

Universität Ulm

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

Ärztlicher Direktor

Prof. Dr. med. Steffen Stenger

Direkte Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien aus
positiven Blutkulturen – Genügt die Zuverlässigkeit der
Agardiffusionsmethode den klinischen Anforderungen?

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der

Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Andreas Edelmann

Münsingen

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. med. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nele Wellinghausen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Peter Kern

Tag der Promotion: 17.07.2009

Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Seite
Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	II
1. Einleitung	1
1.1 Definition von Bakteriämie und Sepsis	1
1.2 Epidemiologie und Letalität der Bakteriämie und Sepsis	2
1.3 Klinik der Sepsis	3
1.4 Erregerspektrum der Sepsis	3
1.5 Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis	4
1.6 Bedeutung der Resistenztestung von Bakterien	5
1.7 Resistenzsituation bakterieller Sepsiserreger	7
1.8 Zielsetzung dieser Arbeit	9
2. Material und Methoden	10
2.1 Material	10
2.2 Methoden	12
3. Ergebnisse	17
3.1 Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen für das Agardiffusionsverfahren	17
3.2 Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen für das Mikrobouillondilutionsverfahren	21
3.3 Ergebnisse der Auswertung der Blutkulturen	24
4. Diskussion	29
5. Zusammenfassung	39
6. Literaturverzeichnis	41
7. Danksagung	45

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATCC	American Type Culture Collection
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DIN	Deutsches Institut für Normung
EARSS	European Antimicrobial Resistance Surveillance System
E. coli	Escherichia coli
GENARS	German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance
GRE	Glykopeptid resistente Enterokokken
KNS	Koagulase-negative Staphylokokken
MAP	mean arterial pressure (mittlerer arterieller Blutdruck)
MHK	Minimale Hemmkonzentration
MRSA	Methicillin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Natrium-Chlorid
NNIS	National Nosocomial Infections Surveillance
S. aureus	Staphylococcus aureus
SIRS	Severe Inflammatory Response Syndrome
VRE	Vancomycin resistente Enterokokken
VRSA	Vancomycin resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>

1. Einleitung

1.1. Definition von Bakteriämie und Sepsis

Eine Bakteriämie bezeichnet das Vorhandensein von Bakterien im Blutkreislauf. Die Definition der Sepsis ist in den S2 Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. und der Deutschen interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin festgehalten und erfordert einen differenzierteren Blickpunkt. Allgemein formuliert handelt es sich um eine komplexe, den ganzen Körper betreffende Entzündungsreaktion auf eine Infektion. Der Begriff der Sepsis beschreibt eine Konstellation aus klinischen und laborchemischen Befunden, sowie Einschränkungen von Organfunktionen. Aus diesen Parametern ergibt sich nicht nur die Definition der Sepsis, vielmehr erlauben sie auch eine Einteilung in die Schweregrade Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock. Zu dieser Definition und Einteilung werden Kriterien aus drei Gruppen zu Rate gezogen. Zum einen der Nachweis einer Infektion. Als zweiter Punkt das Severe inflammatory response syndrome (SIRS) und zum dritten akute Organdysfunktionen. In folgender Tabelle werden die einzelnen Kriterien näher erläutert.

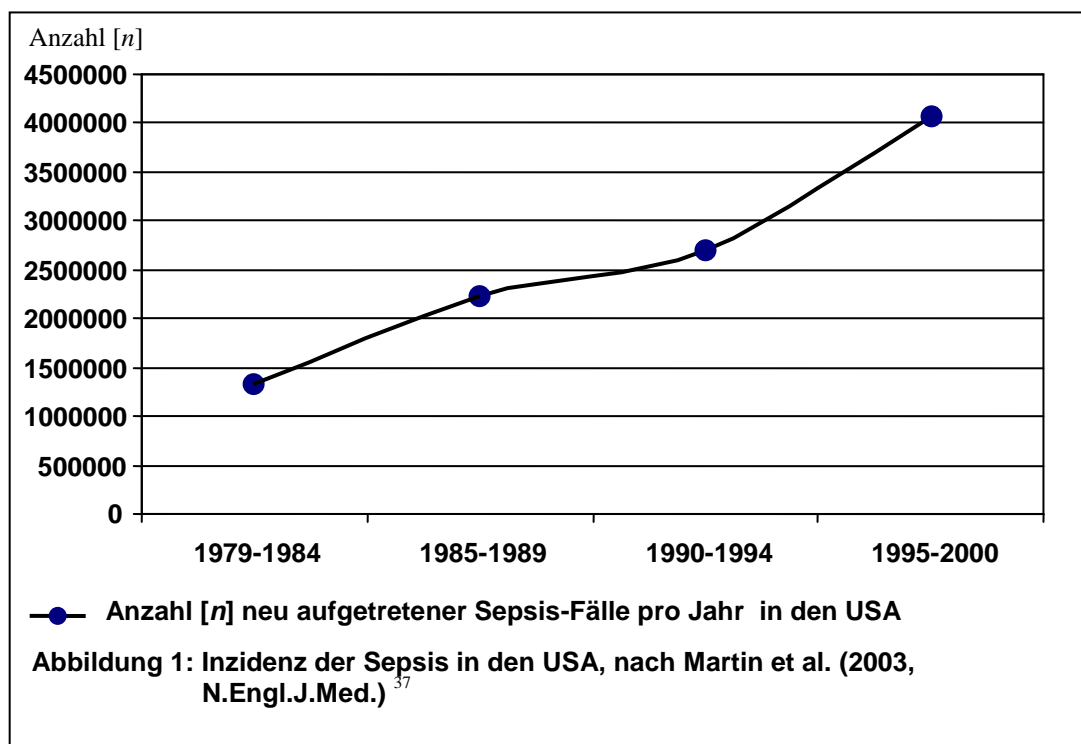
Tabelle 1: Diagnosekriterien der Sepsis
I Infektion <ul style="list-style-type: none"> - Mikrobiologischer Nachweis oder klinische Kriterien
II Severe inflammatory host response (mindestens 2 Kriterien) <ul style="list-style-type: none"> - Fieber ($\geq 38^{\circ}\text{C}$) oder Hypothermie ($\leq 36^{\circ}\text{C}$) - Tachykardie - Tachypnoe ($\geq 20/\text{min}$) oder Hyperventilation ($\text{PaCO}_2 \leq 33 \text{ mmHg}$) - Leukozytose ($\geq 12.000/\text{mm}^3$) oder Leukopenie ($\leq 4.000/\text{mm}^3$) oder 10% unreife Neutrophile im Differentialblutbild
III akute Organdysfunktion (mindestens 1 Kriterium) <ul style="list-style-type: none"> - akute Enzephalopathie (Vigilanzminderung, Desorientierung, Unruhe) - Thrombozytopenie: Abfall um mehr als 30%/24h; oder Thrombozytenzahl $\leq 100.000/\text{mm}^3$ - Arterielle Hypoxämie: $\text{PaO}_2 \leq 75 \text{ mmHg}$ unter Raumluft oder bei Sauerstoffzufuhr ein $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$-Verhältnis $\leq 250 \text{ mmHg}$ - Renale Dysfunktion: Diurese $\leq 0,5\text{ml/kg/h}$ für mindestens 2h oder Anstieg des Serumkreatinins auf mehr als das 2-fache der Norm - Metabolische Azidose:: Base Excess $\leq -5\text{mmol/l}$ oder Lactatkonzentration mehr als das 1,5-fache der Norm

Die einfache Sepsis ist definiert durch die Erfüllung der Kriterien I und II. Das zusätzliche Vorliegen eines Kriteriums der Kategorie III definiert die schwere Sepsis.

Ein septischer Schock liegt definitionsgemäß vor, wenn die Kriterien I und II erfüllt sind und für wenigstens eine Stunde ein systolischer arterieller Blutdruck ≤ 90 mmHg, beziehungsweise ein mittlerer arterieller Druck ≤ 65 mmHg gemessen wird.²³

1.2. Epidemiologie und Letalität der Bakteriämie und Sepsis

Die Bakteriämie und Sepsis sind Krankheitsbilder, die auf Allgemeinstationen, vor allem aber im Bereich der Intensivmedizin eine immer wichtigere Rolle spielen. Lag die Inzidenz der Sepsis in den USA im Jahre 1979 noch bei 70 Fällen pro 100 000 Einwohner, stieg die Zahl der Neuerkrankungen auf 180 pro 100 000 Einwohner im Jahre 1987.³² Eine 2001 veröffentlichte Arbeit zeigte eine Inzidenz von 300 Fällen pro 100 000 Einwohnern im Jahr 1995.¹ Auch die Deutsche Sepsis-Gesellschaft e.V. nennt in ihrem aktuellen Internetangebot diese Zahl. Weitere Studien zeigen einen deutlichen Anstieg der Sepsisfälle an.³⁷



Die hohe Letalität der Sepsis unterstreicht die besondere klinische Bedeutung der Sepsis. In der Literatur finden sich Letalitätsraten innerhalb der ersten 28 Tage nach Beginn der Erkrankung zwischen 18 % und 60 %.^{1,6,10,25,28,33,45,48,61}

Bei Patienten, die sich im septischen Schock befinden, werden Letalitätsraten bis zu 95 % berichtet.⁶⁰

1.3. Klinik der Sepsis

Mit der Sepsis zusammenhängende klinische Manifestationen sind eng mit der Definition verknüpft und wurden bereits in Tabelle 1 erwähnt. Klinische Symptome einer Sepsis sind demnach alle Symptome, die dem Bild einer schweren Infektion entsprechen. Hierzu gehört ein rascher Fieberanstieg, welcher gelegentlich mit Auftreten von Schüttelfrost verbunden ist. Hinzu kommen eine initiale Tachypnoe mit Hyperventilation, woraus sich eine respiratorische Alkalose entwickelt. Ebenfalls zu beobachten ist eine Tachykardie und eventuell eine Hypotension. Wie die Zusammenstellung der klinischen Symptome zeigt, sind die klinischen Zeichen einer Sepsis relativ unspezifisch und lassen ohne Nachweis eines Infektionserregers nur schwerlich die klinische Diagnosestellung zu.

Bei der klinischen Untersuchung sollte auf Zeichen geachtet werden, die auf einen Herd als Ausgangspunkt der Sepsis hindeuten könnten, wie z. B. Pneumonie, Hautinfektionen, Meningitis oder katheterassoziierte Infektionen.

1.4. Erregerspektrum der Sepsis

Bei der Bestimmung der verursachenden Keime finden sich gram-positive Erreger deutlich häufiger als gram-negative Erreger. Die Verteilung liegt bei 60 % bis 70 % Häufigkeit im gram-positiven Spektrum und 20 % bis 30 % im gram-negativen Erregerspektrum.^{20,42,61}

Detaillierter betrachtet sind die häufigsten Erreger, die im Zusammenhang mit einer Sepsis isoliert werden Koagulase-negative Staphylokokken (KNS). Diese werden in bis zu 36 % der Fälle als verursachende Keime isoliert. Weiter findet man mit einer Häufigkeit von bis zu 25 % *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus species* mit bis zu 10 %.⁶¹ Im gram-negativen Spektrum steht *Escherichia coli* mit bis zu 20 % im Vordergrund.³¹ Weitere häufige gram-negative Erreger der Sepsis sind *Klebsiella species*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter species*.

Aus dem Bereich der Pilze finden sich in bis zu 10 % der Sepsisfälle *Candida species*.^{20,61}

1.5. Mikrobiologische Diagnostik der Sepsis

Wie in Abschnitt 1.1. und Tabelle 1 erwähnt, spielt der Nachweis einer Infektion eine entscheidende Rolle für die Diagnosestellung der Sepsis. Der Nachweis des Infektionserregers ist ferner essentiell für eine adäquate Therapie der Patienten.

Allerdings lässt sich eine Bakteriämie nur bei ca. 30 % der klinisch an Sepsis erkrankten Patienten nachweisen.^{3,35}

Die mikrobiologische Diagnostik bei klinischem Verdacht auf eine Sepsis erfolgt vornehmlich mittels der Abnahme und Untersuchung von Blutkulturen. Weitere diagnostische Probenmaterialien umfassen Liquor bei Verdacht auf Meningitis, Urin bei Verdacht auf Urosepsis, respiratorische Sekrete etc.

Eine Blutkultur-Untersuchung sollte schon beim ersten Verdacht auf das Vorliegen einer Sepsis in die Wege geleitet werden.^{35,51} Die Blutkulturen sollten möglichst vor Beginn der antibiotischen Therapie abgenommen werden.⁴⁷ Sollte dies nicht mehr möglich sein, empfiehlt sich die Abnahme kurz vor Gabe der nächsten Antibiotikadosis. Die Entnahme sollte nicht über einen Katheterzugang erfolgen, sondern nach gründlicher Desinfektion über eine periphere Venenpunktion.^{49,52} Bei der Befüllung der Kulturflaschen muss unbedingt die korrekte Befüllmenge eingehalten werden. Ein zu geringes Inokulatvolumen verringert die Sensitivität der Proben.³⁸

In jedem Fall sollte eine Identifikation und Resistenztestung aller aus Blutkulturen isolierten Sepsiserreger erfolgen, um einen Aufschluss über die vorliegende Spezies und die wirksame Therapie nach Antibioigrammerstellung zu erhalten.

Die Verarbeitung der Blutkulturen verläuft in mehreren Schritten. Zunächst werden die Kulturen in einem automatisierten Gerät, z. B. dem BACTEC-System, bebrütet. Nach Meldung einer Kultur als positiv vom Gerät, wird ein Grampräparat angefertigt, das die vorläufige Identifizierung der gewachsenen Bakterien als Kokken oder Stäbchen und gram-positive oder gram-negative Erreger ermöglicht.

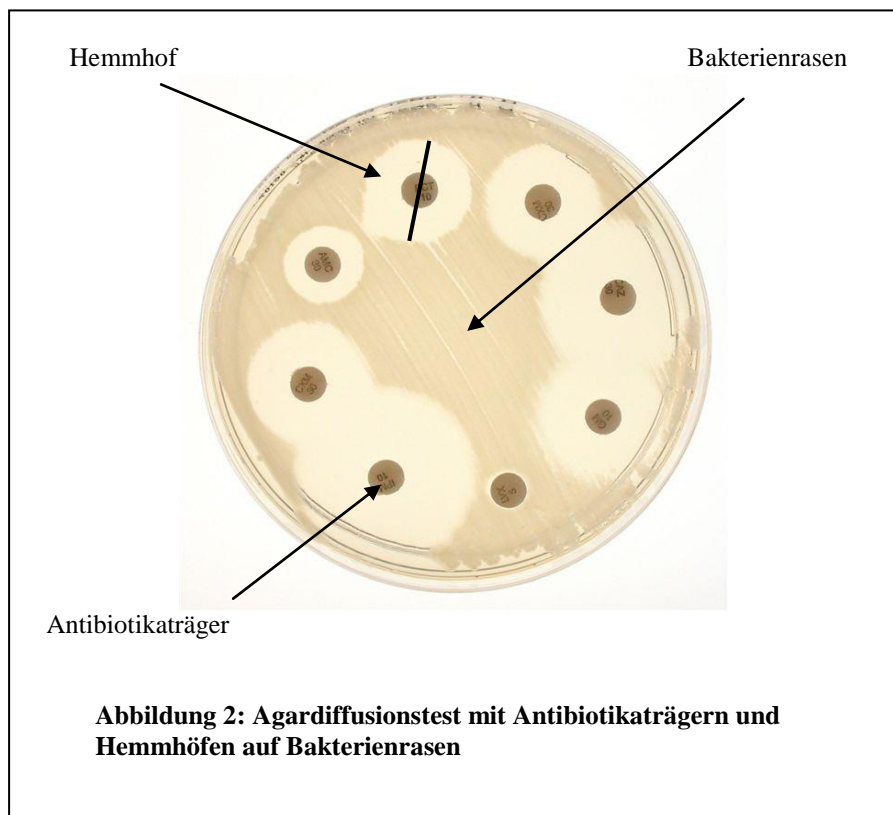
Um möglichst schnell Informationen über die Empfindlichkeit der Erreger gegenüber den wichtigsten Antibiotika zu erhalten, empfehlen die mikrobiologischen Fachgesellschaften, wie das Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)⁹ und die Mikrobiologischen-Infektiologischen Qualitätsstandards (MiQ)¹⁴ der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, eine direkte Resistenztestung der Bakterien, die in Blutkulturflaschen angezüchtet wurden. Diese direkte Empfindlichkeitsprüfung wird in aller Regel mit dem Agardiffusionstest durchgeführt.

Die direkte Resistenztestung sollte zur Bestätigung nach Anzucht der Erreger auf festen Nährmedien von Reinkulturen wiederholt werden, so dass ein endgültiges Ergebnis der Empfindlichkeitsprüfung erst 2 Tage nach Positivmeldung der Blutkultur vorliegt.

Aus der positiven Blutkulturflasche erfolgt ferner die Subkultivierung auf Universal- und Selektivnährmedien für die weitere Identifizierung der Erreger.

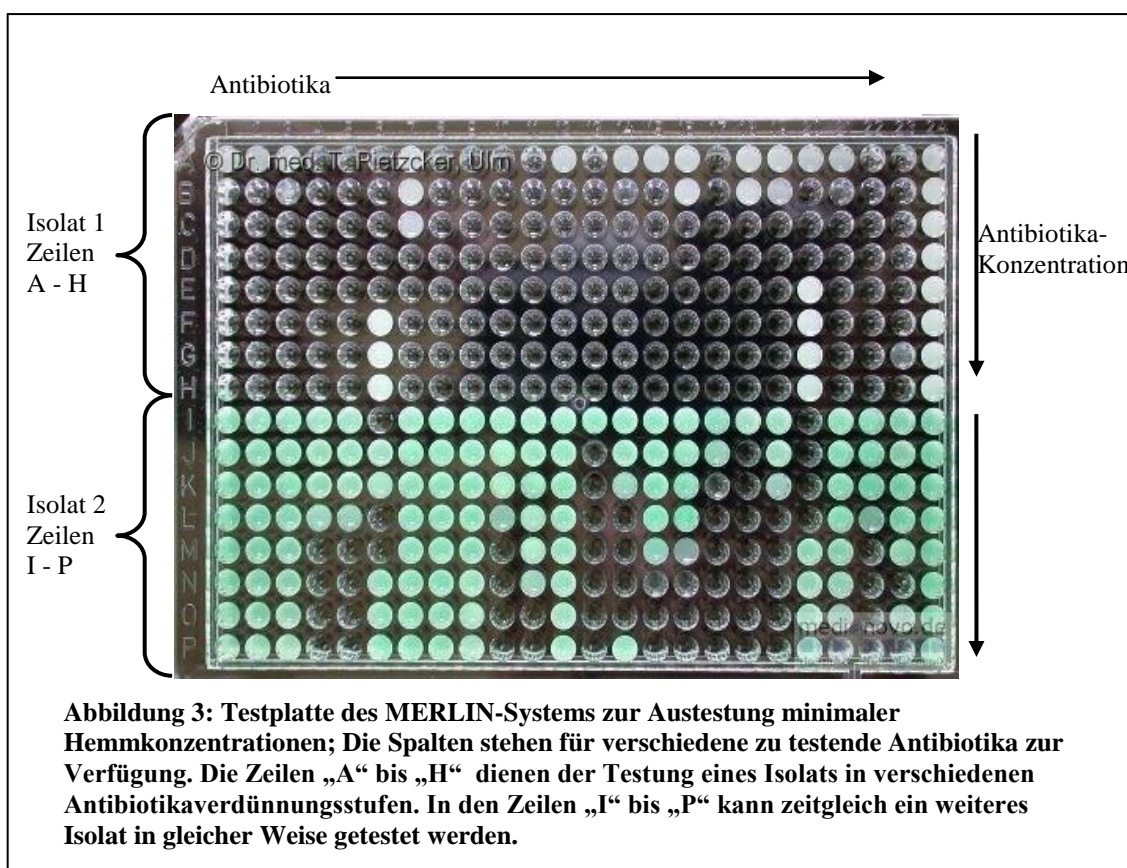
1.6. Bedeutung der Resistenztestung von Bakterien

Standardmäßig angewandte Methoden der Empfindlichkeitsprüfung sind vor allem die Agardiffusion und die Mikrobouillondilution. Die Agardiffusionsmethode ist eine einfache, kostengünstige und weit verbreitete Methode, bei der antibiotikage tränkte Filterpapierblättchen auf einen Agar aufgelegt werden, der mit den zu testenden Bakterien beimpft wurde. Nach Bebrütung über Nacht gibt der Durchmesser einer entstandenen Wachstumshemmung, sog. Hemmhöfe, um die Plättchen herum Aufschluss über die Empfindlichkeit des Bakteriums gegenüber den getesteten Substanzen.



Die Mikrobouillondilutionsmethode erlaubt im Gegensatz zur Agardiffusion nicht nur die Einteilung der Bakterien in empfindlich, intermediär empfindlich oder resistent, sondern sie ermöglicht die Ermittlung einer minimalen Hemmkonzentration (MHK) im

Reihenverdünnungsverfahren. Die MHK ist diejenige Konzentration eines Antibiotikums, die mindestens erreicht werden muss, um das jeweilige Bakterium im Wachstum zu hemmen. Mikrobouillondilutionsmethoden haben den Vorteil einer weitestgehend automatisierten Durchführbarkeit, erlauben eine MHK-adaptierte Dosierung der Antibiotika und stellen aufgrund der hohen Aussagekraft der MHK-Bestimmung bei schwerwiegenden Infektionen die Methode der Wahl dar.



Aufgrund immer häufiger auftretender Resistenzen der pathogenen Erreger gegenüber Antibiotika kommt der korrekten und schnellen Identifikation der jeweiligen Antibiotikaempfindlichkeit eine immer größere Bedeutung zu.¹¹

Eine rasche Information über die Resistenzlage gibt den behandelnden Ärzten die Möglichkeit, eine frühe adäquate antibiotische Therapie zu beginnen, beziehungsweise eine bisher durchgeführte unzureichende Medikation auf wirksame Substanzen umzustellen. Diese frühe adäquate Therapie hat, wie bereits in Studien gezeigt, einen ausgeprägt positiven Effekt auf die Prognose des Patienten.^{10,25,26,31,33}

Neben einer Senkung der Letalität konnte gezeigt werden, dass eine frühe gezielte antibiotische Therapie auch eine Reduktion der Kosten mit sich bringt.⁵⁴

Möglicherweise trägt die frühe gezielte Therapie auch zur Prävention der Entwicklung weiterer Resistenzen bei, indem zum einen die durchschnittliche Liegedauer im Krankenhaus gesenkt und zum anderen auf Antibiotika mit breitem Wirkungsspektrum verzichtet werden kann.^{29,60}

Eine adäquate, frühzeitige antibiotische Therapie können die behandelnden Ärzte jedoch nur durchführen, wenn sie zeitnah zuverlässige Informationen über die Resistenzen der vorhandenen Erreger erhalten. Der direkten Resistenztestung aus Blutkulturen kommt somit eine entscheidende Bedeutung für die Behandlung des Patienten zu.

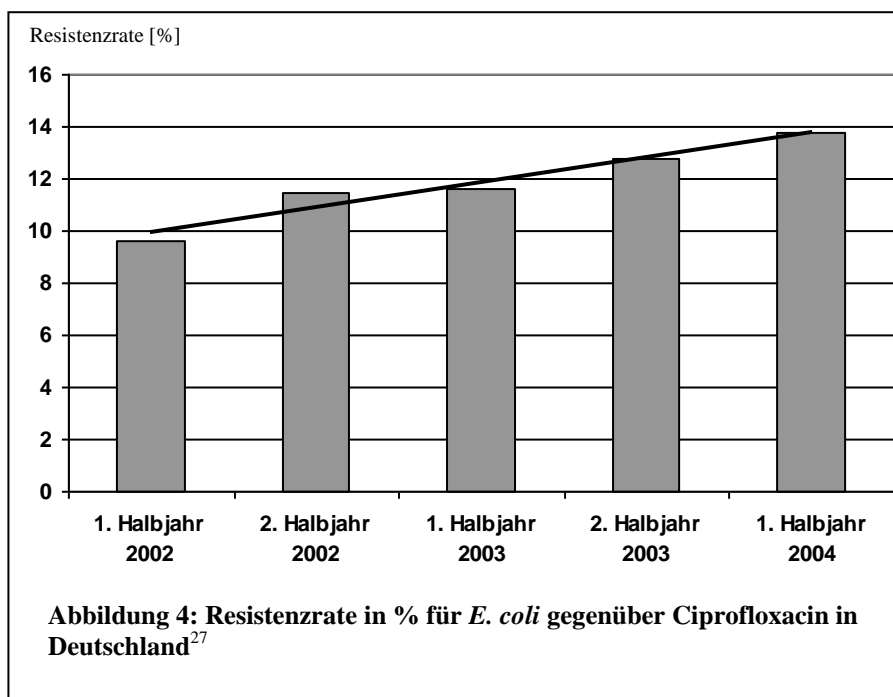
1.7. Resistenzsituation bakterieller Sepsis-Erreger

In Bezug auf die Resistenzraten gegenüber wichtigen Antibiotika gibt es große Unterschiede zwischen einzelnen Erregerspezies. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Identifikation und Resistenztestung aller in Blutkulturen vorhandener Erreger.

Durch Zusammenführen der Daten mikrobiologischer Laboratorien und Auswertung durch übergeordnete Institutionen lassen sich überregionale Trends im Bereich der Resistenzentwicklung erkennen. In Deutschland und Europa erfolgt dies unter anderem über das German Network for Antimicrobial Resistance Surveillance (GENARS) sowie durch das European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS).

Betrachtet man die veröffentlichten Daten dieser Projekte, zeigt sich über die letzten Jahre insgesamt eine Zunahme resistenter Keime unter den analysierten Proben. Auszugsweise sollen hier lediglich einige Daten für die wichtigsten Sepsiserreger *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt werden.

Die Resistenzrate der Spezies *S. aureus* stieg in Deutschland vom ersten Halbjahr 2002 bis zum ersten Halbjahr 2004 für Erythromycin von 19,2 % auf 21,8 %, für Oxacillin von 9 % auf 11,6 %²⁷. Betrachtet man die Daten, die für *P. aeruginosa* vorliegen findet man einen Anstieg der Resistenzrate gegenüber Ciprofloxacin von 11,5 % im ersten Halbjahr 2002 auf 18,8 % im ersten Halbjahr 2004²⁷. Ein ähnliches Bild findet sich auch für Resistenzraten von *E. coli* (Abbildung 4).



Es bestehen aber nicht nur Unterschiede zwischen einzelnen Erregern und Antibiotikaklassen. Auch die geographische Lage spielt eine wesentliche Rolle im Bezug auf Häufigkeit und Verbreitung resistenter Bakterienstämme. Daten des European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) für die Jahre 1999 bis 2005 zeigen dies sehr deutlich. So sind Methicillin resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Mittelmeerländern und in Großbritannien mit einer Häufigkeit von 25 % – 50 % unter allen isolierten *S. aureus* zu finden. In Deutschland, Polen, Tschechien und Österreich finden sich MRSA in 10 % – 25 % und in Skandinavien in unter 5 % der Fälle. Eine Studie zur Ausbreitung von MRSA Stämmen in Europa zwischen 1999 und 2002 zeigt signifikante Anstiege des MRSA Anteils in Belgien, Irland, Deutschland, den Niederlanden und in Großbritannien.⁵³

Ein weiteres Problem stellen Resistenzen gegen die so genannten Reserveantibiotika, wie Vancomycin dar. Vancomycin resistente Enterokokken (VRE), auch als Glykopeptid resistente Enterokokken (GRE) bezeichnet, finden sich in zunehmendem Maße in Deutschland und machen eine gezielte antibiotische Therapie unerlässlich.

Nach Datenlage der EARSS lag der Anteil der glykopeptidunempfindlichen Enterokokken (*Enterococcus faecium*) 1999 in Deutschland noch unter 1% und stieg bis ins Jahr 2005 auf 10,1 %.

1.8. Zielsetzung dieser Arbeit

Die direkte Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien aus positiven Blutkulturen ist essentiell für eine adäquate antibiotische Therapie von Sepsis-Patienten. Hierzu wird in der Regel die technisch einfache und kostengünstige Agardiffusionsmethode verwendet. Diese erscheint in ihrer Exaktheit der MHK-Bestimmung mittels Mikrobouillondilution von der Reinkultur jedoch unterlegen.

Ziel dieser Arbeit ist daher, die Zuverlässigkeit der direkten Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusion aus Blutkulturen im Vergleich zur Standardmethode von der Reinkultur (MHK-Bestimmung mittels Mikrobouillondilution) zu untersuchen.

Dazu sollen zunächst die Präzision und Richtigkeit der Agardiffusionsmethode aus positiven Blutkulturen bestimmt werden. Anschließend sollen die beiden Testmethoden in einer retrospektiven Untersuchung aller Resistenzprüfungen aus Blutkulturen, die vom 01.01.2004 bis 31.12.2004 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene durchgeführt wurden, verglichen werden. Mögliche Abweichungen zwischen der direkten Agardiffusionstestung und der Standardmethode mittels Mikrobouillondilution sollen einer kritischen Wertung in Bezug auf ihre klinischen Konsequenzen unterzogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Datensatz

Zur Analyse standen die Daten aller aus positiven Blutkulturen angezüchteten Erreger zur Verfügung, die im Zeitraum vom 1. Januar 2004 bis zum 31. Dezember 2004 im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Ulm untersucht wurden (n = 1107). Die Blutkulturen stammten von Patienten, die ambulant oder stationär im Universitätsklinikum Ulm oder im Klinikum Günzburg behandelt wurden. Eine Blutkultur beinhaltet jeweils eine aerobe und eine anaerobe Blutkulturflasche bei erwachsenen Patienten, bzw. nur eine aerobe Blutkulturflasche bei pädiatrischen Patienten.

2.1.2 Testverfahren zur Identifikation der Bakterienstämme

- API (Analytical Profile Index) 20 Strep (BioMérieux, Nürtingen)
- API Rapid ID 32 Strep (BioMérieux, Nürtingen)
- API 20 E (BioMérieux, Nürtingen)
- API 20 NE (BioMérieux, Nürtingen)
- Slidex Plus (BioMérieux, Nürtingen)
- API 20 Staph (BioMérieux, Nürtingen)

2.1.3 Blutkulturmedien und Qualitätskontrollstämme

- Bactec 9240 Blutkulturmedium Bactec Plus aerobic/F (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- Bactec 9240 Blutkulturmedium Bactec Plus anaerobic/F (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- Bactec 9240 Blutkulturmedium Bactec Peds Plus/F (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- *Staphylococcus aureus* ATCC 29213
- *Escherichia coli* ATCC 25922
- *Klebsiella pneumoniae ESBL* ATCC 700603
- *Enterococcus faecium* VanA Qualitätskontrollstamm der Fa. Merlin, Bornheim-Hesel

2.1.4 Reagenzien und Verbrauchsmaterial für Mikrobouillonresistenztestung

- Sterile Einweg-Impfösen (Fa. Sarstedt AG & Co.)
- Vorgefertigte, mit Antibiotika beschichtete Mikrotiterplatten zur Resistenztestung, Panel GP für gram-positive Erreger und GN für gram-negative Erreger (Fa. Merlin)
- Müller-Hinton-Phytigel-Bouillon (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

2.1.5 Reagenzien und Verbrauchsmaterial für Agardiffusionstestung

- Müller-Hinton-Agar (Fa. Heipha Dr. Müller GmbH)
- Kochblut-Agar (Fa. Oxoid GmbH)
- Sterile Impfösen (Fa. Sarstedt AG & Co.)
- Sterile NaCl-Lösung, 0,9% (Fa. Braun)
- Antibiotikatestplättchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
 - Vancomycin 30 µg
 - Penicillin G 10 U
 - Clindamycin 2 µg
 - Erythromycin 15 µg
 - Gentamicin 10 µg
 - Doxycyclin 30 µg
 - Levofloxacin 5 µg
 - Cefuroxim 30 µg
 - Oxacillin 1 µg
 - Ampicillin 10 µg
 - Imipenem 10 µg
 - Amoxicillin/Clavulansäure 20/10 µg
 - Piperacillin/Tazobactam 100/10 µg
 - Ceftazidim 30 µg
 - Ofloxacin 5 µg

2.1.6 Geräte

- Blutkultursystem Bactec 9240 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)
- Brutschrank anaerob (Fa. Heraeus Holding GmbH)
- Brutschrank aerob (Fa. Heraeus Holding GmbH)
- Micronaut-System (Merlin Diagnostika GmbH, Bornheim-Hesel)

2.2 Methoden

2.2.1 Auswertung der Blutkulturen

Alle 1107 im Jahr 2004 im Labor des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene aus positiven Blutkulturen angezüchteten Bakterienisolate wurden zunächst in die Studie eingeschlossen. Um eine Verfälschung der Daten durch mehrfach isolierte, identische Erreger zu vermeiden, wurden Isolate der gleichen Spezies, die mehrfach innerhalb eines 5 Tageszeitraumes vom selben Patienten mit identischem Antibiogramm nachgewiesen wurden, aus der Studie ausgeschlossen und lediglich das zuerst untersuchte Isolat berücksichtigt. Ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen wurden Blutkulturen, die im Gram-Präparat eine Mischung verschiedener Mikroorganismen aufwiesen. Einzelne Isolate ohne vorliegende Ergebnisse aus der MHK oder Agardiffusionstestung wurden ebenfalls nicht berücksichtigt. Auch Erreger, die mittels MHK-Testverfahren nicht getestet werden können (z. B. anaerobe Spezies) wurden aus der Studie ausgeschlossen.

Insgesamt standen somit für die Auswertung in Bezug auf die Fragestellung 758 Blutkulturisolate von 590 Patienten zur Verfügung. Die Isolate fanden sich in aeroben Blutkulturflaschen (n = 128), anaeroben Blutkulturflaschen (n = 135), pädiatrisch aeroben Blutkulturflaschen (n = 80), oder aeroben und anaeroben Blutkulturflaschen zugleich (n = 415). Zeigte sich Wachstum eines Isolats sowohl aerob als auch anaerob wurde die definitive Resistenztestung mittels Mikrobouillonresistenztestung aus der aeroben Kultur durchgeführt.

Differenzen zwischen der Anzahl der in die Studie eingeschlossenen Isolate und der Anzahl der Ergebnisse im direkten beziehungsweise endgültigen Testverfahren ergeben sich aus unterschiedlichen Testansätzen für verschiedene Spezies, Fehlapplikation einzelner Antibiotikaplättchen bei der Agardiffusionstestung, fehlende Ergebnisse in der Labor-EDV und fehlende Einzeltestergebnisse in der endgültigen Messung.

2.2.2. Identifikation der Bakterienspezies

Die Identifikation der Bakterienspezies wurde im Rahmen der Routinediagnostik anhand der verschiedenen zur Verfügung stehenden API-Tests (Analytical Profile Index) der Firma BioMérieux gemäß den Standardarbeitsanweisungen durchgeführt. Verwendet wurden hierfür der API 20 Strep, API Rapid ID 32 Strep, API 20 E und API 20 NE. Diese Testverfahren sind Schnelltestverfahren nach dem Prinzip der Bunten Reihe. Die

Identifikation der Bakterien erfolgt durch Austestung ihrer physiologischen und biochemischen Eigenschaften.

Staphylokokken wurden anhand der typischen Mikroskopie und Morphologie, sowie der positiven Katalasereaktion identifiziert. *Staphylococcus aureus* wurden von Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) anhand des Nachweises des Clumping Factors mittels Slidex Plus (BioMérieux) und eines Aureasenachweises (BioMérieux) differenziert. Bei zweifelhaftem Ergebnis dieser Testverfahren wurde ein API 20 Staph zur eindeutigen Identifikation angeschlossen.

2.2.3. Direkte Resistenztestung mit dem Agardiffusionsverfahren

Aus positiv gemeldeten Blutkulturflaschen wurde zunächst ein Grampräparat erstellt, um das Gramverhalten der enthaltenen Erreger zu beurteilen. Dies war auch für die Agardiffusionstestung erforderlich, da für die Herstellung eines einheitlichen, konfluierenden Bakterienrasens auf der jeweiligen Agarplatte für gram-positive und gram-negative Erreger unterschiedliche Mengen des Blutkulturmediums verwendet wurden. Bei Nachweis gram-negativer Stäbchen wurden 0,2 ml des Blutkulturmediums in 10 ml 0,9% steriler Kochsalzlösung suspendiert, für gram-positive Erreger 0,5 ml Blutkulturmedium in 10 ml 0,9% Kochsalzlösung.

Die so erhaltene Suspension wurde mit einem sterilen Wattetupfer flächig auf Müller-Hinton-Agar aufgetragen. Für die Oxacillin-Testung von Staphylokokken wurde Müller-Hinton-Agar mit 2% NaCl verwendet.

Entsprechend der Morphologie und des Gram-Verhaltens der isolierten Bakterienspezies wurden die folgenden Antibiotikapanels getestet.

Gram-positive Haufenkokken (Verdacht auf Staphylokokken) wurden getestet mittels Testplättchen für Doxycyclin (30 µg), Erythromycin (15 µg), Gentamicin (10 µg), Levofloxacin (5 µg), Penicillin (10 U), Vancomycin (30 µg) und Oxacillin (1 µg)⁴⁰.

Gram-positive Kokken in Ketten und/oder Diplokokken wurden getestet mittels Testplättchen für Ampicillin (10 µg), Erythromycin (15 µg), Imipenem (10 µg), Levofloxacin (5 µg) sowie Vancomycin (30 µg).

Gram-negative Stäbchen wurden getestet mittels Testplättchen für Amoxicillin/Clavulansäure (20/10 µg), Ceftazidim (30 µg), Cefuroxim (30 µg), Gentamicin (10 µg), Imipenem (10 µg), Levofloxacin (5 µg) und Piperacillin/Tazobactam (100/10 µg).

Nach Beimpfung der Agarplatten und Belegung mit den Antibiotikatestplättchen wurden diese bei 36 ± 1 °C für 18-24 Stunden unter Raumluft bebrütet.

Die Auswertung der bebrüteten Agarplatten erfolgte gemäß den Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute⁹, die für jeden Hemmhofdurchmesser eine Interpretation in sensibel, intermediär empfindlich oder resistent erlauben (siehe auch Abb. 2).

Es erfolgte zusätzlich eine tägliche Qualitätskontrolle durch die Testung von ATCC-Stämmen.

2.2.4. Standard-Mikrobouillon-Dilutionsverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Zur standardmäßigen Resistenztestung wurden positiv gemeldete Blutkulturflaschen mit dem MICRONAUT System (Merlin Diagnostika) untersucht. Hierbei handelt es sich um ein automatisiertes System zur Resistenztestung von Bakterien mittels MHK-Bestimmung. Es ermöglicht die parallele Testung von 2 Isolaten und je 24 Antibiotika auf einer 384-Loch-Mikrotiterplatte (Abb. 3). Das Bakterienwachstum wird photometrisch beurteilt. Für die Standardbestimmung der minimalen Hemmkonzentrationen wurden ausschließlich über Nacht bebrütete Reinkulturen verwendet. Für die Testung der Isolate stehen verschiedene Antibiotika-Panels für gram-positive und gram-negative Erreger zur Verfügung. Alle Testreihen wurden gemäß den Empfehlungen des Herstellers und unter Beachtung der Richtlinien des Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005) und des Deutschen Instituts für Normung (DIN)¹⁶ durchgeführt. Dies betrifft die korrekte Präparation des Inokulums, die Zusammensetzung der Bouillon und die Inkubationsbedingungen.

Dementsprechend wurden aus den Proben Bakteriensuspensionen in 0,9 % NaCl-Lösung mit einem McFarland-Wert von 0,5 hergestellt. Eine Kontrolle des Wertes erfolgte mittels Nephelometer. Aus der hergestellten Suspension wurden für gram-positive Bakterien 100 µl in 15 ml Müller-Hinton-Phytigel-Bouillon gelöst. Bei gram-negativen Isolaten wurden 50 µl der Vorverdünnung entnommen und ebenfalls in 15 ml Müller-Hinton-Phytigel-Bouillon gelöst. Anschließend erfolgte die Beimpfung der Testplatten mit den Müller-Hinton-Phytigel-Bouillons und deren Bebrütung für 18-24 Stunden bei 36 ± 1 °C unter Raumluft. Nach ausreichender Bebrütung wurden die Testplatten photometrisch ausgewertet. Die Interpretation der gemessenen minimalen Hemmkonzentrationen erfolgte gemäß den Kriterien der CLSI (2005) als sensibel, intermediär empfindlich oder resistent.

Zusätzlich erfolgte die Auswertung gemäß den vom Deutschen Institut für Normung herausgegebenen Kriterien¹⁶.

Eine Qualitätskontrolle erfolgte täglich anhand der Testung von Referenz-Bakterienstämmen der American Type Culture Collection (ATCC) mit definierten MHK-Werten.

Da die Testung von Imipenem aufgrund der Instabilität des Antibiotikums im Micronaut-System nicht zuverlässig möglich ist, erfolgte die Standardtestung für Imipenem als Agardiffusionstestung aus Reinkulturen. Imipenem wurde daher in dieser Studie nicht weiter berücksichtigt.

2.2.5. Validierung der Verfahren

Zur Validierung des Agardiffusionstests wurden alle in 2004 im Rahmen der Routinediagnostik durchgeführten Qualitätskontrolluntersuchungen in Bezug auf ihre Richtigkeit und Präzision ausgewertet. Bei diesen Qualitätskontrolluntersuchungen handelte es sich um Testungen an Subkulturen von Bakterien.

Zur Prüfung der Richtigkeit und Präzision des Agardiffusionsverfahrens als Direktmethode wurden sterile Blutkulturen mit *S. aureus* (ATCC 25923) bzw. *E. coli* (ATCC 25922) versetzt.

Zum Einen wurden je 15 Blutkulturflaschen beimpft. Aus jeder Blutkulturflasche wurde nach Bebrütung ein Agardiffusionstest erstellt und dieser analysiert. Die hierbei gemessenen Hemmhofdurchmesser wurden mit den Grenzwerten des jeweiligen ATCC-Stammes verglichen und auf ihre Richtigkeit und Präzision geprüft. („Präzision und Richtigkeit von Test zu Test“)

Zum Anderen wurden aus einer einzelnen künstlich beimpften Blutkulturflasche 15 Agardiffusionsteste erstellt und nach Bebrütung die Streuung der Hemmhofdurchmesser analysiert. („Präzision und Richtigkeit in der Serie“)

Die Validierung erfolgte analog für gram-positive und gram-negative Isolate.

Berücksichtigt wurden hierbei alle in die Datenanalyse eingeschlossenen Antibiotika.

2.2.6. Datenanalyse

Beim Vergleich der Agardiffusionsmethode mit der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration wurden jeweils die interpretierten Messergebnisse in der Kategorie „sensibel“, „intermediär empfindlich“ und „resistent“ verglichen. Übereinstimmungen und Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Methoden wurden gemäß den Standards der CLSI⁹ wie folgt eingeteilt: „Übereinstimmung“ bei gleichem Ergebnis in Agardiffusions- und Mikrobouillondilutionsverfahren, „Very Major Error“ bei sensiblem Ergebnis in der direkten Testung und resistentem Ergebnis in der Standardtestung, „Major Error“ bei resistentem Ergebnis der direkten Testung und sensiblem Ergebnis der Standardtestung, sowie „Minor Error“ bei sensiblem oder resistentem Ergebnis in der Direkttestung und intermediärem Ergebnis der Standardtestung bzw. bei umgekehrtem Ergebnis. Die Auswertung erfolgte mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel der Firma Microsoft.

3. Ergebnisse

3.1. Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen für das Agardiffusionsverfahren

3.1.1. Richtigkeit des Agardiffusionsverfahrens aus Subkulturen (Standardverfahren)

Die durchgeführte Analyse der täglich angelegten Kontrollen aus 2004 für die Agardiffusionstestung aus Subkulturen zeigt für die in der Analyse berücksichtigten Antibiotika eine Richtigkeit des Verfahrens von 95,4 % für den gram-negativen Bereich (Tabelle 2).

Tabelle 2: Richtigkeit des Agardiffusionsverfahrens aus Subkulturen im gram-negativen Bereich (*Escherichia coli* ATCC (American Type Culture Collection) 25922)

Antibiotikum	Referenzbereich [mm]	Anzahl (n) der Messungen im Bezug auf den Referenzbereich					
		unterhalb		innerhalb		oberhalb	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)
Amoxicillin / Clavulansäure	19 - 25	3	(1,1)	262	(98,9)		
Ceftazidim	25 – 32	13	(4,9)	253	(95,1)		
Cefuroxim	20 – 26	10	(3,8)	256	(96,2)		
Gentamicin	19 – 26	8	(3)	257	(96,6)	1	(0,4)
Levofloxacin	29 – 37	27	(10,2)	239	(89,8)		
Piperacillin / Tazobactam	24 - 30	11	(4,2)	254	(95,8)		
Total		72	(4,5)	1521	(95,4)	1	(0,1)

Auffällig ist hier die hohe Rate an zu gering gemessenen Hemmhofdurchmessern für Levofloxacin. Betrachtet man dies genauer, so zeigt sich, dass 19 der 27 zu niedrig gemessenen Werte nur 1 mm unterhalb des Grenzbereiches bei 28 mm lagen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Gemessene Hemmhofdurchmesser für Levofloxacin bei *Escherichia coli* (ATCC (American Type Culture Collection) 25922). Hervorgehoben sind die Werte außerhalb des Referenzbereiches.

Hemmhofdurchmesser [mm]	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	36
Anzahl (n)	1	5	2	19	36	109	11	56	5	17	5

Die Kontrolluntersuchungen aus Subkulturen von gram-positiven Isolaten, hier *S. aureus* (ATCC 25923), zeigen eine Richtigkeit des Verfahrens von 94,5 % (Tabelle 4).

Antibiotikum	Referenzbereich [mm]	Anzahl (n) der Messungen im Bezug auf den Referenzbereich					
		unterhalb		innerhalb		oberhalb	
		n	(%)	n	(%)	(%)	
Ampicillin	27 - 35	4	(1,5)	255	(97)	4	(1,5)
Doxycyclin	23 - 29	1	(0,4)	247	(96,5)	8	(3,1)
Erythromycin	22 - 30	2	(0,8)	256	(99,2)		
Gentamicin	19 - 27			256	(98,8)	3	(1,2)
Levofloxacin	25 - 30	15	(5,7)	249	(94,3)		
Oxacillin	18 - 24			229	(87,1)	34	(12,9)
Penicillin	26 - 37	5	(1,9)	254	(98,1)		
Vancomycin	17 - 21	39	(15,1)	220	(84,9)		
Total		66	(3,2)	1966	(94,5)	49	(2,4)

Hier zeigen sich erhöhte Fehlerraten bei Levofloxacin (5,7 %), Oxacillin (12,9 %) und Vancomycin (15,1 %). Auch bei diesen drei Antibiotika konzentrieren sich die außerhalb des Grenzbereiches befindlichen Werte auf einen engen Bereich am Rande der Referenz (Tabelle 5).

Levofloxacin	Hemmhofdurchmesser [mm]	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
	Anzahl (n)	2	3	10	34	69	48	68	13	17		
Oxacillin	Hemmhofdurchmesser [mm]	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
	Anzahl (n)	3	7	18	18	42	52	91	20	12	1	1
Vancomycin	Hemmhofdurchmesser [mm]	12	13	14	15	16	17	18	19	20		
	Anzahl (n)	1	1	4	11	22	109	71	37	3		

3.1.2. Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen aus Blutkulturen

3.1.2.1. Ergebnisse für das gram-negative Erregerspektrum

Die durchgeführten Kontrollen zur Zuverlässigkeit der direkten Testung aus 15 separat beimpften Blutkulturen mit der Agardiffusionsmethode zeigten eine Richtigkeit von 100 % für den gram-negativen Bereich (*E. coli* ATCC 25922) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Verteilung der Messungen zur Richtigkeit der Agardiffusionsmethode im gram-negativen Erregerspektrum anhand <i>Escherichia coli</i> (ATCC (American Type Culture Collection) 25922); Erhebung aus 15 separaten Ansätzen			
Antibiotikum	Grenzbereich [mm]	Hemmhofdurchmesser [mm]	Anzahl (n)
Amoxicillin/ Clavulansäure	19-25	21	1
		22	11
		23	2
		24	1
Ceftazidim	25-32	28	1
		29	
		30	11
		31	
		32	3
Cefuroxim	20-26	22	7
		23	1
		24	7
Gentamicin	19-26	22	7
		23	
		24	7
		25	
		26	1
Levofloxacin	29-37	32	1
		34	12
		36	2
Piperacillin/ Tazobactam	24-30	27	1
		28	11
		29	
		30	3

Bei der 15-maligen Untersuchung einer mit *E. coli* (ATCC 25922) beimpften Blutkultur zeigte sich ebenfalls eine Richtigkeit von 100 %, sowie eine hohe Präzision. Die gemessenen Hemmhofdurchmesser verteilten sich auf ± 2 mm (Tabelle 7).

Tabelle 7: Verteilung der Messungen zur Richtigkeit und Präzision der Agardiffusionsmethode im gram-negativen Erregerspektrum anhand *Escherichia coli* (ATCC (American Type Culture Collection) 25922); Erhebung aus 15 separaten Ansätzen aus einer Blutkultur

Antibiotikum	Grenzbereich [mm]	Hemmhofdurchmesser [mm]	Anzahl (n)	Variationskoeffizient
Amoxicillin/ Clavulansäure	19-25	21	9	0,02
		22	6	
Ceftazidim	25-32	28	6	0,03
		29	2	
		30	7	
Cefuroxim	20-26	22	12	0,03
		23	2	
		24	1	
Gentamicin	19-26	21	1	0,05
		22	9	
		23		
		24	5	
Levofloxacin	29-37	32	4	0,03
		34	11	
Piperacillin/ Tazobactam	24-30	26	2	0,03
		27	2	
		28	11	

3.1.2.2. Ergebnisse für das gram-positive Erregerspektrum

Auch im gram-positiven Spektrum (*S. aureus* ATCC 29213) zeigte die Testung aus 15 separat beimpften Blutkulturen mit der Agardiffusionsmethode eine Richtigkeit von 100 % (Tabelle 8).

Tabelle 8: Verteilung der Messungen zur Richtigkeit der Agardiffusionsmethode im gram-positiven Erregerspektrum anhand *Staphylococcus aureus* (ATCC (American Type Culture Collection) 29213); Erhebung aus 15 separaten Ansätzen

Antibiotikum	Grenzbereich [mm]	Hemmhofdurchmesser [mm]	Anzahl (n)
Doxycyclin	23-29	28	12
		29	3
Erythromycin	22-30	26	4
		28	11
Gentamicin	19-27	22	2
		24	12
		26	1
Levofloxacin	25-30	26	5
		28	10
Oxacillin	18-24	20	14
		22	1
Penicillin G	26-37	30	1
		32	6
		34	7
		36	1
Vancomycin	17-21	18	5
		19	6
		20	4

Bei den 15-maligen Untersuchungen aus einer beimpften Blutkultur im gram-positiven Erregerspektrum zeigte sich ebenfalls Streuung auf ± 2 mm. Bis auf 5 gemessene Werte,

dies entspricht 4,8 % aller durchgeführten Messungen, lagen alle Werte innerhalb der Referenzbereiche (Tabelle 9). Es lag hier somit eine Richtigkeit von 95,2 % vor. Die Präzision lag ebenfalls hoch, was sich in einem Variationskoeffizienten von 0,04 – 0,05 widerspiegelt.

Tabelle 9: Verteilung der Messungen zur Richtigkeit und Präzision der Agardiffusionsmethode im gram-positiven Erregerspektrum anhand <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC (American Type Culture Collection) 29213); Erhebung aus 15 Ansätzen aus einer Blutkultur; Hervorgehobene Werte befinden sich außerhalb des Grenzbereiches				
Antibiotikum	Grenzbereich [mm]	Hemmhofdurchmesser [mm]	Anzahl (n)	Variationskoeffizient
Doxycyclin	23-29	26	1	0,04
		28	8	
		29	1	
		30	5	
Erythromycin	22-30	26	6	0,04
		28	9	
Gentamicin	19-27	22	2	0,04
		24	11	
		26	2	
Levofloxacin	25-30	26	4	0,04
		28	10	
		30	1	
Oxacillin	18-24	19	1	0,04
		20	12	
		22	2	
Penicillin G	26-37	32	6	0,05
		34	4	
		36	5	
Vancomycin	17-21	18	5	0,04
		19	8	
		20	2	

3.2. Ergebnisse der Kontrollen für das Mikroboullondilutionsverfahren

3.2.1. Ergebnisse für Kontrollen im gram-negativen Erregerspektrum

Von den insgesamt 630 routinemäßig durchgeführten Kontrollen der in der Studie berücksichtigten Antibiotika befanden sich 623 Messungen innerhalb der für den Kontrollstamm (*E. coli* ATCC 25922) von der CLSI herausgegebenen Referenzbereiche. Dies bedeutet eine Richtigkeit von 98,9 %. Einzelne Messungen außerhalb des Referenzbereiches fanden sich für Amoxicillin/Clavulansäure, Ceftazidim, Levofloxacin und Gentamicin (Tabelle 10).

Tabelle 10: Richtigkeit der Mikrodilutionsmethode für das gram-negative Erregerspektrum anhand *Escherichia coli* (ATCC (American Type Culture Collection) 25922) und der durchgeführten Kontrolluntersuchungen nach CLSI-Standards

Antibiotikum	Grenzbereich	Anzahl der Messungen (n)	Anzahl (n) der Messungen im Bezug auf den Referenzbereich			
			innerhalb		oberhalb	
			n	(%)	n	(%)
Amoxicillin/ Clavulansäure	2/1 8/4	105	104	(99)	1	(1)
Ceftazidim	0,06 – 0,5	105	104	(99)	1	(1)
Cefuroxim	2 – 8	105	105	(100)		
Gentamicin	0,25 – 1	105	102	(97,1)	3	(2,9)
Levofloxacin	0,008 – 0,06	105	103	(98,1)	2	(1,9)
Piperacillin/ Tazobactam	1/4 4/4	105	105	(100)		
Total		630	623	(98,9)	7	(1,1)

Zur Darstellung der Präzision wurde die Häufigkeit der gemessenen MHK-Werte für die betrachteten Antibiotika detailliert aufgeschlüsselt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Gemessene Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) bei *Escherichia coli* (ATCC (American Type Culture Collection) 25922). Hervorgehoben sind Werte außerhalb des Referenzbereiches.

Amoxicillin/ Clavulansäure	MHK-Wert	1	2	4	>128/2		
	Anzahl (n)	15	78	11	1		
Ceftazidim	MHK-Wert	< 0,25	0,5		1		
	Anzahl (n)	101	3		1		
Cefuroxim	MHK-Wert	2	4	8			
	Anzahl (n)	2	92	11			
Gentamicin	MHK-Wert	≤ 0,25	0,5	1	2	4	> 32
	Anzahl (n)	2	67	33	1	1	1
Levofloxacin	MHK-Wert	≤ 0,0625	0,125			> 8	
	Anzahl (n)	103	1			1	
Piperacillin/ Tazobactam	MHK-Wert	≤ 1/4	0,5	4			
	Anzahl (n)	20	84	1			

3.2.2. Ergebnisse für Kontrollen im gram-positiven Erregerspektrum

Im gram-positiven Erregerspektrum wurden insgesamt 693 Kontrollen am Kontrollstamm *S. aureus* (ATCC 29213) durchgeführt. 660 dieser Messungen lagen innerhalb der Grenzbereiche der CLSI. Die Richtigkeit ist hierfür mit 95,2 % anzugeben. Messungen außerhalb der angegebenen Grenzbereiche fanden sich hauptsächlich bei Penicillin G, seltener auch bei Gentamicin und Levofloxacin (Tabelle 12). Die erhöhten Werte für

Penicillin G lagen genau wie die richtigen Messwerte im Bereich der Interpretation als sensibel.

Tabelle 12: Richtigkeit der Mikrodilutionsmethode für das gram-positive Erregerspektrum anhand <i>S. aureus</i> (ATCC (American Type Culture Collection) 29213) und der durchgeführten Kontrolluntersuchungen nach CLSI-Standards						
Antibiotikum	Grenzbereich	Anzahl der Messungen (n)	Anzahl (n) der Messungen im Bezug auf den Referenzbereich			
			innerhalb		oberhalb	
			n	(%)	n	(%)
Doxycyclin	0,12 – 1	99	99	(100)		
Erythromycin	0,25 – 1	99	99	(100)		
Gentamicin	0,12 – 1	99	97	(98)	2	(2)
Levofloxacin	0,06 – 0,5	99	98	(99)	1	(1)
Oxacillin	0,12 – 0,5	99	98	(99)	1	(1)
Penicillin	0,25 – 2	99	70	(70,7)	29	(29,3)
Vancomycin	0,5 - 2	99	99	(100)		
Total		693	660	(95,2)	33	(4,8)

Zur genaueren Analyse wurde zur Berechnung der Präzision auch im gram-positiven Spektrum die Häufigkeit der jeweils gemessenen Minimalen Hemmkonzentrationen ermittelt (Tabelle 13).

Tabelle 13: Gemessene Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) bei <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC (American Type Culture Collection) 29213). Hervorgehoben sind Werte außerhalb des Referenzbereiches.						
Doxycyclin	MHK-Wert	≤ 0,125			0,25	
	Anzahl (n)	50			49	
Erythromycin	MHK-Wert	0,25	0,5	1		
	Anzahl (n)	31	67	1		
Gentamicin	MHK-Wert	≤ 0,25	0,5	1	2	8
	Anzahl (n)	3	71	23	1	1
Levofloxacin	MHK-Wert	≤ 0,125		0,25	2	
	Anzahl (n)	20		78	1	
Oxacillin	MHK-Wert	≤ 0,25		0,5	1	
	Anzahl (n)	88		10	1	
Penicillin	MHK-Wert	0,5	1	2	4	8
	Anzahl (n)	1	24	45	24	5
Vancomycin	MHK-Wert	1			2	
	Anzahl (n)	15			84	

3.3. Ergebnisse der Auswertung der Blutkulturen

3.3.1. Studiendaten und Erregerverteilung

Die direkte Resistenztestung mittels Agardiffusionsmethode und das Standardmikrobouillondilutionsverfahren wurden auf 758 Bakterien, die aus Blutkulturen angezüchtet wurden, angewendet. So konnten insgesamt 4930 Erreger-Antibiotika-Kombinationen vergleichend untersucht werden. Unter den 758 untersuchten Isolaten wurden 532 gram-positive und 226 gram-negative Isolate identifiziert. Die hierbei gefundene Häufigkeit einzelner Bakterienspezies (Tabelle 14) ist vergleichbar mit Erregerspektren, die in anderen Studien in Blutkulturen gefunden wurden.^{31,61}

Tabelle 14: Erregerhäufigkeit unter den untersuchten Blutkulturen	
Gram-positive Spezies (n = 532)	Gram-negative Spezies (n = 226)
<i>Aerococcus viridans</i> (1)	<i>Acinetobacter</i> spp. (4)
<i>Enterococcus faecalis</i> (23)	<i>Citrobacter freundii</i> (4)
<i>Enterococcus faecium</i> (12)	<i>Citrobacter</i> spp. (4)
<i>Enterococcus gallinarum</i> (1)	<i>Enterobacter cloacae</i> (7)
<i>Enterococcus</i> spp. (4)	<i>Enterobacter</i> spp. (5)
<i>Micrococcus</i> spp. (4)	<i>Escherichia coli</i> (110)
<i>Staphylococcus aureus</i> (71)	<i>Hafnia alvei</i> (1)
Koagulase-negative Staphylokokken (413)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (22)
	<i>Klebsiella oxytoca</i> (2)
	<i>Morganella morganii</i> (4)
	<i>Pantoea</i> spp. (2)
	<i>Proteus mirabilis</i> (8)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (28)
	<i>Pseudomonas</i> spp. (2)
	<i>Rhizobium (Agrobacterium) radiobacter</i> (1)
	<i>Salmonella</i> Enteritidis (2)
	<i>Serratia marcescens</i> (8)
	<i>Serratia</i> spp. (5)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (7)

3.3.2. Datenanalyse unter Berücksichtigung der CLSI-Standards

Da der Agardiffusionstest gemäß den Richtlinien der CLSI durchgeführt wurde, erfolgte zunächst eine Auswertung des Mikrobouillondilutionsverfahrens ebenfalls nach den Richtlinien der CLSI. Bei der Analyse der untersuchten Erreger-Antibiotika-Kombinationen unter Zugrundelegen der CLSI-Richtlinien⁹ fanden sich für die gesamte Studienpopulation von 4930 Kombinationen 4628 Übereinstimmungen (93,9 %) von direkter Agardiffusionstestung und dem Standardmikrodilutionsverfahren.

Minor Errors wurden in 177 Fällen (3,6 %), Major Errors in 50 Fällen (1 %) und Very Major Errors in 75 Fällen (1,5 %) gefunden.

Für eine detaillierte Auswertung wurden gram-negative und gram-positive Isolate getrennt betrachtet.

Gram-positive Bakterien fanden sich bei 532 von 758 Isolaten (70,2 %) und wurden in 3587 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen untersucht. Hierbei fand sich eine Übereinstimmung der Testverfahren in 3394 Fällen (94,6 %). Minor Errors fanden sich in 93 Fällen (2,6 %), Major Errors in 41 Fällen (1,1 %) und Very Major Errors in 59 Fällen (1,6 %) (Tabelle 15).

Tabelle 15: Korrelation von direkter Resistenztestung mittels Agardiffusionsverfahren und Standard-Mikrobouillondilutionsverfahren für gram-positive Kokken analysiert nach CLSI-Standard				
Antibiotikum	Anzahl (%) der Isolate mit			
	Übereinstimmung	Very major error	Major error	Minor error
Ampicillin	36 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Doxycyclin	457 (93,3)	0 (0)	9 (1,8)	24 (4,9)
Erythromycin	509 (96,4)	3 (0,6)	5 (0,9)	11 (2,1)
Gentamicin	450 (91,6)	10 (2,0)	13 (2,6)	18 (3,7)
Levofloxacin	481 (91,1)	9 (1,7)	3 (0,6)	35 (6,6)
Oxacillin	459 (93,7)	26 (5,3)	1 (0,2)	4 (0,8)
Penicillin	476 (96,4)	9 (1,8)	8 (1,6)	1 (0,2)
Vancomycin	526 (99,2)	2 (0,4)	2 (0,4)	0 (0)
Total (%)	3394 (94,6)	59 (1,6)	41 (1,1)	93 (2,6)

Die höchsten Anteile an Very Major Errors wurden für Oxacillin bei Koagulase-negativen Staphylokokken ($n = 21$) und *Micrococcus luteus* ($n = 5$) gefunden. Bei Gentamicin fanden sich die Very Major Errors bei Koagulase-negativen Staphylokokken ($n = 9$) und bei *Enterococcus faecalis* ($n = 1$).

Gram-negative Bakterien fanden sich bei 226 Isolaten (29,8 %) und wurden in 1343 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen untersucht. Hierbei fand sich eine Übereinstimmung der Testverfahren in 1234 Fällen (91,9 %). Minor Errors fanden sich in 84 Fällen (6,3 %), Major Errors in 9 Fällen (0,7 %) und Very Major Errors in 16 Fällen (1,2 %) (Tabelle 16).

Tabelle 16: Korrelation von direkter Resistenztestung mittels Agardiffusionsverfahren und Standard-Mikrobouillondilutionsverfahren für gram-negative Spezies analysiert nach CLSI-Standard				
Antibiotikum	Anzahl (%) der Isolate mit			
	Übereinstimmung	Very major error	Major error	Minor error
Amoxicillin/Clavulansäure	183 (82,4)	1 (0,5)	2 (0,9)	36 (16,2)
Ceftazidim	216 (98,2)	2 (0,9)	1 (0,4)	4 (5,0)
Cefuroxim	200 (88,9)	4 (1,7)	2 (0,9)	19 (8,4)
Gentamicin	216 (96,4)	2 (0,9)	2 (0,9)	4 (1,8)
Levofloxacin	214 (94,7)	2 (0,9)	1 (0,4)	9 (4,0)
Piperacillin / Tazobactam	205 (91,9)	5 (2,2)	1 (0,4)	12 (5,3)
Total (%)	1234 (91,9)	16 (1,2)	9 (0,7)	84 (6,3)

Bei der Analyse der gram-negativer Spezies fanden sich die höchsten Raten an Very Major Errors bei Piperacillin / Tazobactam für *Stenotrophomonas maltophilia* ($n = 3$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 1$) und *Escherichia coli* ($n = 1$). Die Very Major Errors bei Cefuroxim ließen sich jeweils einem Isolat von *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und *Serratia marcescens* zuordnen.

3.3.3. Datenanalyse unter Berücksichtigung der DIN-Standards

Die Auswertung der MHK-Ergebnisse des MICRONAUT-Systems erfolgt in Deutschland zumeist nach den Richtlinien und Grenzwerten der DIN. Aus diesem Grund wurden alle Blutkulturen zusätzlich zur Analyse nach dem CLSI-Standard auch auf Basis der DIN ausgewertet und analysiert.

Bei der Analyse nach DIN wurden 4505 (91,4 %) Übereinstimmungen von Standard-MHK-Verfahren und direkter Agardiffusionstestung gefunden.

Bei 287 (5,8 %) Messungen resultierte ein Minor error, bei 42 (0,9 %) ein Major error und bei 96 (1,9 %) Messungen ein Very major error.

Betrachtet man gram-positive Bakterien isoliert, waren 3398 (94,7 %) der 3587 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen übereinstimmend. Bei 107 (3 %) der Kombinationen ergab sich ein Minor error, bei 35 (1 %) ein Major error und bei 47 (1,3 %) ein Very major error. Schlüsselte man das Ergebnis nach den einzelnen Antibiotika auf (Tabelle 17), findet man die höchste Rate an Very Major Errors wie auch bei der Auswertung nach CLSI-Standards bei Oxacillin und Gentamicin.

Tabelle 17: Korrelation von direkter Resistenztestung mittels Agardiffusionsverfahren und Standard-Mikrobouillondilutionsverfahren für gram-positive Kokken analysiert nach DIN-Standard				
Antibiotikum	Anzahl (%) der Isolate mit			
	Übereinstimmung	Very major error	Major error	Minor error
Ampicillin	34 (94,4)	0 (0)	0 (0)	2 (5,6)
Doxycyclin	469 (95,7)	2 (0,4)	5 (1,0)	14 (2,8)
Erythromycin	509 (96,4)	4 (0,8)	7 (1,3)	8 (1,5)
Gentamicin	437 (89,0)	10 (2,0)	2 (0,4)	42 (8,6)
Levofloxacin	481 (91,1)	9 (1,7)	3 (0,6)	35 (6,6)
Oxacillin	466 (95,1)	12 (2,4)	8 (1,6)	4 (0,8)
Penicillin	476 (96,4)	9 (1,8)	8 (1,6)	1 (0,2)
Vancomycin	526 (99,2)	1 (0,2)	2 (0,4)	1 (0,2)
Total (%)	3398 (94,7)	47 (1,3)	35 (1,0)	107 (3,0)

Die Very Major Errors traten in den Kombinationen Oxacillin mit Koagulase-negativen Staphylokokken (KNS) (n = 9) und *Micrococcus luteus* (n = 3), sowie für bei KNS (n = 9) und *Enterococcus faecalis* (n = 1) auf.

Bei der Analyse der gram-negativen Organismen nach DIN-Standards konnte eine Übereinstimmung der Standard-Testung mit der direkten Agardiffusionstestung in 1107 (82,4 %) der insgesamt 1343 Bakterien-Antibiotika-Kombinationen gezählt werden. Bei 180 (13,4 %) Messungen kam es zu einem Minor error, bei 7 (0,5 %) zu einem Major error und in 49 (3,6 %) Fällen zu einem Very major error (Tabelle 18).

Tabelle 18: Korrelation von direkter Resistenztestung mittels Agardiffusionsverfahren und Standard-Mikrobouillondilutionsverfahren für gram-negative Spezies analysiert nach DIN-Standard

Antibiotikum	Anzahl (%) der Isolate mit			
	Übereinstimmung	Very major error	Major error	Minor error
Amoxicillin / Clavulansäure	134 (60,4)	15 (6,8)	1 (0,4)	72 (32,4)
Ceftazidim	212 (95,1)	2 (0,9)	1 (0,4)	8 (3,6)
Cefuroxim	160 (71,1)	15 (6,7)	1 (0,4)	49 (21,7)
Gentamicin	182 (81,3)	2 (0,9)	2 (0,9)	38 (17,0)
Levofloxacin	217 (96,0)	4 (1,8)	1 (0,4)	4 (1,8)
Piperacillin / Tazobactam	202 (90,6)	11 (4,9)	1 (0,4)	9 (4,0)
Total (%)	1107 (82,4)	49 (3,6)	7 (0,5)	180 (13,4)

Die Erreger, bei denen die höchsten Very Major Error-Raten auftraten, waren bei Cefuroxim *Escherichia coli* (n = 7), *Klebsiella pneumoniae* (n = 2), *Acinetobacter spezie* (n = 2), *Serratia marcescens* (n = 2), *Pseudomonas fluorescens* (n = 1) und *Proteus mirabilis* (n = 1). Bei Amoxicillin / Clavulansäure traten die Very Major Errors auf bei *Escherichia coli* (n = 14) und *Acinetobacter spezie* (n = 1). Bei Piperacillin / Tazobactam waren die Very Major Error zu finden bei *Escherichia coli* (n = 7), *Stenotrophomonas maltophilia* (n = 3) und *Pseudomonas aeruginosa* (n = 1).

Die hohe Zahl bei Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam aufgetretener Very Major Errors bei *E. coli* korrelierte nicht miteinander.

Im gram-negativen Erregerspektrum findet sich bei der Analyse nach DIN gegenüber der Analyse nach CLSI-Standards eine deutlich höhere Rate an Very major errors für Amoxicillin/Clavulansäure (DIN 6,8 % vs. CLSI 0,5 %), Cefuroxim (DIN 6,7 % vs. CLSI 1,7 %) und Piperacillin/Tazobactam (DIN 4,9 % vs. CLSI 2,2 %). Für Amoxicillin/Clavulansäure findet sich auch ein sehr viel höherer Wert für die Minor errors mit 16,2 % nach CLSI und 32,4 % nach DIN.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Zuverlässigkeit der direkten Agardiffusionsmethode zur Antibiotikaresistenztestung von Bakterien aus positiven Blutkulturen untersucht. Diese Methode stellt eine einfache und kostengünstige Technik dar, um bei Positivmeldung von Blutkulturen eine schnelle Vorhersage der Empfindlichkeit der gewachsenen Bakterien zu ermöglichen. Die Aussagekraft dieser Methode erscheint jedoch im diagnostischen Routinegebrauch eingeschränkt, so dass sie in der hier vorliegenden Arbeit einer kritischen Wertung im Vergleich zu Standardmethoden unterzogen wird. Um die direkte Agardiffusionstestung positiver Blutkulturen zu bewerten, wurden die Ergebnisse des Agardiffusionstests aus positiven Blutkulturen über den Zeitraum eines Jahres im Vergleich zur Standard-Testung, dem Mikrobouillondilutionsverfahren, retrospektiv analysiert.

Beide verglichenen Methoden wurden zunächst einer eingehenden Untersuchung der Qualität anhand definierter Referenzorganismen, sog. Qualitätskontrollstämmen, unterzogen. Hierbei wurden die Richtigkeit und Präzision der Methoden bestimmt.

Zur Prüfung der Richtigkeit des Agardiffusionsverfahrens wurden die täglich im Rahmen der Patientenversorgung angelegten Qualitätskontrollen aus dem Jahr 2004 analysiert. Es konnte eine Richtigkeit von 95,4 % für gram-negative Erreger und eine Richtigkeit von 94,5 % für gram-positive Spezies nachgewiesen werden. Dies entspricht den Ansprüchen, die an die Testung mittels Agardiffusion gestellt werden sollten. In zusätzlichen Untersuchungen wurden Blutkulturen mit Referenzorganismen versetzt und im automatisierten Gerät bebrütet. Bei Positivmeldung der Blutkultur wurden die Richtigkeit und Präzision der Agardiffusionsmethode bestimmt. Es konnte für die Messungen aus beimpften Blutkulturen eine Richtigkeit von 95,2 % - 100 % festgestellt werden, der Variationskoeffizient als Maß der Präzision lag stets unter 0,05. Diese Daten entsprechen damit den bisher veröffentlichten Daten zur Zuverlässigkeit der Agardiffusionsmethode. In einer groß angelegten Studie konnten in den USA für die Agardiffusionstestung zuverlässige Ergebnisse in durchschnittlich 97 % bei der Testung gram-positiver und bis zu 98 % bei der Testung gram-negativer Organismen erreicht werden⁴⁴.

Um eine so hohe Zuverlässigkeit der Testverfahren zu erreichen, ist es insbesondere bei der Agardiffusionsmethode wichtig, streng standardisiert zu arbeiten. Bereits 1979 konnte gezeigt werden, dass schon die geringste Veränderung des Inokulumvolumens bei der

Herstellung der Bakteriensuspension eine signifikante Veränderung der Hemmhofdurchmesser bei der Agardiffusion bewirken kann²¹. Die Konsequenzen, die sich daraus für die klinische Arbeit bzgl. der Auswahl von Antibiotika ergeben, machen es unerlässlich, sich bei der Durchführung der Testverfahren strikt an die Vorgaben der Qualitätssicherung zu halten und die etablierten Standards einzuhalten.

Dennoch ist hier zu beachten, dass die Agardiffusionsmethode nicht für alle Antibiotika gleichwertig zuverlässig anzusehen ist. Die Zuverlässigkeit der Testung ist nicht allein vom getesteten Antibiotikum, sondern auch deutlich von der getesteten Kombination aus Bakterium und Antibiotikum abhängig. Die in den USA durchgeführte Analyse zeigte schlechtere Ergebnisse bei gram-positiven Erregern für Ciprofloxacin (94,3 % korrekt), Levofloxacin (93,7 %) und Oxacillin (93,4 %) bei *S. epidermidis*, Tetracyclin (94,3 %) und Vancomycin (94,3 %) bei *E. faecalis*, sowie Linezolid (94,8 %) bei *E. faecium* und Tetracyclin (90,4 %) bei *S. pneumoniae*.

Im gram-negativen Erregerspektrum fanden sich schlechte Ergebnisse für Ceftazidim (93,9 %) und Meropenem (92,8 %) bei *H. influenzae*, Meropenem (90,9 %) bei *A. baumannii*, sowie Tetracyclin (90,9 %) bei *K. pneumoniae*⁴⁴.

Diese Ergebnisse müssen in der Auswertung von Qualitätskontrolluntersuchungen berücksichtigt werden. Da in der hier durchgeführten Studie zur Überprüfung der Richtigkeit und Präzision nur *S. epidermidis* und *E. coli* verwendet wurden, können keine Aussagen über anspruchsvoll wachsende Bakterien, wie z. B. *S. pneumoniae*, gemacht werden. Dies stellt für die Auswertung dieser Studie jedoch keine Einschränkung dar, da die Studie nur schnell wachsende Bakterienspezies untersucht.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse zur Richtigkeit der Mikrodilutionsmethode zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei der Agardiffusionstestung.

Im gram-negativen Erregerspektrum, ermittelt anhand der regelmäßigen Kontrollen mit *E. coli* (ATCC 25922), lässt sich eine Richtigkeit von insgesamt 98,9 % nachweisen. Einzelne schlechtere Ergebnisse zeigten sich in der Testung von Amoxicillin/Clavulansäure (99 %), Ceftazidim (99 %), Levofloxacin (98,1 %) und Gentamicin (97,1 %).

In der bereits genannten amerikanischen Studie zeigte sich auch für die Mikrobouillondilutionstestung eine Abhängigkeit der Zuverlässigkeit von den getesteten Erreger-Antibiotika-Kombinationen. Bei einer durchschnittlichen Richtigkeit von 99,2 % im gram-positiven Bereich und einer Richtigkeit von größer als 98 % im gram-negativen Spektrum, konnten auch hier für einige Erreger und Antibiotika deutlich schlechtere Ergebnisse

gezeigt werden. Dies betrifft im Einzelnen bei gram-negativen Erregern Tetracycline bei *H. influenzae* (92,5 %), Piperacillin/Tazobactam bei *S. marcescens* (92,8 %), Imipenem bei *S. marcescens*, sowie Ceftazidim bei *S. marcescens* (94,8 %). Bei gram positiven Erregern betrifft es vor allem Cefuroxim in Kombination mit *S. pneumoniae* (89,9 %), oder *S. epidermidis* (93,3 %), Ciprofloxacin mit *S. dysgalactiae* (90,3 %), sowie Penicillin bei *S. pneumoniae* (89,4 %).⁴⁴ Entsprechend fand sich bei den Untersuchungen in der vorliegenden Studie für Penicillin (getestet an *S. aureus* ATCC 29213) eine vergleichsweise hohe Abweichung von den Richtwerten in 29,3 % der Fälle. Für gram-negative Erreger (hier *E. coli* ATCC 25922) fanden sich im Gegensatz zur zitierten Studie sehr gute Ergebnisse bei Gentamicin mit einer Richtigkeit von 97,1 % und bei Levofloxacin mit einer Richtigkeit von 98,1 %.

Insgesamt zeigt sich, wie bereits bei den Untersuchungen zur Richtigkeit der Agardiffusionsmethode, deutlich, dass die Verwertung der Testergebnisse beider Verfahren mit Rücksicht auf die getesteten Antibiotika und die Erregerspezies erfolgen sollte. Für Unterschiede in den Ergebnissen der einzelnen Antibiotika sind ursächlich vor allem eine Instabilität der getesteten Substanzen und Einflussfaktoren in der Testanordnung anzunehmen. Die Dichte des Bakterienrasens auf der Agarplatte, die Umgebungstemperatur und auch die Lage des Antibiotikaträgers können das Testergebnis beeinflussen. Obgleich versucht wird, diese Faktoren weitestgehend auszuschalten, können leichte Schwankungen nicht sicher ausgeschlossen werden.

Auch für die Mikrobouillondilution konnte gezeigt werden, dass ein striktes Einhalten der Standards eine deutliche Verbesserung der Ergebnisse bewirkt. Die häufigsten Ursachen für falsche Testungen resultieren aus Abweichungen von den vorgegebenen Richtlinien. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überprüfung der Einhaltung dieser Vorgaben zu einer Qualitätsverbesserung führen kann.⁴⁴

Im Hinblick auf die direkte Antibiotikaresistenztestung aus Blutkulturen zeigen die Ergebnisse der Qualitätskontrolluntersuchungen auf, dass eine Standardisierung dringend erforderlich ist, um eine hohe Zuverlässigkeit des Verfahrens zu gewährleisten.

Bei der Herstellung eines Inokulums zur Beimpfung einer Agarplatte sollten die vorgegebenen Werte und Volumina strikt eingehalten werden. Bereits 1979 konnte von Fay und Oldfather gezeigt werden, dass bereits geringe Veränderungen des Inokulatvolumens eine Veränderung des Hemmhofdurchmessers bewirken und so das

Testergebnis nachhaltig beeinflussen können.²¹ Bei der Herstellung des Inokulums für die durchgeführte Studie wurden weitgehend dieselben Volumina verwendet, die Fay und Oldfather empfohlen hatten. Im Gegensatz zu deren Vorgehen jedoch wurde hier nicht das Blut direkt auf die Agarplatte verbracht, sondern mit 10 ml 0,9 % Natrium-Chlorid-Lösung verdünnt. Hier wurde auch auf das Verhalten der Erreger in der Gram-Färbung Rücksicht genommen und für gram-positive und gram-negative Erreger unterschiedliche Volumina des Blutkulturmediums in der Herstellung des Inokulums verwendet. Die Verdünnung mit Kochsalzlösung sollte wachstumshemmende Effekte durch das Blutkulturmedium oder das Blut selbst ausschalten. Die so hergestellten Inokula erbrachten auf den Agarplatten ein gleichmäßiges Bakterienwachstum, welches für die Bewertung des Tests nach den Qualitätskriterien der CLSI gefordert wird.⁹

Die durchgeführten Tests aus mit standardisierten Teststämmen beimpften Blutkulturen erbrachten wie oben bereits gezeigt eine hohe Richtigkeit und Präzision.

In der retrospektiven Analyse der Daten klinischer Isolate in dieser Dissertation wurden insgesamt 758 Bakterienisolate aus positiven Blutkulturen berücksichtigt, von denen 532 auf Gram-positive und 226 auf Gram-negative Isolate entfielen. Betrachtet man die identifizierten Erregerspezies, so zeigt sich eine Verteilung, welche in anderen Studien als typische Häufigkeiten im Rahmen von Bakteriämien beschrieben wurden.⁶¹

Da die Agardiffusionstestung im Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene gemäß den Leitlinien der CLSI⁹ erfolgte, wurden die Ergebnisse der direkten Agardiffusionstestung aus Blutkulturen zunächst mit den ebenfalls nach CLSI-Kriterien ausgewerteten Ergebnissen der Mikrobouillondilutionsmethode, d. h. dem Standardverfahren, verglichen.¹⁹ Bei einer Übereinstimmungsrate von insgesamt 93,9 % , Minor errors 3,6 % , Major errors 1 % und Very Major errors 1,5 % , konnten die von Jorgensen 1993 geforderten Kriterien für die Zuverlässigkeit von Resistenztestungsverfahren erfüllt werden.³⁰

Bei der getrennten Analyse von Gram-positiven und Gram-negativen Spezies zeigte sich für Gram-positive Erreger eine Häufung der Very Major errors bei Oxacillin in Kombination mit Koagulase-negativen Staphylokokken und *Micrococcus luteus*, sowie bei Gentamicin in Kombination mit *Enterococcus faecalis* und Koagulase-negativen Staphylokokken. Eine relativ aktuelle Studie zeigte für die direkte Antibiotikaresistenztestung mit dem VITEK2-System, welche jedoch nicht auf der

Agardiffusionsmethode, sondern auf einer automatisierten Breakpoint-Bestimmung beruht, ebenfalls erhöhte Very Major error Raten für Oxacillin.¹⁵ Leider wurden in der genannten Untersuchung keine Hinweise zu möglichen Fehlerquellen gegeben. Auch uns war es leider nicht möglich, weitere Untersuchungen der Isolate, z. B. im Hinblick auf das Vorhandensein entsprechender Enzyme, oder des *mecA*-Gens, durchzuführen. Es ist denkbar, dass eine Instabilität des Oxacillin zu der hohen Abweichung beiträgt. Die gefundene hohe Anzahl an Very Major errors bei der Testung von Oxacillin legt nahe, dass diesbezüglich andere Testmethoden, deren Zuverlässigkeit beim Nachweis von Resistenzen gegenüber Oxacillin höher liegen, angewandt werden sollten. Hier kommen zum Beispiel die Agardilutionstestung oder das E-Test-Verfahren in Frage. In einer Studie konnte für beide Testverfahren hohe Sensitivität und Spezifität nachgewiesen werden.⁵⁵ Ferner wird neuerdings empfohlen, die Resistenz gegenüber Oxacillin anhand der Resistenz gegenüber Cefoxitin zu bestimmen, da eine Cefoxitin-Resistenz einen hohen Vorhersagewert für eine *mecA*-Gen-induzierte Oxacillin-Resistenz hat.^{8,34,39,43,46,50} Die Zuverlässigkeit einer Cefoxitin-Testung mittels Agardiffusion aus positiven Blutkulturen wurde allerdings bislang nicht untersucht. Neuere Verfahren bieten die Möglichkeit eines kombinierten Nachweises der *S. aureus*-spezifischen Koagulase und das Vorliegen einer Oxacillin-Resistenz direkt aus Blutkulturen mit ebenfalls hoher Zuverlässigkeit. Der Test kombiniert einen direkten Koagulase-Nachweis mit einer Bestimmung des Penicillinbindepotein 2a (PBP2a) mittels Latex-Agglutinationstest nach Kurzzeitinkubation zur *mecA*-Gen-Induktion. Für diesen kombinierten Nachweis konnte eine Sensitivität von 96,8 % und eine Spezifität von 100 % nachgewiesen werden. Die Voraussage einer Oxacillin-Resistenz konnte hiermit innerhalb von fünf Stunden nach Positivmeldung der Blutkultur mit 100 % Sicherheit erfolgen.⁷ Auch mittels PCR-Verfahren ist heutzutage ein schneller Nachweis des *mecA*-Gens in positiven Blutkulturen möglich.^{58,59}

Betrachtet man die Ergebnisse für Gram-negative Bakterien finden sich verhältnismäßig hohe Zahlen an Very Major errors bei Piperacillin/Tazobactam und Cefuroxim. Jedoch lässt sich zwischen diesen Fehlern keine Verbindung herstellen, so dass die Fehlerraten bei Piperacillin/Tazobactam und Cefuroxim wahrscheinlich auf verschiedene Mechanismen und/oder Fehlerquellen zurückzuführen sein müssen. In zwei getesteten Blutkulturen konnte das kombinierte Auftreten von Very Major errors für jeweils zwei verschiedene Antibiotika gefunden werden. Zum einen zeigten sich bei einem *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm Very Major errors für Ceftazidim und Piperacillin/Tazobactam, zum anderen fand

sich bei einem Isolat eines *E. coli* Stammes ein Very Major error für Amoxicillin/Clavulansäure und Gentamicin.

Die auffällig erhöhte Fehlerrate bei Antibiotika, die aus einer β -Lactam/ β -Lactamase-Inhibitor-Kombination bestehen, wie Piperacillin/Tazobactam und Amoxicillin/Clavulansäure, könnte am ehesten auf die strukturellen Eigenschaften und eine mögliche Instabilität bzw. erhöhte Beeinflussbarkeit der Substanzen durch das bluthaltige Inokulum bedingt sein. Dabei ist zu beachten, dass Very major errors, die ja ein falsch sensibles Ergebnis der direkten Testung beinhalten, weitaus gravierender zu bewerten sind als minor errors, bei denen es sich nur um Fehler der Bewertung von intermediär zu sensibel oder resistent und vice versa handelt.

Bezüglich der Fehlerrate von Ceftazidim wurden bereits in früheren Studien Probleme bezüglich der direkten Testung von Cephalosporinen der zweiten Generation aus positiven Blutkulturen mit automatisierten Testsystemen beschrieben.^{5,13,22} Als mögliche Ursachen für die aufgetretenen Fehler kommen generelle Interaktionen zwischen dem Blutkulturmedium und dem Blut selbst mit den getesteten Antibiotika infrage. Diese scheinen eine eingeschränkte Stabilität der Antibiotika zu bewirken. Die speziellen Gründe für die erhöhte Fehlerrate bei den Cephalosporinen sind jedoch unbekannt. Möglicherweise beeinflusst auch hier die Stabilität der Substanz oder die Herstellung des Testsystems, in dem die Antibiotika in der Regel in getrockneter Form vorgelegt sind, die Ergebnisse. Insgesamt zeigte sich bei der Auswertung jedoch eine Zuverlässigkeit vergleichbar derer, die in früheren Studien gezeigt wurde.^{17,41}

Da die Ergebnisse der standardmäßig im Institut für Med. Mikrobiologie und Hygiene verwendeten Mikrobouillondilutionsmethode (Merlin Micronaut System) nicht nach CLSI sondern nach der DIN-Norm¹⁶ bewertet werden, wurde ein zusätzlicher Vergleich der im Agardiffusionstest (nach CLSI) erhaltenen Werte mit den Ergebnisse der Standardtestung nach DIN durchgeführt.

Hierbei fanden sich Übereinstimmungen zwischen der direkten Agardiffusionstestung und der Standardmethode in 91,4 % der Fälle. Dies bedeutet 2,5 % geringer, als bei der Analyse nach CLSI-Kriterien. Minor errors zeigten sich in 5,8 % (2,2 % mehr als bei der Auswertung nach CLSI), Major errors in 0,9 % (CLSI 1 %) und Very Major errors in 1,9 % (CLSI 1,5 %).

Schlüsselt man auch für die Analyse nach den DIN-Grenzwerten die Daten in Gram-positive und Gram-negative Erreger auf, so erhält man auch hier ähnlich der Auswertung

nach den CLSI-Richtlinien für Gram-positive Erreger eine erhöhte Rate an Very major errors bei der Testung von Oxacillin an Koagulase-negativen Staphylokokken und *Micrococcus luteus*, sowie für Gentamicin bei Koagulase-negativen Staphylokokken und *Enterococcus faecalis*. Insgesamt stellten sich die Ergebnisse der Auswertungen jedoch ähnlich dar.

Im Gram-negativen Erregerspektrum waren Very Major errors vor allem für Cefuroxim in Kombination mit *E. coli* und Amoxicillin/Clavulansäure in Kombination mit *E. coli* nachweisbar. Aber auch für Piperacillin/Tazobactam konnte eine deutlich erhöhte Häufigkeit an Very Major errors mit *E. coli* beobachtet werden. Die beobachteten Very Major errors bei Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam traten unabhängig voneinander auf, so dass eine gemeinsame Ursache für die Fehlerhäufigkeit nicht ausgemacht werden konnte. Der einzige Zusammenhang besteht weiterhin in der Tatsache, dass es sich bei beiden Präparaten um Kombinationspräparate aus einem Penicillin-Antibiotikum mit einem β -Laktamase-Inhibitor handelt. Die Häufigkeit von Minor errors bei Amoxicillin/Clavulansäure erreichte einen Wert von 32,4 % bei der Analyse der Daten nach DIN Kriterien, so dass hier eine klinisch bedeutsame Abweichung vorliegt.

Insgesamt zeigen die erhaltenen Ergebnisse der Resistenztestung klinischer Isolate, dass bei der direkten Resistenztestung mittels Agardiffusion unabhängig von der für die Interpretation der Werte verwendeten Norm eine hohe Fehlerrate bei Cefuroxim und β -Laktam/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen für Gram-negative Erreger und bei Oxacillin für Gram-positive Erreger auftritt. Bei diesen als problematisch erkannten Antibiotika handelt es sich um bedeutsame Substanzen, die sowohl für die antibiotische Primärtherapie ambulant und nosokomial erworbener Infektionen als auch für schwerwiegende Infektionen, wie zum Beispiel bei Patienten auf Intensivstation oder Patienten mit Fieber in Neutropenie, eingesetzt werden. Typische Präparate umfassen Elobact®, Augmentan®, Tazobac®, Staphylex® etc. Ein falsch sensibles Ergebnis der direkten Empfindlichkeitsprüfung (d. h. ein very major error) könnte somit zur Behandlung eines Patienten mit einem Mittel führen, dass in Wahrheit in vitro als resistent zu bewerten wäre.

Damit verbunden ist eine große Anzahl relevanter Folgen. Die initiale Therapie mit einem nicht wirksamen Antibiotikum führt zu einer deutlichen Verlängerung der erforderlichen

Krankenhausbehandlung und damit auch zu einer Erhöhung der Kosten.¹⁸ Daraus lässt sich schließen, dass eine frühe zuverlässige Aussage bezüglich der Antibiotikaresistenzen vorliegender Bakterien zu einer relevanten Kostenreduktion führen kann.^{2,4,54}

Wichtiger jedoch als der finanzielle Vorteil einer initial greifenden Therapie ist die Senkung der Krankheitsdauer und damit assoziiert die Reduktion der Mortalität. So konnte gezeigt werden, dass bei einer von Anfang an greifenden antibiotischen Therapie eine Verkürzung der Hospitalisierungsdauer von 22 Tagen auf bis zu 14 Tage möglich ist.³⁶ Die Mortalität von Patienten mit Erregernachweisen aus Blutkulturen oder mit manifester Sepsis konnte durch frühe adäquate Antibiotikatherapie deutlich gesenkt werden.^{18,26,28,33} Eine Reduktion der Sterblichkeit um bis zu 11 % scheint durch die Anwendung entsprechender Testverfahren zur schnellen Resistenztestung und den dadurch frühzeitig möglichen gezielten Einsatz von Antibiotika erreichbar.³¹

Angesichts der durch Antibiotikaresistenzen per se höheren Kosten und höheren Mortalitätsraten muss eine schnelle Methode zur Resistenztestung flächendeckend etabliert werden.¹¹

Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der aus Blutkulturen isolierten Bakterienspezies bekommt man einen Eindruck, weshalb staphylokokkenwirksame Antibiotika und auch speziell β -laktamasefeste Antibiotika eine so tragende Rolle in der Therapie der Bakteriämie und Sepsis spielen. In der durchgeführten Studie wurden bei 532 Gram-positiven Isolaten in 91 % Staphylokokken nachgewiesen. Alleine 13 % waren *S. aureus*. Auch in anderen Studien zur Verteilung der Erreger der Sepsis konnten hohe Anteile an *S. aureus* (22,5 %) und *S. epidermidis* (7,6 %) nachgewiesen werden.¹² Auf Basis dieser Ergebnisse ist die korrekte Resistenztestung v.a. im Bezug auf Oxacillin, welches eines der wichtigsten β -laktamasefesten Antibiotika darstellt, als äußerst relevant herauszuheben.

Ähnliches gilt für Kombinationspräparate wie Amoxicillin/Clavulansäure oder Piperacillin/Tazobactam in Anbetracht der Häufigkeit gram-negativer Bakterien in Blutkulturen. *E. coli* konnten in der durchgeführten Analyse in 48,7 % der Gram-negativen Isolate identifiziert werden. Auch in anderen Studien stellte *E. coli* (6 %) einen großen Anteil der Isolate.

Piperacillin/Tazobactam stellt am Universitätsklinikum Ulm das Standard-Breitspektrumantibiotikum in der Therapie von Fieber in Neutropenie sowie schwerer abdomineller Infektionen und nosokomial erworbener Pneumonie dar. Entsprechend ist eine zuverlässige Testung der genannten Antibiotika von immenser klinischer Bedeutung für die Therapie der der Bakteriämie und Sepsis.

Aufgrund der genannten möglichen Konsequenzen einer fehlerbehafteten direkten Resistenztestung mittels Agardiffusionstest aus positiven Blutkulturen muss von der Anwendung der hier praktizierten Methode für die Substanzen Cefuroxim, Oxacillin und β -Laktam/ β -Laktamase-Inhibitor-Kombinationen abgeraten werden. Trotz der oben genannten Einschränkungen stellt die direkte Resistenztestung von Blutkulturen mittels Agardiffusion eine einfache, kostengünstige und zuverlässige Methode für die anderen getesteten Substanzen dar. Ihre Zuverlässigkeit bei sonstigen, in dieser Arbeit nicht eingeschlossenen Antibiotika, sollte untersucht werden.

Zur Optimierung einer zeitnahen und zuverlässigen Resistenztestung von Bakterien aus positiven Blutkulturen sollte angestrebt werden, eine automatisierte Methode zu etablieren, welche entsprechenden Standards unterliegt und auch eine Bestimmung der Minimalen Hemmkonzentration der einzelnen Antibiotika direkt aus der positiven Blutkultur ermöglicht. Sollte dies gelingen, könnte das eine deutliche Reduktion der Mortalität im Rahmen der Sepsis bedeuten, verbunden mit erheblicher Reduktion der Hospitalisierungszeiten und daraus resultierender Kostensenkung.^{2,4}

Diesbezüglich konnten bereits in mehreren Studien vielversprechende Daten für automatisierte Systeme wie VITEK (BioMérieux) und PHOENIX (BD) gesammelt werden.^{5,13,15,22,24,56} In diesen Studien zeigten sich die getesteten Systeme ausreichend zuverlässig für die direkte Testung Gram-negativer Bakterien, um im klinischen Alltag eingeführt zu werden. Die Testung Gram-positiver Bakterien erwies sich jedoch als noch nicht ausreichend zuverlässig. Da Gram-positive Bakterien jedoch die Mehrzahl der Erreger in positiven Blutkulturen darstellen, ist eine zuverlässige Testung auch dieser Erreger unabdinglich.

Bei der Testung Gram-positiver Bakterien hat sich kürzlich das Mikrobouillon-dilutionsverfahren mit dem Merlin MICRONAUT System als äußerst zuverlässig und anderen automatisierten Testverfahren überlegen gezeigt.⁵⁷ In der hier publizierten Studie wurde nicht das Blutkulturmedium direkt verwendet, sondern es wurde mittels einer Zweischnittzentrifugation eine Suspension der Bakterien hergestellt, die in Form eines McFarland-Standards im System für die Testung eingesetzt wurde. Dieses Vorgehen könnte sich auch als zuverlässig bei der Testung in anderen automatisierten Systemen erweisen, ist jedoch arbeits- und zeitintensiver als der direkte Einsatz positiven Blutkulturmediums. Zwischenzeitlich wurde, als Konsequenz der vorliegenden Arbeit, die direkte Empfindlichkeitsprüfung von Bakterien aus Blutkulturen im Institut für Med.

Mikrobiologie und Hygiene von der Agardiffusionsmethode auf die Mikrobouillon-dilutionsmethode auf dem MICRONAUT System umgestellt.

Insgesamt bietet die Einführung automatisierter Systeme zur direkten Resistenztestung aus Blutkulturen eine Perspektive, die auch für die anderen kommerziell erhältlichen Systeme dringend weiterentwickelt werden sollte, da im Hinblick auf steigende Inzidenzen der Bakteriämie und Sepsis sowie steigende Resistenzraten der Erreger gegenüber Antibiotika eine schnelle, zuverlässige Resistenzbestimmung wesentlich zu einer optimalen Patientenversorgung beiträgt.

5. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es nachzuweisen, wie zuverlässig die Testergebnisse einer direkt aus Blutkulturen durchgeführten Antibiotikaresistenztestung mit der Agardiffusionsmethode für die klinische Anwendung verwendet werden können.

Um hierüber eine Aussage gewinnen zu können, wurden zunächst die Präzision und Richtigkeit der Agardiffusionstestung sowie des Standardverfahrens der Mikrobouillondilution anhand von Kontrollstämmen sowohl Gram-positiver, als auch Gram-negativer Bakterien untersucht. Anschließend wurden im Rahmen einer retrospektiven Analyse die Ergebnisse einer direkten Empfindlichkeitsprüfung mittels Agardiffusionsmethode mit den Ergebnissen der Standardtestung im Mikrobouillondilutionsverfahren von klinischen Isolaten verglichen.

Die Untersuchungen zur Richtigkeit und Präzision der Agardiffusionstestung von bakteriellen Reinkulturen und direkt aus positiven Blutkulturen konnten zeigen, dass dieses ein Verfahren mit hoher Richtigkeit und Präzision darstellt. Auch das Standardverfahren der Mikrobouillondilution von Reinkulturen zeigte eine hohe Richtigkeit und Präzision.

Für die retrospektive Datenanalyse klinischer Isolate standen Ergebnisse von 758 Bakterienisolaten, die im Jahr 2004 aus Blutkulturen des Universitätsklinikum Ulm isoliert worden waren, zur Verfügung. Insgesamt wurden 4930 Erreger-Antibiotika-Kombinationen untersucht werden. Bei der Analyse nach den amerikanischen CLSI-Standards konnten Übereinstimmungen von direkter Agardiffusions- und Standardtestung in 93,9 % beobachtet werden. Minor errors traten in 3,6 %, Major errors in 1 % und Very Major errors in 1,5 % der Erreger-Antibiotika-Kombinationen auf. Bei den Gram-positiven Bakterien, die in 3587 Kombinationen untersucht wurden, fanden sich übereinstimmende Ergebnisse beider Methoden in 94,6 % der Erreger-Antibiotika-Kombinationen, Minor errors in 2,6 %, Major errors in 1,1 % und Very Major errors in 1,6 %. Die Very Major errors traten vorwiegend bei Oxacillin (5,3 %) auf. Bei den Gram-negativen Bakterien, die in 1343 Kombinationen untersucht wurden, fanden sich übereinstimmende Ergebnisse in 91,9 %, Minor errors in 6,3 %, Major errors in 0,7 % und Very Major errors in 6,3 %. Die aufgetretenen Very Major errors fanden sich gehäuft bei Cefuroxim, sowie Amoxicillin/Clavulansäure und Piperacillin/Tazobactam. Eine zusätzliche Datenanalyse nach Kriterien den deutschen DIN-Kriterien erbrachte keine wesentlichen Unterschiede bezüglich der Zuverlässigkeit der direkten Agardiffusionstestung.

Anhand der erhobenen Daten lässt sich festhalten, dass die direkte Agardiffusionstestung eine einfache, kostengünstige und schnelle Methode darstellt, um frühzeitig eine Aussage über die *in vitro*-Wirksamkeit häufig verwendeter Antibiotika bei Patienten mit Bakteriämie, Sepsis oder anderen schweren Infektionen treffen zu können. Wesentliche Einschränkungen finden sich jedoch bei den relevanten, klinisch häufig eingesetzten Breitspektrumantibiotika Piperacillin/Tazobactam, Amoxicillin/Clavulansäure und Oxacillin. Für diese Substanzen kann aufgrund der vergleichsweise hohen Rate falsch sensibler Ergebnisse eine direkte Empfindlichkeitsprüfung aus Blutkulturen mittels Agardiffusionstest nicht empfohlen werden. Im Hinblick auf steigende Inzidenzen der Sepsis, zunehmende Antibiotikaresistenzen und geltende mikrobiologische Leitlinien kann auf die direkte Resistenztestung von Bakterienisolaten aus Blutkulturen jedoch nicht verzichtet werden. Moderne, automatisierte Verfahren, die zudem eine Bestimmung von Minimalen Hemmkonzentrationen der Substanzen ermöglichen, bieten eine vielversprechende Perspektive. Die Anwendung dieser Methoden direkt aus positiven Blutkulturen sollte im Sinne einer optimierten Patientendiagnostik, auch in Bezug auf ihre Konsequenzen bezüglich Behandlungsdauer, Mortalität und Kosten, dringend weiter entwickelt werden.

6. Literaturverzeichnis

- (1) Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. Epidemiology of Severe Sepsis in the United States: Analysis of Incidence, Outcome, and Associated Costs of Care. *Crit. Care Med.* 2001, 29, 1303-1310.
- (2) Barenfanger, J.; Drake, C.; Kacich, G. Clinical and Financial Benefits of Rapid Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing. *J. Clin. Microbiol.* 1999, 37, 1415-1418.
- (3) Bates, D. W.; Sands, K.; Miller, E.; Lanken, P. N.; Hibberd, P. L.; Graman, P. S.; Schwartz, J. S.; Kahn, K.; Snyderman, D. R.; Parsonnet, J.; Moore, R.; Black, E.; Johnson, B. L.; Jha, A.; Platt, R. Predicting Bacteremia in Patients With Sepsis Syndrome. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *J. Infect. Dis.* 1997, 176, 1538-1551.
- (4) Beekmann, S. E.; Diekema, D. J.; Chapin, K. C.; Doern, G. V. Effects of Rapid Detection of Bloodstream Infections on Length of Hospitalization and Hospital Charges. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41, 3119-3125.
- (5) Bruins, M. J.; Bloembergen, P.; Ruijs, G. J.; Wolfhagen, M. J. Identification and Susceptibility Testing of Enterobacteriaceae and Pseudomonas Aeruginosa by Direct Inoculation From Positive BACTEC Blood Culture Bottles into Vitek 2. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 7-11.
- (6) Brun-Buisson, C.; Doyon, F.; Carlet, J.; Dellamonica, P.; Gouin, F.; Lepoutre, A.; Mercier, J. C.; Offenstadt, G.; Regnier, B. Incidence, Risk Factors, and Outcome of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults. A Multicenter Prospective Study in Intensive Care Units. French ICU Group for Severe Sepsis. *J Am Med Assoc* 1995, 274, 968-974.
- (7) Carey, B. E.; Nicol, L. The Combined Oxacillin Resistance and Coagulase (CORC) Test for Rapid Identification and Prediction of Oxacillin Resistance in Staphylococcus Species Directly From Blood Culture. *J. Clin. Pathol.* 2008, 61, 866-868.
- (8) Cauwelier, B.; Gordts, B.; Descheemaeker, P.; Van Landuyt, H. Evaluation of a Disk Diffusion Method With Cefoxitin (30 Microg) for Detection of Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 23, 389-392.
- (9) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100 S15 (2005). 2005.
- (10) Cosgrove, S. E. The Relationship Between Antimicrobial Resistance and Patient Outcomes: Mortality, Length of Hospital Stay, and Health Care Costs. *Clin. Infect. Dis.* 2006, 42 Suppl 2, S82-S89.
- (11) Cosgrove, S. E.; Carmeli, Y. The Impact of Antimicrobial Resistance on Health and Economic Outcomes. *Clin. Infect. Dis.* 2003, 36, 1433-1437.
- (12) Crowe, M.; Ispahani, P.; Humphreys, H.; Kelley, T.; Winter, R. Bacteraemia in the Adult Intensive Care Unit of a Teaching Hospital in Nottingham, UK, 1985-1996. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1998, 17, 377-384.
- (13) de Cueto, M.; Ceballos, E.; Martinez-Martinez, L.; Perea, E. J.; Pascual, A. Use of Positive Blood Cultures for Direct Identification and Susceptibility Testing With the Vitek 2 System. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 3734-3738.
- (14) Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie. MiQ: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik. 2007. Mauch, H.; Podbielski, Andreas ; Herrmann, Mathias ; Kniehl, Eberhard.

- (15) Diederens, B. M.; Zieltjens, M.; Wetten, H.; Buiting, A. G. Identification and Susceptibility Testing of Staphylococcus Aureus by Direct Inoculation From Positive BACTEC Blood Culture Bottles. *Clin. Microbiol. Infect.* 2006, 12, 84-86.
- (16) DIN. Empfindlichkeitsprüfung von mikrobiellen Krankheitserregern gegen Chemotherapeutika. DIN 58940.
- (17) Doern, G. V.; Scott, D. R.; Rashad, A. L.; Kim, K. S. Evaluation of a Direct Blood Culture Disk Diffusion Antimicrobial Susceptibility Test. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1981, 20, 696-698.
- (18) Doern, G. V.; Vautour, R.; Gaudet, M.; Levy, B. Clinical Impact of Rapid in Vitro Susceptibility Testing and Bacterial Identification. *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 1757-1762.
- (19) Edelmann, A.; Pietzcker, T.; Wellinghausen, N. Comparison of Direct Disk Diffusion and Standard Microtitre Broth Dilution Susceptibility Testing of Blood Culture Isolates. *J. Med. Microbiol.* 2007, 56, 202-207.
- (20) Edmond, M. B.; Wallace, S. E.; McClish, D. K.; Pfaller, M. A.; Jones, R. N.; Wenzel, R. P. Nosocomial Bloodstream Infections in United States Hospitals: a Three-Year Analysis. *Clin. Infect. Dis.* 1999, 29, 239-244.
- (21) Fay, D.; Oldfather, J. E. Standardization of Direct Susceptibility Test for Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 1979, 9, 347-350.
- (22) Funke, G.; Funke-Kissling, P. Use of the BD PHOENIX Automated Microbiology System for Direct Identification and Susceptibility Testing of Gram-Negative Rods From Positive Blood Cultures in a Three-Phase Trial. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 1466-1470.
- (23) Gramm, H. J.; Hannemann, L.; Reinhart, K.; Lode, H. [Sepsis: a Conception in Change. Possibilities and Limitations of Diagnosis Based on Clinical Criteria]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 1995, 120, 498-502.
- (24) Hansen, D. S.; Jensen, A. G.; Norskov-Lauritsen, N.; Skov, R.; Bruun, B. Direct Identification and Susceptibility Testing of Enteric Bacilli From Positive Blood Cultures Using VITEK (GNI+/GNS-GA). *Clin. Microbiol. Infect.* 2002, 8, 38-44.
- (25) Harbarth, S.; Ferriere, K.; Hugonnet, S.; Ricou, B.; Suter, P.; Pittet, D. Epidemiology and Prognostic Determinants of Bloodstream Infections in Surgical Intensive Care. *Arch. Surg.* 2002, 137, 1353-1359.
- (26) Harbarth, S.; Garbino, J.; Pugin, J.; Romand, J. A.; Lew, D.; Pittet, D. Inappropriate Initial Antimicrobial Therapy and Its Effect on Survival in a Clinical Trial of Immunomodulating Therapy for Severe Sepsis. *Am. J. Med.* 2003, 115, 529-535.
- (27) Huppertz K.; Beer J.; Pfister W.; Pietzcker T.; Schubert S.; Wichelhaus T.; Ziesing S.; Wiedemann B. The Development of Antimicrobial Resistance in German Hospitals. 2005. Poster for 15th ECCMID; Copenhagen 2005.
- (28) Ibrahim, E. H.; Sherman, G.; Ward, S.; Fraser, V. J.; Kollef, M. H. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest* 2000, 118, 146-155.
- (29) Jafari, H. S.; McCracken, G. H., Jr. Sepsis and Septic Shock: a Review for Clinicians. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1992, 11, 739-748.
- (30) Jorgensen, J. H. Selection Criteria for an Antimicrobial Susceptibility Testing System. *J. Clin. Microbiol.* 1993, 31, 2841-2844.

- (31) Kang, C. I.; Kim, S. H.; Park, W. B.; Lee, K. D.; Kim, H. B.; Kim, E. C.; Oh, M. D.; Choe, K. W. 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.* 2005, *49*, 760-766.
- (32) Marre R: Sepsis In: Köhler, Eggers, Fleischer, Marre, Pfister, Pulverer (Herausg.). Medizinische Mikrobiologie, Lehrbuch, 8. Auflage. Urban & Fischer-Verlag, S. 778-782. (2001).
- (33) Kollef, M. H.; Sherman, G.; Ward, S.; Fraser, V. J. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections: a Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. *Chest* 1999, *115*, 462-474.
- (34) Lee, Y.; Kim, C. K.; Kim, M.; Yong, D.; Lee, K.; Chong, Y. [Detection of *MecA* in Strains With Oxacillin and Cefoxitin Disk Tests for Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus*]. *Korean J. Lab Med.* 2007, *27*, 276-280.
- (35) Leibovici, L.; Greenshtain, S.; Cohen, O.; Mor, F.; Wysenbeek, A. J. Bacteremia in Febrile Patients. A Clinical Model for Diagnosis. *Arch. Intern. Med.* 1991, *151*, 1801-1806.
- (36) Lodise, T. P.; McKinnon, P. S.; Swiderski, L.; Rybak, M. J. Outcomes Analysis of Delayed Antibiotic Treatment for Hospital-Acquired *Staphylococcus Aureus* Bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* 2003, *36*, 1418-1423.
- (37) Martin, G. S.; Mannino, D. M.; Eaton, S.; Moss, M. The Epidemiology of Sepsis in the United States From 1979 Through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003, *348*, 1546-1554.
- (38) Mermel, L. A.; Maki, D. G. Detection of Bacteremia in Adults: Consequences of Culturing an Inadequate Volume of Blood. *Ann. Intern. Med.* 1993, *119*, 270-272.
- (39) Mimica, M. J.; Berezin, E. N.; Carvalho, R. L.; Mimica, I. M.; Mimica, L. M.; Safadi, M. A.; Schneider, E.; Caiaffa-Filho, H. H. Detection of Methicillin Resistance in *Staphylococcus Aureus* Isolated From Pediatric Patients: Is the Cefoxitin Disk Diffusion Test Accurate Enough? *Braz. J. Infect. Dis.* 2007, *11*, 415-417.
- (40) Mirrett, S. Antimicrobial Susceptibility Testing and Blood Cultures. *Clin. Lab Med.* 1994, *14*, 171-179.
- (41) Mirrett, S.; Reller, L. B. Comparison of Direct and Standard Antimicrobial Disk Susceptibility Testing for Bacteria Isolated From Blood. *J. Clin. Microbiol.* 1979, *10*, 482-487.
- (42) Munson, E. L.; Diekema, D. J.; Beekmann, S. E.; Chapin, K. C.; Doern, G. V. Detection and Treatment of Bloodstream Infection: Laboratory Reporting and Antimicrobial Management. *J. Clin. Microbiol.* 2003, *41*, 495-497.
- (43) Perez, L. R.; d'Azevedo, P. A. Evaluation of the Accuracy of Various Phenotypic Tests to Detect Oxacillin Resistance in Coagulase-Negative *Staphylococci*. *Braz. J. Infect. Dis.* 2008, *12*, 210-212.
- (44) Pfaller, M. A.; Jones, R. N. Performance Accuracy of Antibacterial and Antifungal Susceptibility Test Methods: Report From the College of American Pathologists Microbiology Surveys Program (2001-2003). *Arch. Pathol. Lab Med.* 2006, *130*, 767-778.
- (45) Pittet, D.; Li, N.; Woolson, R. F.; Wenzel, R. P. Microbiological Factors Influencing the Outcome of Nosocomial Bloodstream Infections: a 6-Year Validated, Population-Based Model. *Clin. Infect. Dis.* 1997, *24*, 1068-1078.
- (46) Quale, J.; Bratu, S.; Gupta, J.; Landman, D. Interplay of Efflux System, *AmpC*, and *OprD* Expression in Carbapenem Resistance of *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, *50*, 1633-1641.

- (47) Reimer, L. G.; Wilson, M. L.; Weinstein, M. P. Update on Detection of Bacteremia and Fungemia. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997, 10, 444-465.
- (48) Sands, K. E.; Bates, D. W.; Lankester, P. N.; Graman, P. S.; Hibberd, P. L.; Kahn, K. L.; Parsonnet, J.; Panzer, R.; Orav, E. J.; Snyderman, D. R.; Black, E.; Schwartz, J. S.; Moore, R.; Johnson, B. L., Jr.; Platt, R. Epidemiology of Sepsis Syndrome in 8 Academic Medical Centers. *JAMA* 1997, 278, 234-240.
- (49) Shahar, E.; Wohl-Gottesman, B. S.; Shenkman, L. Contamination of Blood Cultures During Venepuncture: Fact or Myth? *Postgrad. Med. J.* 1990, 66, 1053-1058.
- (50) Sharp, S. E.; Warren, J. A.; Thomson, R. B., Jr. Cefoxitin Disk Diffusion Screen for Confirmation of Oxacillin-Resistant Staphylococcus Aureus Isolates and Utility in the Clinical Laboratory. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005, 51, 69-71.
- (51) Smith-Elekes, S.; Weinstein, M. P. Blood Cultures. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 1993, 7, 221-234.
- (52) Souvenir, D.; Anderson, D. E., Jr.; Palpant, S.; Mroch, H.; Askin, S.; Anderson, J.; Claridge, J.; Eiland, J.; Malone, C.; Garrison, M. W.; Watson, P.; Campbell, D. M. Blood Cultures Positive for Coagulase-Negative Staphylococci: Antisepsis, Pseudobacteremia, and Therapy of Patients. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 1923-1926.
- (53) Tiemersma, E. W.; Bronzwaer, S. L.; Lyytikäinen, O.; Degener, J. E.; Schrijnemakers, P.; Bruinsma, N.; Monen, J.; Witte, W.; Grundman, H. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus in Europe, 1999-2002. *Emerg. Infect. Dis.* 2004, 10, 1627-1634.
- (54) Trenholme, G. M.; Kaplan, R. L.; Karakusis, P. H.; Stine, T.; Fuhrer, J.; Landau, W.; Levin, S. Clinical Impact of Rapid Identification and Susceptibility Testing of Bacterial Blood Culture Isolates. *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 1342-1345.
- (55) Tveten, Y.; Jenkins, A.; Digraanes, A.; Melby, K. K.; Allum, A. G.; Kristiansen, B. E. Comparison of PCR Detection of MecA With Agar Dilution and Etest for Oxacillin Susceptibility Testing in Clinical Isolates of Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, 10, 462-465.
- (56) Waites, K. B.; Brookings, E. S.; Moser, S. A.; Zimmer, B. L. Direct Susceptibility Testing With Positive BacT/Alert Blood Cultures by Using MicroScan Overnight and Rapid Panels. *J. Clin. Microbiol.* 1998, 36, 2052-2056.
- (57) Wellinghausen, N.; Pietzcker, T.; Poppert, S.; Belak, S.; Fieser, N.; Bartel, M.; Essig, A. Evaluation of the Merlin MICRONAUT System for Rapid Direct Susceptibility Testing of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli From Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2007, 45, 789-795.
- (58) Wellinghausen, N.; Wirths, B.; Essig, A.; Wassill, L. Evaluation of the Hyplex BloodScreen Multiplex PCR-Enzyme-Linked Immunosorbent Assay System for Direct Identification of Gram-Positive Cocci and Gram-Negative Bacilli From Positive Blood Cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 3147-3152.
- (59) Wellinghausen, N.; Wirths, B.; Franz, A. R.; Karolyi, L.; Marre, R.; Reischl, U. Algorithm for the Identification of Bacterial Pathogens in Positive Blood Cultures by Real-Time LightCycler Polymerase Chain Reaction (PCR) With Sequence-Specific Probes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2004, 48, 229-241.
- (60) Wiessner, W. H.; Casey, L. C.; Zbilut, J. P. Treatment of Sepsis and Septic Shock: a Review. *Heart Lung* 1995, 24, 380-392.
- (61) Wisplinghoff, H.; Bischoff, T.; Tallent, S. M.; Seifert, H.; Wenzel, R. P.; Edmond, M. B. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases From a Prospective Nationwide Surveillance Study. *Clin. Infect. Dis.* 2004, 39, 309-317.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die an dieser Arbeit beteiligt waren.

Herzlichen Dank an Frau Prof. Dr. Nele Wellinghausen für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Veröffentlichung der Daten. Vor allem aber danke ich für die hervorragende Betreuung während der gesamten Arbeit.

Ein besonderes Dankeschön an die technischen Assistentinnen des mikrobiologischen Labors der Universitätsklinik Ulm für die geleistete Arbeit und alle beantworteten Fragen.

Danke an Herrn Prof. Dr. Peter Kern für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke Frau Prof. Dr. Heike von Baum und Herrn Prof. Dr. Andreas Essig für die Übernahme des Wahlprüferamtes.

Nicht zuletzt ein dickes Dankeschön von Herzen an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht, mich während der gesamten Studienzzeit in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und mir auch jetzt noch mit Rat und Tat zur Seite stehen.

Danke an meine Partnerin Susanne für ihre Geduld und Unterstützung, ihr Verständnis, sowie ihr beruhigendes Gemüt.