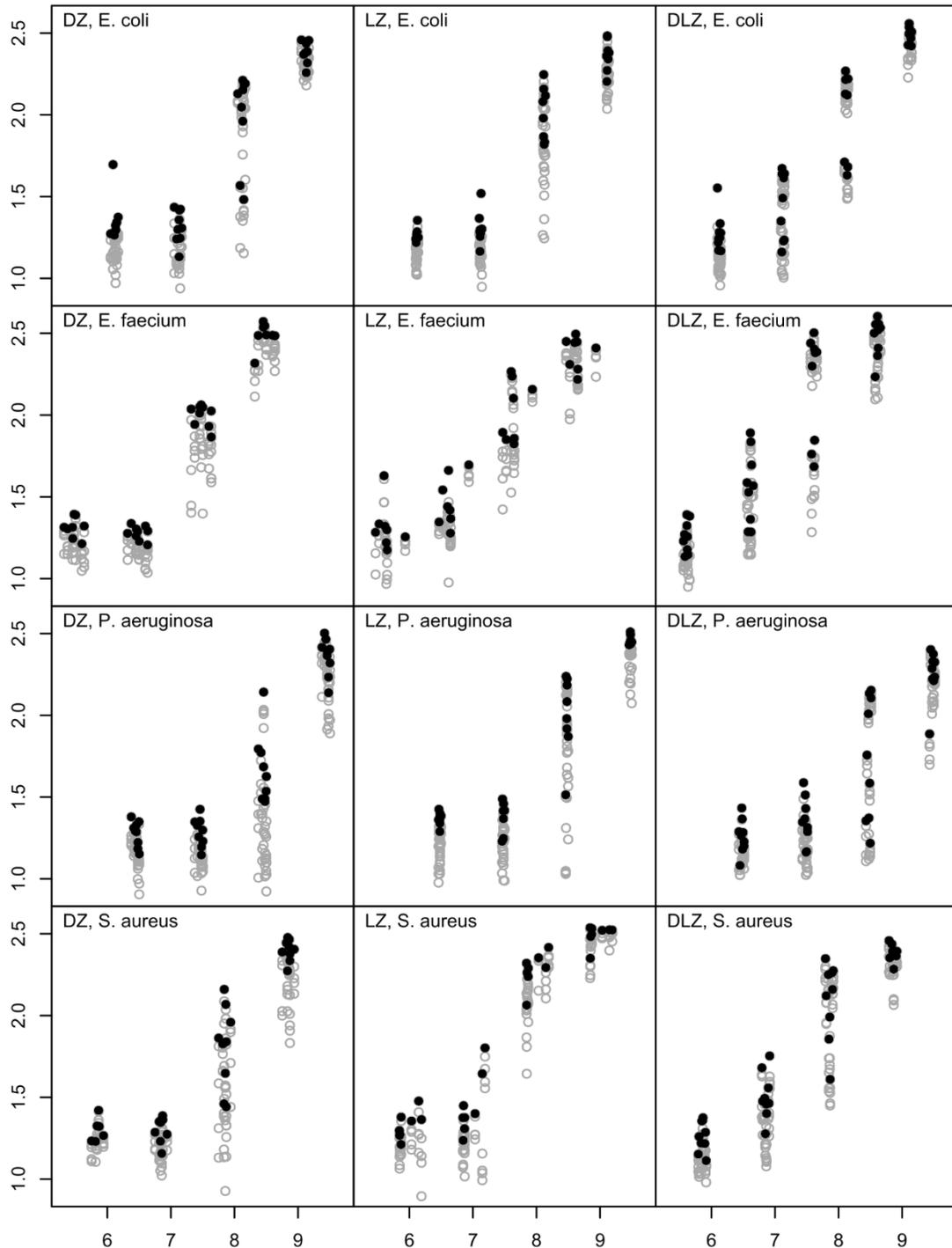


Abbildung 5: Identifikationsscores in Abhängigkeit vom Logarithmus der Bakterienkonzentration.

Dargestellt sind die Ergebnisse aller Einzelmessungen, gruppiert nach Stamm und Methode. Der jeweils höchste der in den fünf Replikatmessungen jeder Einzelprobe erzielte Identifikationsscore ist durch einen gefüllten Kreis hervorgehoben.

4.4 Deskriptive Statistik

4.4.1 Intra-Assay Variabilität

Der mittlere Variationskoeffizient der in Replikatmessungen erzielten Identifikationsscores betrug 5,7 % (Median: 4,7 %, IQR: 2,6 - 7,7 %). Eine besonders geringe Variabilität wurde in den Proben mit den niedrigsten bzw. höchsten Identifikationsscores beobachtet (Abbildung 6).

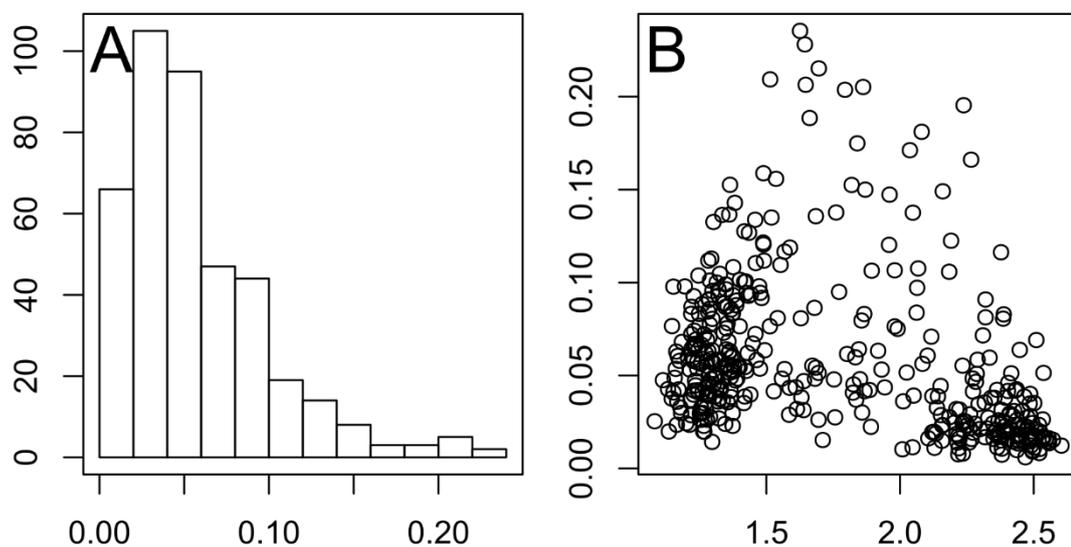


Abbildung 6: Intra-Assay-Variabilität des Identifikationsscores.

A: Absolute Häufigkeit der in Replikatmessungen ermittelten relativen Variationskoeffizienten. B: Relative Variationskoeffizienten in Abhängigkeit vom Identifikationsscore.

Bei Berücksichtigung der jeweiligen Probencharakteristika zeigten sich nur geringe Unterschiede der mittleren Variabilität in Abhängigkeit von der zur Probenaufarbeitung verwendeten Methode (Abbildung 7A), dem untersuchten Bakterienstamm (Abbildung 7B) oder dem Alter der untersuchten Blutkulturprobe (Abbildung 7C). Deutliche Unterschiede in der Variabilität wurden lediglich in Abhängigkeit von der Bakterienkonzentration beobachtet (Abbildung 7D, Kruskal-Wallis-Test; $H = 98,1$; $df = 3$; $p < 0,0001$).

Ergebnisse

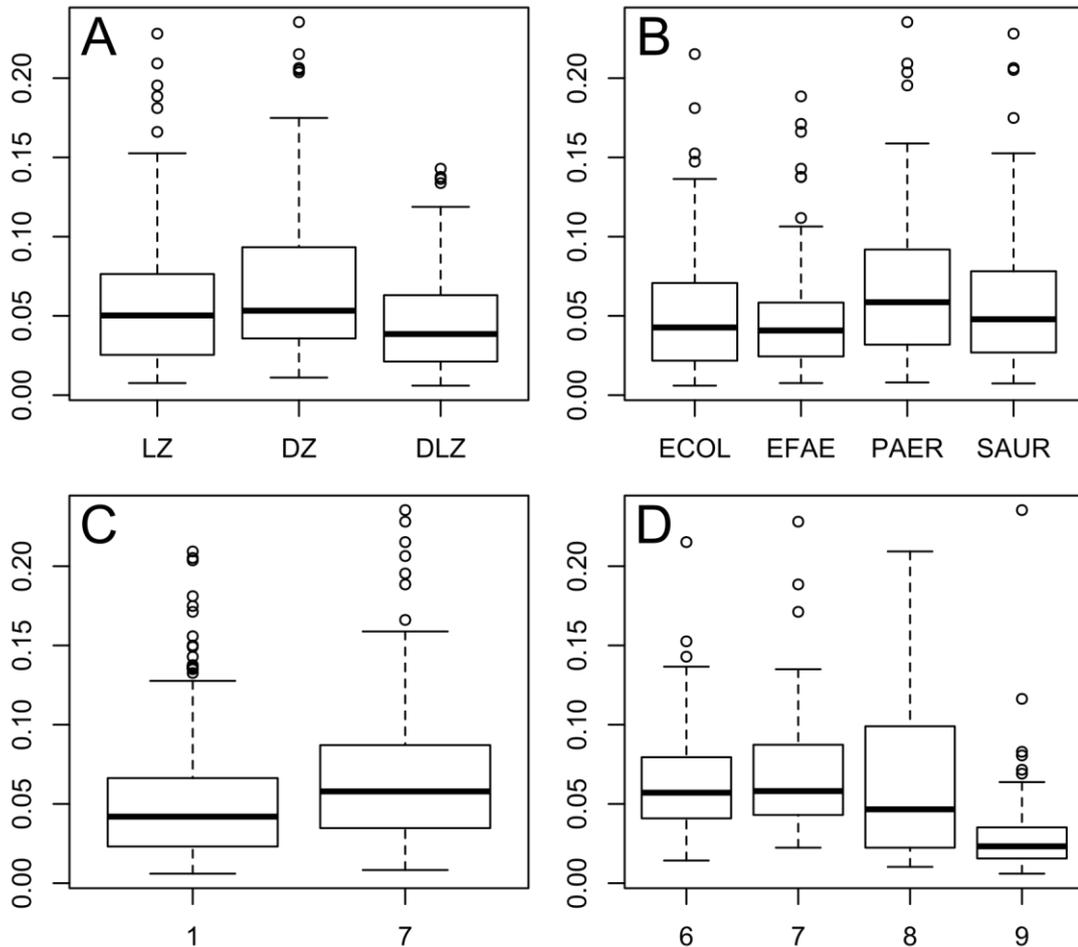


Abbildung 7: Median, Quartilsabstand (IQR) und $1,5 \times$ IQR der Variationskoeffizienten in Replikatmessungen in Abhängigkeit von verschiedenen Probeneigenschaften.

A: Methode der Probenaufarbeitung; B: Bakterienstamm; C: Alter der Blutkulturprobe; D: Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml.

Die Durchführung einer zweiten/dritten/vierten bzw. fünften Messung aus demselben Extrakt (technische Replikate) verbesserte den maximal erzielten Identifikationsscore im Mittel um 3,0 / 1,6 / 1,1 bzw. 0,8 %. Der Anteil der Proben, bei denen eine zweite / dritte / vierte bzw. fünfte Replikatmessung zu einer Verbesserung des maximal erzielten Identifikationsscores um mindestens 10 % führte, betrug 8,3 / 3,9 / 2,9 bzw. 2,0 %. Eine Verbesserung um mindestens 20 % konnte nur bei 2,9 / 1,2 / 0,4 bzw. 0,0 % durch eine zweite / dritte / vierte bzw. fünfte Replikatmessung erreicht werden.

4.4.2 Inter-Assay Variabilität

Echte Probenreplikate für eine exakte Bestimmung der Inter-Assay Variabilität wurden im Rahmen der vorliegenden Studie nicht untersucht. Allerdings waren die Abweichungen der eingestellten Bakterienkonzentrationen zwischen den für Wiederholungsmessungen unter ansonsten identischen Bedingungen (Methode, Kulturalter, Bakterienstamm) hergestellten Proben gering (siehe 0). Der Variationskoeffizient für Messungen des Identifikationsscores in diesen Pseudoreplikaten kann daher für eine konservative Schätzung der Inter-Assay Variabilität herangezogen werden. Der mittlere relative Variationskoeffizient über alle Proben betrug 6,2 % (Median: 4,6 %, IQR: 2,7 - 8,9 %, Abbildung 8A). Eine geringere Variabilität wurde in den Proben mit den niedrigsten bzw. höchsten Identifikationsscores beobachtet (Abbildung 8B).

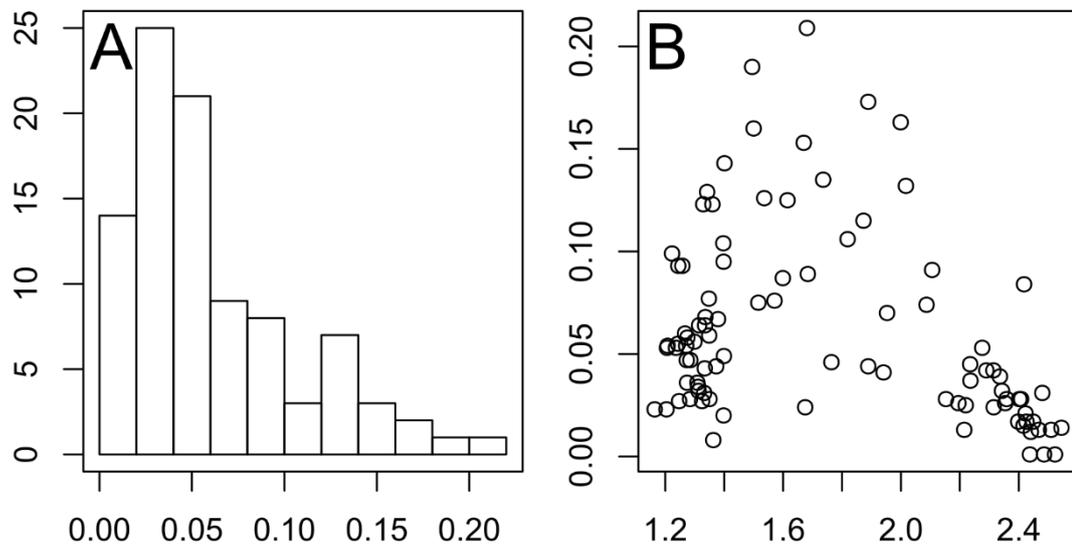


Abbildung 8: Geschätzte Inter-Assay Variabilität des Identifikationsscores.

A: Absolute Häufigkeit des in Pseudoreplikaten (siehe Text) ermittelten relativen Variationskoeffizienten. B: Relative Variationskoeffizienten in Abhängigkeit vom Identifikationsscore.

Es zeigten sich keine Unterschiede der mittleren Inter-Assay Variabilität in Abhängigkeit von der zur Probenaufarbeitung verwendeten Methode

(
 Abbildung 9A; Kruskal-Wallis-Test; $H = 0,39$; $df = 2$; $p = 0,82$), dem unter-
 suchten Bakterienstamm (
 Abbildung 9B; Kruskal-Wallis-Test; $H = 1,30$; $df = 3$; $p = 0,73$) oder dem
 Alter der untersuchten Blutkulturprobe (
 Abbildung 9C; Mann-Whitney U-Test; $W = 1183$, $p = 0,56$). Lediglich die im
 Zusammenhang mit der Bakterienkonzentration einhergehenden Variabili-
 tätsschwankungen waren statistisch signifikant (
 Abbildung 9D; Kruskal-Wallis-Test; $H = 24,8$; $df = 3$; $p < 0,0001$) und stan-
 den im Einklang mit der beobachteten Korrelation zwischen Bakterienkon-
 zentration und Identifikationsscore.

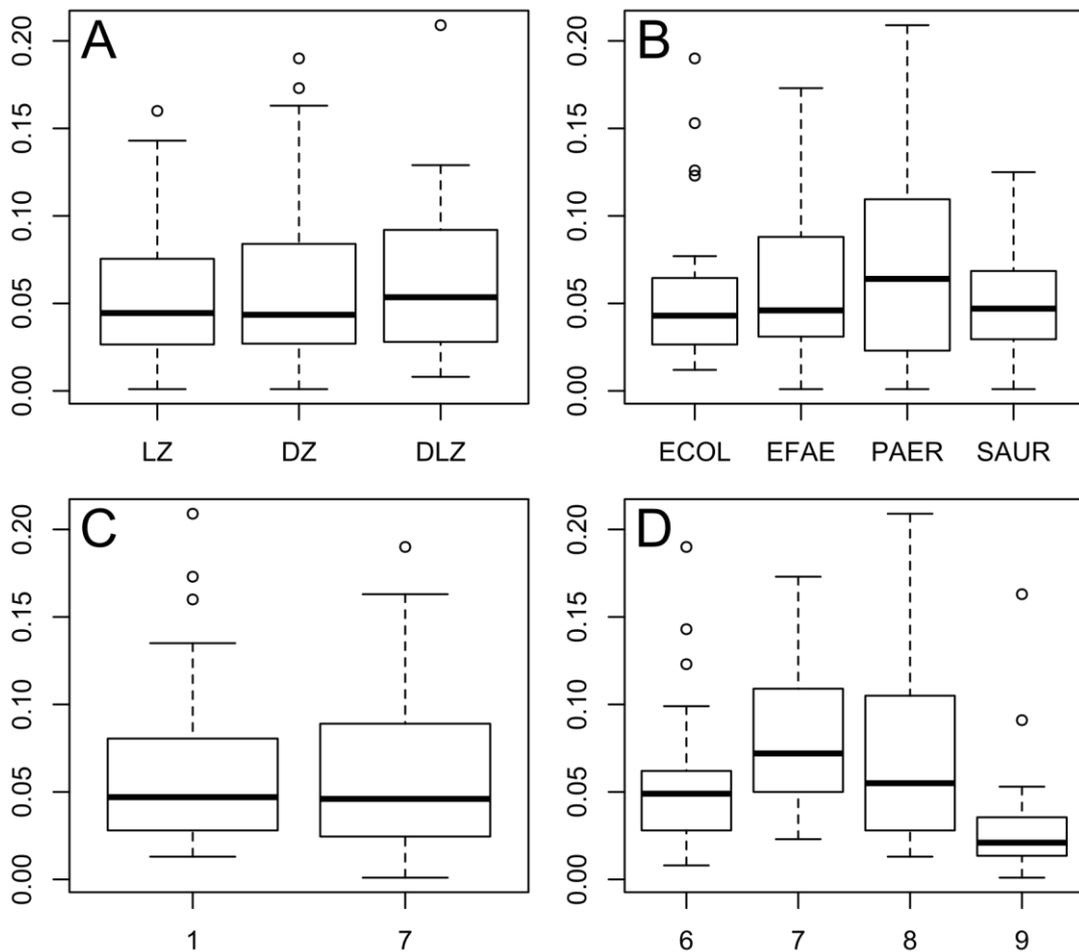


Abbildung 9: Median, Quartilsabstand (IQR) und $1,5 \times$ IQR der Variationskoeffizienten in Pseudoreplikaten (siehe Text) in Abhängigkeit von verschiedenen Probeneigenschaften.

A: Methode der Probenaufarbeitung; B: Bakterienstamm; C: Alter der Blutkulturprobe;
D: Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml.

4.5 Einfluss der Probeneigenschaften - Univariate Analyse

Die visuelle Datenauswertung zeigte einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Bakterienkonzentration einer Probe und dem erzielten Identifikationsscore (Abbildung 10G). Dieser Zusammenhang ließ sich über einen hochgradig signifikanten Kruskal-Wallis Test objektivieren ($H = 307,4$; $df = 3$; $p < 0,0001$; Abbildung 10H). Die univariate Analyse zeigte darüber hinaus keine signifikanten Unterschiede im Identifikationsscore in Abhängigkeit von den untersuchten Probeneigenschaften Bakterienstamm (Kruskal-Wallis-Test; $H = 4,1$; $df = 3$; $p = 0,25$; Abbildung 10D), Alter der Kultur (Mann-Whitney U-Test; $W = 20343$; $p = 0,21$; Abbildung 10F) oder der zur Probenaufarbeitung verwendeten Methode (Kruskal-Wallis-Test; $H = 1,6$; $df = 2$; $p = 0,45$; Abbildung 10B). Die Begutachtung der entsprechenden grafischen Darstellungen suggerierte dagegen zusätzlich Effekte des Bakterienstamms (siehe Abbildung 10C) und eventuell auch des Kulturalters (Abbildung 10E), die in der orientierenden univariaten Analyse vom starken Einfluss der Bakterienkonzentration überlagert wurden.

Ergebnisse

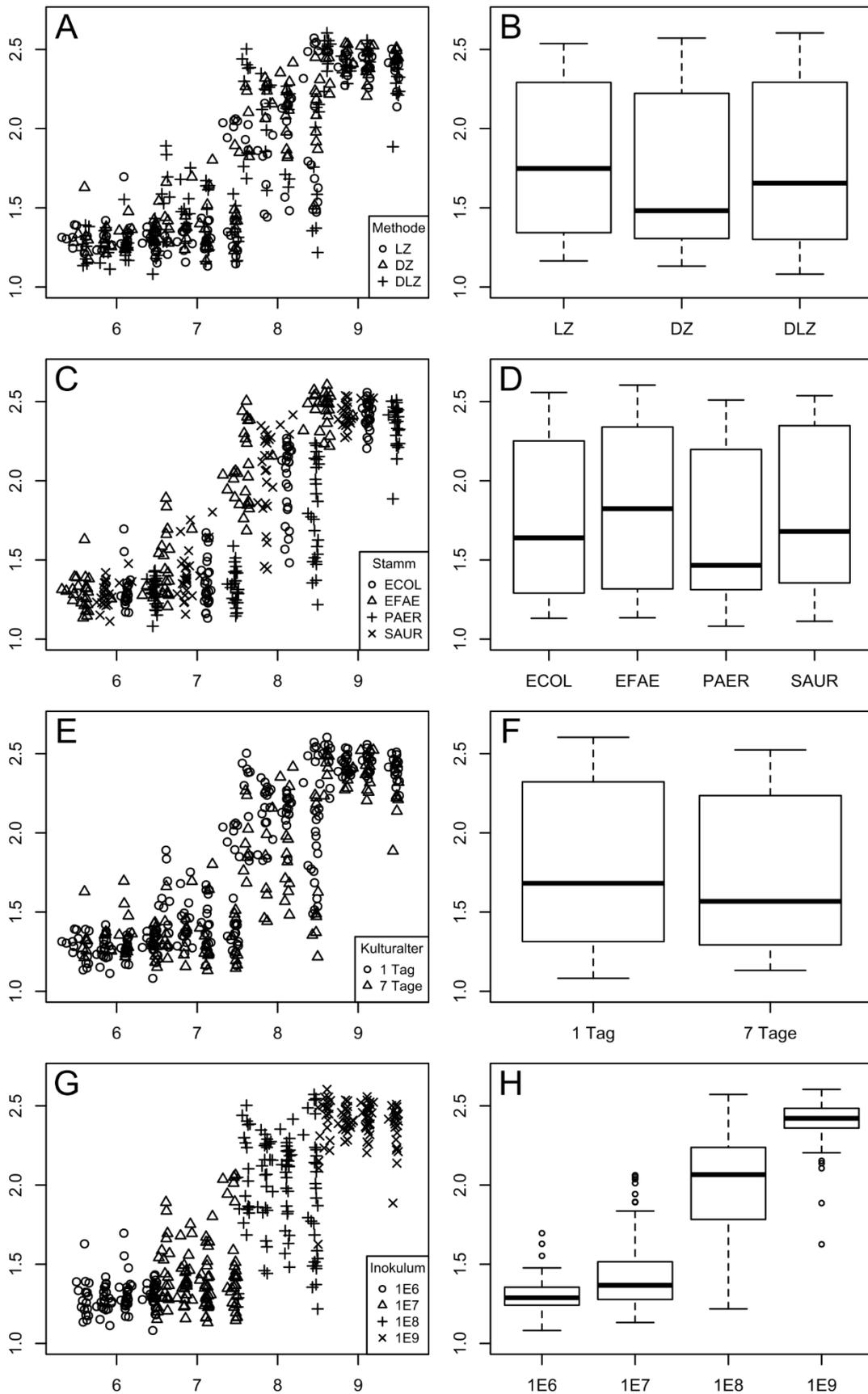


Abbildung 10: Einfluss von Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore.

Zusammenhang zwischen dem Identifikationsscore und dem Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml (A, C, E, G) sowie Median, Interquartilsabstand (IQR) und 1,5 x IQR des Identifikationsscores (B, D, F, H) in Abhängigkeit von der Methode der Probenaufarbeitung (A, B), dem untersuchten Bakterienstamm (C, D), dem Alter der Blutkulturprobe (E, F) und der Bakterienkonzentration (G, H).

4.6 Einfluss der Probeneigenschaften - Nichtlineare Regression

4.6.1 Modellselektion und -validation

Der Zusammenhang zwischen Bakterienkonzentration und Identifikationsscore wurde mit einer logistischen Gleichung mit vier Parametern beschrieben (Abbildung 11).

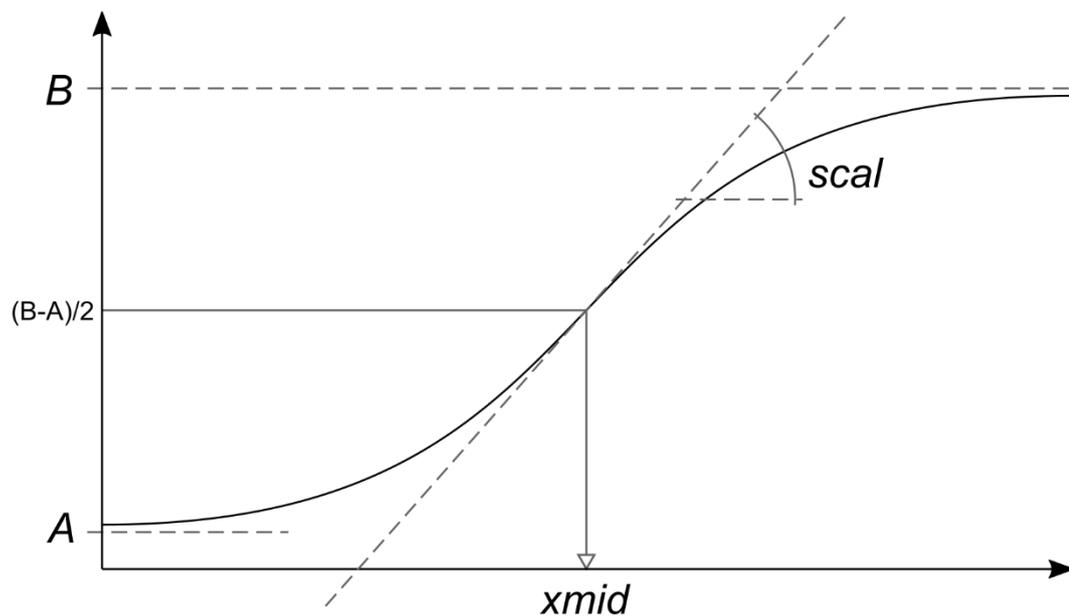


Abbildung 11: Illustration der Parameter der logistischen Gleichung mit vier Parametern.

Minimale Asymptote (A), maximale Asymptote (B), Umkehrpunkt (x_{mid}) und Steigung ($scal$)

Durch Regression über die vorliegenden experimentellen Daten konnten die Gleichungsparameter für 22 der 24 untersuchten experimentellen Bedingungen (3 Methoden x 4 Stämme x 2 Kulturalter) geschätzt werden.

Eine genauere Analyse der Parameterschätzwerte zeigte dabei weitestgehend überlappende 95%-Konfidenzintervalle für die unter verschiedenen Bedingungen (Methode/Stamm/Kulturalter) zu erwartenden Minimal- (minimale Asymptote A , Abbildung 12C) und Maximalscores (maximale Asymptote B , Abbildung 12D). Dagegen wurde für den Umkehrpunkt (x_{mid} , Abbildung 12A) eine deutliche Variabilität über die experimentellen Bedingungen beobachtet. Die Konfidenzintervalle für die Steigung ($scaI$, Abbildung 12B) waren ebenfalls weitestgehend überlappend, im Vergleich zu den Konfidenzintervallen der anderen Parameter relativ weit und reichten dabei zum Teil deutlich in biologisch nicht sinnvolle Bereiche hinein.

Daher wurde alternativ ein vereinfachtes Modell mit fixer Steigung (Mittelwert der Parameterschätzung) untersucht. Die Anzahl konvergierender Regressionen wurde dadurch auf 23 von 24 erhöht. Die Breite der 95 %-Konfidenzintervalle der übrigen Parameter nahm ab und die Parameterschätzer für alle konvergierenden Modelle bewegten sich im Rahmen der theoretischen Annahmen (Abbildung 13). Auch im Modell mit fixer Maximalsteigung zeigte der Parameter x_{mid} die größte Variabilität über die untersuchten experimentellen Bedingungen und wies, im Gegensatz zu Minimal- und Maximalscore, weitestgehend überschneidungsfreie Konfidenzintervalle auf.

Ergebnisse

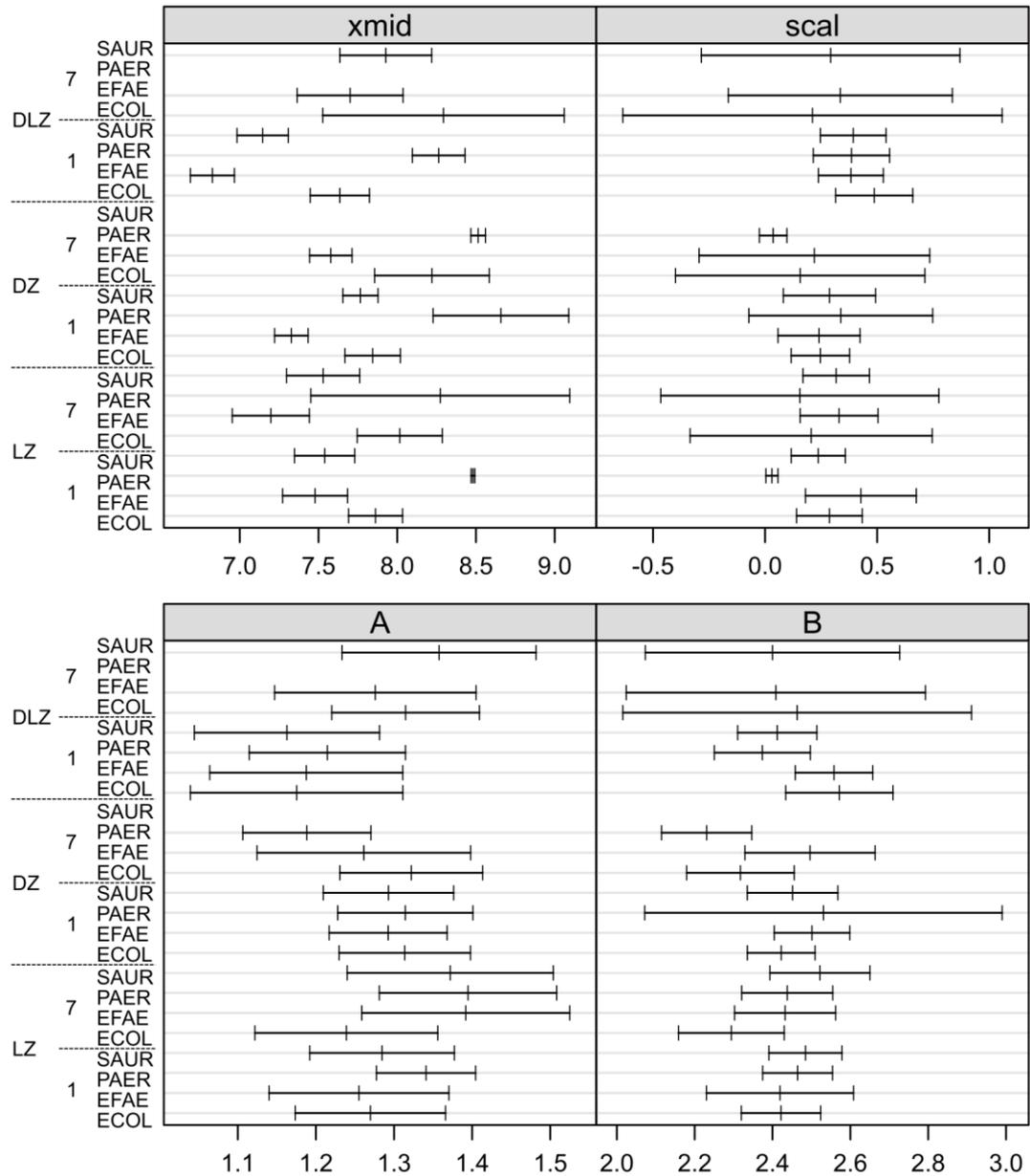


Abbildung 12: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für die Parameterschätzungen aus nichtlinearer Regression nach Kulturalter, Stamm und Methode.

xmid: Umkehrpunkt; scal: Steigung; A: Minimalscore; B: Maximalscore (siehe auch Abbildung 11).

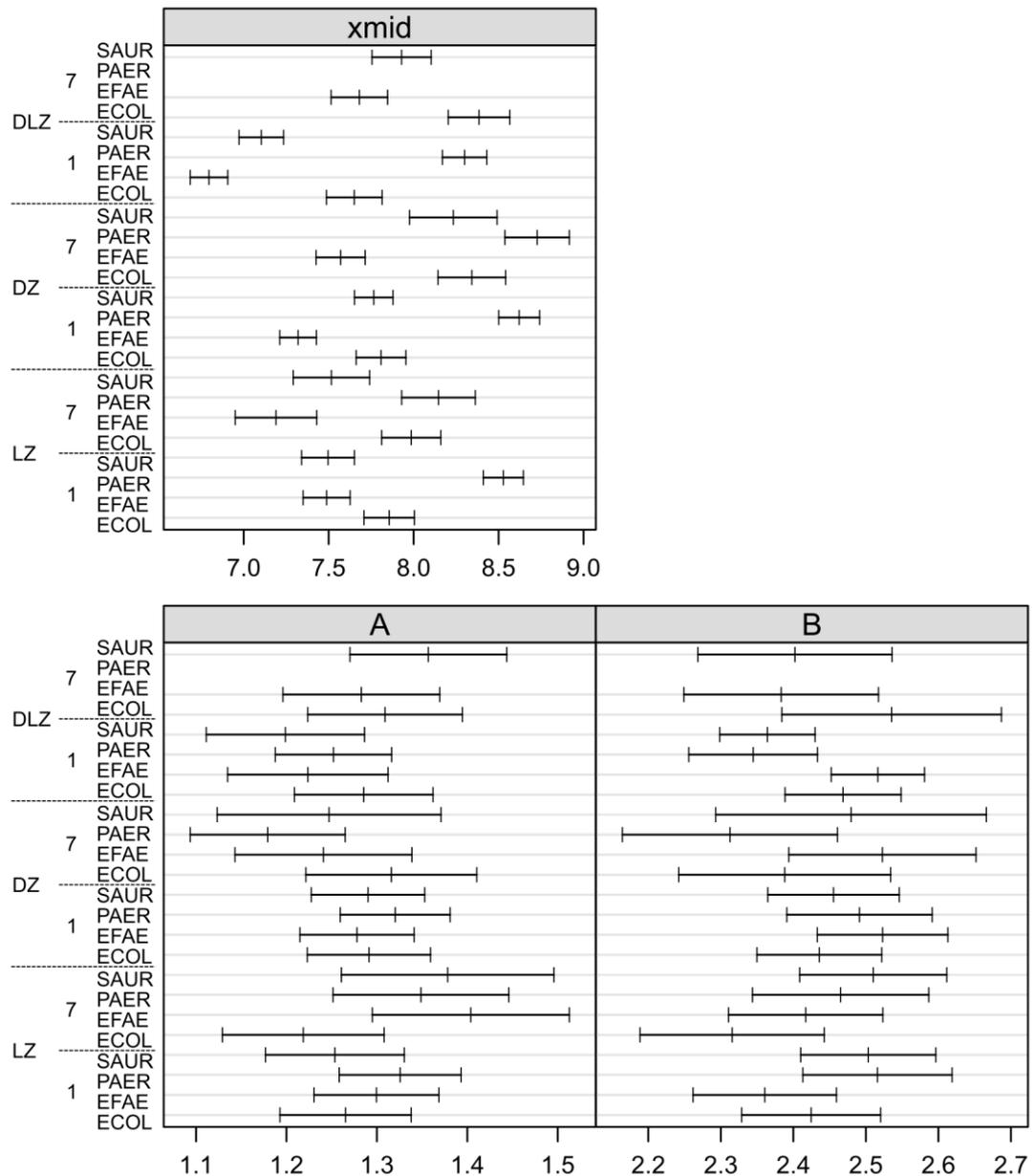


Abbildung 13: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für die Parameterschätzungen aus nichtlineare Regression mit fixierter Maximalsteigung ($scal = 0,29$).

xmid: Umkehrpunkt; A: Minimalscore; B: Maximalscore (siehe auch Abbildung 11).

4.6.2 Modellvalidierung

Die grafische Analyse der Residualwerte (Abbildung 14) zeigte keine Verletzung der dem Modell zugrunde liegenden Annahmen bezüglich Homoskedastizität (Abbildung 14A bis E) und Normalverteilung der Residualwerte (Abbildung 14F).

Ergebnisse

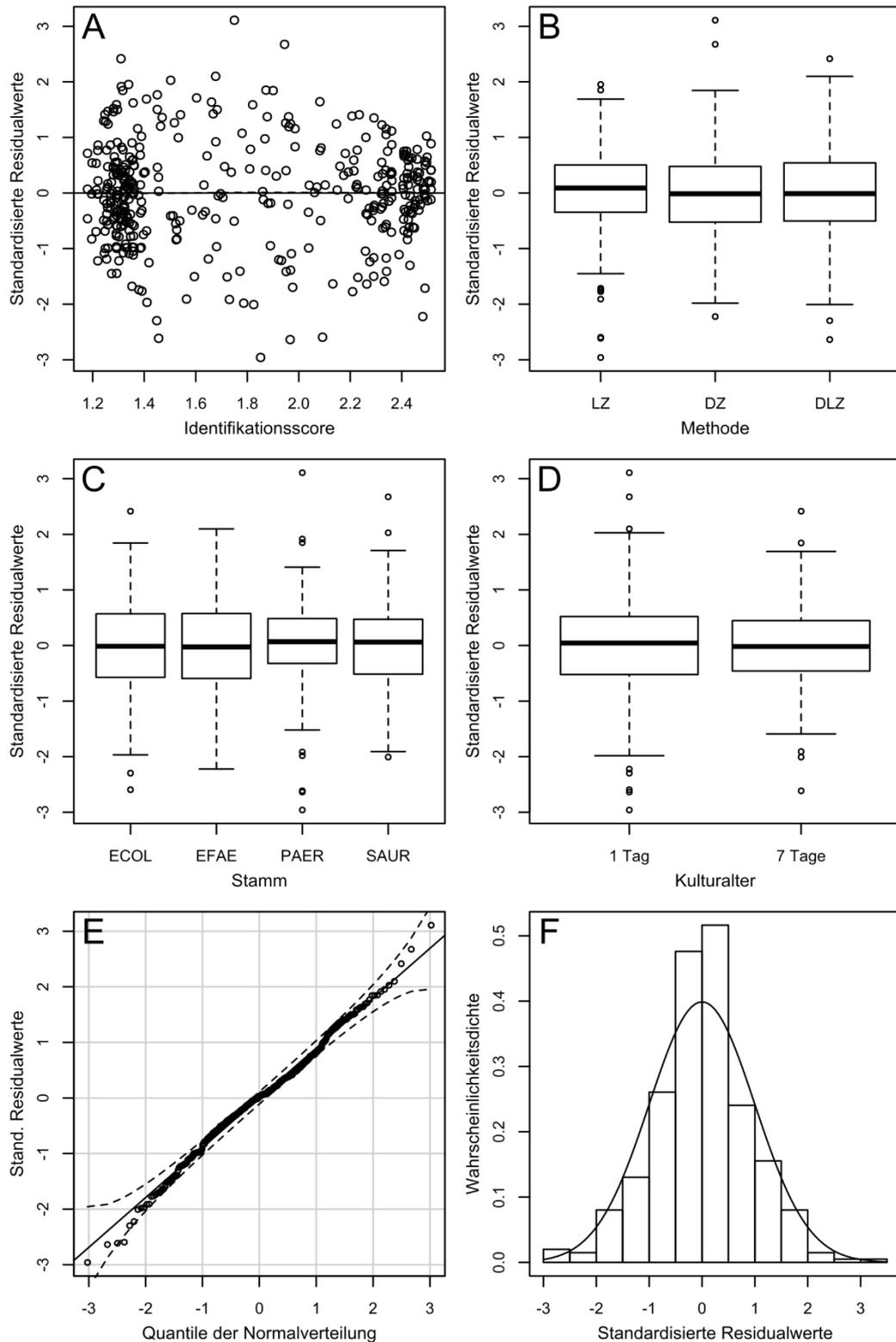


Abbildung 14 Analyse der Residualwerte (nichtlineare Regression).

A: Residualwerte in Abhängigkeit vom vorhergesagten Wert der abhängigen Variable (Identifikationsscore); B bis D: Residualwerte in Abhängigkeit vom Wert der Faktoren Methode, Stamm und Kulturalter. E: qq-Plot der Residualwerte. F: Vergleich der Verteilung der Residualwerte (Histogramm) mit der Standardnormalverteilung (Kurve).

Ergebnisse

Die Annahme der Homoskedastizität (einheitliche Varianz der Störterme für alle Ausprägungen der Prädiktor-Variablen) konnte für die diskreten Variablen Methode ($p = 0,13$), Stamm ($p = 0,55$) und Blutkulturalter ($p = 0,34$) auch durch nicht signifikante Levene Tests bestätigt werden.

Eine relevante Korrelation der im Modell eingesetzten Parameter konnte ebenfalls ausgeschlossen werden (Tabelle 6). Die gemeinsame Darstellung der experimentellen Daten und der Ergebnisse der nichtlinearen Regression bestätigte die Eignung der gewählten Gleichung (logistischen Gleichung mit vier Parametern) zur Beschreibung der experimentellen Daten (Abbildung 15).

Tabelle 6: Parameterkorrelation (4-Parameter logistische Regression mit fixierter Maximalsteigung).

	A	B	Xmid
A	1,000	--	--
B	0,260	1,000	--
xmid	0,023	-0,132	1,000

Ergebnisse

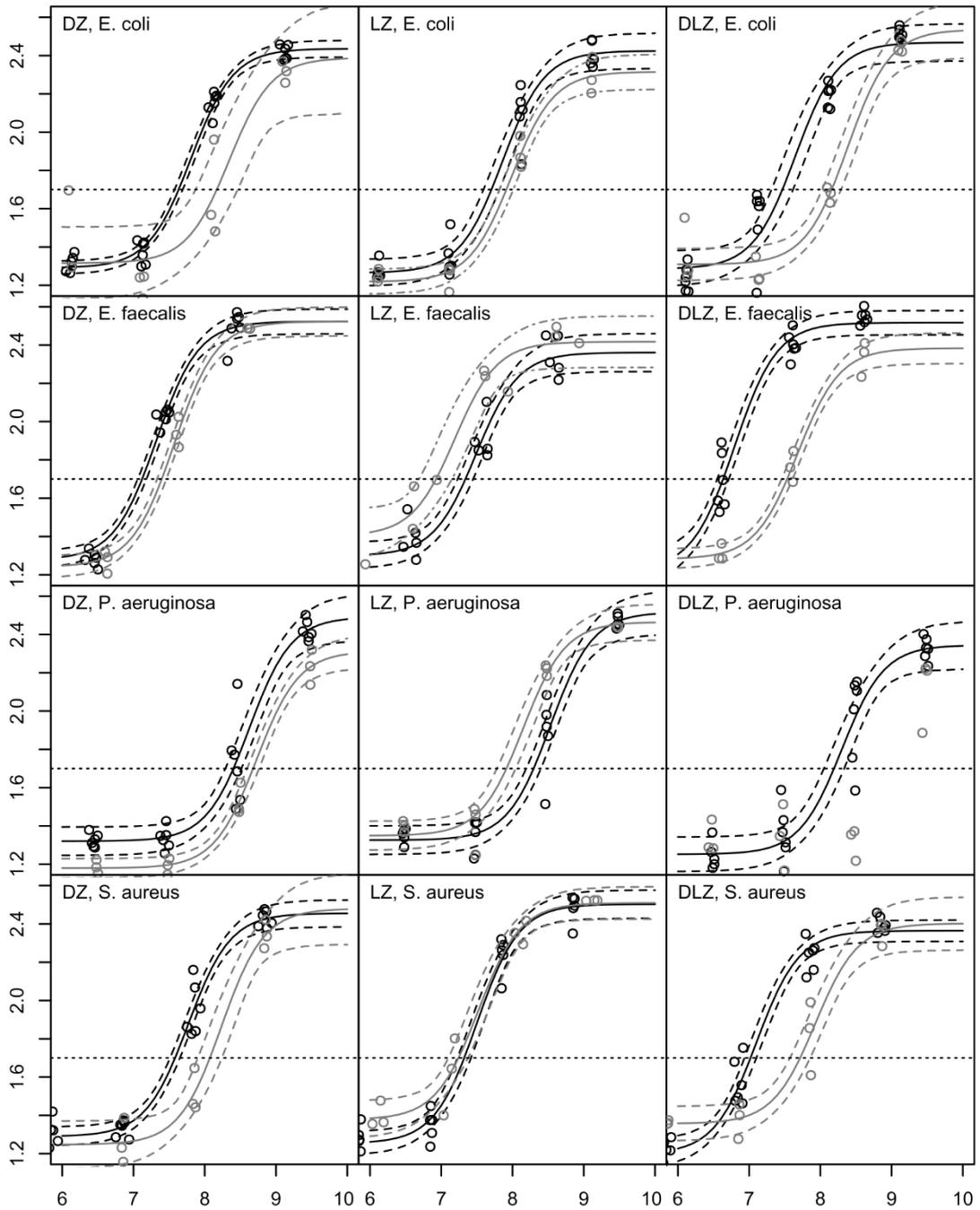


Abbildung 15: Nichtlineare Regression mit fixierter Maximalsteigung (0,29) nach Methode, Stamm und Kulturalter.

Maximaler Identifikationsscore in Abhängigkeit vom Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml. Vorhersagen der nichtlinearen Regression (durchgezogene Linien; Kulturalter 1 Tag in schwarz, Kulturalter 7 Tage in grau) mit 95%-Konfidenzintervall (gestrichelte Linien) und Mittelwerte der Replikatmessungen (Punkte).

4.6.3 Einfluss der Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore

Zur Untersuchung des globalen Einflusses der einzelnen Versuchsbedingungen auf den Parameter *xmid* wurden nichtlineare Regressionsanalysen mit jeweils nach dem untersuchten Parameter gruppierten Daten durchgeführt. Im Gegensatz zur univariaten Analyse im Hinblick auf den Identifikationsscore (siehe Abschnitt 4.5) zeigte die nichtlineare Regressionsanalyse einen signifikanten Einfluss der Parameter Bakterienstamm und Kulturalter (Tabelle 7). Die im Modell berechnete Konzentrations-Identifikationsscore-Kurve war im Vergleich zu *E. coli* für *S. aureus* und *E. faecalis* zu niedrigeren, für *P. aeruginosa* zu höheren Konzentrationen verschoben (niedrigerer bzw. höherer Wert des Parameters *xmid*). Für ältere Kulturen (Kulturalter = 7) war, im Vergleich zu 1-Tages-Kulturen, ebenfalls eine Erhöhung des *xmid*-Schätzwerts zu beobachten (entsprechend einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurve).

Tabelle 7: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter *xmid* bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm oder Kulturalter gruppierte Daten.

Gruppierung	Methode	<i>xmid</i>	95% CI
Methode	DZ	7,86	7,71 - 8,01
	LZ	7,72	7,58 - 7,86
	DLZ	7,59	7,44 - 7,73
Stamm	<i>E. coli</i>	7,98	7,88 - 8,07
	<i>E. faecalis</i>	7,35	7,24 - 7,45
	<i>P. aeruginosa</i>	8,53	8,43 - 8,61
	<i>S. aureus</i>	7,68	7,58 - 7,79
Kulturalter	1 Tag	7,61	7,52 - 7,71
	7 Tage	8,03	7,88 - 8,18

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

Im Hinblick auf die eingesetzte Präparationsmethode wies die Differentielle Lysiszentrifugation den niedrigsten *xmid*-Schätzwert auf. Allerdings waren die errechneten 95 %-Konfidenzintervalle für die drei getesteten Methoden, gemittelt über alle Ausprägungen der übrigen erfassten Parameter (Stamm, Kulturalter), überlappend (Tabelle 7).

Eine Analyse der *xmid*-Schätzwerte unter Berücksichtigung verschiedener Kombinationen der experimentellen Parameter (Tabelle 8, Tabelle 9, DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

Tabelle 10) wies jedoch darauf hin, dass der Effekt der verwendeten Präparationsmethode einer Stamm- bzw. Kulturalter-spezifischen Variabilität unterlag und folglich von den global gemittelten *xmid*-Werten nur unzureichend erfasst wurde. So wurden bei 1-Tages-Kulturen die durchweg niedrigsten *xmid*-Schätzwerte für die Differentielle Lysiszentrifugation errechnet, bei 7-Tages-Kulturen dagegen für die Lysiszentrifugation. Zudem erbrachte das differentielle Zentrifugieren vergleichsweise schlechte Ergebnisse bei *S. aureus*-Kulturen.

Ergebnisse

Tabelle 8 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode und Stamm gruppierte Daten.

Stamm	Methode	Xmid	95% CI
<i>E. coli</i>	DZ	7,99	7,83 - 8,15
	LZ	7,91	7,74 - 8,08
	DLZ	8,01	7,86 - 8,15
<i>E. faecalis</i>	DZ	7,39	7,25 - 7,53
	LZ	7,45	7,26 - 7,65
	DLZ	7,04	6,83 - 7,26
<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,66	8,50 - 8,81
	LZ	8,39	8,24 - 8,55
	DLZ	8,53	8,37 - 8,69
<i>S. aureus</i>	DZ	7,91	7,77 - 8,06
	LZ	7,49	7,29 - 7,68
	DLZ	7,46	7,24 - 7,68

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

Tabelle 9 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode und Kulturalter gruppierte Daten.

Kulturalter	Methode	Xmid	95% CI
1 Tag	DZ	7,70	7,53 - 7,86
	LZ	7,72	7,55 - 7,88
	DLZ	7,46	7,31 - 7,61
7 Tage	DZ	8,27	8,02 - 8,53
	LZ	7,73	7,50 - 7,97
	DLZ	8,39	8,12 - 8,66

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

Ergebnisse

Tabelle 10 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter x_{mid} bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.

Kulturalter	Stamm	Methode	X_{mid}	95% CI
1 Tag	<i>E. coli</i>	DZ	7,81	7,65 - 7,97
		LZ	7,86	7,70 - 8,02
		DLZ	7,65	7,78 - 7,83
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,32	7,21 - 7,43
		LZ	7,56	7,41 - 7,71
		DLZ	6,79	6,68 - 6,91
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,62	8,49 - 8,75
		LZ	8,52	8,40 - 8,65
		DLZ	8,30	8,16 - 8,44
	<i>S. aureus</i>	DZ	7,77	7,65 - 7,89
		LZ	7,50	7,33 - 7,66
		DLZ	7,10	6,96 - 7,24
7 Tage	<i>E. coli</i>	DZ	8,34	8,13 - 8,55
		LZ	7,99	7,80 - 8,17
		DLZ	8,38	8,19 - 8,57
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,57	7,42 - 7,72
		LZ	7,19	6,93 - 7,44
		DLZ	7,68	7,50 - 7,86
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,72	8,52 - 8,92
		LZ	8,15	7,92 - 8,38
		DLZ	nicht konvergiert	
	<i>S. aureus</i>	DZ	8,23	7,96 - 8,50
		LZ	7,51	7,27 - 7,75
		DLZ	7,93	7,74 - 8,11

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

Ergebnisse

Tabelle 11 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle der für einen Identifikations-score von 1,7 benötigten Bakterienkonzentration bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.

Kulturalter	Stamm	Methode	Konz. für Score 1,7	95% CI
1 Tag	<i>E. coli</i>	DZ	7,64	7,58 - 7,70
		LZ	7,71	7,60 - 7,82
		DLZ	7,47	7,32 - 7,62
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,13	7,07 - 7,19
		LZ	7,34	7,34 - 7,45
		DLZ	6,64	6,56 - 6,72
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,41	8,30 - 8,52
		LZ	8,30	8,20 - 8,40
		DLZ	8,20	8,06 - 8,34
	<i>S. aureus</i>	DZ	7,59	7,52 - 7,66
		LZ	7,33	7,23 - 7,42
		DLZ	7,02	6,94 - 7,11
7 Tage	<i>E. coli</i>	DZ	8,16	7,88 - 8,47
		LZ	7,92	7,82 - 8,02
		DLZ	8,16	8,03 - 8,30
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,40	7,34 - 7,47
		LZ	6,92	6,69 - 7,16
		DLZ	7,54	7,46 - 7,62
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,68	8,60 - 8,77
		LZ	7,92	7,79 - 8,05
		DLZ	nicht konvergiert	
	<i>S. aureus</i>	DZ	8,07	7,91 - 8,25
		LZ	7,24	7,11 - 7,74
		DLZ	7,72	7,58 - 7,86

DZ: Differentielles Zentrifugieren; LZ: Lysiszentrifugation; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation

4.7 Einfluss der Probeneigenschaften - Nichtlineares gemischtes Model

4.7.1 Modellselektion

Im nichtlinearen gemischten Modell wurde der Zusammenhang zwischen Bakterienkonzentration und Identifikationsscore auf Ebene der durchgeführten Einzelexperimente (jeweils eine Verdünnungsreihe eines einzelnen Bakterienstamms in einer Blutprobe eines bestimmten Alters) modelliert. Als Grundlage diente erneut die für die nicht-lineare Regression verwendete logistische Gleichung mit vier Parametern. Die Parameter A , B und $scal$ wurden dabei unter dem Einfluss verschiedener fester Effekte (*fixed effects*) modelliert, für den Parameter $xmid$, mit der größten Variabilität zwischen den Einzelexperimenten (Abbildung 13), wurden sowohl feste als auch zufällige Effekte (*random effects*) angenommen (gemischte Effekte, *mixed effects*). Die Verwendung gemischter Effekte zur Modellierung der anderen Gleichungsparameter brachte, gemessen an Akaikes Informationskriterium, keine Verbesserung der Modelle. Als Subjekt der zufälligen Effekte wurde das jeweilige Einzelexperiment angenommen. Ausgehend von einem Basismodell ohne Faktoren (*Intercept-only-model*, MM_0) wurden die systematisch variierten experimentellen Bedingungen Methode, Stamm und Probenalter als Prediktoren (Faktor) der Gleichungsparameter hinzugefügt (*Bottom up* Verfahren). Die dadurch erzeugten Modelle wurden anhand von Akaikes Informationskriterium (AIC) und *likelihood-ratio*-Tests mit dem Basismodell verglichen. Eine Auswahl der evaluierten Modelle ist in Tabelle 12 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 12: Vergleich ausgewählter Modelle aus dem Modellselektionsprozess.

Modell	Nr.	Df	AIC	LR (p-Wert) ¹
Basismodell: FE: A+B+xmid+scal~1; RE: xmid~1	M0	6	- 424,7	--
Zusätzlich Einfluss von Methode und Probenalter auf Parameter A: A~Methode*Kulturalter	M1	11	- 429,4	14,7 (0,012)
Zusätzlich Einfluss von Methode und Stamm auf Parameter B: (B~Methode*Stamm)	M2	22	- 446,8	39,4 (< 0,0001)
Zusätzlich Einfluss von Methode und Stamm sowie Methode und Probenalter auf Parameter xmid: xmid~Methode*Stamm+Methode*Kulturalter	M3	36	- 636,4	214,7 (< 0,0001)

1) Likelihood-ratio und korrespondierender p-Wert für den Vergleich mit dem jeweils vorherigen Modell

Df: Freiheitsgrade; AIC: Akaiikes Informationskriterium; LR: likelihood-ratio

Das bevorzugte Modell (M3 in Tabelle 12) enthielt, zusätzlich zum Basismodell die Interaktionsterme Methode*Kulturalter als Einflussfaktor für den Parameter A, Methode*Stamm als Einflussfaktor für Parameter B sowie Methode*Kulturalter und Methode*Stamm als Einflussfaktoren für den Parameter *xmid*. Im Vergleich zum Basismodell wurde durch die Einführung der Einflussfaktoren der nicht erklärte Anteil der Variabilität im Parameter *xmid* deutlich reduziert (Reduktion der Standardabweichung des *random effect* Anteils von *xmid* von 0,58 auf 0,17). Die Parameterschätzwerte dieses Modells sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 13: Parameterschätzwerte des nichtlinearen gemischten Modells M3 (siehe Tabelle 12).

Parame- ter	Effekt	Wert	SE	Df	t	p
A	Intercept	1,291	0,016	274	80,2	<0,00 1
	M(DZ)	0,005	0,021	274	0,2	0,810
	M(DLZ)	-0,060	0,023	274	-2,6	0,010
	A(7)	0,037	0,027	274	1,4	0,168
	M(DZ),A(7)	-0,084	0,036	274	-2,3	0,022
	M(DLZ),A(7)	0,046	0,036	274	1,3	0,211
B	Intercept	2,397	0,034	274	71,6	<0,00 1
	M(DZ)	0,020	0,046	274	0,4	0,659
	M(DLZ)	0,043	0,043	274	1,0	0,311
	S(Efae)	-0,031	0,045	274	-0,7	0,498
	S(Paer)	0,092	0,047	274	1,9	0,054
	S(Saur)	0,103	0,044	274	2,3	0,020
	M(DZ),S(Efae)	0,131	0,063	274	2,1	0,041
	M(DZ),S(Paer)	-0,056	0,068	274	-0,8	0,413
	M(DZ),S(Saur)	-0,063	0,064	274	-1,0	0,323
	M(DLZ),S(Efae)	0,078	0,058	274	1,3	0,180
	M(DLZ),S(Paer)	-0,169	0,066	274	-2,6	0,011
	M(DLZ),S(Saur)	-0,172	0,058	274	-3,0	0,003
xmid	Intercept	8,036	0,082	274	97,8	<0,00 1
	M(DZ)	-0,194	0,114	274	-1,7	0,089
	M(DLZ)	-0,562	0,112	274	-5,0	<0,00 1
	A(7)	-0,192	0,078	274	-2,5	0,014
	S(Efae)	-0,515	0,109	274	-4,7	<0,00 1
	S(Paer)	0,404	0,106	274	3,8	<0,00 1
	S(Saur)	-0,469	0,108	274	-4,4	<0,00 1
	M(DZ),A(7)	0,573	0,107	274	5,4	<0,00 1
	M(DLZ),A(7)	1,057	0,107	274	9,9	<0,00 1
	M(DZ),S(Efae)	-0,044	0,148	274	-0,3	0,766
	M(DZ),S(Paer)	0,315	0,148	274	2,1	0,035
	M(DZ),S(Saur)	0,420	0,148	274	2,8	0,005
	M(DLZ),S(Efae)	-0,140	0,146	274	-1,0	0,337
	M(DLZ),S(Paer)	0,435	0,148	274	2,9	0,004

Ergebnisse

	M(DLZ),S(Saur)	0,089	0,146	274	0,6	0,543
scal	Intercept	0,279	0,014	274	19,4	<0,001

A: Kulturalter in Tagen; DZ: Differentielles Zentrifugieren; Efae: *E. faecium*; LZ: Lysiszentrifugation; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; M: Methode; Paer: *P. aeruginosa*; S: Stamm; Saur: *S. aureus*

4.7.2 Modellvalidierung

Die grafische Analyse der Residualwerte zeigte keine Verletzung der dem Modell zugrunde liegenden Annahmen bezüglich Homoskedastizität (Abbildung 16 Panel A-D) oder Normalverteilung der Residualwerte und der zufälligen Effekte (Abbildung 16 Panel E-F). Die gemeinsame Darstellung der experimentellen Daten und der Voraussagen des finalen Modells M3 zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen Modell und Messwerten (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Ergebnisse

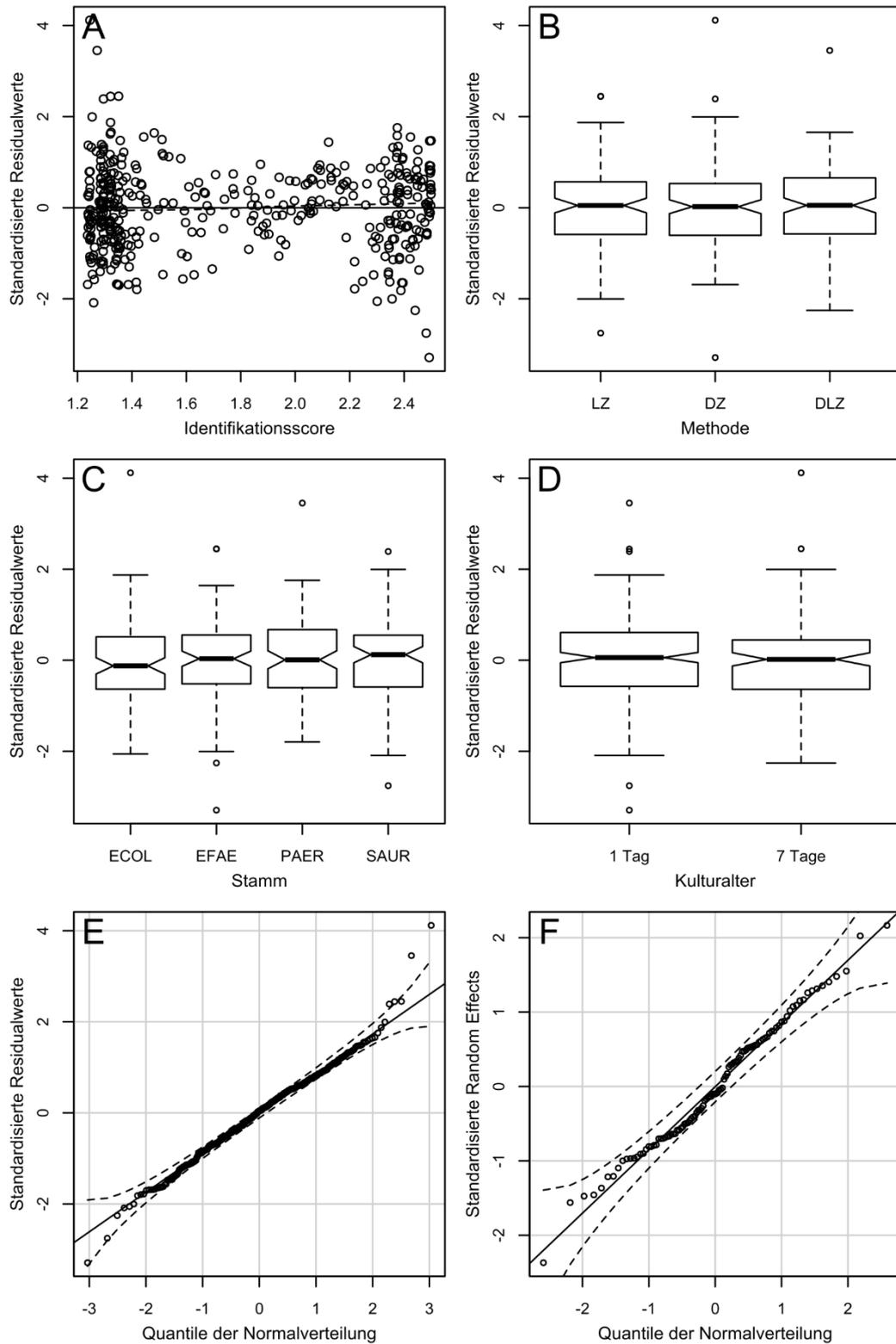


Abbildung 16: Analyse der Residualwerte (nichtlineares gemischtes Modell).

A: Residualwerte in Abhängigkeit vom vorhergesagten Wert der abhängigen Variable (Identifikationsscore); B bis D: Residualwerte in Abhängigkeit vom Wert der Faktoren Methode, Stamm und Kulturalter. E: qq-Plot der Residualwerte. F: qq-Plot der zufälligen Effekte (random effects).

Ergebnisse

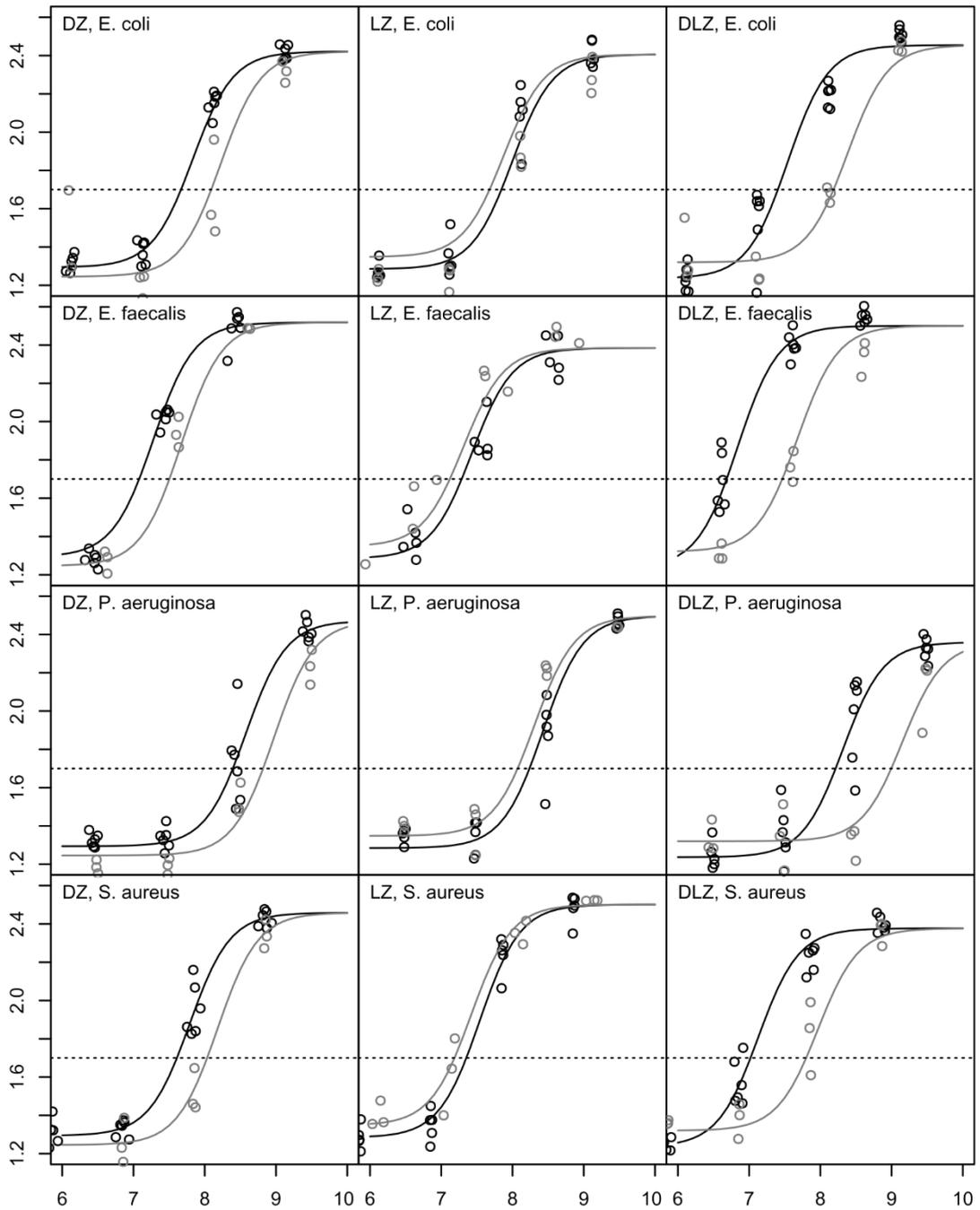
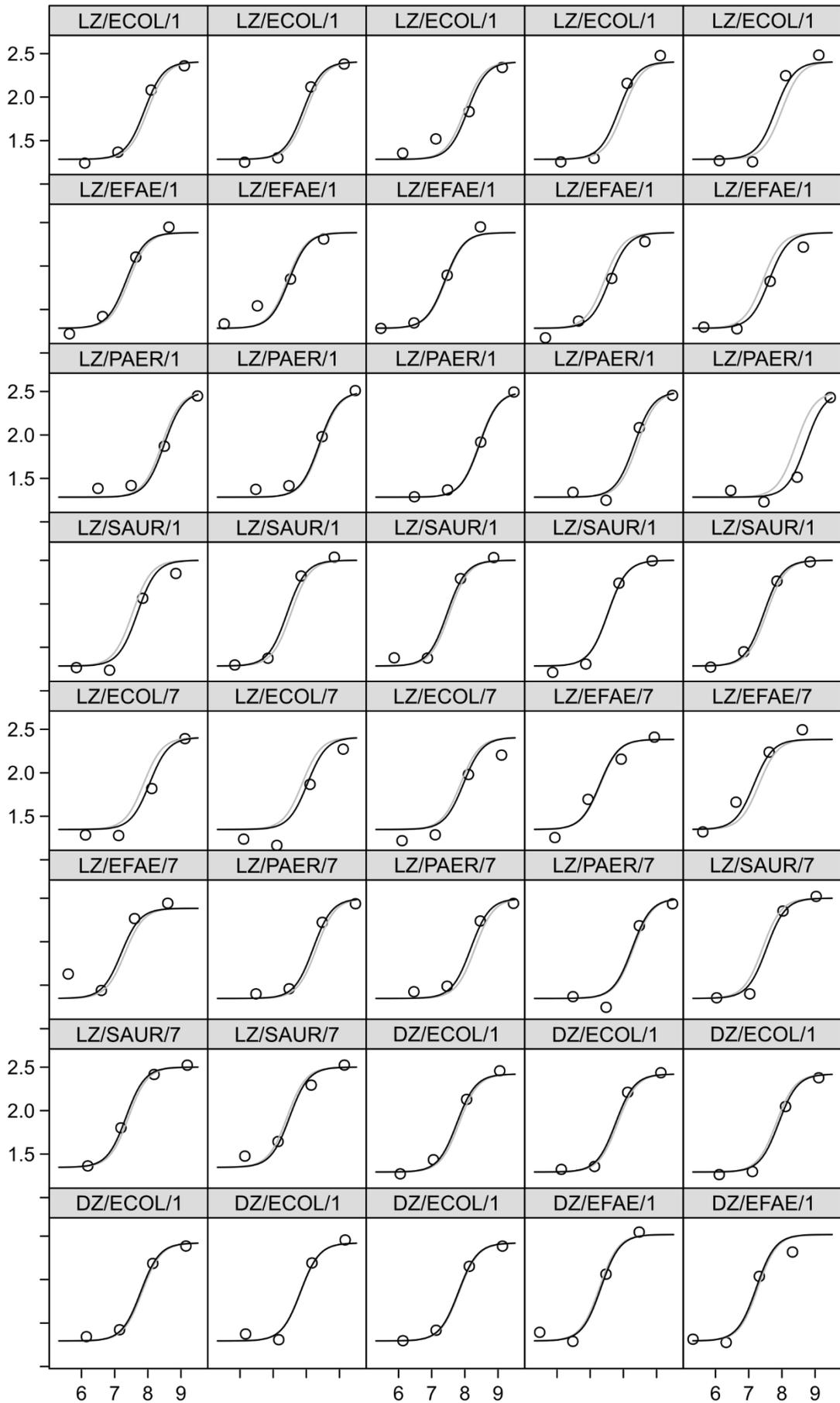


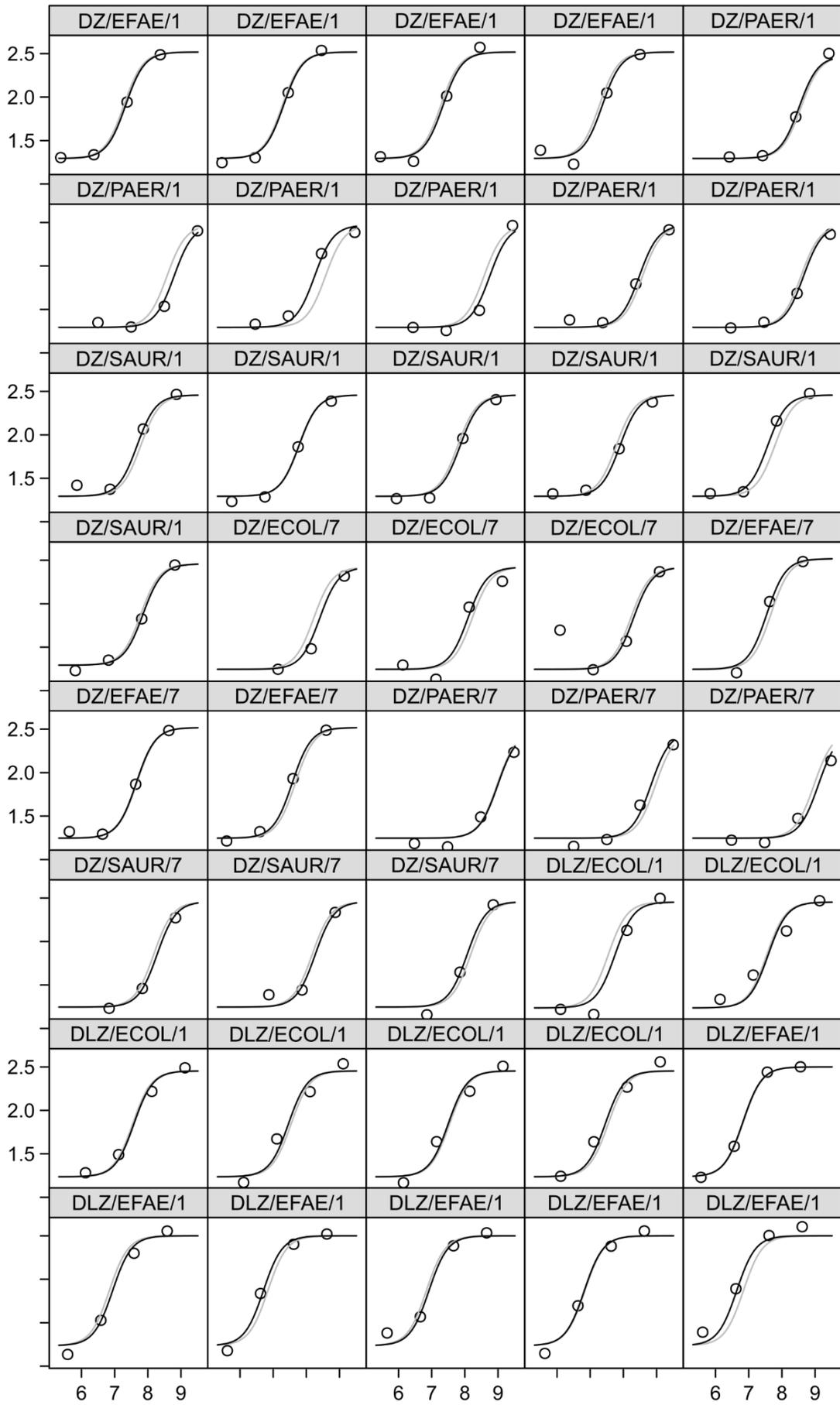
Abbildung 17: Nichtlineares gemischtes Modell nach Methode, Stamm und Kulturalter.

Maximaler Identifikationsscore in Abhängigkeit vom Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml. Vorhersagen des nichtlinearen gemischten Modells (durchgezogene Linien; Kulturalter 1 Tag in schwarz, Kulturalter 7 Tage in grau) und Mittelwerte der Replikatmessungen (Punkte).

Ergebnisse



Ergebnisse



Ergebnisse

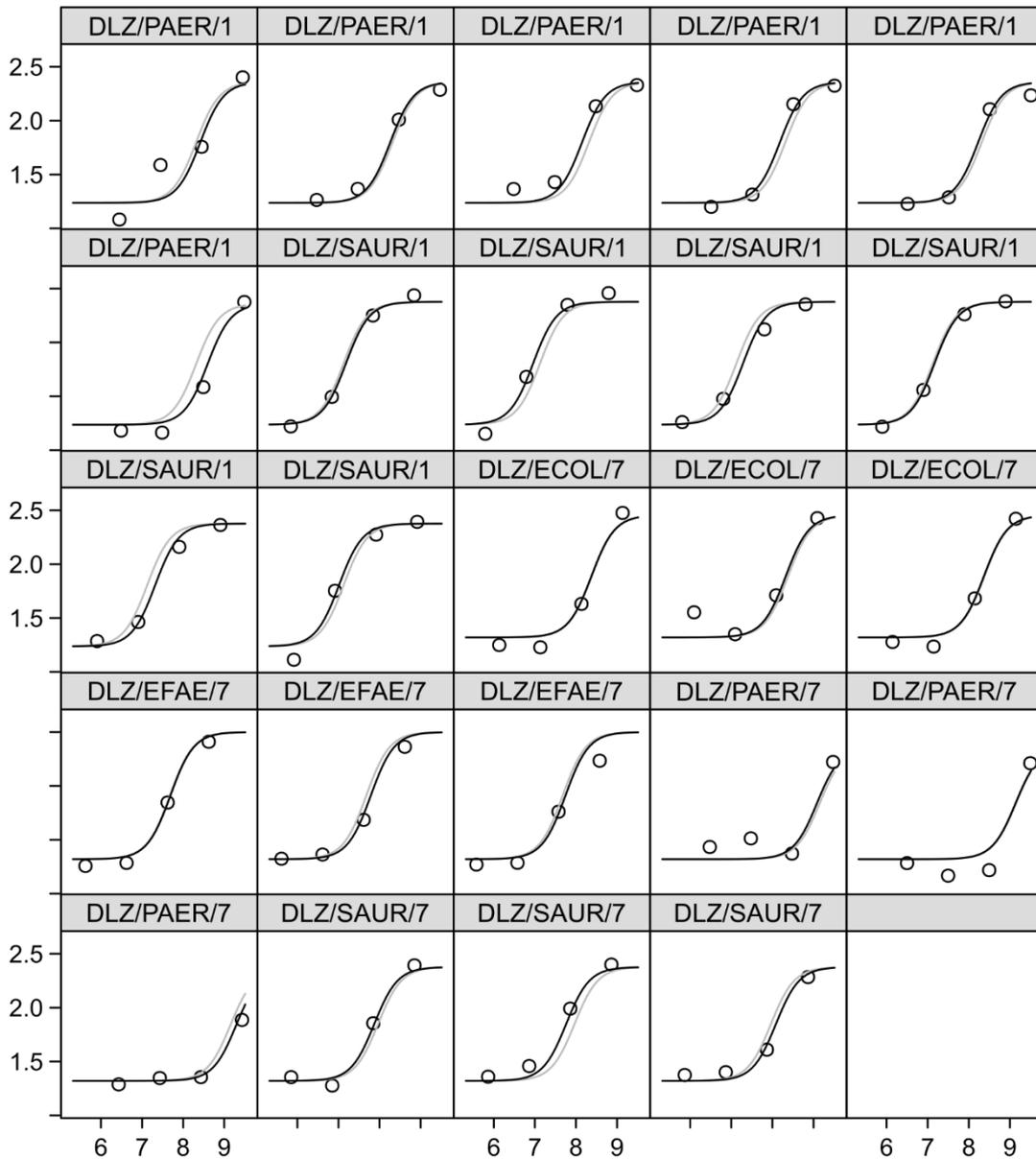


Abbildung 18: Nichtlineares gemischtes Modell (alle Einzelexperimente).

Maximaler Identifikationsscore in Abhängigkeit vom Logarithmus der Bakterienkonzentration in KBE/ml. Vorhersagen des nichtlinearen gemischten Modells (Linien; feste und zufällige Effekte in schwarz, nur feste Effekte in grau) und Werte der Einzelmessungen (Punkte) für alle durchgeführten Experimente sortiert nach Methode, Kulturalter und Stamm.

4.7.3 Einfluss der Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore

Im Hinblick auf die Effekte von Stamm und Kulturalter bestätigt das gemischt lineare Modell die Ergebnisse der nichtlinearen Regression (Abschnitt 4.6.3). Die Signifikanz der Interaktionsterme Methode*Kulturalter und Methode*Stamm für den Parameter *xmid* (Tabelle 13) bekräftigt darüber hinaus die Vermutung, dass Stärke und Richtung dieser Effekte von der verwendeten Präparationsmethode abhängen. Die resultierenden Werte für den bezüglich der Beurteilung der Identifikationsleistung maßgeblichen Parameter *xmid* (Tabelle 14) zeigen eine weitestgehend methodenunabhängige Linksverschiebung der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurve für *E. faecalis* (Erniedrigung von *xmid* um ca. 0,5) und eine deutliche, methodenunabhängige Rechtsverschiebung für *P. aeruginosa* (Erhöhung von *xmid* um ca. 0,7). Methodenabhängige Effekte können besonders ausgeprägt beim Kulturalter beobachtet werden: Während vom Modell für ältere Kulturen bei differentiellm Zentrifugieren und differentieller Lysiszentrifugation eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurve vorausgesagt wird, prognostiziert es für die Lysiszentrifugation eine Linksverschiebung. Die Differenz von *xmid* zwischen Lysiszentrifugation und den beiden anderen Verfahren beträgt dabei im Mittel ca. 0,8.

Ergebnisse

Tabelle 14: Mittelwerte für den Parameter xmid im nichtlinearen gemischten Modell.

Kulturalter	Stamm	Methode	Xmid
1 Tag	<i>E. coli</i>	DZ	7,84
		LZ	8,04
		DLZ	7,47
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,28
		LZ	7,52
		DLZ	6,82
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,56
		LZ	8,44
		DLZ	8,31
	<i>S. aureus</i>	DZ	7,79
		LZ	7,57
		DLZ	7,09
7 Tage	<i>E. coli</i>	DZ	8,22
		LZ	7,84
		DLZ	8,34
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,66
		LZ	7,33
		DLZ	7,68
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,94
		LZ	8,25
		DLZ	9,18
	<i>S. aureus</i>	DZ	8,17
		LZ	7,37
		DLZ	7,96

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

4.8 Analytische Sensitivität

Zur Abschätzung der analytischen Sensitivität der eingesetzten Verfahren wurden aus den Regressionsdaten bzw. aus dem nichtlinearen Modell die Bakterienkonzentrationen abgeleitet, bei denen unter den gegebenen Bedingungen im Mittel ein Identifikationsscore von 1,7 erzielt wurde.

Ergebnisse

Tabelle 15: Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der für einen Identifikations-score von 1,7 benötigten Bakterienkonzentration bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.

Kulturalter	Stamm	Methode	Konz. für Score 1,7	95% CI
1 Tag	<i>E. coli</i>	DZ	7,64	7,58 - 7,70
		LZ	7,71	7,60 - 7,82
		DLZ	7,47	7,32 - 7,62
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,13	7,07 - 7,19
		LZ	7,34	7,34 - 7,45
		DLZ	6,64	6,56 - 6,72
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,41	8,30 - 8,52
		LZ	8,30	8,20 - 8,40
		DLZ	8,20	8,06 - 8,34
	<i>S. aureus</i>	DZ	7,59	7,52 - 7,66
		LZ	7,33	7,23 - 7,42
		DLZ	7,02	6,94 - 7,11
7 Tage	<i>E. coli</i>	DZ	8,16	7,88 - 8,47
		LZ	7,92	7,82 - 8,02
		DLZ	8,16	8,03 - 8,30
	<i>E. faecalis</i>	DZ	7,40	7,34 - 7,47
		LZ	6,92	6,69 - 7,16
		DLZ	7,54	7,46 - 7,62
	<i>P. aeruginosa</i>	DZ	8,68	8,60 - 8,77
		LZ	7,92	7,79 - 8,05
		DLZ	nicht konvergiert	
	<i>S. aureus</i>	DZ	8,07	7,91 - 8,25
		LZ	7,24	7,11 - 7,74
		DLZ	7,72	7,58 - 7,86

DZ: Differentielles Zentrifugieren; DLZ: Differentielle Lysiszentrifugation; LZ: Lysiszentrifugation

4.9 Bearbeitungsaufwand und Kosten

4.9.1 Bearbeitungsaufwand

Beim Vergleich der für die parallele Bearbeitung von 4 Proben erforderlichen Bearbeitungszeit (Hands-on-Time) sowie der Gesamtdauer (Turnaround Time) der Probenvorbereitung erwies sich die mit einem kommerziellen Reagenzienset durchgeführte Lysiszentrifugation als schnellstes Verfahren (Tabelle 16). Bei annähernd gleicher mittlerer Bearbeitungszeit

fürten die längeren Zentrifugationsschritte beim differentiellen Zentrifugieren zu einer um 20 % höheren Gesamtdauer der Probenvorbereitung. Die bei der differentiellen Lysiszentrifugation im Vergleich zu beiden vorgenannten Verfahren erhöhte Anzahl durchzuführender Einzelschritte resultierte in einer im Vergleich zur Lysiszentrifugation um 30 % erhöhten Bearbeitungszeit bei 40 % längerer Gesamtdauer.

Tabelle 16: Zeitaufwand für die untersuchten Methoden bei Parallelbearbeitung von 4 Proben

Methode	Bearbeitungszeit¹	Gesamtdauer²
Differentielles Zentrifugieren	15 min	65 min
Lysiszentrifugation	15 min	50 min
Differentielle Lysiszentrifugation	20 min	70 min

1) Hands-on-Time; Summe der vom Anwender zur Durchführung der einzelnen Protokollschritte benötigten Zeit.

2) Turnaround-Time; Gesamtdauer der Probenvorbereitung; Bearbeitungszeit plus Wartezeiten (z. B. Inkubation, Zentrifugation)

4.9.2 Verbrauchsmittelkosten

Unter den getesteten Verfahren verursachte das differentielle Zentrifugieren mit insgesamt 0,3 Euro je untersuchter Probe die geringsten Verbrauchsmittelkosten (Tabelle 17). Die höchsten Kosten entstanden bei Verwendung der Lysiszentrifugation. Obwohl hier nur wenige Reagenzien benötigt wurden, ließ der hohe Anschaffungspreis des Reagenziensets die Gesamtkosten auf mehr als das Zehnfache der Kosten für das differentielle Zentrifugieren steigen. Die differentielle Lysiszentrifugation war im Vergleich dazu nur unwesentlich teurer als das differentielle Zentrifugieren. Berücksichtigt man zusätzlich die für alle Proben gleichermaßen anfallenden Kosten für die abschließende MALDI-TOF-Messung, ergeben sich Materialkosten von ca. einem Euro für die beiden in-house Verfahren und fünf Euro für die Lysiszentrifugation mit kommerziellen Reagenzien. Unter Berücksichtigung der Personalkosten (35 Euro pro Stunde) liegen die Gesamtkosten für Differentielles Zentrifugieren, Lysiszentrifugation und Differentielle

Ergebnisse

Lysiszentrifugation bei Verarbeitung von einer bzw. vier Proben bei 10/14/13 bzw. 3/7/4 Euro pro Probe.

Tabelle 17: Verbrauchsmittelkosten der untersuchten Verfahren bezogen auf eine Probe.

Methode	Verbrauchsmittel	Anzahl, Menge	Kosten [Euro]¹
Differentialles Zentrifugieren	Destilliertes Wasser	3 ml	0,20
	12 ml PS-Röhrchen	1	
	1,5 ml Reaktionsgefäß	1	
	Einweg-Pasteurpipette	1	
	Pippettenspitze (1 ml)	5	
Lysiszentrifugation	Bruker Sepsityper Lösung 1	200 µl	4,70
	Bruker Sepsityper Lösung 2	1 ml	
	1,5 ml Reaktionsgefäß	1	
	Pippettenspitze (1 ml)	5	
	Pippettenspitze (20-200 µl)	2	
Differenzielle Lysiszentrifugation	RBC-Lysis-Lösung	1 ml	0,50
	Destilliertes Wasser	1 ml	
	VACUETTE 8 ml Z	2	
	Serum Sep Clot Activator		
	1,5 ml Reaktionsgefäß	2	
	Einweg-Pasteurpipette	1	
	Pippettenspitze (1 ml)	8	
FA-Extraktion ²	Destilliertes Wasser	300 µl	0,10
	Ethanol	900 µl	
	Acetonitril	50 µl	
	Ameisensäure	50 µl	
	1,5 ml Reaktionsgefäß	2	
	Pippettenspitze (1 ml)	3	
	Pippettenspitze (20-200 µl)	4	

1) Zugrunde gelegt wurden die aktuellen Beschaffungskosten bei Bestellung laborüblicher Mengen im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene des Universitätskrankenhauses Hamburg-Eppendorf im Juni 2013 (ohne Mehrwertsteuer).

2) Wurde bei allen untersuchten Verfahren als letzter Teil der Probenvorbereitung durchgeführt.

5 Diskussion

5.1 Eignung künstlicher Blutkulturproben zur Beurteilung der Qualität verschiedener Extraktionsverfahren

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Verfahren zur direkten Identifizierung von Bakterien in bewachsenen Blutkulturmedien verglichen werden. Zu Beginn der Untersuchungen lagen nur wenige Studien vor, in denen entsprechende Vergleiche direkt an klinischen Proben durchgeführt wurden (Schubert et al. 2011; Saffert et al. 2012). Dabei wurden positive Blutkulturflaschen jeweils parallel mit unterschiedlichen Verfahren analysiert. Ein derartiges Vorgehen verspricht, bei ausreichend großer Probenzahl, Daten mit hoher Aussagekraft bezüglich möglicher Leistungsunterschiede der untersuchten Verfahren. Die notwendigen logistischen Voraussetzungen für solche Parallelmessungen sind allerdings für mehr als zwei Verfahren kaum zu erfüllen. Alternativ lassen sich die publizierten Leistungsdaten aus verschiedenen Studien zu je einer einzelnen Methode miteinander vergleichen (siehe Tabelle 18). Da für die meisten in-house-Verfahren bisher nur Einzelpublikationen vorliegen, und die untersuchten Probenkollektive oft klein und in der Zusammensetzung oft deutlich unterschiedlich sind, ist die Aussagekraft derartiger Vergleiche zurzeit begrenzt. In der vorliegenden Arbeit wurde für den Methodenvergleich ein experimenteller Ansatz mit künstlich hergestellten Blutkulturproben gewählt. Durch die beliebige Reproduzierbarkeit dieser Proben entfällt die Notwendigkeit zur Parallelmessung und die erforderliche Probenanzahl ist im Vergleich zur nicht parallelen Messung mit klinischen Proben deutlich reduziert. Bei der Herstellung der künstlichen Proben konnten zudem Faktoren, für die bereits in früheren Studien ein Einfluss auf den Identifikationsscore vermutet wurde (Bakterienkonzentration, Art des Erregers, Blutkulturalter), gezielt berücksichtigt werden. Bei der Auswertung der MALDI-TOF Ergebnisse zeigte sich, dass der nichtlineare

Zusammenhang zwischen Bakterienkonzentration und Identifikationsscore für die drei untersuchten Verfahren einheitlich beschrieben werden konnte (logistische Regression mit vier Parametern). Darüber hinaus konnte die Leistungsfähigkeit der getesteten Verfahren anhand eines einzelnen Lageparameters, des Wendepunkts (x_{mid}), analysiert und verglichen werden. Die beobachtete niedrige inter-Assay Variabilität (siehe Abschnitt 4.4.2) weist auf eine insgesamt gute Reproduzierbarkeit des beschriebenen Verfahrens hin. Ein höherer Standardisierungsgrad ließe sich gegebenenfalls noch durch die Verwendung kommerzieller Blutprodukte anstelle des hier eingesetzten Spenderbluts erreichen. Da in den unter Verwendung der hier getesteten Extraktionsmethoden publizierten Studien die Bakterienkonzentration in positiven Blutkulturflaschen nicht gemessen wurde, ließen sich keine Konzentrations-Score-Beziehungen für die unmittelbare Plausibilitätskontrolle der durch den Einsatz künstlicher Proben erzeugten Daten ableiten. Allerdings konnten einige der in klinischen Proben beobachteten Besonderheiten im Hinblick auf die Leistungsfähigkeit bei unterschiedlichen Probenarten in dieser Arbeit reproduziert werden (siehe unten). Da die getesteten Verfahren im Hinblick auf die zugrundeliegenden physikalischen Prinzipien das gesamte Spektrum der bisher publizierten Methoden abbilden, sollte der hier gewählte Ansatz, d. h. die Verwendung künstlicher Proben zur Analyse des Zusammenhangs zwischen Bakterienkonzentration und Identifikationsscore, problemlos auch zur Bewertung weiterer Extraktionsverfahren einsetzbar sein.

5.2 Einfluss der verwendeten Extraktionsmethode auf den Identifikationsscore

Gemittelt über alle untersuchten Proben konnte, gemessen an der Lage der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurven (Regressionsparameter x_{mid}), kein signifikanter Unterschied der Leistungsfähigkeit zwischen den untersuchten Extraktionsverfahren festgestellt werden. Bei überlappenden 95%-Konfidenzintervallen lagen die Differenzen zwischen den entsprechenden Parameterschätzwerten innerhalb einer Zweierpotenz und damit im Bereich

des für die Bestimmung der Keimzahl im Plattengussverfahren anzunehmenden Messfehlers. Zur Detektion möglicherweise vorhandener Leistungsunterschiede unterhalb dieser Größenordnung wäre die Untersuchung zusätzlicher Proben erforderlich. In Anbetracht der untergeordneten Relevanz, die derartig geringfügige Leistungsunterschiede für die vergleichende Beurteilung der Routinetauglichkeit der getesteten Verfahren hätten, erscheint der zusätzliche Aufwand allerdings kaum gerechtfertigt. Die in verschiedenen Studien an echten Blutkulturproben erzielten Identifikationsraten sind, unter Berücksichtigung der aus den zahlreichen Studien zur Lysiszentrifugation ableitbaren Variabilität zwischen verschiedenen Anwendern (Inter-Operator-Variability), mit der hier vertretenen Hypothese der Gleichwertigkeit der untersuchten Verfahren vereinbar (Tabelle 18).

Tabelle 18: Methodenabhängige Identifikationsraten in Studien zur direkten Erregeridentifizierung in positiven Blutkulturproben.

Methode	Studie	n (Anteil gp [%])	Score $\geq 1,7$ [%] ¹			Score $\geq 2,0$ [%] ¹		
			alle	gp	gn	alle	gp	gn
DZ	Christner 2010	277 (66)	87	83	97	75	67	94
DLZ	Stevenson 2010	212 (63)	76	69	89	< 65 ²	< 57 ²	< 79 ²
LZ	Alle LZ	840 (62)	77	70	89	58	43	82
	Buchan 2012	145 (69)	81	75	93	61	50	87
	Klein 2012	124 (58)	82	72	96	54	32	85
	Kok 2011	472 (60)	75	67	87	59	45	80
	Saffert 2012	99 (65)	76	72	83	53	37	78

1) Anteil der bei Anwendung des angegebenen Grenzwerts für den Identifikationsscore korrekt identifizierten Isolate.

2) Die aufgeführten Zahlen beruhen auf einem Identifikationsscore-Grenzwert $\geq 1,9$; der Anteil von Isolaten mit einem Score $\geq 2,0$ ist demnach geringer.

gn: gramnegative Bakterien; gp: grampositive Bakterien

Größere Unterschiede zwischen den Methoden wurden lediglich für einzelne experimentelle Untergruppen beobachtet. Auffällig waren dabei insbesondere das vergleichsweise gute Abschneiden der Lysiszentrifugation bei alten Blutkulturproben (im Gegensatz zu den beiden anderen Verfahren waren die Ergebnisse der Lysiszentrifugation praktisch unabhängig vom Kulturalter) und das schlechte Abschneiden des differentiellen Zentrifugierens bei *S. aureus*. In diesem Punkt konnte mit den hier verwendeten künstlichen Blutkulturproben ein Ergebnis der Untersuchungen an echten Blutkulturen reproduziert werden. In der Studie zur Validierung des differentiellen Zentrifugierens mit klinischen Proben wurden ebenfalls signifikant niedrigere Identifikationsscores für aerobe *S. aureus* Kulturen beobachtet (Christner et al. 2010). Als mögliche Ursache dieses methodenspezifischen Phänomens kommt z. B. eine durch Agglutination der Erreger erhöhte Sedimentationsrate in Frage, die die Isolierung der Bakterien durch differentielles Zentrifugieren, nicht aber durch Lysis-basierte Verfahren, behindern würde. Im Gegensatz dazu wären von der ebenfalls bei *S. aureus* beobachteten erniedrigten Keimzahl zum Zeitpunkt der Positivität alle Verfahren betroffen (Tan et al. 2008). Die beobachtete Robustheit der Lysiszentrifugation gegenüber dem Probenalter ist am ehesten darauf zurückzuführen, dass die Lyse von Blutzellen als wesentlicher Effekt der Probenalterung prinzipienbedingt keinen Einfluss auf die Extraktionseffizienz dieses Verfahrens haben sollte. Im Gegensatz dazu unterminiert die altersbedingte Zelllyse das zentrale Prinzip zur Trennung von Bakterien und zellulären Blutkulturbestandteilen beim differentiellen Zentrifugieren und bei der differentiellen Lysiszentrifugation. Während der Einfluss des Blutkulturalters bei klinischen Proben bisher nur für das differentielle Zentrifugieren systematisch untersucht wurde, konnte in einer vergleichenden Arbeit bei Anwendung der Lysiszentrifugation und eines rein zentrifugationsbasierten Verfahrens für die Lysiszentrifugation ein geringerer Einfluss des Gramverhaltens auf den Identifikationsscore beobachtet werden (Loonen et al. 2012). Auch wenn dieses Verhalten für die hier untersuchten Stämme und Vergleichsverfahren nicht beobachtet wurde, bestätigen diese Daten den Eindruck einer

vergleichsweise großen Homogenität der mittels Lysiszentrifugation erzielten Ergebnisse (Tabelle 18).

5.3 Einfluss von Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore

Für alle untersuchten Verfahren konnte in dieser Arbeit eine klare nichtlineare Abhängigkeit der Identifikationsleistung von der Bakterienkonzentration in der verarbeiteten Probe demonstriert werden. Dabei wurden Identifikationsscores oberhalb des regelhaft für die Direktidentifizierung herangezogenen Grenzwerts von 1,7, in Abhängigkeit vom untersuchten Stamm und dem Alter der Blutkultur, ab Bakterienkonzentrationen von ca. 10^7 bis 10^8 KBE/ml erzielt. Da in den bisher durchgeführten Studien mit klinischen Proben die Bakterienkonzentration in den untersuchten Proben nicht gemessen wurde, liegen für kein Verfahren echte Vergleichswerte mit klinischen Blutkulturproben vor. Allerdings wurde in den Validierungsstudien zum differentiellen Zentrifugieren und zur differentiellen Lysiszentrifugation aus Messungen mit künstlichen Proben und theoretischen Erwägungen ebenfalls eine Schwellenkonzentration von 10^7 KBE/ml abgeleitet (Christner et al. 2010; Stevenson et al. 2010).

Tabelle 19: Bakterienkonzentration in Blutkulturproben zum Zeitpunkt der Positivität.

Probenzahl (Erreger)	Tendenz (Lagemaß)	Spanne	Studie
30 (gemischt)	5×10^8 (Median)	2×10^7 bis 7×10^9	Christner 2010
8 (<i>S. aureus</i>)	$1,5 \times 10^8$ (Mittelwert)	5×10^6 bis 1×10^9	Tan 2008
19 (<i>Enterobacteriaceae</i>)	$1,5 \times 10^{10}$ (Mittelwert)	1×10^9 bis 5×10^{10}	
ca. ¹ 20 (gemischt)	$1,9 \times 10^{10}$ (Mittelwert)	ca. ¹ 2×10^8 bis 1×10^{11}	Konerth 2014

1) Probenzahl und Spanne wurden aus der Abbildung abgeleitet.

In Kombination mit verfügbaren Angaben zur Bakterienkonzentration in Blutkulturproben zum Zeitpunkt der Positivität (Tan et al. 2008; Christner et al. 2010; Konnerth et al. 2014) (Tabelle 19) passen die hier ermittelten Konzentrations-Identifikationsscore-Beziehungen gut zu den in klinischen Proben beobachteten Identifikationsraten (Tabelle 18).

Neben der Bakterienkonzentration wurde in dieser Arbeit auch das Blutkulturalter als signifikanter Faktor für den erzielbaren Identifikationsscore ermittelt. Die Anwendung von Differentiellem Zentrifugieren oder Differentieller Lysiszentrifugation führte zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurve um 0,5 bis 1 \log_{10} (Tabelle 13). Dieser Effekt wurde bei Verwendung zentrifugationsbasierter Aufarbeitungsverfahren auch bei klinischen Proben bereits beobachtet. Für eine sichere Identifikation waren dabei zwei- bis sechsmal so hohe Bakterienkonzentration (entspricht einer Rechtsverschiebung um 0,3 bis 0,8 \log_{10}) wie bei 1 Tages-Blutkulturen erforderlich (Christner et al. 2010; Stevenson et al. 2010). Da der entsprechende Effekt nach Probenvorbereitung mittels Lysiszentrifugation nicht auftrat, kann das Blutkulturalter, zumindest nach den Ergebnissen dieser Arbeit, allerdings nur als methodenspezifischer Einflussfaktor betrachtet werden (Abschnitt 5.2). Die praktische Relevanz für die mikrobiologische Routinediagnostik ist vermutlich ohnehin gering, da mehr als 90 % aller Blutkulturproben innerhalb der ersten zwei Tage positiv werden (Reimer et al. 1997). Auch wenn vergleichbare „Alterungseffekte“ eventuell frühzeitig auch durch Bakterien-induzierte Hämolyse hervorgerufen werden könnten, ist ein daraus für die Lysiszentrifugation resultierender Vorteil zumindest an den publizierten Identifikationsraten nicht ablesbar (Tabelle 18). Ein deutlicher methodenunabhängiger Einfluss war in den simulierten Proben auch für den untersuchten Bakterienstamm nachweisbar. Die Konzentrations-Identifikationsscore-Kurven waren dabei für *E. faecalis* zu niedrigeren und für *P. aeruginosa* zu höheren Bakterienkonzentrationen verschoben. Dieser Befund findet nur bedingt Entsprechung in den Ergebnissen aus klinischen Proben: Dort wurden die höchsten Identifikationsraten für Kulturen mit *E. coli* erzielt, während vergleichsweise schlechte Leistungen bei

Diskussion

S. aureus beobachtet wurden (Tabelle 20). Eine aktuelle Übersicht (Schief-fer et al. 2014) über insgesamt 20 Studien (10 Studien zur SepsisTyper Ly-siszentrifugation und 10 Studien mit verschiedenen in-house Protokollen) findet die höchsten Identifikationsraten, unabhängig vom verwendeten Pro-tokoll, ebenfalls für *Enterobacteriaceae* (ca. 95 %) und vergleichsweise schlechtere Ergebnisse bei grampositiven Kokken (77 %), aber auch bei anderen gramnegativen Stäbchenbakterien (80 %).

Tabelle 20: Speziesspezifische Identifikationsraten in Blutkulturproben

Meth	Studie	n	Korrekt identifizierter Isolate (Anteil in %) ¹			
			<i>E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aerug.</i>
DZ	Christner 2010	277	13/13 (100)	41/42 (98)	47/60 (78)	5/5 (100)
DLZ	Stevenson 2010	212	12/12 (100)	16/16 (100)	12/14 (86)	10/12 (83)
LZ	Alle LZ	840	26/35 (74)	148/154 (96)	77/110 (70)	18/27 (67)
	Buchan 2012	145	12/12 (100)	22/22 (100)	10/10 (100)	4/4 (100)
	Klein 2012	124	6/10 (60)	18/19 (95)	13/27 (48)	1/9 (11)
	Kok 2011	472	5/9 (56)	97/102 (95)	49/54 (91)	11/12 (92)
	Saffert 2012	99	3/4 (75)	11/11 (100)	5/19 (26)	2/2 (100)

1) Identifikationsscore-Grenzwert: 1,7

Allerdings ist der prädiktive Wert der in der vorliegenden Arbeit ermittelten Konzentrations-Identifikationsscore-Kurven für die speziesspezifische Lei-stungsfähigkeit der getesteten Verfahren mit realen Blutkulturproben auch von mehreren, hier nicht kontrollierten, Faktoren abhängig. Zum einen ist die durchgeführte Keimzahlbestimmung im Plattengussverfahren (kolonie-bildenden Einheiten pro Volumeneinheit) zwar ein offenbar gut reproduzier-bares aber letztlich nur relatives Maß für die Konzentration der

Bakterienzellen in einer Probe. In Abhängigkeit vom Aggregationsgrad der Bakterien kann eine koloniebildende Einheit aus einer oder mehreren hundert Zellen bestehen. Da der Identifikationsscore aber wahrscheinlich mit der tatsächlichen Zellzahl korreliert, können stammspezifische Unterschiede im Ausmaß der Aggregation (d. h. der Anzahl der Bakterienzellen pro KBE) ebenso zu Verschiebungen der Konzentrations-Identifikationsscore-Kurven zwischen zwei Stämmen führen, wie stammspezifische Unterschiede in der Probenaufarbeitung. Es muss zudem davon ausgegangen werden, dass neben spezies- auch stammspezifische Unterschiede im Aggregationsverhalten bestehen, was die Übertragbarkeit speziesspezifischer Effekte aus Messungen an ausgewählten Referenzstämmen insgesamt in Frage stellen würde. Darüber hinaus unterliegen die Keimzahlen zum Zeitpunkt der Positivität einer Blutkultur offenbar stamm- und speziesspezifischen Schwankungen (Tan et al. 2008), so dass in den bisher publizierten Daten aus klinischen Proben (keine Bestimmung der Bakterienkonzentration) möglicherweise vorhandene speziesspezifische Effekte nicht vom Konzentrationseffekt (siehe oben) zu trennen sind.

Um zu entscheiden, ob die für klinische Blutkulturproben durchgehend beobachteten signifikant niedrigeren Identifikationsraten mit grampositiven Bakterien (Kok et al. 2011; Schubert et al. 2011; Klein et al. 2012; Loonen et al. 2012; Saffert et al. 2012) tatsächlich auf konzentrationsunabhängige speziesspezifische Effekte zurückzuführen sind (Smole et al. 2002; Prod'hom et al. 2010; Schubert et al. 2011), müssten die hier durchgeführten Untersuchungen unter Verwendung mikroskopischer oder molekularbiologischer Verfahren wiederholt werden, die verlässliche stammübergreifende Konzentrationsvergleiche ermöglichen (Ott et al. 2004).

5.4 Bearbeitungsaufwand und Kosten

Die drei untersuchten Verfahren erlauben die Identifizierung von Bakterien in positiven Blutkulturen innerhalb einer Stunde. Die hier gemessenen Bearbeitungszeiten entsprechen dabei den Angaben anderer Anwender

(Christner et al. 2010; Stevenson et al. 2010). Dem aus der Direktidentifizierung resultierenden Zeitgewinn bei der Speziesidentifizierung von etwa 24 Stunden im Vergleich zur konventionellen Verarbeitung mit Subkultur (Huang et al. 2013; Martiny et al. 2013; Schneiderhan et al. 2013) stehen der zusätzliche Arbeitsaufwand für die Probenaufbereitung und die Verbrauchsmittelkosten der Extraktionsverfahren gegenüber. Etwa ein Viertel der für die Identifikation benötigten Zeit muss dabei als Arbeitszeit exklusiv für die Bearbeitung der Proben aufgewandt werden (hands-on-time). Bearbeitungs- und Gesamtdurchsatzzeit sind beim einfachsten Verfahren, der Lysiszentrifugation, bis zu 25 % kürzer als beim differentiellen Zentrifugieren und der differentiellen Lysiszentrifugation. Durch das verwendete kommerzielle Reagenzienkit ist die Lysiszentrifugation allerdings auch fünfmal teurer als die beiden in-house Methoden (5 Euro / Probe gegenüber 1 Euro / Probe). In Abhängigkeit der anfallenden Personalkosten, des verwendeten Verfahrens und der Zahl der parallel verarbeiteten Proben verursacht die Direktidentifizierung damit Mehrkosten von etwa drei (in-house-Verfahren, Parallelverarbeitung von vier bis acht Proben) bis 14 Euro (Lysiszentrifugation mit kommerziellem Reagenzienkit, Einzelprobe) pro Probe im Vergleich zur konventionellen Blutkulturdiagnostik. Für Labore, die den letzten Teilschritt der Aufarbeitung, die Ameisensäureextraktion, regelhaft im Rahmen der Routineidentifizierung von Kulturoisolen (z. B. Hefen) durchführen, wäre der zusätzliche Personalaufwand reduziert. Die Mehrkosten ließen sich dadurch u. U. auch bei Einsatz der kommerziellen Lysiszentrifugation auf die in einer Kosten-Nutzen-Analyse für den US-Markt ermittelten Werte von 3 bis 4 \$ reduzieren (Lagacé-Wiens et al. 2012).

Die Frage nach der Kosteneffizienz der Direktidentifizierung insgesamt oder nach Unterschieden in der Kosteneffizienz der einzelnen Extraktionsverfahren ist im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend zu beantworten. Zum Zeit liegen nur wenige klinische Studien zu den direkten Auswirkungen der schnellen MALDI-TOF Identifizierung von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen auf das Patientenmanagement vor. Demnach führte die zeitnahe Erregeridentifizierung in zwei Observationsstudien bei einem relevanten Teil der Patienten zur frühzeitigen Modifikation der Antibiotikatherapie

(Clerc et al. 2013; Martiny et al. 2013). Der größte Einfluss wurde dabei bei Patienten mit Bakteriämie durch typischerweise AmpC produzierende *Enterobacteriaceae* (Umstellung der Antibiotikatherapie in 59 % der Fälle), Enterokokken (30 %) und betahämolsierende Streptokokken (30 %) beobachtet. Bei diesen Erregern lässt sich die Antibiotikaempfindlichkeit mit großer Sicherheit aus der Speziesidentifizierung ableiten. Der Effekt von Maßnahmen zur schnellen Erregeridentifizierung ist folglich sowohl vom lokalen Erregerspektrum bei Bakteriämie und den Vorgaben zur empirischen Antibiotikatherapie abhängig. In der Arbeiten Martiny et al. wurde außerdem ein signifikant geringerer Einfluss der schnellen Erregeridentifizierung bei pädiatrischen Patienten beobachtet (Umstellungen in weniger als 3 % der Fälle gegenüber 13 % bei Erwachsenen), der von den Autoren der Studie auf den Widerwillen der Behandler zur Deeskalation einer begonnenen Antibiotikatherapie bei klinischer Besserung der Patienten zurückgeführt wurde (Martiny et al. 2013). In der gleichen Studie wurde außerdem festgestellt, dass in mehr als der Hälfte der Fälle mehr als vier Stunden zwischen der Mitteilung der MALDI-TOF Ergebnisse und einer darauf aufbauenden Intervention vergingen. Da der positive Effekt einer zielgerichteten Antibiotikatherapie bei septischen Patienten offenbar wesentlich von der frühzeitigen Einleitung abhängt (Leibovici et al. 1998), wären für eine Reduktion der Morbidität oder gar Mortalität in Folge einer beschleunigten Diagnostik sowohl eine leistungsfähige Infrastruktur zur verzögerungsfreien Übermittlung von Laborbefunden und eine hohe Adhärenz der Behandler in Bezug auf die daraus resultierenden Therapieempfehlungen erforderlich (Huang et al. 2013). Ähnliches gilt für mögliche Reduktionen im Antibiotikaverbrauch. In welchem Umfang sich die z. T. auch für andere Techniken demonstrierten möglichen positiven Effekte einer beschleunigten Diagnostik durch MALDI-TOF Direktidentifizierung im klinischen Alltag bemerkbar machen, ist daher nicht unwesentlich auch von den lokalen Rahmenbedingungen abhängig (Barenfanger et al. 1999; Beekmann et al. 2003; Bruins et al. 2005; Kerremans et al. 2008).

5.5 Fazit

Der Vergleich von drei physikalisch unterschiedlichen Verfahren zur Erregerdirektidentifizierung aus positiven Blutkulturen erbrachte eine weitestgehende analytische Gleichwertigkeit der getesteten Methoden. Die gefundenen marginalen Leistungsunterschiede für einzelne Probenarten sind im klinischen Alltag wahrscheinlich nicht relevant. Bei der Auswahl eines Verfahrens können daher Aspekte wie Handhabbarkeit und Kosten im Vordergrund stehen. Unter den hier getesteten Verfahren zeigte das Lysis-basierte Protokoll mit kommerziellem Reagenzienkit die kürzeste Bearbeitungszeit. Dazu kommen ein - gemessen an der Zahl der publizierten Studien - hoher Validierungsgrad und mögliche Vorteile im Hinblick auf die Homogenität der Identifikationsraten in verschiedenen Probenkollektiven. Im Gegenzug entstehen im Vergleich zu den in-house Protokollen Zusatzkosten von einigen Euro pro Probe.

Der im Labor zu leistende Mehraufwand ist für alle getesteten Methoden beträchtlich; insbesondere wenn die Messungen für eine maximale Beschleunigung der Diagnostik mehrmals am Tag mit jeweils kleiner Probenanzahl durchgeführt werden sollen (Schneiderhan et al. 2013) und das Ameisensäure-Extraktionsprotokoll als Bestandteil aller untersuchten Aufbereitungsverfahren nicht bereits regelhaft zur Untersuchung von Festkulturen durchgeführt wird. Nichtsdestotrotz erscheint die Implementierung der Technik im mikrobiologischen Routinelabor vor dem Hintergrund der hohen klinischen Relevanz von Blutkulturen und der möglichen Auswirkungen auf das Patientenmanagement erstrebenswert. Das hier vorgestellte Testverfahren mit definierten Referenzstämmen in künstlichen Blutkulturproben hat sich als schnelle Methode für einen aussagekräftigen Leistungsvergleich verschiedener Methoden bewährt und kann damit sowohl die Einführung von in-house-Protokollen als auch die regelmäßigen Qualitätskontrolle unterstützen.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung deutsch

Durch die schnelle zielgerichtete Antibiotikatherapie bei bakteriämischen Patienten können Mortalität und Antibiotikaverbrauch reduziert werden. Die beschleunigte Erregeridentifizierung trägt dabei maßgeblich zur Reduktion der Zeit bis zur Einleitung einer pathogenspezifischen Behandlung bei. In den letzten Jahren wurden verschiedene Verfahren zur direkten Erregeridentifizierung aus positiven Blutkulturen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie publiziert. Wegen des hohen Aufwands der Verfahren liegen allerdings nur wenige Paralleluntersuchungen mit unterschiedlichen Protokollen vor und Leistungsvergleiche zwischen den Arbeiten sind wegen der geringen Zahl an Veröffentlichungen zu einzelnen in-house-Protokollen und der zum Teil beträchtlichen Heterogenität der Arbeiten im Hinblick auf die verwendeten Bewertungskriterien und das untersuchte Probenkollektiv schwierig.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher drei unterschiedliche Verfahren zur direkten Identifikation von Bakterien aus positiven Blutkulturen unter Verwendung eines standardisierten Testprotokolls verglichen. Dabei wurden unter Verwendung künstlicher Blutkulturproben mit definierten Konzentrationen verschiedener Referenzstämme Stamm- und Probenalter-spezifische Konzentrations-Identifikationsscore-Beziehungen für die einzelnen Verfahren abgeleitet. Die vergleichende Analyse dieser Beziehungen mittels nicht-linearer Regression und eines nicht-linearen gemischten Modells bestätigte Ergebnisse und Trends aus früheren Studien an klinischen Proben. U. a. zeigten sich methodenspezifisch reduzierte Identifikationsraten für alte Blutkulturen beim Einsatz von Aufarbeitungsverfahren, die eine Abtrennung von intakten Zellen durch differentielles Zentrifugieren vorsehen. Gemittelt über alle untersuchten Proben zeigten die beiden getesteten in-house Verfahren und das vielfach an klinischen Proben validierte Kit der Firma Bruker

gleichwertige Leistungen. Die erzielbaren Identifikationsscores waren letztlich vor allem von der untersuchten Bakterienkonzentration abhängig. Dabei wurde eine Schwellenkonzentration von 10^7 KBE/ml errechnet, die im Zusammenhang mit den Daten zur Keimzahl in positiven Blutkulturen gut zu den veröffentlichten Identifikationsraten in klinischen Proben passt.

Alle getesteten Verfahren lassen sich einfach erlernen und reproduzierbar durchzuführen. Das kommerzielle Lysis-Protokoll zeigt dabei die kürzeste Bearbeitungszeit bei gleichzeitig höchsten Zusatzkosten. In Abhängigkeit von der untersuchten Probenanzahl und dem für MALDI-TOF Routinemessungen im Labor eingesetzten Extraktionsprotokoll kann die Direktidentifizierung von Blutkulturisolaten mit Zusatzkosten von drei bis fünf Euro implementiert werden.

Das hier vorgestellte Testverfahren kann dabei sowohl die Einführung als auch die nachfolgende kontinuierliche Qualitätssicherung unterstützen.

6.2 Zusammenfassung englisch

Fast bacterial identification from positive blood cultures allows for early initiation of targeted therapy in bacteremic patients with potentially beneficial effects on mortality and antibiotic consumption. During the last couple of years, several protocols for direct bacterial identification from positive blood culture bottles by MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting had been published. Because of the substantial effort required for most of those protocols, only few comparative analyses are available. Because of the small number of studies performed for most in-house-protocols and the heterogeneity regarding evaluation criteria and sample selection, indirect comparison of method efficiencies is problematic.

In the present study three different protocols for direct bacterial identification of positive blood culture bottles were compared with standardized test protocols. The use of blood culture samples with defined concentrations of reference strains allowed for comparisons considering strain- and culture age specific effects on the relation between bacterial concentration and identification scores. Data analysis using non-linear regression and a non-linear

mixed effect models confirmed several assumptions derived from the analysis of clinical samples in previous studies. Among others, we observed reduced identification rates from blood culture bottles of higher age with protocols relying on differential centrifugation to separate microorganisms from intact cells. Averaged over all tested conditions, both in-house-methods and the more thoroughly validated Bruker kit showed equal performances. Identification scores were mainly dependent on the bacterial concentration. The observed threshold of 10^7 CFU/ml for reliable identification fits well with available data on bacterial counts in positive blood culture bottles and identification rates obtained with clinical samples.

All tested methods can reproducibly be executed with manageable training effort. The commercial lysis-protocol offers the shortest processing time at the highest costs. Depending on the number of processed samples and the method used for routine MALDI-TOF mass spectrometry based identification of cultured isolates, direct identification of positive blood cultures could be implemented with extra costs of three to five Euros per sample.

The presented strategy for evaluating the performance of MALDI-TOF mass spectrometry fingerprinting from positive blood cultures could also be useful during test implementation and for continuous quality control.

7 Abkürzungsverzeichnis

AU	Aribtrary unit (willkürliche Einheit)
DLZ	Differentielle Lysiszentrifugation
DNA	Deoxyribonucelic acid (englisch für Desoxyribonukleinsäure)
DZ	Differentielles Zentrifugieren
KBE	Koloniebildende Einheiten
KNS	Koagulasenegative Staphylokokken
LZ	Lysiszentrifugation
MALDI-TOF	Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight (Matrix-assistierte Laser-Desorption-Ionisation mit Flugzeitbestimmung)
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (englisch für Polymerase-Kettenreaktion)
sp.	Species (Spezies)
spp.	Species plurales (mehrere Spezies)
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prinzip der MALDI-TOF Massenspektrometrie (nach Sauer 2010).....	7
Abbildung 2: Massenspektrum von <i>E. coli</i> nach Probenvorbereitung durch Ameisensäureextraktion.	8
Abbildung 3: Kultivierung der Referenzstämme.	15
Abbildung 4: Bakterienkonzentration in den präparierten Blutproben.	24
Abbildung 5: Identifikationsscores in Abhängigkeit vom Logarithmus der Bakteri-enkonzentration.	26
Abbildung 6: Intra-Assay-Variabilität des Identifikationsscores.	27
Abbildung 7: Median, Quartilsabstand (IQR) und $1,5 \times$ IQR der Variationskoeffizienten in Replikatmessungen in Abhängigkeit von verschiedenen Probeneigenschaften.	28
Abbildung 8: Geschätzte Inter-Assay Variabilität des Identifikationsscores.	29
Abbildung 9: Median, Quartilsabstand (IQR) und $1,5 \times$ IQR der Variationskoeffizienten in Pseudoreplikaten (siehe Text) in Abhängigkeit von verschiedenen Probeneigenschaften.	31
Abbildung 10: Einfluss von Probeneigenschaften auf den Identifikationsscore.	32
Abbildung 11: Illustration der Parameter der logistischen Gleichung mit vier Parametern.	33
Abbildung 12: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für die Parameterschätzungen aus nichtlinearer Regression nach Kulturalter, Stamm und Methode.....	35
Abbildung 13: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für die Parameterschätzungen aus nichtlineare Regression mit fixierter Maximalsteigung ($scal = 0,29$).	36
Abbildung 14 Analyse der Residualwerte (nichtlineare Regression).....	37

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 15: Nichtlineare Regression mit fixierter Maximalsteigung (0,29) nach Methode, Stamm und Kulturalter.....	39
Abbildung 16: Analyse der Residualwerte (nichtlineares gemischtes Modell).....	50
Abbildung 17: Nichtlineares gemischtes Modell nach Methode, Stamm und Kulturalter.	51
Abbildung 18: Nichtlineares gemischtes Modell (alle Einzelexperimente).	54

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentualer Erregeranteil bei Bakteriämien (Seifert et al. 2007)	3
Tabelle 2: Studien zur Direktidentifizierung von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen.....	10
Tabelle 3: Korrelation von optischer Dichte und Bakterienkonzentration für PBS-Suspensionen der in der Studie verwendeten Stämme.	22
Tabelle 4: Betrag der Differenz im Median der logarithmierten Bakterienkonzentration zwischen Blutproben mit den unterschiedlichen Bakterienstämmen.	23
Tabelle 5: Übersicht über die untersuchten Proben.	25
Tabelle 6: Parameterkorrelation (4-Parameter logistische Regression mit fixierter Maximalsteigung).	38
Tabelle 7: Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm oder Kulturalter gruppierte Daten.	40
Tabelle 8 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode und Stamm gruppierte Daten.	43
Tabelle 9 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode und Kulturalter gruppierte Daten.	43
Tabelle 10 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle für den Parameter xmid bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.	44
Tabelle 11 Mittelwerte und 95 %-Konfidenzintervalle der für einen Identifikationsscore von 1,7 benötigten Bakterienkonzentration bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.	45

Tabellenverzeichnis

Tabelle 12: Vergleich ausgewählter Modelle aus dem Modellselektionsprozess.	47
Tabelle 13: Parameterschätzwerte des nichtlinearen gemischten Modells M3 (siehe Tabelle 12).	48
Tabelle 14: Mittelwerte für den Parameter xmid im nichtlinearen gemischten Modell.	56
Tabelle 15: Mittelwerte und 95% Konfidenzintervalle der für einen Identifikationsscore von 1,7 benötigten Bakterienkonzentration bei nichtlinearer Regression für nach Methode, Stamm und Kulturalter gruppierte Daten.	57
Tabelle 16: Zeitaufwand für die untersuchten Methoden bei Parallelbearbeitung von 4 Proben.	58
Tabelle 17: Verbrauchsmittelkosten der untersuchten Verfahren bezogen auf eine Probe.	59
Tabelle 18: Methodenabhängige Identifikationsraten in Studien zur direkten Erregeridentifizierung in positiven Blutkulturproben.	62
Tabelle 19: Bakterienkonzentration in Blutkulturproben zum Zeitpunkt der Positivität.	64
Tabelle 20: Speziesspezifische Identifikationsraten in Blutkulturproben ..	66

10 Literaturverzeichnis

Allard C, Carignan A, Bergevin M, Boulais I, Tremblay V, Robichaud P, Duperval R, Pepin J (2008): Secular changes in incidence and mortality associated with *Staphylococcus aureus* bacteraemia in Quebec, Canada, 1991-2005. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 14, 421–428

Ammerlaan H, Seifert H, Harbarth S, Brun-Buisson C, Torres A, Antonelli M, Kluytmans J, Bonten M, European Practices of Infections with *Staphylococcus aureus* (SEPIA) Study Group (2009): Adequacy of antimicrobial treatment and outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia in 9 Western European countries. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 49, 997–1005

Barenfanger J, Drake C, Kacich G (1999): Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. *J Clin Microbiol* 37, 1415–1418

Bearman GML, Wenzel RP (2005): Bacteremias: a leading cause of death. *Arch Med Res* 36, 646–659

Beekmann SE, Diekema DJ, Chapin KC, Doern GV (2003): Effects of rapid detection of bloodstream infections on length of hospitalization and hospital charges. *J Clin Microbiol* 41, 3119–3125

Bruins M, Oord H, Bloembergen P, Wolffhagen M, Casparie A, Degener J, Ruijs G (2005): Lack of effect of shorter turnaround time of microbiological procedures on clinical outcomes: a randomised controlled trial among hospitalised patients in the Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 24, 305–313

Buchan BW, Riebe KM, Ledebauer NA (2012): Comparison of the MALDI Biotyper system using Sepsityper specimen processing to routine microbiological methods for identification of bacteria from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 50, 346–352

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. *J Clin Microbiol* 48, 1584–1591

Claydon MA, Davey SN, Edwards-Jones V, Gordon DB (1996): The rapid identification of intact microorganisms using mass spectrometry. *Nat Biotechnol* 14, 1584–1586

Clerc O, Prod'hom G, Vogne C, Bizzini A, Calandra T, Greub G (2013): Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 56, 1101–1107

Cohen ML (1992): Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era. *Science* 257, 1050–1055

Doern GV, Vautour R, Gaudet M, Levy B (1994): Clinical impact of rapid in vitro susceptibility testing and bacterial identification. *J Clin Microbiol* 32, 1757–1762

Drancourt M (2010): Detection of microorganisms in blood specimens using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: a review. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 16, 1620–1625

Emonet S, Shah HN, Cherkaoui A, Schrenzel J (2010): Application and use of various mass spectrometry methods in clinical microbiology. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 16, 1604–1613

Endimiani A, Tamborini A, Luzzaro F, Lombardi G, Toniolo A (2003): A two-year analysis of risk factors and outcome in patients with bloodstream infection. *Jpn J Infect Dis* 56, 1–7

Fox J, Weisberg S, Fox J: *An R companion to applied regression*. 2nd ed; SAGE Publications, Thousand Oaks, Calif 2011

Gaieski DF, Mikkelsen ME, Band RA, Pines JM, Massone R, Furia FF, Shoffer FS, Goyal M (2010): Impact of time to antibiotics on survival in patients with severe sepsis or septic shock in whom early goal-directed therapy was initiated in the emergency department. *Crit Care Med* 38, 1045–1053

Gasch O, Camoez M, Dominguez MA, Padilla B, Pintado V, Almirante B, Lepe JA, Lagarde M, Ruiz de Gopegui E, Martinez JA, et al. (2013): Predictive factors for early mortality among patients with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 68, 1423–1430

Holland RD, Wilkes JG, Rafii F, Sutherland JB, Persons CC, Voorhees KJ, Lay JO (1996): Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom RCM* 10, 1227–1232

Huang AM, Newton D, Kunapuli A, Gandhi TN, Washer LL, Isip J, Collins CD, Nagel JL (2013): Impact of rapid organism identification via matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight combined with antimicrobial stewardship team intervention in adult patients with bacteremia and candidemia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 57, 1237–1245

Ibrahim EH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH (2000): The influence of inadequate antimicrobial treatment of bloodstream infections on patient outcomes in the ICU setting. *Chest* 118, 146–155

Kang C-I, Kim S-H, Park WB, Lee K-D, Kim H-B, Kim E-C, Oh M-D, Choe K-W (2005): Bloodstream infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacilli: risk factors for mortality and impact of inappropriate initial antimicrobial therapy on outcome. *Antimicrob Agents Chemother* 49, 760–766

Kerremans JJ, Verboom P, Stijnen T, Hakkaart-van Roijen L, Goessens W, Verbrugh HA, Vos MC (2008): Rapid identification and antimicrobial susceptibility testing reduce antibiotic use and accelerate pathogen-directed antibiotic use. *J Antimicrob Chemother* 61, 428–435

Khatib R, Saeed S, Sharma M, Riederer K, Fakhri MG, Johnson LB (2006a): Impact of initial antibiotic choice and delayed appropriate treatment on the outcome of *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 25, 181–185

Khatib R, Johnson LB, Fakhri MG, Riederer K, Khosrovaneh A, Shamsi Tabriz M, Sharma M, Saeed S (2006b): Persistence in *Staphylococcus aureus* bacteremia: incidence, characteristics of patients and outcome. *Scand J Infect Dis* 38, 7–14

Klein S, Zimmermann S, Köhler C, Mischnik A, Alle W, Bode KA (2012): Integration of matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in blood culture diagnostics: a fast and effective approach. *J Med Microbiol* 61, 323–331

Klouché M, Schröder U (2008): Rapid methods for diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem Lab Med* 46, 888–908

Kok J, Thomas LC, Olma T, Chen SCA, Iredell JR (2011): Identification of bacteria in blood culture broths using matrix-assisted laser desorption-ionization Sepsityper™ and time of flight mass spectrometry. *PloS One* 6, e23285

Kollef MH, Zilberberg MD, Shorr AF, Vo L, Schein J, Micek ST, Kim M (2011): Epidemiology, microbiology and outcomes of healthcare-associated and community-acquired bacteremia: a multicenter cohort study. *J Infect* 62, 130–135

Konnerth S, Rademacher G, Suerbaum S, Ziesing S, Sedlacek L, Vonberg R-P (2014): Identification of pathogens from blood culture bottles in spiked and clinical samples using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass-spectrometry analysis. *BMC Res Notes* 7, 405

Kumar A, Ellis P, Arabi Y, Roberts D, Light B, Parrillo JE, Dodek P, Wood G, Kumar A, Simon D, et al. (2009): Initiation of inappropriate antimicrobial

therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136, 1237–1248

La Scola B, Raoult D (2009): Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PloS One* 4, e8041

Lagacé-Wiens PRS, Adam HJ, Karlowsky JA, Nichol KA, Pang PF, Guenther J, Webb AA, Miller C, Alfa MJ (2012): Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: analysis of performance, cost, and turnaround time. *J Clin Microbiol* 50, 3324–3328

Lark RL, Chenoweth C, Saint S, Zemencuk JK, Lipsky BA, Plorde JJ (2000): Four year prospective evaluation of nosocomial bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome. *Diagn Microbiol Infect Dis* 38, 131–140

Laupland KB, Ross T, Gregson DB (2008): *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: risk factors, outcomes, and the influence of methicillin resistance in Calgary, Canada, 2000-2006. *J Infect Dis* 198, 336–343

Leibovici L, Shraga I, Drucker M, Konigsberger H, Samra Z, Pitlik SD (1998): The benefit of appropriate empirical antibiotic treatment in patients with bloodstream infection. *J Intern Med* 244, 379–386

Leone M, Martin C (2008): How to break the vicious circle of antibiotic resistances? *Curr Opin Crit Care* 14, 587–592

Lodise TP, McKinnon PS, Swiderski L, Rybak MJ (2003): Outcomes analysis of delayed antibiotic treatment for hospital-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremia. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 36, 1418–1423

Loonen AJM, Jansz AR, Stalpers J, Wolffs PFG, van den Brule AJC (2012): An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 31, 1575–1583

MacArthur RD, Miller M, Albertson T, Panacek E, Johnson D, Teoh L, Bar-chuk W (2004): Adequacy of early empiric antibiotic treatment and survival in severe sepsis: experience from the MONARCS trial. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 38, 284–288

Marín M, Gudiol C, Garcia-Vidal C, Ardanuy C, Carratalà J (2014): Bloodstream infections in patients with solid tumors: epidemiology, antibiotic therapy, and outcomes in 528 episodes in a single cancer center. *Medicine (Baltimore)* 93, 143–149

Marra AR, Camargo LFA, Pignatari ACC, Sukiennik T, Behar PRP, Medeiros EAS, Ribeiro J, Girão E, Correa L, Guerra C, et al. (2011): Nosocomial

bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. *J Clin Microbiol* 49, 1866–1871

Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M (2003): The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med* 348, 1546–1554

Martiny D, Debaugnies F, Gateff D, Gérard M, Aoun M, Martin C, Konopnicki D, Loizidou A, Georgala A, Hainaut M, et al. (2013): Impact of rapid microbial identification directly from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry on patient management. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 19, E568-581

Meyer E, Schwab F, Schroeren-Boersch B, Gastmeier P (2010): Dramatic increase of third-generation cephalosporin-resistant *E. coli* in German intensive care units: secular trends in antibiotic drug use and bacterial resistance, 2001 to 2008. *Crit Care Lond Engl* 14, R113

Morgenthaler NG, Kostrzewa M (2015): Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: review and meta-analysis of the performance of the sepsityper kit. *Int J Microbiol* 2015, 827416

Muñoz P, Cruz AF, Rodríguez-Crèixems M, Bouza E (2008): Gram-negative bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 32 Suppl 1, S10-14

Munson EL, Diekema DJ, Beekmann SE, Chapin KC, Doern GV (2003): Detection and treatment of bloodstream infection: laboratory reporting and antimicrobial management. *J Clin Microbiol* 41, 495–497

Naber CK (2009): *Staphylococcus aureus* bacteremia: epidemiology, pathophysiology, and management strategies. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 48 Suppl 4, S231-237

Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, Muñoz A, Mensa J (2009): Analysis of 4758 *Escherichia coli* bacteraemia episodes: predictive factors for isolation of an antibiotic-resistant strain and their impact on the outcome. *J Antimicrob Chemother* 63, 568–574

Osmon S, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH (2004): Hospital mortality for patients with bacteremia due to *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 125, 607–616

Osthoff M, Gürtler N, Bassetti S, Balestra G, Marsch S, Pargger H, Weisser M, Egli A (2017): Impact of MALDI-TOF-MS-based identification directly from positive blood cultures on patient management: a controlled clinical trial. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis* 23, 78–85

Ott SJ, Musfeldt M, Ullmann U, Hampe J, Schreiber S (2004): Quantification of intestinal bacterial populations by real-time PCR with a universal primer

set and minor groove binder probes: a global approach to the enteric flora. *J Clin Microbiol* 42, 2566–2572

Paul M, Kariv G, Goldberg E, Raskin M, Shaked H, Hazzan R, Samra Z, Paghis D, Bishara J, Leibovici L (2010): Importance of appropriate empirical antibiotic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia. *J Antimicrob Chemother* 65, 2658–2665

Pinheiro JC, Bates DM: *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. (Statistics and computing); Springer, New York 2000

Pinheiro JM, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, R Core Team: *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. 2014

Prod'hom G, Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G (2010): Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for direct bacterial identification from positive blood culture pellets. *J Clin Microbiol* 48, 1481–1483

R Core Team: *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria 2014

Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP (1997): Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 10, 444–465

Reisner BS, Woods GL (1999): Times to detection of bacteria and yeasts in BACTEC 9240 blood culture bottles. *J Clin Microbiol* 37, 2024–2026

Retamar P, Portillo MM, Lopez-Prieto MD, Rodriguez-Lopez F, de Cueto M, Garcia MV, Gomez MJ, del Arco A, Munoz A, Sanchez-Porto A, et al. (2012): Impact of Inadequate Empirical Therapy on the Mortality of Patients with Bloodstream Infections: a Propensity Score-Based Analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 472–478

del Rio A, Cervera C, Moreno A, Moreillon P, Miró JM (2009): Patients at risk of complications of *Staphylococcus aureus* bloodstream infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 48 Suppl 4, S246-253

Ritz C, Streibig JC: *Nonlinear regression with R. (Use R!)*; Springer, New York 2008

Robinson JO, Pearson JC, Christiansen KJ, Coombs GW, Murray RJ (2009): Community-associated versus healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacteraemia: a 10-year retrospective review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 28, 353–361

Rodríguez-Baño J, Millán AB, Domínguez MA, Borraz C, González MP, Almirante B, Cercenado E, Padilla B, Pujol M, GEIH/GEMARA/REIPI (2009): Impact of inappropriate empirical therapy for sepsis due to health care-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Infect* 58, 131–137

Saffert RT, Cunningham SA, Mandrekar J, Patel R (2012): Comparison of three preparatory methods for detection of bacteremia by MALDI-TOF mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis* 73, 21–26

Sauer S, Kliem M (2010): Mass spectrometry tools for the classification and identification of bacteria. *Nat Rev Microbiol* 8, 74–82

Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, Geider K (2008): Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One* 3, e2843

Schieffer KM, Tan KE, Stamper PD, Somogyi A, Andrea SB, Wakefield T, Romagnoli M, Chapin KC, Wolk DM, Carroll KC (2014): Multicenter evaluation of the Sepsityper™ extraction kit and MALDI-TOF MS for direct identification of positive blood culture isolates using the BD BACTEC™ FX and VersaTREK(®) diagnostic blood culture systems. *J Appl Microbiol* 116, 934–941

Schneiderhan W, Grundt A, Wörner S, Findeisen P, Neumaier M (2013): Work flow analysis of around-the-clock processing of blood culture samples and integrated MALDI-TOF mass spectrometry analysis for the diagnosis of bloodstream infections. *Clin Chem* 59, 1649–1656

Schrenzel J (2007): Clinical relevance of new diagnostic methods for bloodstream infections. *Int J Antimicrob Agents* 30 Suppl 1, S2-6

Schubert S, Weinert K, Wagner C, Gunzl B, Wieser A, Maier T, Kostrzewa M (2011): Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J Mol Diagn JMD* 13, 701–706

Scott JS, Sterling SA, To H, Seals SR, Jones AE (2016): Diagnostic performance of matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry in blood bacterial infections: a systematic review and meta-analysis. *Infect Dis Lond Engl* 48, 530–536

Seifert H, Abele-Horn M, Fätkenheuer G, Glück T, Jansen B, Kern WV, Mack D, Plum G, Reinert RR, Roos R, et al.: MIQ 03a: Blutkulturdiagnostik - Sepsis, Endokarditis, Katheterinfektionen (Teil I). (Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik), Band 3a; 2007

Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P-E, Rolain JM, Raoult D (2009): Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 49, 543–551

Shorr AF, Micek ST, Kollef MH (2008): Inappropriate therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: resource utilization and cost implications. *Crit Care Med* 36, 2335–2340

Smole SC, King LA, Leopold PE, Arbeit RD (2002): Sample preparation of Gram-positive bacteria for identification by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight. *J Microbiol Methods* 48, 107–115

Søgaard M, Nørgaard M, Dethlefsen C, Schønheyder HC (2011): Temporal changes in the incidence and 30-day mortality associated with bacteremia in hospitalized patients from 1992 through 2006: a population-based cohort study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 52, 61–69

Spiess A-N: propagate: Propagation of Uncertainty. 2014

Steinberg JP, Clark CC, Hackman BO (1996): Nosocomial and community-acquired *Staphylococcus aureus* bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 23, 255–259

Stevenson LG, Drake SK, Murray PR (2010): Rapid identification of bacteria in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 48, 444–447

Tan TY, Ng LSY, Kwang LL (2008): Evaluation of disc susceptibility tests performed directly from positive blood cultures. *J Clin Pathol* 61, 343–346

Tumbarello M, Sanguinetti M, Montuori E, Treccarichi EM, Posteraro B, Fiori B, Citton R, D'Inzeo T, Fadda G, Cauda R, Spanu T (2007): Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 1987–1994

Tumbarello M, Sali M, Treccarichi EM, Leone F, Rossi M, Fiori B, De Pascale G, D'Inzeo T, Sanguinetti M, Fadda G, et al. (2008): Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors for inadequate initial antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3244–3252

Vitkauskienė A, Skrodenienė E, Dambrauskienė A, Macas A, Sakalauskas R (2010): *Pseudomonas aeruginosa* bacteremia: resistance to antibiotics, risk factors, and patient mortality. *Med Kaunas Lith* 46, 490–495

Wareham DW, Bean DC, Khanna P, Hennessy EM, Krahe D, Ely A, Millar M (2008): Bloodstream infection due to *Acinetobacter* spp: epidemiology, risk factors and impact of multi-drug resistance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol* 27, 607–612

Warren DK, Zack JE, Elward AM, Cox MJ, Fraser VJ (2001): Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 33, 1329–1335

Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, Edmond MB (2004): Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 39, 309–317

Wolkewitz M, Frank U, Philips G, Schumacher M, Davey P, BURDEN Study Group (2011): Mortality associated with in-hospital bacteraemia caused by *Staphylococcus aureus*: a multistate analysis with follow-up beyond hospital discharge. *J Antimicrob Chemother* 66, 381–386

Zuur AF (Hrsg.): *Mixed effects models and extensions in ecology with R.* (Statistics for biology and health); Springer, New York, NY 2009

11 Danksagung

Ich danke allen ganz herzlich, die mich bei der Umsetzung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Für die Bereitschaft von Herrn Prof. Dr. Aepfelbacher, diese Promotion am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene durchführen zu können, möchte ich mich ausdrücklich bedanken.

Sehr herzlich danke ich Herrn Prof. Dr. Holger Rohde für seine humorvolle Unterstützung und seine Bereitschaft, für Probleme jederzeit ansprechbar zu sein.

Mein tief empfundener Dank gilt Herrn Dr. Martin Christner für die stets hilfsbereite, geduldige und kompetente Betreuung während der Entstehungszeit dieser Arbeit, insbesondere für seinen unermüdlichen Einsatz beim Erarbeiten von statistischen Problemlösungen und Hilfestellung bei Fehlermeldungen an Blutkulturautomaten einer bekannten Firma.

Ganz besonders danke ich den Arbeitsgruppen Rohde und Aepfelbacher sowie insbesondere Marta, Cristina und Lena für motivierende Gespräche, wichtige Ratschläge und eine lustige Zeit auch außerhalb des Labors.

Ich danke auch herzlich den Blutspendern Monika, Rolf, Martin und Holger. Mein besonderer Dank gilt den MTAs der mikrobiologischen Diagnostik und der Arbeitsgruppe Rohde, wo ich wiederholt die Geräte belegen durfte, und die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Für schöne Kaffeepausen und Gespräche danke ich von Herzen Isabel, Joaquin, Cristina, Marta, Filiz, Anna, Steffi, Agnes und Ayham.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Monika und Rolf, sowie meinen Geschwistern Judith und Philipp, die durch ihre konstruktiven Anregungen, ihre Unterstützung und Motivation dieser Arbeit zu einem erfolgreichen Abschluss verholfen haben.

12 Curriculum Vitae

Lebenslauf wurde aus datenschutzrechtlichen Gründen entfernt.

13 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.

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

Unterschrift: