

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der
Universität Tübingen
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Evaluation des Accelerate Pheno™ Systems für den
Einsatz in der bakteriologischen Blutkulturdiagnostik**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Bachmaier, Johanna, Elisabeth

2020

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Peter

2. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. S. Krajewski

Tag der Disputation: 28.09.2020

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	III
TABELLENVERZEICHNIS	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Sepsis	1
1.2 Erregerspektrum und Bedeutung von Sepsis im Krankenhaus.....	3
1.3 Blutkulturdiagnostik	5
1.4 Neue Systeme für schnellere Identifizierung und Antibiotikaempfindlichkeitstestung aus Blutkulturen.....	7
1.5 Funktionsprinzip des Accelerate Pheno™ Systems	8
1.6 Aufgabenstellung/Zielsetzung	10
2 Material und Methoden	12
2.1 Aufbau	12
2.2 Ablauf der Routine Blutkulturdiagnostik	13
2.3 Accelerate Pheno™ System	14
2.4 Datenzusammenführung und detaillierte Charakterisierung der eingeschlossenen Isolate.....	16
2.4.1 Auftauen, Abimpfen und Einfrieren der Isolate	16
2.4.2 VITEK 2	17
2.4.3 Arbeitsablauf Epsilometerstest (E - Test)	18
2.5 Datenauswertung	21
3 Ergebnisse.....	24
3.1 Identifizierung gramnegativer Sepsiserreger.....	24
3.2 Ergebnisse der Antibiotika Resistenztestung gramnegativer Erreger.....	27

INHALTSVERZEICHNIS

3.3	Ergebnisse der Antibiotika Resistenztestung gramnegativer Erreger mit Resistenzen	32
3.4	Zeitenvergleich	35
3.4.1	Vergleich der Zeit bis zum Ergebnis zwischen dem Accelerate Pheno TM System und der kulturbasierten Diagnostik	35
3.4.2	Zeit bis zur Identifikation	37
3.4.3	Zeit bis zur Resistenztestung	38
4	Diskussion	39
4.1	Identifikation.....	39
4.2	Erregerspektrum	40
4.3	Antibiotikaempfindlichkeitstestung und multiresistente Keime	41
4.4	Einfluss auf Therapie	42
4.5	Tauglichkeit des Accelerate Pheno TM Systems in der täglichen Laborroutine Diagnostik.....	43
4.6	Vergleich mit weiteren Studien über das Accelerate Pheno TM System.....	44
5	Zusammenfassung	47
6	Literaturverzeichnis	49
7	Erklärung zum Eigenanteil	56
8	Anhang.....	57

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AB.....	Antibiotikum/Antibiotika
AMK.....	Amikacin
AZT	Aztreonam
BC - GN.....	Gram - Negativer Blood Culture Test
BC - GP	Gram - Positiver Blood Culture Test
BCID.....	<i>Blood Culture Identification</i>
BD.....	Becton Dickinson
BH - Agar	Brain - Heart - Agar
BK.....	Blutkultur
CAZ	Ceftazidim
CFZ.....	Cefazolin
CIP	Ciprofloxacin
CNA - Agar	Colistin - Nalidixinsäure - Agar
CO ₂	Kohlendioxid
CRO	Ceftriaxon
CST.....	Colistin
DNA.....	<i>deoxyribonucleic acid</i>
ESBL	<i>Extended Spectrum Betalaktamase</i>
E - Test.....	Epsilometertest
ETP	Ertapenem
EUCAST.....	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
FEP	Cefepim
FISH.....	Fluoreszenz - in - situ - Hybridisierung
GEN	Gentamicin
I.....	intermediär
IMP.....	Imipenem
IQR	<i>interquartile range</i>
KBE	koloniebildende Einheit
MALDI - TOF	<i>matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry</i>

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MBL.....	Metallo - β - Laktamase
MEM.....	Meropenem
MH.....	Müller - Hinton
MHK.....	minimale Hemmkonzentration
MIC.....	<i>minimum inhibitory concentration</i>
MIN	Minocyclin
MRSA.....	Methicillin - resistenter Staphylococcus aureus
MTA	medizinisch technische/r Assistent/in
NW.....	Nachweis
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i>
qSOFA	<i>quick sequential organ failure assessment</i>
R.....	resistent
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
S	sensibel
SAB - Agar	Sabouraud - Agar
SAM.....	Ampicillin - Sulbactam
SIRS.....	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SOFA	<i>sequential organ failure assessment</i>
TOB	Tobramycin
TTP.....	<i>time to positivity</i>
TZP	Piperacillin - Tazobactam
VRE.....	Vancomycin - resistente Enterokokken

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1 Aufbau der Studie 13

Abbildung 2 Zwei Accelerate Pheno™ System Module mit Bildschirm..... 15

Abbildung 3 Accelerate Pheno™ Test BC Kit 15

Abbildung 4 Accelerate Pheno™ Modul offen 15

Abbildung 5 Vergleich der durchschnittlichen Zeit vom Start der Bearbeitung einer positiven Blutkultur bis zu einem Identifizierungs- und Antibiotikaempfindlichkeitsergebnis zwischen Accelerate Pheno™ System und Routine Diagnostik..... 37

Abbildung 6 Laufzeit Accelerate Pheno™ System für Identifizierung, Antibiotikaempfindlichkeitstestung und insgesamt 38

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1	Definition septischer Begriffe nach der Konsensuskonferenz von 1992... 2
Tabelle 2	Accelerate Pheno™ Identifikations- und Antibiotikapanel für gramnegative Keime 10
Tabelle 3	Accelerate Pheno™ System Gerät und Material 14
Tabelle 4	VITEK 2 Gerät und Material 17
Tabelle 5	E - Test Material 18
Tabelle 6	E - Teststreifen..... 19
Tabelle 7	EUCAST-Breakpoints Version 6.0 für Enterobacteriaceae und <i>Pseudomonas</i> spp..... 21
Tabelle 8	Übersicht im Panel enthaltener, korrekt identifizierter gramnegativer Erreger durch das Accelerate Pheno™ System..... 25
Tabelle 9	Übersicht diskrepanter Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems 26
Tabelle 10	Übersicht der Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems aus multibakteriellen Blutkulturen..... 27
Tabelle 11	Vergleich der Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse zwischen dem Accelerate Pheno™ System und der kulturbasierten Routinemethode ... 30
Tabelle 12	Vergleich der Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems mit den kulturbasierten Methoden für 95 gramnegative Keime..... 31
Tabelle 13/1	Überblick der MHK Ergebnisse des Accelerate Pheno™ und der E -Teste bei Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon, Ertapenem oder Meropenem resistenten Isolaten (1-7/13)..... 33
Tabelle 13/2	Überblick der MHK Ergebnisse des Accelerate Pheno™ und der E - Teste bei Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon, Ertapenem oder Meropenem resistenten Isolaten (8-13/13)..... 34
Tabelle 14	Accelerate Pheno™ System Testergebnisse für Identifikation und Antibiotikaempfindlichkeit innerhalb unterschiedlicher Zeitspannen nach Positivmeldung der Blutkultur 36

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 15	Übersicht der Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems und des MALDI - TOFs.....	57
Tabelle 16	Übersicht der Laufzeit des Accelerate Pheno™ Systems, der Zeit vom Positivwerden der Blutkultur bis zur Bearbeitung am Accelerate Pheno™ und fehlerhafter Identifikationsergebnisse.....	64
Tabelle 17	Übersicht nicht durchgeführter Antibiotikaempfindlichkeitstestungen des Accelerate Pheno™ Systems	67
Tabelle 18	Übersicht der Anzahl an minor, major und very major errors des Accelerate Pheno™ bei der Antibiotikaempfindlichkeitstestung mit Angabe der Zeit vom Positivwerden der Blutkultur bis zur Bearbeitung am Accelerate Pheno™	68

1 Einleitung

1.1 Sepsis

„Sepsis ist definiert als eine Invasion von Mikroorganismen und/oder ihrer Toxine in den Blutstrom zusammen mit der Reaktion des Organismus auf diese Invasion.“

Diese im Jahr 1989 von Roger C. Bone, einem US - amerikanischen Intensivmediziner, formulierte Definition von Sepsis hat noch heute Gültigkeit (Balk, 2011, Sepsis Stiftung, 23.11.2016). Die Wortherkunft lässt sich auf das griechische „σήψη“ für „Fäulnis“ zurückführen und wurde bereits von Hippokrates (ca. 460-370 v. Chr.) eingeführt. Über Jahrtausende war die Sepsis ein gefürchtetes und häufig letal endendes Krankheitsbild, aufgrund fehlenden Wissens und Verständnisses für hygienische Maßnahmen in der Medizin (Gül et al., 2017).

Auch heute noch stellen die Sepsis und der septische Schock, die jedes Jahr weltweit Millionen von Menschen betreffen, eine Herausforderung für die moderne Medizin dar (Rhodes et al., 2017). Bei der Sepsis handelt es sich um eine generalisierte Entzündungsreaktion des Wirts auf eine Infektion mit Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten) bzw. deren Zellbestandteilen. Es gibt derzeit keinen alleinigen Parameter, der zur Diagnose einer Sepsis herangezogen werden kann. Vielmehr wird die Beurteilung einer Kombination aus Vitalparametern, Laborwerten, hämodynamischen Werten und Organfunktionen herangezogen, um bestimmte septische Begriffe zu definieren (Herold, 2016, Reinhart et al., 2010). Von der Konsensuskonferenz wurde 1992 ein Kriterienkatalog für die Definition septischer Begriffe erstellt, die in *Tabelle 1* zusammengefasst sind.

Tabelle 1 Definition septischer Begriffe nach der Konsensuskonferenz von 1992

Begriff	Definition
Sepsis	SIRS + Infektion
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome = generalisierte Entzündungsreaktion Für eine klinische Manifestation der SIRS müssen mindestens 2 der folgenden Symptome auftreten: <ul style="list-style-type: none"> • Temperatur > 38°C oder < 36°C • Herzfrequenz > 90/min • Atemfrequenz > 20/min oder PaCO₂ < 32 mmHg • Leukozyten > 12.000 mm³ oder < 4.000 mm³ ; > 10% unreife Granulozyten (Stäbe)
Infektion	Klinisch nachgewiesen bzw. mikrobiologisch gesichert
Schwere Sepsis	Sepsis + Organdysfunktion(en)
Septischer Schock	<ul style="list-style-type: none"> • Persistierende arterielle Hypotension trotz adäquater Flüssigkeitssubstitution • Notwendiger Einsatz von Vasopressoren, um Hypotension zu vermeiden • Arterielle Hypotension nicht durch andere Ursachen zu erklären

(Herold, 2016, Gül et al., 2017)

Im Jahr 2001 wurde diese Definition um einige klinische und laborchemische Kriterien ergänzt, um die Ausmaße der Organschädigung mit einzubeziehen (Levy et al., 2003, Gül et al., 2017).

Seit Anfang 2016 wurden die bis dato geltenden Definitionen der Sepsis überarbeitet und durch die sogenannte „Sepsis 3“ - Definition abgelöst (Gül et al., 2017, Robert Koch Institut, 2017b). Die Sepsis wird nun „als lebensbedrohliche Organdysfunktion aufgrund einer fehlregulierten Körperantwort auf eine Infektion“ bezeichnet. Die SIRS - Kriterien werden hier nicht mehr berücksichtigt. Der Fokus liegt nun auf der Organfunktion, die anhand des SOFA - Scores (sequential organ failure assessment

score) beurteilt wird. Kriterien des SOFA - Scores sind Atmung (Horowitz - Index), Herzkreislauffunktion (mittlerer arterieller Blutdruck), Koagulation (Thrombozyten), Leberfunktion (Bilirubin), Nierenfunktion (Kreatinin) und zentrales Nervensystem (Glasgow Coma - Scale). Für jedes Organsystem werden 0 (normale Funktion) bis 4 (massiv eingeschränkte Funktion) Punkte vergeben. Bei Verschlechterung des Scores eines Patienten um zwei oder mehr Punkte, liegt eine Sepsis vor. Eine vereinfachte Form ist der „qSOFA“, wobei „q“ für quick (schnell) steht, der eine erste schnelle Einschätzung des Risikos einer Sepsis in der präklinischen Situation, in der Notaufnahme oder am Krankenbett ermöglichen soll. Die Parameter sind eine Atemfrequenz > 22/min., eine Bewusstseinsveränderung und ein systolischer Blutdruck < 100 mmHg (Gül et al., 2017, Robert Koch Institut, 2017b, Deutsches Ärzteblatt, 24.02.2016).

1.2 Erregerspektrum und Bedeutung von Sepsis im Krankenhaus

Im Durchschnitt stieg die Häufigkeit der Sepsis in deutschen Krankenhäusern zwischen 2007 und 2013 pro Jahr um 5,7 % und betrug 2013 335 pro 100.000 Einwohner. Besonders viele Fälle treten unter Neugeborenen und in höherem Alter auf. Ab dem 40. Lebensjahr kommt es zu einem fast linearen Anstieg der Sepsisletalität. Die Krankenhausletalität für die schwere Sepsis lag 2013 bei 43,6 %, die für den septischen Schock bei 58,8 % (Fleischmann et al., 2016).

Hauptursachen sind pulmonale (46,6 %), intraabdominale (28,7 %), urogenitale (12,6 %), Haut- und Weichteilinfektionen (10,4 %). Die häufigsten Erreger im gramnegativen Bereich sind *Escherichia coli* (*E. coli*), *Klebsiella species* (spp.) und *Pseudomonas aeruginosa*, (*P. aeruginosa*) im grampositiven Bereich *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) und *Enterococcus* spp (Herold, 2016, SepNet Critical Care Trials Group, 2016, Reinhart et al., 2010).

Insgesamt sind 42,8 % der Infektionen, die zu einer Sepsis führen, ambulant erworben, die restlichen 57,2 % sind nosokomialer Genese. Von diesen nosokomialen Infektionen wiederum werden 25,7 % auf der Intensivstation erworben, 21,2% auf Normalstation und 4,6 % in stationären Pflegeeinrichtungen (SepNet Critical Care Trials Group, 2016).

Nosokomiale Erreger und ihre Häufigkeit sind abhängig von der Infektions - und Stationsart. Auf deutschen Intensivstationen waren von 2012 bis 2016 folgende Erreger am häufigsten: für Harnwegskatheter - assoziierte Harnwegsinfektionen: *E. coli* 36,2 %, Extended - Spectrum - Betalaktamase (ESBL) - bildende *E. coli* 5,6 %, *Enterococcus* spp. 26,7 %, *P. aeruginosa* 14,9 %, *Klebsiella* spp. 11,8 % und ESBL - bildende *Klebsiella* spp. 6,4 %. Für die zentraler Venenkatheter-assoziierte Sepsis: Koagulase - negative *Staphylokokken* 32,2 %, *Enterococcus* spp. 20,6 %, *S. aureus* 14,1 %, Methicillin - resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) 27,5 %, *E. coli* 5,6 % und ESBL - bildende *E. coli* 7,1 %. Atemwegsinfektionen invasiv beatmeter Patienten waren bedingt durch Infektionen mit: *S. aureus* 17,7 %, MRSA 26,1 %, *P. aeruginosa* 15,4 %, *Klebsiella* spp. 14,8 %, ESBL - bildende *Klebsiella* spp. 4,4 %, *E. coli* 14,4 % und ESBL - bildende *E. coli* 7,1 %. Die Erreger von Atemwegsinfektionen nicht - invasiv beatmeter Patienten verteilen sich wie folgt: *S. aureus* 18,9 %, MRSA 22,4 %, *E. coli* 14,1 %, ESBL - bildende *E. coli* 8,6 %, *Klebsiella* spp. 14,1 %, ESBL - bildende *Klebsiella* spp. 1 % und *P. aeruginosa* 12,1 % (Nationales Referenzzentrum für Surveillance von nosokomialen Infektionen, 2017).

Nur in etwa 30 % der Fälle ist eine Bakteriämie in der Blutkultur (BK) nachweisbar. In weiteren 30 % kann kein mikrobiologischer Infektionsnachweis erbracht werden, obwohl in klinischer Hinsicht eine Infektion wahrscheinlich ist (Herold, 2016, Reinhart et al., 2010).

Sepsis ist ein Grund für erhöhte Morbidität und Mortalität und assoziiert mit verlängerten Krankenhausaufenthalten und hohen Behandlungskosten (Angus et al., 2001, Mayr et al., 2014). Insbesondere Blutstrominfektionen mit multiresistenten Keimen stellen ein Problem dar, da die verbleibenden therapeutischen Optionen häufig eingeschränkt sind. Beispielsweise werden ca. 2 % der bakteriellen Sepsisfälle durch *P. aeruginosa* verursacht. Hiervon besitzen fast 16 % ein Gen für die Bildung einer Metallo - β - Laktamase (MBL), die dazu führt, dass eine Resistenz gegenüber allen β -lactam Antibiotika inklusive der Carbapeneme vorliegt. Die Mortalität im Krankenhaus beträgt bei MBL-bildenden *P. aeruginosa* Stämmen im Vergleich zu nicht MBL-bildenden 61 % zu 34 %, bei 3/4 multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen im Vergleich zu nicht multiresistenten 63 % zu 30 % (Willmann et al., 2013). Somit ist eine schnelle und effiziente Diagnostik sehr wichtig, da eine zeitnahe Keimidentifizierung und

Antibiotikaempfindlichkeitstestung zur Einleitung einer adäquaten Therapie den Verlauf der Erkrankung verbessern und die Mortalität, die Dauer des Krankenhausaufenthaltes und die Behandlungskosten senken können (Bauer et al., 2014, Savinelli et al., 2004).

1.3 Blutkulturdiagnostik

Die Blutkulturdiagnostik gehört zu den wichtigsten mikrobiologischen Untersuchungsmethoden und liefert durch schnellen und zuverlässigen Erregernachweis und Erstellung eines Antibiogramms die Voraussetzung für eine gezielte Therapie, verbesserte Prognose und Reduktion der Letalität bei einem septischen Geschehen (Seifert, 2007, Brunkhorst et al., 2010, Dahouk, 2009).

Indikationen für die Abnahme von Blutkulturen stellen der klinische Verdacht auf eine Sepsis oder einen septischen Schock, kontinuierliche Bakteriämien (z.B. Endokarditis, Osteomyelitis, Pneumonien), sowie intermittierende Bakteriämien (z.B. Meningitis, Abszesse, Katheter), Fieber unklarer Genese und zyklische Infektionskrankheiten (z.B. Typhus) dar. Besonders zu beachten sind die Indikationen bei Neugeborenen, Immunsupprimierten, Intensivpatienten und geriatrischen Patienten, da sich eine Sepsis hier häufig nicht mit den typischen klinischen Symptomen äußert.

Blutkulturen sollten unabhängig von der Fieberhöhe und möglichst vor Beginn einer Antibiotikatherapie abgenommen werden. Die Entnahme muss unter aseptischen Bedingungen (hygienische Händedesinfektion, Einmalhandschuhe, Desinfektion der Punktionsstelle, Desinfektion des Diaphragmas der Blutkulturflasche) erfolgen. Es sollten mindestens zwei, aber maximal vier Blutkulturen durch separate periphere Venenpunktionen entnommen werden, wobei jeweils eine aerobe, eine anaerobe und ggf. eine Pilz-Blutkulturflasche mit dem gewonnenen Blut befüllt werden. Ein zeitlicher Mindestabstand ist nicht erforderlich. Bei Erwachsenen sollte das Blutvolumen pro Flasche ca. 10 ml betragen, bei Kindern > 20 kg Körpergewicht je 5 ml/Flasche, bei Kindern < 20 kg Körpergewicht 1-5 ml/ Flasche und bei Früh- und Neugeborenen mind. 0,5 ml. Nach Abnahme sollten die Blutkulturen innerhalb von zwei bis vier Stunden, unter Schutz vor Auskühlung, in ein mikrobiologisches Labor transportiert werden. Eine Zwischenlagerung darf nur über Nacht, je nach Herstellerangaben bei

36°C oder Raumtemperatur (RT), erfolgen. Lagerung und Transport dürfen 16 Stunden nicht überschreiten (Seifert, 2007, Brunkhorst et al., 2010).

Nach Eingang im Labor werden die Blutkulturen optisch auf Erregerwachstum, Füllmenge, korrekte Beschriftung etc. überprüft und anschließend bebrütet. Die Bebrütung erfolgt heutzutage überwiegend in automatischen Blutkultursystemen, in Europa v.a. BacT/Alert von BioMérieux und BACTEC von Becton Dickinson (BD), die in den 1970er Jahren eingeführt wurden und die manuellen Systeme weitestgehend abgelöst haben (Seifert, 2007, Dahouk, 2009). Beide Systeme nutzen die Messung von Kohlendioxid (CO₂), welches beim Wachstum von Mikroorganismen entsteht, als Nachweisverfahren. Der CO₂ - Anstieg wird fluorometrisch oder kolorimetrisch über einen Indikator am Boden der Blutkulturflasche gemessen (Standardverfahren am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Tübingen) (Seifert, 2007). Die Bebrütungszeit beträgt in der Regel fünf bis sieben Tage, die Mehrzahl der Blutkulturen wird bereits in den ersten 24 Stunden positiv (Seifert, 2007, Brunkhorst et al., 2010). Nach der Positivmeldung einer Blutkultur folgen die Anfertigung eines Grampräparates, das Anlegen von Subkulturen und eine orientierende Empfindlichkeitsprüfung. Die endgültige Identifizierung und Resistenztestung erfolgt erst nach Anzucht mit ausreichendem Kulturmaterial (Brunkhorst et al., 2010, Robert Koch Institut, 2017a, Simon, 2012). Die derzeitige Routinediagnostik für Erregeridentifizierung und Antibiotikaempfindlichkeitstestung ist in erster Linie kulturbasiert und dauert im Schnitt zwei oder mehr Tage (Bauer et al., 2014, Savinelli et al., 2004). Das analytische Ziel der Blutkulturdiagnostik besteht in der Verkürzung der Zeit zwischen dem Positivwerden der Blutkultur und dem Ergebnis der Erregeridentifizierung und Antibiotikaresistenztestung, um dem Patienten schnellstmöglich eine adäquate antimikrobielle Therapie zukommen zu lassen (Seifert, 2007, Simon, 2012). Die Ergebnisse dieser Verfahren müssen dem behandelnden Arzt schnellstmöglich telefonisch weiter gegeben werden.

1.4 Neue Systeme für schnellere Identifizierung und Antibiotikaempfindlichkeitstestung aus Blutkulturen

Für eine schnellere Erregeridentifizierung aus positiven Blutkulturen stehen vermehrt massenspektrometrische und molekularbiologische Verfahren im Fokus. Es gibt bereits mehrere Studien über den direkten Erregernachweis mittels MALDI - TOF - Massenspektrometrie (matrix - assisted laser desorption ionization - time of flight mass spectrometry) (Clerc et al., 2013, La Scola and Raoult, 2009, Fiori et al., 2016, Vlek et al., 2012) und molekularbiologischer Tests, wie beispielsweise dem BioFire FilmArray Blood Culture Identification Panel (BCID Panel) (BioMérieux, USA) und den Verigene Bloodstream Infection Tests (Nanosphere, USA) (Fiori et al., 2016, Salimnia et al., 2016, Ward et al., 2015, Altun et al., 2013, Walker et al., 2016, Ledebøer et al., 2015). Die molekular basierten Testsysteme zeichnen sich durch einen hohen Grad an Automatisierung und einer geringen „hands - on time“ aus.

Das BioFire FilmArray BCID Panel ist ein geschlossenes, automatisiertes Kartuschen Multiplex PCR System, welches 24 Pathogene (8 grampositive Bakterien, 11 gramnegative Bakterien, 5 *Candida* spp.) und 3 Antibiotikaresistenzgene (*mecA*, *vanA/B*, *bla_{KPC}*) umfasst. Das System extrahiert und reinigt zuerst die DNA in der Probe. Anschließend wird eine nested multiplex PCR durchgeführt. In der ersten PCR werden zwischen 200 und 500 Basenpaar - Segmente vervielfältigt. In der zweiten PCR werden Primer genutzt, die an Sequenzen innerhalb der bereits entstandenen Fragmente binden, und so zur Amplifikation kürzerer PCR-Fragmente führen und die Spezifität erhöhen. Mittels Endpunkt - Schmelzkurven werden die Ergebnisse automatisch analysiert und festgehalten. Die Durchführungsdauer des Tests beträgt zwei Minuten, die Zeit zum Ergebnis ca. eine Stunde (Pence et al., 2013, BioFire, 2017, bioMérieux, 2017).

Die Verigene Bloodstream Infection Tests basieren auf einer sogenannten Nanogold Technologie. Hierbei ist keine DNA - Amplifikation notwendig. Auf Glasträgern fixierte, erregerspezifische Fangsonden werden mit der aus positiven Blutkulturen extrahierten DNA inkubiert. Es kommt zur Hybridisierung komplementärer Sequenzen. In einem nächsten Schritt binden mit Gold - Nanopartikeln konjugierte, zur Ziel - DNA komplementäre Sonden und bilden ein „Sandwich“. Die Goldpartikel geben ein Signal,

welches durch die Bindung von elementarem Silber verstärkt wird und den Nachweis gebundener DNA ermöglicht. Der Verigene Gram - Negative Blood Culture Test (BC - GN) umfasst 9 Pathogene (4 auf Genuslevel, 5 auf Spezieslevel) und 6 Antibiotikaresistenzgene (*bla_{CTX-M}*, *bla_{IMP}*, *bla_{KPC}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{VIM}*), der Verigene Gram - Positive Blood Culture Test (BC - GP) 13 Pathogene (4 auf Genuslevel, 9 auf Spezieslevel) und 3 Antibiotikaresistenzgene (*mecA*, *vanA*, *vanB*). Für die Durchführung benötigt man nicht länger als fünf Minuten, die Laufzeit beträgt zwei bis zweieinhalb Stunden (Pence et al., 2013). Abgesehen vom Nachweis einzelner Resistenzgene, liefern diese Systeme keine Informationen über die Antibiotikaresistenz oder -empfindlichkeit des Erregers.

1.5 Funktionsprinzip des Accelerate Pheno™ Systems

Im Gegensatz zu den vorhergehend beschriebenen Systemen, handelt es sich beim Accelerate Pheno™ um ein vollautomatisiertes System zur direkten Identifizierung und zusätzlich zur Antibiotikaresistenztestung von Bakterien aus positiven Blutkulturen.

Automatische Probenaufbereitung mittels Gelelektrofiltration

Das Probenmaterial wird automatisch in eine Agarosegeltasche überführt. Das Gel besitzt Poren, die kleiner als Bakterienzellen sind. Durch Eintauchen des Gels in einen Puffer nehmen die Bakterien eine negative Ladung an. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung, wird der Debris ins Gel gezogen, die Bakterien aber bleiben aufgrund ihrer Größe an der Wand der Tasche hängen. Nach Ablegen der Spannung bleibt eine reine Bakterienlösung im Well zurück (Accelerate Diagnostics, 2017, Chantell, 2015).

Immobilisation der Zellen mittels elektrokinetischer Konzentration

Die Bakterienlösung wird nun in eine Multikanalkassette überführt. Die Kassette besitzt 48 Kanäle/Zellen (20 für die Identifikation, 28 für die Resistenztestung), deren Boden aus durchsichtigem Glas und deren Oberseite aus Plastik besteht. Die Oberfläche jeder Zelle ist mit einer Schicht aus Indiumzinnoxid überzogen, welches als Elektrode dient. Der Boden ist zusätzlich mit einem kationischen Poly - L - Lysin beschichtet. Wird eine

niedrige Spannung angelegt, werden die Bakterien negativ geladen und haften an der positiv geladenen Bodenschicht (Accelerate Diagnostics, 2017, Chantell, 2015).

Identifikation mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Nun kommt in jede Zelle ein Gemisch aus ATTO - 532 (grün) markierten DNA - Sonden und ATTO - 647 (rot) markierten Sonden. Die ATTO - 647 - Sonden binden an rRNA aller Bakterien (universell), wohingegen die ATTO - 532 - Sonden jeweils spezifisch für ein Bakterium sind. Ein Epifluoreszenzmikroskop mit einer Kamera im Bereich von 532 - 647 nm und mit Dunkelfeld erstellt Fotos von jeder Zelle, welche von einer speziellen Software ausgewertet werden. Dabei werden nur Objekte analysiert, die ein Universal - Proben - Signal bzw. ein Universal - und ein Target - Proben - Signal geben. Letztere Konstellation stellt das Identifikationsergebnis dar. Es kann auch eine Quantifizierung der Organismen vorgenommen werden. Hierzu wird als Kontrolle in einer zusätzlichen Zelle eine universelle Nukleinsäurefarbe pipettiert, um die Anzahl aller Organismen in der Probe zu bestimmen. Das Ergebnis wird mit der Anzahl jedes Zielorganismus und aller Universalorganismen verglichen und verrechnet (Accelerate Diagnostics, 2017, Chantell, 2015).

Resistenztestung

Entsprechend dem Ergebnis der Identifizierung wird ein Antibiotika - Panel gewählt und getestet. Zunächst wird die Wachstumsrate normalisiert und erneut die Anzahl der Organismen in der Bakterienlösung gemessen. Die Zellen für die Resistenztestung werden mit der Bakterienlösung befüllt und die Bakterien wie bereits beschrieben immobilisiert. Müller - Hinton (MH) - Boullion mit je einem unterschiedlichen Antibiotikum wird hinzugefügt. Jedes Antibiotikum wird in nur einer Konzentration getestet. Ein Kanal mit reiner MH - Boullion dient als Wachstumskontrolle. Alle 10 Minuten nimmt ein Dunkelfeldmikroskop mit Kamera Bilder jeder koloniebildenden Einheit (KBE) auf. Eine Software analysiert die Wachstumsrate und erstellt spezifische Wachstumskurven, deren Muster ein Computer Algorithmus mit Ergebnissen bekannter Organismen vergleicht. Die ermittelte MHK wird mit Hilfe standardisierter Breakpoints in sensitiv (S), intermediär (I) und resistent (R) eingeteilt (Accelerate Diagnostics, 2017, Chantell, 2015).

In *Tabelle 2* sind das Identifikationsspektrum und das Antibiotikapanel für gramnegative Erreger abgebildet.

Tabelle 2 Accelerate Pheno™ Identifikations- und Antibiotikapanel für gramnegative Keime

AB Keim	SAM	TZP	CFZ	FEP	CAZ	CRO	ETP	IMP	MEM	AMK	GEN	TOB	CIP	MIN	AZT	CST
<i>E. coli</i>	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
<i>Klebsiella</i> spp.	•	•	•	•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
<i>Enterobacter</i> spp.		•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
<i>Proteus</i> spp.	•	•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	
<i>Citrobacter</i> spp.		•		•	•	•	•		•	•	•	•	•		•	•
<i>S. marcescens</i>		•		•	•	•	•		•		•		•		•	
<i>P. aeruginosa</i>		•		•	•			•	•	•	•	•	•		•	•
<i>A. baumannii</i>	•	•		•				•	•	•			•	•		•

AB = Antibiotikum; SAM = Ampicillin-Sulbactam; TZP = Piperacillin-Tazobactam; CFZ = Cefazolin; FEP = Cefepim; CAZ = Ceftazidim; CRO = Ceftriaxon; ETP = Ertapenem; IMP = Imipenem; MEM = Meropenem; AMK = Amikacin; GEN = Gentamicin; TOB = Tobramycin; CIP = Ciprofloxacin; MIN = Minocyclin; AZT = Aztreonam; CST = Colistin.
(Chantell, 2015)

1.6 Aufgabenstellung/Zielsetzung

Da es sich bei der Sepsis um ein häufiges Erkrankungsbild handelt, das mit einer hohen Mortalität belastet ist, ist eine schnelle Blutkulturdiagnostik von entscheidender Bedeutung, um ein adäquates Patientenmanagement und eine optimale Patientenversorgung zu gewährleisten. Insbesondere das Auftreten von Sepsis mit multiresistenten gramnegativen Bakterien wie ESBL - bildenden Enterobacteriaceae und multiresistenten *P. aeruginosa* Stämmen stellt eine therapeutische und krankenhaushygienische Herausforderung dar (Angus et al., 2001, Bauer et al., 2014, Savinelli et al., 2004, Peleg and Hooper, 2010).

Das Accelerate Pheno™ System (Accelerate Diagnostics, USA) ist ein vollautomatisiertes Testsystem, das eine direkte Erregeridentifizierung innerhalb von 1,35 Stunden und eine Antibiotikaempfindlichkeitstestung innerhalb von 5,3 Stunden

direkt aus positiven Blutkulturen ermöglicht. Zur Identifizierung von Bakterien werden Gelelektrofiltration und Fluoreszenz - in - situ - Hybridisierung (FISH) kombiniert. Mittels Automikroskopie werden Wachstumsraten der Bakterien unter Zugabe des Antibiotikums analysiert und minimale Hemmkonzentrationen (MHKs) errechnet.

Ziel dieser Studie ist es, bei Sepsisepisoden verursacht durch gramnegative Bakterien

- i) zu überprüfen, inwiefern das Accelerate PhenoTM System positive Blutkulturererreger im Vergleich zur herkömmlichen kulturbasierten Identifizierung korrekt identifizieren kann,
- ii) das Ergebnis der Resistenztestung des Accelerate PhenoTM mit den konventionellen kulturbasierten Resistenztestungen übereinstimmt und
- iii) zu erheben, wie viel schneller eine Identifizierung und ein Resistenztestungsergebnis durch den Einsatz des Accelerate PhenoTM, im Vergleich zur herkömmlichen kulturbasierten Routinediagnostik, vorliegen.

Der Fokus der Studie liegt hierbei auf Sepsisepisoden, die durch gramnegative Erreger verursacht werden. Der Grund hierfür liegt in den sehr niedrigen Raten von Sepsisepisoden mit resistenten grampositiven Keimen, wie MRSA und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE), die in unserem Labor derzeit noch unter 1 % liegen (Marschal et al., 2017).

2 Material und Methoden

Die Angaben zu Material und Methoden basieren auf laborinterner standardisierter Vorgehensweise.

2.1 Aufbau

Die Studie fand im Zeitraum von April 2016 bis Oktober 2016 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Universität Tübingen mit Zustimmung des zuständigen Ethik Komitees (Aktenzeichen des Ethikvotums: 139/2016BO2) statt. Eingeschlossen wurden positive Blutkulturen, die von stationären Patienten und Notfallpatienten der CRONA - Klinik, sowie der BG Unfallklinik in Tübingen stammten. Es wurde jeweils die erste positive Blutkultur eines jeden Patienten, die im Grampräparat gramnegative Stäbchen zeigte, in die Studie aufgenommen. Zeigten sich im ersten Grampräparat grampositive Bakterien oder Pilze, wurde die Probe nicht in die Studie eingeschlossen.

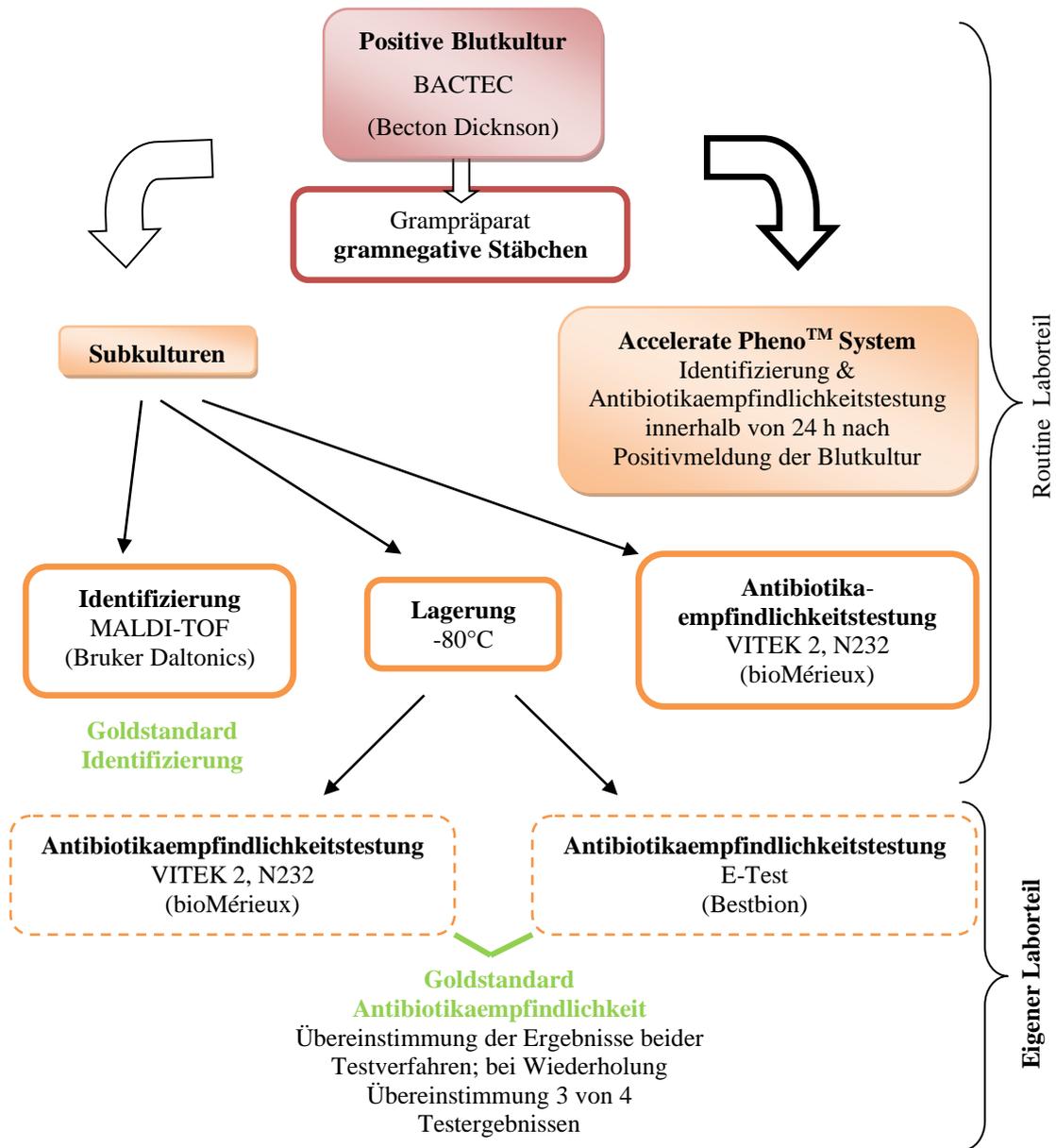


Abbildung 1 Aufbau der Studie

Eigene Darstellung

2.2 Ablauf der Routine Blutkulturdiagnostik

Die in die Studie eingeschlossenen Proben wurden normal in der Routine durch das medizinisch technische Assistenten (MTA) Team der medizinischen Mikrobiologie bearbeitet. Die Laborarbeitszeiten sind werktags von 7.30 Uhr bis 17.30 Uhr und am Wochenende von 7.30 Uhr bis 15.00 Uhr. Die Bearbeitung der Blutkulturen erfolgte

jeden Morgen ab 7.30 Uhr und während der Arbeitszeiten, sobald sie positiv gemeldet wurden.

Nach Eingang im Labor wurden die Blutkulturen im Bactec 9240 (BD) bei 35°C +/- 1,5°C inkubiert. Nach Positivmeldung erfolgte eine Gramfärbung nach Standardprotokoll, sowie die Aussaat der positiven Blutkulturflasche auf verschiedene Agarplatten (aerobe BK: Colistin - Nalidixinsäure - Agar (CNA - Agar) aerob, Brain - Heart - Agar (BH - Agar) CO₂; anaerobe BK: CNA - Agar aerob, BH - Agar CO₂ und anaerob; Pilz BK: BH - Agar CO₂, Sabouraud - Agar (SAB - Agar) aerob), die über Nacht bei 37°C Grad bebrütet wurden. Anschließend wurde am nächsten Tag eine Identifizierung mittels MALDI - TOF (Bruker Daltonics) vorgenommen und ein Antibiogramm im VITEK 2 (BioMérieux) mit der Resistenztestungskarte AST - N232 gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Alle Resultate wurden im Laborinformationssystem SWISSLAB (Roche Diagnostics) dokumentiert. Falls in der initialen Gramfärbung ein gramnegatives Stäbchen mikroskopisch gesehen wurde, wurde direkt ein Accelerate Pheno™ Test durchgeführt. Die Stämme wurden zur ausführlichen Charakterisierung bei -80°C in speziellen Tubes (Microbank blue, Pro-Lab Diagnostics) eingefroren.

Für die Evaluierung wurde die Antibiotikaempfindlichkeit sowohl am VITEK 2 wiederholt, als auch mit E - Tests ermittelt.

2.3 Accelerate Pheno™ System

Material

Tabelle 3 Accelerate Pheno™ System Gerät und Material

Name	Hersteller	Bestellnummer
Accelerate Pheno™ System, Software Version 1.0	Accelerate Diagnostics	
Accelerate Pheno™ Test BC Kit	Accelerate Diagnostics	10101008



Abbildung 2 Zwei Accelerate Pheno™ System Module mit Bildschirm
Eigenes Bild



Abbildung 3 Accelerate Pheno™ Test BC Kit
Eigenes Bild



Abbildung 4 Accelerate Pheno™ Modul offen
Eigenes Bild

Testprinzip

Das Gerät stellt ein vollautomatisiertes System zur direkten Identifizierung und Resistenztestung häufiger gramnegativer und grampositiver Bakterien aus positiven Blutkulturen dar.

Die Probenaufbereitung erfolgt automatisch mittels Gelelektrofiltration. Immobilisiert werden die Bakterien per elektrokinetischer Konzentration.

In einem nächsten Schritt werden die Erreger anhand von Fluoreszenz - in - situ - Hybridisierung identifiziert.

Entsprechend dem Ergebnis der Identifizierung erfolgt eine Resistenztestung mit einem erregerspezifischen Antibiotika - Panel. Mittels durch Dunkelfeldmikroskopie erzeugter Bilder werden von einer Software Wachstumskurven erstellt und ausgewertet.

Durchführung

Laut Hersteller wird empfohlen, eine Blutkultur nach Positivmeldung innerhalb von acht Stunden zu verarbeiten. Aufgrund der Arbeitszeiten im Labor wurde diese Zeit auf 24 Stunden ausgeweitet. Die Assay Cassette wurde aus der Kartusche entnommen und die Kartusche 3 x ruckartig nach unten bewegt, um mögliche Reagenzienbläschen zu entfernen. Das Probefläschchen wurde herausgenommen und mit 5 ml Blut aus der positiv gemeldeten Blutkultur befüllt. Anschließend wurde das Probefläschchen wieder in die Kartusche eingesetzt. Die Assay Cassette und die Kartusche wurden in das Accelerate Pheno™ Gerät eingesetzt und der Vorgang gestartet. Die Durchführung erforderte nicht mehr als zwei Minuten.

2.4 Datenzusammenführung und detaillierte Charakterisierung der eingeschlossenen Isolate

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sämtliche in die Studie eingeschlossenen Isolate erneut aufgetaut, die Resistenztestung mit dem VITEK 2 wiederholt und mit dem Ellipsometertest für alle aufgeführten Antibiotika bestätigt. Für Amikacin, Ceftriaxon, Ertapenem, Aztreonam und Colistin wurde die MHK nur mittels E - Test bestimmt, da diese Antibiotika nicht in der VITEK 2 AST-N232 Karte vorhanden sind. Die Ergebnisse wurden anhand der European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Linien der Version 6.0 beurteilt.

2.4.1 Auftauen, Abimpfen und Einfrieren der Isolate

Die Isolate wurden dem -80 C° Freezer entnommen und in einer Box auf Eis gestellt. Das Tube wurde geöffnet, der Rand abgeflammt und mit einer Einmalöse ein Kügelchen herausgenommen und auf einer beschrifteten Blutplatte im 3 - Ösen - Prinzip ausgestrichen. Der Rand des Tubes wurde erneut abgeflammt, das Röhrchen wieder bei -80 C° aufbewahrt und die Blutplatte bei 36 C° im Brutschrank bebrütet. Am

nächsten Tag erfolgte auf einer neuen Blutplatte eine Abimpfung der aufgetauten Kultur. Diese wurde ebenfalls bei 36 C° bis zum folgenden Tag inkubiert.

Von der Abimpfung wurden zwei neue Tubes beimpft, indem jeweils der Rand des Röhrchens abgeflammt wurde, Kulturmaterial von mindestens der Hälfte der 1. Fraktion mit einem sterilen Wattetupfer aufgenommen und in das Medium (Kügelchen und Flüssigkeit) des Tubes eingerieben wurde, bis eine deutliche Trübung entstand. Nach ca. zweiminütiger Inkubation wurde mit einer Einmalpipette die ganze Mediumflüssigkeit abgenommen, das Tube abgeflammt, verschlossen und bei -80 C° aufbewahrt. Aus der Mediumflüssigkeit wurde auf einer Viertel Blutplatte eine Reinheitskultur angelegt und bei 36 C° inkubiert.

2.4.2 VITEK 2

Material

Untersuchungsmaterial: Bakterienkulturen, nicht älter als 48 Stunden

Tabelle 4 VITEK 2 Gerät und Material

Name	Hersteller	Bestellnummer
VITEK 2	bioMérieux	
AST-N232 (gramnegative Stäbchen)	bioMérieux	413116
VITEK NaCl	bioMérieux	417820
Pipettenspitzen	bioMérieux	21319

Testprinzip

Es handelt sich um ein vollautomatisiertes Gerät zur Resistenztestung häufiger gramnegativer und grampositiver Bakterien. Zum Einsatz kommen Karten, welche ein miniaturisiertes und geschlossenes System darstellen. Jede Karte besitzt 64 Küvetten, die Antibiotika in jeweils verschiedenen Konzentrationen enthalten. Die Inkubation erfolgt bei 35°C, wobei die Zeit abhängig von der Kartenart und dem Wachstumsverhalten des Erregers ist. Die Art der Messung und Auswertung ist je nach Karte unterschiedlich.

Bei der Resistenzbestimmung wird das Wachstum der Bakterien in An - und Abwesenheit entsprechender Antibiotika mittels Transmissionsmessung ermittelt. Diese erfolgt bei einer Wellenlänge von 660 nm für jede Küvette alle 15 Minuten. Das

gewonnene Wachstumsprofil wird elektronisch ausgewertet und die MHK für jedes Antibiotikum errechnet. Anhand der EUCAST Standards wird in S, I und R unterteilt.

Durchführung

Für die Resistenztestung wurde in 1,5 ml steriler 0,45 % iger Kochsalzlösung mit 2 - 3 Kolonien des zu untersuchenden Keims eine homogene Keimsuspension hergestellt. Der Dichtewert wurde auf einen McFarland von 0,5 eingestellt. Das beimpfte Plastiktube wurde auf den Carrier gestellt, daneben ein leeres Rohr, in welches die entsprechende Karte gestellt wurde. Der Carrier wurde in das Gerät eingesetzt. Aus der Keimsuspension wurde auf einer halben Blutplatte eine Reinheitskontrolle mitgeführt.

2.4.3 Arbeitsablauf Epsilometertest (E - Test)

Material

Untersuchungsmaterial: Bakterienkulturen, nicht älter als 24 Stunden

Tabelle 5 E - Test Material

Name	Hersteller	Bestellnummer
Müller - Hinton - Agar	Laboreigene Herstellung	
Blutagar	Oxoid	CM0331

E - Teststreifen

Tabelle 6 E - Teststreifen

Antibiotikum / MIC Test Strip	Hersteller	Bestell - nummer	MHK-Bereich (µg/ml)	Lagerung
Amikacin	Bestbion	01B10003	0,016-256	4°C
Ampicillin/Sulbactam (2/1)	Bestbion	01B10018	0,016-256	-20°C
Aztreonam	Bestbion	01B10026	0,016-256	4°C
Cefepim	Bestbion	01B10036	0,016-256	4°C
Ceftazidim	Bestbion	01B10063	0,016-256	4°C
Ceftriaxon (high range)	Bestbion	01B10068	0,016-256	4°C
Ciprofloxacin	Bestbion	01B10083	0,002-32	4°C
Colistin (low range)	Bestbion	01B10093	0,016-256	4°C
Ertapenem	Bestbion	01B10111	0,002-32	-20°C
Gentamicin (high range)	Bestbion	01B10131	0,064-1024	4°C
Imipenem	Bestbion	01B10134	0,002-32	-20°C
Meropenem	Bestbion	01B10150	0,002-32	-20°C
Piperacillin/Tazobactam	Bestbion	01B10192	0,016-256	4°C
Tobramycin (low range)	Bestbion	01B10234	0,016-256	4°C

MIC = minimum inhibitory concentration, MHK = minimale Hemmkonzentration

Testprinzip

E - Teste dienen der Bestimmung der MHK von Bakterien für verschiedene Antibiotika. Ein E - Test Streifen der Firma Bestbion besteht aus Papier. Auf der Unterseite enthält der Streifen einen definierten Antibiotikagradienten, der mit den MHK - Werten auf der Oberseite korreliert. Diese ist mit je 15 MHK - Werten beschriftet, die jeweils um den Faktor 2 ansteigen. Die MHK - Skala ergibt sich durch 15 Verdünnungen mit dem Faktor 0,5. Der Streifen wird auf einen mit Bakterien ausgestrichenen Agar gelegt. Der Antibiotikagradient diffundiert in den Agar und bleibt dort stabil. Das Wachstum der zu untersuchenden Bakterien wird analog ihrer Resistenz gehemmt. Es ergibt sich ein ellipsoider Hemmhof. Der Messbereich ist je nach Antibiotikum und dessen EUCAST - Breakpoints unterschiedlich. Die MHK wird in µg/ml angegeben.

Durchführung

Die E - Teststreifen sollten ca. 30 min vor Benutzung auf RT gebracht werden.

Mit einer 0,85 % igen Kochsalzlösung wurde mit Kulturmaterial eine homogene Bakteriensuspension hergestellt. Der Dichtewert wurde auf einen McFarland von 0,5 eingestellt. Mit einem sterilen Wattetupfer wurde die Agarplatte gitterförmig ausgestrichen, sodass ein gleichmäßiger Bakterienrasen entstand. Nach einer Trockenzeit von 10 - 15 min bei RT wurde mit einer Pinzette der entsprechende E - Teststreifen mittig aufgelegt. Die MHK - Skala zeigte dabei nach oben. Zusätzlich wurde auf einer halben Blutplatte (Ausnahme *Proteus* spp.: ganze Platte) aus dem Inokulum eine Reinheitskontrolle angelegt. Die Bebrütung von gramnegativen Stäbchen erfolgte 16 - 20 Stunden, bei langsam wachsenden Isolaten bis zu 48 Stunden, bei 35°C +/- 2°C.

Ergebnisbewertung und Besonderheiten

Die Platten wurden nach der vorgegebenen Inkubationszeit abgelesen, wenn ausreichendes Wachstum vorhanden war und die Hemmhofellipse sicher abgelesen werden konnte. Die MHK wurde am Schnittpunkt der Hemmhofellipse mit der Skala abgelesen. Einzelne Kolonien wurden beachtet und die MHK angegeben, bei der eine vollständige Wachstumshemmung sichtbar war (Ausnahme bakteriostatische Antibiotika, siehe unten). Die Ablesung erfolgte unabhängig durch zwei Personen mittels 4 - Augen - Prinzip.

Erregerbedingte Effekte:

- Das Schwärmen von *Proteus* spp. wird ignoriert.
- β - Hämolyse wird ignoriert und nur der Endpunkt der Wachstumshemmung abgelesen.
- Um winzige Kolonien und Trübungen besser sehen zu können wird die Platte gekippt.
- Bei bakteriziden Antibiotika wird die MHK bei vollständiger Hemmung des Wachstums abgelesen.
- Bei bakteriostatischen Antibiotika wird die MHK bei 80 % iger Wachstumshemmung abgelesen.

E-Teste erzeugen einen kontinuierlichen Antibiotikagradienten, sodass bei der Ablesung auch Werte vorkommen, die zwischen denen der Reihenverdünnung mit dem Faktor 0,5 liegen. Diese Werte wurden vor der Auswertung immer auf den nächsthöheren Wert aufgerundet.

Auswertung anhand der EUCAST - Breakpoints Version 6.0

Tabelle 7 EUCAST - Breakpoints Version 6.0 für Enterobacteriaceae und *Pseudomonas* spp.

Antibiotikum	Enterobacteriaceae		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	MHK (mg/l)		MHK (mg/l)	
	S ≤	R >	S ≤	R >
Ampicillin - Sulbactam	8	8	-	-
Piperacillin - Tazobactam	8	16	16	16
Cefepim	1	4	8	8
Ceftazidim	1	4	8	8
Ceftriaxon	1	2	4	4
Ertapenem	0,5	1	-	-
Imipenem	2	8	4	8
Meropenem	2	8	2	8
Aztreonam	1	4	1	16
Ciprofloxacin	0,5	1	0,5	1
Amikacin	8	16	8	16
Gentamicin	2	4	4	4
Tobramycin	2	4	4	4
Colistin	2	2	4	4

MHK = minimale Hemmkonzentration, S = sensibel, R = resistent
(EUCAST, 2016)

2.5 Datenauswertung

Goldstandard für Identifizierung und Resistenztestung

Als Goldstandard für die Bakterienidentifikation wurde die kulturbasierte Identifikation festgelegt. Für die Resistenztestung der Antibiotika, die in der VITEK 2 Karte enthalten sind, wurden die übereinstimmenden Ergebnisse aus dem VITEK 2 und den E - Tests

als Goldstandard definiert. Gab es zwischen dem Ergebnis aus dem ersten VITEK 2 und dem E - Test eine Diskrepanz, wurden beide Teste wiederholt. Zeigten drei der vier Testergebnisse (S, I oder R) eine Übereinstimmung, wurde dieses Resultat als korrekt eingestuft. Für alle Antibiotika (Amikacin, Ertapenem, Ceftriaxon, Aztreonam, Colistin), die nicht in der VITEK 2 Karte vorhanden waren, wurde das Resultat des E - Tests alleine als Goldstandard gewählt. Dieser wurde erneut doppelt getestet, wenn keine Übereinstimmung vorlag. Deckten sich zwei der drei Testresultate (S, I oder R), wurde dieses Ergebnis als korrekt gewertet. Alle Ergebnisse wurden in einer Exceltabelle erfasst und zusammengeführt.

Datenanalyse

Die Ergebnisse der Identifizierung des Accelerate PhenoTM wurden mit den kulturbasierten Resultaten verglichen. War das Identifizierungsergebnis des gramnegativen Keims mit beiden Methoden gleich, wurde die Probe durch den Accelerate PhenoTM als korrekt identifiziert erachtet. Wurde ein zusätzlicher gramnegativer Keim gefunden, ein anderer gramnegativer Stab identifiziert oder kein Identifikationsergebnis erzielt, wurde die Probe als nicht korrekt identifiziert gewertet. Grampositive Keime und Pilze wurden nicht mit einbezogen. Die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung des Accelerate PhenoTM wurden mit dem oben beschriebenen Goldstandard verglichen. Auftretende Diskrepanzen wurden wie folgt definiert: very major error (falsche Empfindlichkeit), major error (falsche Resistenz), minor error (intermediär statt sensibel oder resistent). Der Anteil der very major errors wurde errechnet, indem die Anzahl der very major errors durch die Anzahl der als resistent getesteten Stämme dividiert und mit 100 multipliziert wurde. Für die Rate der major errors wurde die Anzahl der major errors durch die Anzahl der sensibel getesteten Stämme dividiert und mit 100 multipliziert und für den Anteil der minor errors wurde die Anzahl der minor errors durch die Gesamtzahl der Stämme dividiert und mit 100 multipliziert. Alle drei Raten wurden in % angegeben.

Unter Supervision von Prof. Dr. med. MSc. Matthias Willmann und PD Dr. med. Silke Peter wurden die Daten mittels der folgenden statistischen Verfahren ausgewertet.

Zur Überprüfung auf eine Normalverteilung hin, wurde der D'Agostino's K - squared Test angewandt. Die Daten wurden in Medianen und Interquartilsabständen (IQR =

engl. Interquartile range) angegeben. Mittels Bartlett's Test wurde auf Gleichheit der Varianzen zwischen Gruppen geprüft. Im Falle eines positiven Bartlett's Testergebnisses wurde anhand des Wilcoxon - Vorzeichen - Rang - Test ein Hypothesentest durchgeführt; andernfalls mittels gepaartem t - Test. Alle Analysen wurden mit der Stata Version 12.1 durchgeführt.

Erfassung der Ergebnisse für Identifizierung, Resistenztestung und Bearbeitungszeiten

Zum Vergleich der Zeit bis zu einem Ergebnis der Identifizierung und Antibiotikaresistenztestung zwischen der Routinediagnostik und dem Accelerate Pheno™ System, wurden die Ergebnisse und Zeiten sowohl aus dem Laborinformationssystem SWISLAB, wie auch aus der Accelerate Pheno™ Software extrahiert. Alle Daten wurden anschließend mit den Daten der wiederholten Antibiotikaempfindlichkeitstestung am VITEK 2 und den Ergebnissen der E - Teste in einer Exceltabelle zusammengeführt. Diese enthielt ca. 15000 Datenpunkte. Erfasst wurden Auftrags -, Labor -, Accelerate - und Einfriernummer der Proben, jeweils Datum und Uhrzeit von Abnahme, Laboreingang, Positivmeldung und Bearbeitungsbeginn sowie die time - to - positivity (TTP) der Blutkulturen, Datum und Uhrzeit des Ergebnisses der Gramfärbung und der telefonischen Weitergabe des Gramergebnisses, Datum, Uhrzeit und Ergebnis der Identifizierung mittels MALDI - TOF, Datum und Uhrzeit der Antibiotikaresistenztestung mittels VITEK 2 aus der Routinediagnostik und alle Ergebnisse aus der Routine und der Wiederholung, Datum und Uhrzeit von Start, Erhalt der Ergebnisse und Testende, sowie der Laufzeit und aller Ergebnisse der Identifizierung und Antibiotikaempfindlichkeitstestung des Accelerate Pheno™ und alle Ergebnisse der Antibiotikaresistenztestung mittels E - Test. Zudem wurden in einer weiteren Exceltabelle die Ergebnisse der Identifizierung und Antibiotikaresistenztestung aller Testverfahren für einen besseren Überblick direkt gegenübergestellt.

3 Ergebnisse

Über einen Zeitraum von 6 Monaten wurden insgesamt 120 Blutkulturen mit gramnegativen Stäbchen mit dem Accelerate Pheno™ System getestet und ausgewertet. 5 Proben wurden von der Studie ausgeschlossen. Probe 1 wurde ausgeschlossen, da die Bearbeitung am Accelerate Pheno™ System erst nach 44 Stunden erfolgte. Bei Nummer 77 handelte es sich um das Material desselben Patienten wie bei Nummer 75. In der Probe 78 konnte nur *Candida*, jedoch kein gramnegatives Stäbchen nachgewiesen werden und bei den Nummern 104 und 105 wurden Proben und Kontrollen vertauscht. Alle weiteren 115 Proben wurden in die Studie eingeschlossen und ausgewertet. Dabei handelte es sich bei 105 dieser Blutkulturen um Monokulturen, bei 10 um Mischkulturen. Teile dieser Arbeit wurden bereits publiziert (Marschal et al., 2017).

3.1 Identifizierung gramnegativer Sepsiserreger

Insgesamt wurden folgende Erreger aus monobakteriellen Sepsisepisoden nachgewiesen: *E. coli* (n = 58), *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (n = 14), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) (n = 2), *P. aeruginosa* (n = 8), *Enterobacter cloacae* (*E. cloacae*) Komplex (n = 6), *Serratia marcescens* (*S. marcescens*) (n = 3), *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) (n = 2), *Acinetobacter baumannii* (*A. baumannii*) Komplex (n = 1), *Citrobacter freundii* (*C. freundii*) (n = 1), *Bacteroides fragilis* (*B. fragilis*) (n = 3), *Morganella morganii* (*M. morganii*) (n = 1), *Acinetobacter radioresistens* (*A. radioresistens*) (n = 1), *Hafnia alvei* (*H. alvei*) (n = 1), *Sphingomonas paucimobilis* (*S. paucimobilis*) (n = 1), *Moraxella nonliquefaciens* (*M. nonliquefaciens*) (n = 1), *Serratia rubidaea* (*S. rubidaea*) (n = 1) und *Rhizobium radiobacter* (*R. radiobacter*) (n = 1).

Die Erreger der Mischkulturen waren: *P. aeruginosa* und *Candida krusei* (*C. krusei*) (n = 1); *E. coli*, *Staphylococcus simulans* (*S. simulans*) und *Staphylococcus hominis* (*S. hominis*) (n = 1); *C. freundii* und *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (n = 1); *E. coli*, *Proteus vulgaris* (*P. vulgaris*) und *C. freundii* (n = 1); *S. marcescens* und *E. faecalis* (n = 1); *K. pneumoniae* und *E. faecalis* (n = 2); *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* und *Streptococcus lutetiensis* (*S. lutetiensis*) (n = 1); *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. faecalis* und *Enterococcus casseliflavus* (*E. casseliflavus*) (n = 1) und *E. coli* und *E. faecalis* (n = 1) (Marschal et al., 2017).

Tabelle 8 Übersicht im Panel enthaltener, korrekt identifizierter gramnegativer Erreger durch das Accelerate Pheno™ System

ACC Panel gramnegativ	Korrekte Identifikation Accelerate Pheno™ (n = 102/115)*	
	Monokulturen (n = 92/105)**	Mischkulturen (n = 10)
<i>E. coli</i>	n = 57	n = 5
<i>Klebsiella</i> spp.	n = 14	n = 4
<i>Enterobacter</i> spp.	n = 6	n = 0
<i>Proteus</i> spp.	n = 2	n = 1
<i>Citrobacter</i> spp.	n = 1	n = 2
<i>S. marcescens</i>	n = 3	n = 1
<i>P. aeruginosa</i>	n = 8	n = 1
<i>A. baumannii</i>	n = 1	n = 0

ACC = Accelerate Pheno™ System, * = das Accelerate Pheno™ System konnte bei 102 der 115 in der Studie eingeschlossenen Proben den Erreger korrekt identifizieren, ** = das Accelerate Pheno™ System konnte 92 von 105 Monokulturen richtig identifizieren

Eigene Darstellung

In 102 der 115 Proben (88,7 %) wurden die gramnegativen Keime richtig identifiziert (Tabelle 8). Bei 10 dieser Proben handelte es sich um Mischkulturen. In 13 Fällen wurden die Erreger entweder falsch oder gar nicht identifiziert. Diese diskrepanten Ergebnisse sind in Tabelle 9 aufgeführt. Hierbei enthielten die Blutkulturen in 8 Fällen Keime, die nicht vom Erregerspektrum des Accelerate Pheno™ Systems abgedeckt werden und somit keine Identifizierung erfolgen konnte. Diese waren *B. fragilis* (n = 3), *M. morgani* (n = 1), *A. radioresistens* (n = 1), *H. alvei* (n = 1), *S. paucimobilis* (n = 1) und *M. nonliquefaciens* (n = 1). Betrachtet man nur Keime, die durch das Spektrum des Accelerate Pheno™ Identifizierungspanel abgedeckt werden, konnte das System 102 von 105 (97,1 %) der gramnegativen Erreger richtig identifizieren. Desweiteren konnte bei zwei Isolaten von *K. pneumoniae* kein Identifikationsergebnis erbracht werden. In drei Proben erbrachte das Accelerate Pheno™ System falsche Ergebnisse bei der Erregeridentifikation. Hierbei wurden in zwei Proben falsche Keime identifiziert: *S. rubidaea* wurde als *S. marcescens* identifiziert und in einer Probe mit *R. radiobacter* wurde *Candida glabrata* (*C. glabrata*) als Identifikationsergebnis berichtet sowie in einem einzigen Fall ein gramnegatives Stäbchen als falsch positiv ermittelt: zusätzlich zu *E. coli* identifizierte der Accelerate Pheno™ eine *K. pneumoniae*. In fünf Monokulturen wurde jeweils fälschlicherweise ein weiterer Keim bestimmt (Marschal

et al., 2017). In den 10 Mischkulturen konnten alle gramnegativen Erreger richtig identifiziert werden (Tabelle 10).

Tabelle 9 Übersicht diskrepanter Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems

Identifikationsergebnis (n)		Kommentar
Kultur	Accelerate Pheno™ System	
<i>K. pneumoniae</i> (2)	Keine Identifizierung (2)	Keine Identifizierung, keine AB-Empfindlichkeitstestung Bakterium nicht im Identifikationsspektrum enthalten, keine AB-Empfindlichkeitstestung Falsche Identifizierung, NW eines zusätzlichen Keims, keine AB-Empfindlichkeitstestung Falsche Identifizierung, Bakterium nicht im Identifikationsspektrum enthalten, keine AB-Empfindlichkeitstestung Falsche Identifizierung, Bakterium nicht im Identifikationsspektrum enthalten, keine AB-Empfindlichkeitstestung NW eines zusätzlichen Keims NW eines zusätzlichen Keims
<i>B. fragilis</i> (3)	Keine Identifizierung (3)	
<i>M. morgani</i> (1)	Keine Identifizierung (1)	
<i>A. radioresistens</i> (1)	Keine Identifizierung (1)	
<i>H. alvei</i> (1)	Keine Identifizierung (1)	
<i>S. paucimobilis</i> (1)	Keine Identifizierung (1)	
<i>M. nonliquefaciens</i> (1)	Keine Identifizierung (1)	
<i>E. coli</i> (1)	<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp. (1)	
<i>S. rubidaea</i> (1)	<i>S. marcescens</i> (1)	
<i>R. radiobacter</i> (1)	<i>C. glabrata</i> (1)	
<i>E. coli</i> (2)	<i>E. coli</i> , <i>C. glabrata</i> (2)	
<i>K. pneumoniae</i> (2)	<i>Klebsiella</i> spp., <i>S. aureus</i> (1)	
	<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. faecium</i> (1)	
<i>S. marcescens</i> (1)	<i>S. marcescens</i> , <i>C. glabrata</i> (1)	

AB = Antibiotikum/Antibiotika, NW = Nachweis
(Marschal et al., 2017)

Tabelle 10 Übersicht der Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems aus multibakteriellen Blutkulturen

Identifikationsergebnis		Korrekte Identifizierung des gram-negativen Keims	keine Antibiotika-Empfindlichkeitstestung
Kultur	Accelerate Pheno™ System		
<i>P. aeruginosa, C. krusei</i>	<i>P. aeruginosa, S. aureus</i>	X	
<i>E. coli, S. simulans, S. hominis</i>	<i>E. coli</i>	X	
<i>C. freundii, E. faecalis</i>	<i>Citrobacter</i> spp.	X	
<i>E. coli, P. vulgaris, C. freundii</i>	<i>E. coli, Proteus</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp.	X	X
<i>S. marcescens, E. faecalis</i>	<i>S. marcescens</i>	X	
<i>K. pneumoniae, E. faecalis</i>	<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. faecalis</i>	X	
<i>E. coli, K. pneumoniae, K. oxytoca, S. lutetiensis</i>	<i>E. coli, Klebsiella</i> spp.	X	X
<i>K. pneumoniae, E. faecalis</i>	<i>Klebsiella</i> spp.	X	X
<i>K. pneumoniae, E. coli, E. faecalis, E. casseliflavus</i>	<i>Klebsiella</i> spp., <i>E. coli, E. faecalis</i>	X	X
<i>E. coli, E. faecalis</i>	<i>E. coli</i>	X	

(Marschal et al., 2017)

3.2 Ergebnisse der Antibiotika Resistenztestung gramnegativer Erreger

Nach erfolgreicher Identifizierung wird im Accelerate Pheno™ System eine Antibiotikaresistenztestung durchgeführt. Voraussetzung hierfür ist eine ausreichende Menge an Bakterien in der Wachstumskontrolle. Von den 105 Proben, die in der Kultur einen gramnegativen Erreger zeigten, konnte das System bei 104 Proben ebenfalls ein gramnegatives Bakterium identifizieren. In einem Fall wurde eine *C. glabrata* anstelle von *R. radiobacter* identifiziert. Der Accelerate Pheno™ erbrachte bei 95 (91,3 %)

dieser 104 Proben Antibiotikaresistenzergebnisse. Von den insgesamt 115 Fällen konnten bei 20 Proben keine Resultate der Antibiotikaresistenztestung erbracht werden. Dabei handelte es sich bei 10 Proben um nicht identifizierte Keime, bei 2 Proben um falsch identifizierte Keime (*Tabelle 9*), bei 4 Proben um gramnegative Mischkulturen (*Tabelle 10*) und bei weiteren 4 Proben um Monokulturen (Marschal et al., 2017).

Die Resultate des Accelerate Pheno™, insgesamt 987, wurden mit den kulturbasierten Ergebnissen des VITEK 2 und den Ergebnissen der E - Teste verglichen. Für die endgültige Beurteilung blieben 976 Ergebnisse übrig, da es bei 11 Messungen selbst nach Wiederholung keine Übereinstimmung zwischen VITEK 2 und E - Testen gab. Diese wurden für die nachfolgende Beurteilung ausgeschlossen (Marschal et al., 2017). Die detaillierten Ergebnisse hierzu sind in den *Tabellen 11 und 12* dargestellt.

Insgesamt betrug die Übereinstimmung zwischen dem Accelerate Pheno™ System und den kulturbasierten Ergebnissen der Antibiotikaresistenztestung 96,4 %. Die Rate der minor errors betrug 1,4 %, die der major errors 2,3 % und die der very major errors 1,0 %. Betrachtet man die einzelnen Antibiotika, so zeigte sich bei Ertapenem die höchste Übereinstimmung (100 %), gefolgt von Meropenem (98,9 %) und Gentamicin (98,9 %), Amikacin (97,9 %), Tobramycin (97,9 %), Ceftriaxon (97,6 %), Colistin (96,6 %), Ciprofloxacin (95,7 %), Ampicillin - Sulbactam (95,5 %). Die geringste Übereinstimmung gab es bei Cefepim mit 88,9 % und Piperacillin - Tazobactam mit 92,3 %. Bei den major errors zeigten sich vor allem Diskrepanzen bei den Betalactam Antibiotika Ampicillin - Sulbactam (8,8 %) und Piperacillin - Tazobactam (8,2 %) (*Tabelle 11*) (Marschal et al., 2017).

Bei Ampicillin - Sulbactam traten die major errors in *E. coli* (n = 2) und *K. pneumoniae* (n = 1) Spezies auf, bei Piperacillin - Tazobactam in *Enterobacter* spp. (n = 3) und *P. aeruginosa* (n = 4). Weitere major errors zeigten sich bei Cefepim (3,6 %) in *E. coli* (n = 1), *P. aeruginosa* (n = 1) und *Enterobacter* spp. (n = 1), bei Colistin (3,4 %) in *E. coli* (n = 2) und *K. pneumoniae* (n = 1), bei Ceftriaxon (2,6 %) in *E. coli* (n = 1) und *S. marcescens* (n = 1), bei Gentamicin (1,2 %) in *E. coli* (n = 1) und bei Tobramycin (1,2 %) ebenfalls in *E. coli* (n = 1). Insgesamt gab es nur einen very major error (1,0 %), der bei Amikacin in *P. aeruginosa* (n = 1) auftrat. Der Anteil der minor errors verteilt sich wie folgt: Cefepim (7,8 %), Ciprofloxacin (4,3 %), Meropenem und Amikacin mit jeweils 1,1 %. Bei 7 (0,7 %) Messungen der insgesamt 976 zur

Antibiotikaresistenztestung erbrachte der Accelerate Pheno™ kein Ergebnis, obwohl die Messungen anderer Antibiotika bei diesen Stämmen erfolgreich abgeschlossen wurden (*Tabelle 12*) (Marschal et al., 2017).

Bei der Durchführung der Antibiotikaempfindlichkeitstestung ergaben sich folgende Auffälligkeiten des Accelerate Pheno™ Systems: die Messung von Ceftazidim und Aztreonam wurde nach der Studiennummer 26 abgebrochen und bei allen weiteren Messungen nicht mehr durchgeführt. Ebenso wurde die Empfindlichkeit für Imipinem, welches das System regulär bei *P. aeruginosa* und *A. baumannii* testet, nach dem vierten *P. aeruginosa* Stamm (Studiennummer 22) nicht weiter gemessen. Auch wurde bei dem einzigen identifizierten *A. baumannii* Stamm (Studiennummer 83) keine Empfindlichkeit für Minocyclin getestet, wie eigentlich im Panel angegeben.

Ein Interpretationsfehler trat nach der Studiennummer 35 auf. Ein Großteil eigentlich sensibel gemessener MHK Werte für Ceftriaxon wurde von der Software des Accelerate Pheno™ Systems als resistent angegeben.

Tabelle 11 Vergleich der Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse zwischen dem Accelerate Pheno™ System und der kulturbasierten Routinemethode

AB	Antibiotikaempfindlichkeit								
	Accelerate Pheno™ System ↔ Kulturbasiert								
	Anzahl der AB-Empfindlichkeitsergebnisse	Anzahl (%) der Übereinstimmungen					Anzahl (%) der Fehler		
S		S	R/I	R	Insgesamt	minor errors	major errors	very major errors	
SAM	66	31	34	32	32	63 (95,5)	0 (0)	3 (8,8)	0 (0)
TZP	91	78	85	6	6	84 (92,3)	0 (0)	7 (8,2)	0 (0)
FEP	90	73	83	6/1*	6/1*	80 (88,9)	7 (7,8)	3 (3,6)	0 (0)
CRO	85	75	77	8	8	83 (97,6)	0 (0)	2 (2,6)	0 (0)
ETP	85	85	85	0	0	85 (100)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
MEM	94	91	91	2	3	93 (98,9)	1 (1,1)	0 (0)	0 (0)
AMK	95	91	92	2	3	93 (97,9)	1 (1,1)	0 (0)	1 (33,3)
GEN	94	84	85	9	9	93 (98,9)	0 (0)	1 (1,2)	0 (0)
TOB	94	82	84	10	10	92 (97,9)	1 (1,1)	1 (1,2)	0 (0)
CIP	94	69	73	21	21	90 (95,7)	4 (4,3)	0 (0)	0 (0)
CST	88	85	88	0	0	85 (96,6)	0 (0)	3 (3,4)	0 (0)
Insgesamt	976	844	876	97	100	941 (96,4)	14 (1,4)	20 (2,3)	1 (1,0)

* ein Stamm zeigte bei FEP ein intermediäres Ergebnis im Accelerate Pheno™ und der kulturbasierten Methode. AB = Antibiotikum, SAM = Ampicillin-Sulbactam, TZP = Piperacillin-Tazobactam, FEP = Cefepim, CRO = Ceftriaxon, ETP = Ertapenem, MEM = Meropenem, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin, TOB = Tobramycin, CIP = Ciprofloxacin, CST = Collistin, S = sensibel, R/I = resistent/intermediär, AB = Antibiotikum/Antibiotika (Marschal et al., 2017)

Tabelle 12 Vergleich der Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems mit den kulturbasierten Methoden für 95 gramnegative Keime

Keim	Anzahl der Stämme	Anzahl der AB-Empfindlichkeits-ergebnisse	Keine Ergebnisse	Übereinstimmung	Anzahl minor errors	Anzahl major errors	Anzahl very major errors
<i>E. coli</i>	56	608	2 FEP (1) MEM (1)	594	6 FEP (3) CIP (2) AMK (1)	8 SAM (2) FEP (1) CRO (1) GEN (1) TOB (1) CST (2)	0
<i>Klebsiella</i> spp.	14	148	2 SAM (1) CIP (1)	144	2 TOB (1) CIP (1)	2 SAM (1) CST (1)	0
<i>P. aeruginosa</i>	9	72	0	65	1 SAM (1) CST (1)	5 TZP (4) FEP (1)	1 AMK (1)
<i>Enterobacter</i> spp.	6	59	0	51	4 FEP (3) CIP (1)	4 TZP (3) FEP (1)	0
<i>S. marcescens</i>	5	45	0	44	0	1 CRO (1)	0
<i>Proteus</i> spp.	2	20	0	20	0	0	0
<i>Citrobacter</i> spp.	2	20	0	19	1 FEP (1)	0	0
<i>A.baumannii</i>	1	4	3 SAM (1) TZP (1) FEP (1)	4	0	0	0
Insgesamt	95	976	7	941	14	20	1

SAM = Ampicillin-Sulbactam, TZP = Piperacillin-Tazobactam, FEP = Cefepim, CRO = Ceftriaxon, MEM = Meropenem, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin, TOB = Tobramycin, CIP = Ciprofloxacin, CST = Colistin, AB = Antibiotikum/Antibiotika

(Marschal et al., 2017)

3.3 Ergebnisse der Antibiotika Resistenztestung gramnegativer Erreger mit Resistenzen

Die Studie beinhaltete 13 Stämme, die Resistenzen bei Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon oder den Carbapenemen Ertapenem und Meropenem zeigten. Darunter befanden sich 7 ESBL - Bildner und 3 multiresistente *P. aeruginosa* Stämme. Der Accelerate PhenoTM konnte die Resistenzen gegenüber diesen Antibiotika in allen Stämmen erfolgreich nachweisen. Zwei Stämme (*M. morganii* und *H. alvei*) mit chromosomalen *AmpC* - Betalactamasen konnten nicht bestimmt werden, da sie nicht im Identifikationsspektrum des Systems enthalten sind (Marschal et al., 2017). Einen genauen Überblick der MHK Ergebnisse dieser resistenten Isolate liefern die *Tabellen 13/1* und *13/2*.

Tabelle 13/1 Überblick der MHK Ergebnisse des Accelerate Pheno™ und der E - Teste bei Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon, Ertapenem oder Meropenem resistenten Isolaten (1-7/13)

MHK (µg/ ml)	Test	Isolate (n = 13, 1-7)						
		<i>C. freundii</i> (1)	<i>E. coli</i> (2)	<i>E. coli</i> (3)	<i>E. coli</i> (4)	<i>E. coli</i> (5)	<i>E. coli</i> (6)	<i>E. coli</i> (7)
SAM	ACC	ND	4 (S)	≥64 (R)				
	E-Test		6 (S)	24 (R)	24 (R)	>256 (R)	64 (R)	>256 (R)
TZP	ACC	128 (R)	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)	128 (R)	≤4 (S)	128 (R)
	E-Test	>256 (R)	0,75 (S)	2 (S)	0,5 (S)	>256 (R)	4 (S)	64 (R)
FEP	ACC	≤1 (S)	≤1 (S)	16 (R)	2 (I)	≤1 (S)	≥32 (R)	≤1 (S)
	E-Test	1 (S)	*	*	4 (I)	0,38 (S)	12 (R)	1 (S)
CRO	ACC	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)	0,5 (S)	≥8 (R)	≤0,25 (S)
	E-Test	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	0,125 (S)	>32 (R)	0,094 (S)
ETP	ACC	0,25 (S)	0,25 (S)	≤0,125 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	≤0,125 (S)
	E-Test	0,094 (S)	0,012 (S)	0,012 (S)	0,008 (S)	0,012 (S)	0,012 (S)	0,008 (S)
MEM	ACC	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)
	E-Test	0,047 (S)	0,032 (S)	0,023 (S)	0,016 (S)	0,032 (S)	0,023 (S)	0,016 (S)
AMK	ACC	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)	≤4 (S)	16 (I)	≤4 (S)
	E-Test	1,5 (S)	2 (S)	4 (S)	2 (S)	2 (S)	8 (S)	1 (S)
GEN	ACC	≤1 (S)	≤1 (S)	16 (R)	≤1 (S)	≤1 (S)	2 (S)	16 (R)
	E-Test	0,25 (S)	0,5 (S)	24 (R)	0,75 (S)	0,5 (S)	0,5 (S)	12 (R)
TOB	ACC	≤1 (S)	≤1 (S)	16 (R)	≤1 (S)	≤1 (S)	≥32 (R)	16 (R)
	E-Test	1 (S)	0,75 (S)	24 (R)	0,75 (S)	0,75 (S)	16 (R)	16 (R)
CIP	ACC	≤0,25 (S)	≤0,25 (S)	≥8 (R)				
	E-Test	0,047 (S)	0,5 (S)	>32 (R)				
CST	ACC	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	2 (S)	≤0,5 (S)	2 (S)	≤0,5 (S)
	E-Test	1,5 (S)	1 (S)	0,75 (S)	1(S)	2 (S)	1,5 (S)	1 (S)
Kommentar		AmpC +	ESBL +	ESBL +	ESBL +	CAZ, CTX (S)	ESBL +	CAZ, CTX (S)

MHK = minimale Hemmkonzentration, ACC = Accelerate Pheno™, ND = nicht durchgeführt ,
 * = nicht übereinstimmende Ergebnisse von VITEK2 und E-Test wurden für die Auswertung ausgeschlossen, SAM = Ampicillin-Sulbactam, TZP = Piperacillin-Tazobactam, FEP = Cefepim,
 CRO = Ceftriaxon, ETP = Ertapenem, MEM = Meropenem, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin,
 TOB = Tobramycin, CIP = Ciprofloxacin, CST = Colistin, AmpC = AmpC-Betalaktamasen ,
 ESBL = Extended-Spectrum-Betalaktamasen, CAZ = Ceftazidim, CTX = Cefotaxim
 (Marschal et al., 2017)

Tabelle 13/2 Überblick der MHK Ergebnisse des Accelerate Pheno™ und der E - Teste bei Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon, Ertapenem oder Meropenem resistenten Isolaten (8-13/13)

MHK (µg/ ml)	Test	Isolate (n = 13, 8-13)					
		<i>E. coli</i> (8)	<i>E. coli</i> (9)	<i>E. coli</i> (10)	<i>P. aeruginosa</i> (11)	<i>P. aeruginosa</i> (12)	<i>P. aeruginosa</i> (13)
SAM	ACC	16 (R)	32 (R)	≥64 (R)	-	-	-
	E-Test	*	16 (R)	64 (R)	ND	ND	ND
TZP	ACC	<4 (S)	<4 (S)	≤4 (S)	128 (R)	128 (R)	128 (R)
	E-Test	0,38 (S)	0,5 (S)	0,75 (S)	>256 (R)	>256 (R)	12 (S)
FEP	ACC	<1 (S)	16 (R)	≥32 (R)	32 (R)	32 (R)	32 (R)
	E-Test	*	6 (R)	16 (R)	96 (R)	>256 (R)	24 (R)
CRO	ACC	>8 (R)	>8 (R)	≥8 (R)	-	-	-
	E-Test	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	ND	ND	ND
ETP	ACC	0,25 (S)	0,25 (S)	0,25 (S)	-	-	-
	E-Test	0,006 (S)	0,012 (S)	0,023 (S)	ND	ND	ND
MEM	ACC	<0,25 (S)	<0,25 (S)	≤0,25 (S)	≥16 (R)	4 (I)	≥16 (R)
	E-Test	0,012 (S)	0,016 (S)	0,032 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
AMK	ACC	<4 (S)	<4 (S)	≤4 (S)	≥128 (R)	≤4 (S)	≥128 (R)
	E-Test	1 (S)	0,75 (S)	1,5 (S)	24 (R)	16 (I)	24 (R)
GEN	ACC	2 (S)	<1 (S)	16 (R)	≥32 (R)	16 (R)	16 (R)
	E-Test	0,38 (S)	0,25 (S)	0,5 (S)	>256 (R)	>256 (R)	16 (R)
TOB	ACC	<1 (S)	<1 (S)	8 (R)	≥32 (R)	16 (R)	≥32 (R)
	E-Test	0,75 (S)	0,5 (S)	1 (S)	>256 (R)	>256 (R)	24 (R)
CIP	ACC	>8 (R)	<0,25 (S)	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)	≥8 (R)
	E-Test	>32 (R)	0,094 (S)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)	>32 (R)
CST	ACC	<0,5 (S)	<0,5 (S)	2 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)	≤0,5 (S)
	E-Test	0,75 (S)	1 (S)	1 (S)	2 (S)	1,5 (S)	0,75 (S)
Kommentar		ESBL +	ESBL +	ESBL +	MDR Phänotyp	MDR Phänotyp	MDR Phänotyp

MHK = minimale Hemmkonzentration, ACC = Accelerate Pheno™, ND = nicht durchgeführt,
 * = nicht übereinstimmende Ergebnisse von VITEK2 und E-Test wurden für die Auswertung ausgeschlossen, - = diese Pathogen-Antibiotikum Kombination wurde nicht vom Accelerate Pheno™ durchgeführt, SAM = Ampicillin-Sulbactam, TZP = Piperacillin-Tazobactam, FEP = Cefepim,
 CRO = Ceftriaxon, ETP = Ertapenem, MEM = Meropenem, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin,
 TOB = Tobramycin, CIP = Ciprofloxacin, CST = Colistin, ESBL = Extended-Spectrum-Betalaktamasen,
 MDR = multidrug resistant
 (Marschal et al., 2017)

3.4 Zeitenvergleich

3.4.1 Vergleich der Zeit bis zum Ergebnis zwischen dem Accelerate Pheno™ System und der kulturbasierten Diagnostik

Für die Studie standen 2 Module des Accelerate Pheno™ Systems zur Verfügung, somit konnten jeweils 2 Proben gleichzeitig bearbeitet werden. Im Mittel wurde die Testung am Accelerate Pheno™ 8,13 h (IQR = 2,63 – 13,38 h) nachdem die Blutkultur im Blutkulturinkubator positiv geworden ist und 2,23 h (IQR = 1,42 – 3,02 h) nach Beginn der Bearbeitung der positiven Blutkultur gestartet. Für alle Proben, die erst nach 8 h nach Positivmeldung der Blutkultur am Accelerate Pheno™ getestet wurden, konnte bei den Ergebnissen von Identifikation und Antibiotika Resistenztestung kein Nachteil festgestellt werden (*Tabelle 14*) (Marschal et al., 2017).

Tabelle 14 Accelerate Pheno™ System Testergebnisse für Identifikation und Antibiotikaempfindlichkeit innerhalb unterschiedlicher Zeitspannen nach Positivmeldung der Blutkultur

Zeitspanne von der Positivmeldung einer Blutkultur bis zum Start am Accelerate Pheno™ System n (%)			
0 – 8 h	8 h – 16 h	16 h – 24 h	Kommentar
57 (49,6)	42 (36,5)	16 (13,9)	
Identifikation			
49 (48,0)	38 (37,3)	15 (14,7)	Gramnegativer Keim richtig identifiziert (n=102)
5 (62,5)	2 (25,0)	1 (12,5)	Keine Identifizierung (nicht im Panel) (n=8)
2 (100,0)	0 (0)	0 (0)	Keine Identifizierung (im Panel) (n=2)
1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0)	Falsche Identifizierung (n=3)
4 (57,1)	3 (42,9)	0 (0)	Zusätzlich vom ACC identifizierter Keim, nicht kultiviert (n=7)
3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	Zusätzlicher Keim in Mischkultur vom ACC nicht identifiziert (n=8)
Antibiotikaempfindlichkeitstestung			
45 (47,4)	36 (37,9)	14 (14,7)	Durchgeführt (n=95)
2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0)	Trotz richtiger Identifizierung nicht durchgeführt (n=4)
8 (66,7)	3 (25,0)	1 (8,3)	Nicht durchgeführt, keine Identifizierung (n=12)
2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	Nicht durchgeführt, Mischkultur (n=4)
Fehler bei der Antibiotikaempfindlichkeitstestung			
FEP (n=4), TOB (n=1), CIP (n=2)	FEP (n=2), MEM (n=1), AMK (n=1), CIP (n=2)	FEP (n=1)	Minor error (n=14)
SAM (n=3), TZP (n=4), FEP (n=3), CRO (n=2), GEN (n=1), CST (n=2)	TZP (n=2), CST (n=1)	TZP (n=1), TOB (n=1)	Major error (n=20)
	AMK (n=1)		Very major error (n=1)
22 (62,9)	10 (28,6)	3 (8,6)	Fehler insgesamt (n=35)

SAM = Ampicillin-Sulbactam, TZP = Piperacillin-Tazobactam, FEP = Cefepim, CRO = Ceftriaxon, MEM = Meropenem, AMK = Amikacin, GEN = Gentamicin, TOB = Tobramycin, CIP = Ciprofloxacin, CST = Colistin, ACC = Accelerate Pheno™ System (Marschal et al., 2017)

3.4.2 Zeit bis zur Identifikation

Zum Vergleich konnten 95 Proben herangezogen werden, Mischkulturen wurden hierfür ausgeschlossen. Beurteilt wurde die Zeit vom Start der Bearbeitung einer positiven Blutkultur bis zum Ergebnis der jeweiligen Methode. Im Schnitt betrug die Zeit bis zum Ergebnis der Gramfärbung 1,53 h (IQR = 0,97 – 2,12 h), die Zeit bis zum Ergebnis des Accelerate Pheno™ 3,58 h (IQR = 2,75 – 4,38 h) und die Zeit bis zum Ergebnis der kulturbasierten Diagnostik 31,07 h (IQR = 28,82 – 46,55 h) (Abbildung 5). Die mittlere Laufzeit für die Identifikation des Accelerate Pheno™ Systems betrug 1,35 h (IQR = 1,35 – 1,35 h) (Abbildung 6). Der Accelerate Pheno™ konnte das Identifizierungsergebnis durchschnittlich 27,49 h ($P < 0,0001$) früher liefern als die kulturbasierte Methode (Abbildung 5) (Marschal et al., 2017).

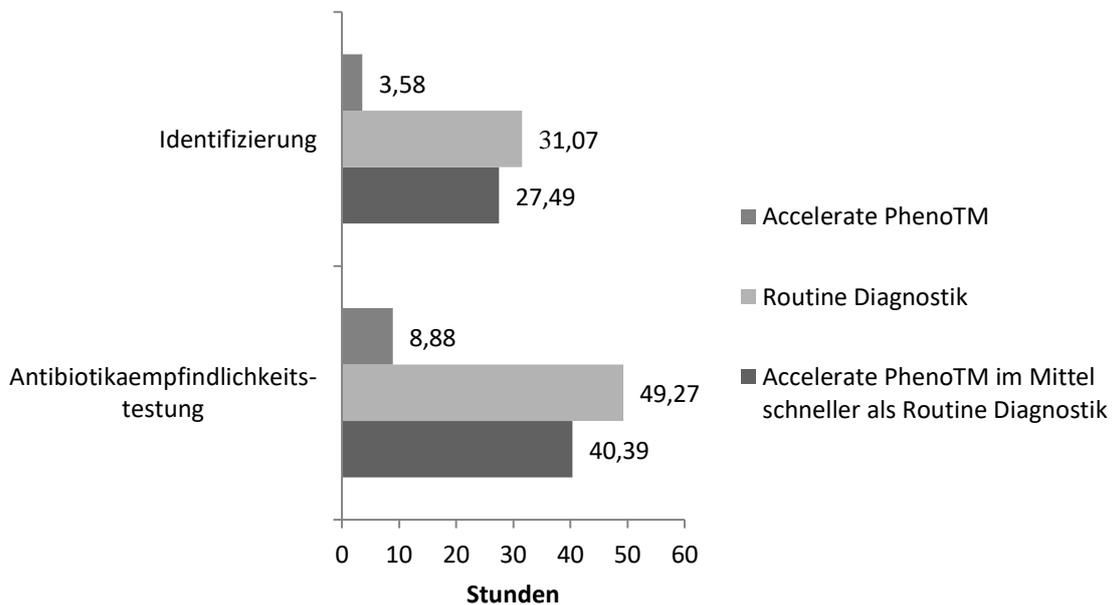


Abbildung 5 Vergleich der durchschnittlichen Zeit vom Start der Bearbeitung einer positiven Blutkultur bis zu einem Identifizierungs- und Antibiotikaempfindlichkeitsergebnis zwischen Accelerate Pheno™ System und Routine Diagnostik

Eigene Darstellung

3.4.3 Zeit bis zur Resistenztestung

Für den Zeitvergleich bis zum Erhalt der Antibiotikaresistenztestung wurden die Ergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems mit denen des in der Routinediagnostik eingesetzten VITEK 2 verglichen. Die Antibiotika Amikacin, Ertapenem und Colistin, die nicht in der VITEK 2 Karte enthalten sind und nur mittels E - Test getestet wurden, sind hier nicht berücksichtigt. Insgesamt wurden 89 Proben nach Beginn der Bearbeitung der positiv gewordenen Blutkultur beurteilt. Die mittlere Zeit bis zum Ergebnis der Antibiotikaresistenztestung des Accelerate Pheno™ betrug 8,88 h (IQR = 8,10 – 9,67 h) im Vergleich zu 49,27 h (IQR = 46,00 – 49,80 h) in der Routinediagnostik mit dem VITEK 2 (Abbildung 5). Durchschnittlich dauerte ein Lauf am Accelerate Pheno™ für Identifikation und Antibiotika Resistenztestung 6,65 h (IQR = 6,63 – 6,67 h) (Abbildung 6). Die Antibiotikaresistenztestung mit dem Accelerate Pheno™ führte im Schnitt 40,39 h ($P < 0,0001$) früher zu einem Ergebnis als die kulturbasierte Routine Methode (Abbildung 5) (Marschal et al., 2017).

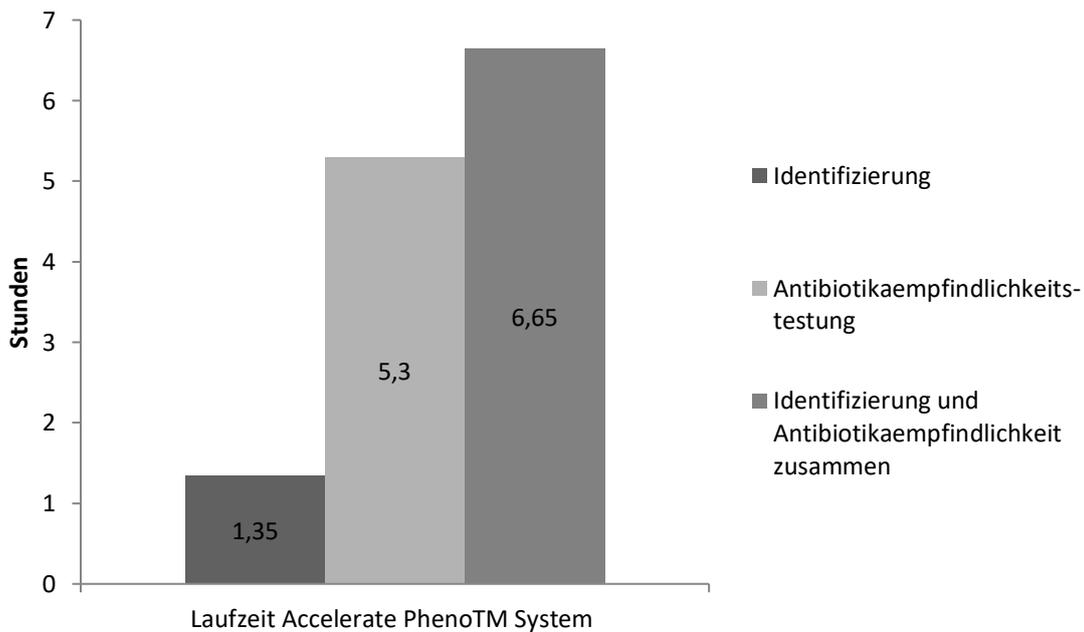


Abbildung 6 Laufzeit Accelerate Pheno™ System für Identifizierung, Antibiotikaempfindlichkeitstestung und insgesamt

Eigene Darstellung

4 Diskussion

Diese Studie stellt eine der ersten Untersuchungen des Accelerate Pheno™ Systems zur direkten Identifikation und Antibiotikaresistenztestung aus positiven Blutkulturen in der Routine Diagnostik dar. Im Folgenden werden die Ergebnisse diskutiert.

4.1 Identifikation

Insgesamt waren 115 Blutkulturen in die Studie eingeschlossen, davon waren 10 Proben Mischkulturen. Von diesen 115 Proben konnte der Accelerate Pheno™ 102 (88,7 %) richtig identifizieren. Betrachtet man nur die Proben, die Keime aus dem Erregerspektrum des Accelerate Pheno™ enthielten, waren es 102 von 105 (97,1 %). Nur einmal kam es zu einem falsch positiven Ergebnis bei einem gramnegativen Keim. In einer Monokultur mit *Escherichia coli* meldete das System zusätzlich eine *Klebsiella* spp. (Marschal et al., 2017). Die Sensitivität dieser Ergebnisse ist vergleichbar mit Veröffentlichungen zu Daten des BioFire Film Array Blood Culture Identification Panel für gramnegative und grampositive Erreger, sowie Pilze (BioFire, bioMérieux SA, USA) (Ward et al., 2015, Altun et al., 2013, Rand and Delano, 2014, Blaschke et al., 2012, Southern et al., 2015, MacVane and Nolte, 2016, Banerjee et al., 2015) und des Verigene Gram-Negative Blood Culture Test (Nanosphere, IL) (Ledeboer et al., 2015, Sullivan et al., 2014, Dodemont et al., 2014, Mancini et al., 2014, Tojo et al., 2014, Hill et al., 2014).

Aus den 10 Mischkulturen konnte das Accelerate Pheno™ System alle gramnegativen Keime richtig identifizieren. In sieben davon konnten aber kultivierte grampositive Erreger nicht gefunden werden. Bei sechs Monokulturen meldete das System zusätzlich einen oder mehrere Keime: *C. glabrata* (n = 3), *S. aureus* (n = 1), *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) (n = 1) und *Klebsiella* spp. (n = 1). Diese Ergebnisse legen weitere Studien, v.a. über die Identifikation von grampositiven Keimen und Pilzen, auch in Bezug auf die neue Software Version 1.2 mit optimiertem Identifikations - Algorithmus, nahe (Marschal et al., 2017).

4.2 Erregerspektrum

Das Accelerate Pheno™ System konnte bei 10 Proben kein Identifikationsergebnis liefern. Hierunter befanden sich 8 Spezies, die nicht im Accelerate Pheno™ Test BC Kit enthalten sind: *B. fragilis* (n = 3), *M. morgani* (n = 1), *A. radioresistens* (n = 1), *H. alvei* (n = 1), *S. paucimobilis* (n = 1) und *M. nonliquefaciens* (n = 1) (Tabelle 9). Jedoch könnten einige dieser Spezies von klinischer Relevanz sein. So werden Anaerobier in bis zu 4,1 % der Fälle als Erreger in positiven Blutkulturen isoliert und sind mit einer Mortalitätsrate von bis zu 25 % assoziiert (Ng et al., 2015, Tan et al., 2017). Die *B. fragilis* Gruppe gehört mit 45 % zu den vorherrschenden anaeroben Erregern, gefolgt von *Clostridium* spp. (12 %), *Propionibacterium* spp. (11 %) und *Fusobacterium* spp. (6 %) (Ng et al., 2015). Durch die bei anaeroben Bakterien meist längeren Inkubations- und Anzuchtzeiten im Prozess der konventionellen Diagnostik, wird die Zeit bis zum Identifikationsergebnis deutlich verlängert. Im Falle der drei *Bacteroides* Isolate betrug diese Zeit 45.13 h, im Vergleich zur mittleren Identifikationszeit von 31.07 h (IQR = 28.82 – 46.55 h) in unserer Studie.

Eine schnellere Identifikation mit anschließender Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei *Bacteroides* spp. über das Accelerate Pheno™ Systems würde vielleicht auch zu einem besseren Outcome und einer niedrigeren Mortalität der Patienten führen (Marschal et al., 2017).

Die beiden Spezies *H. alvei* und *M. morgani*, die ebenfalls nicht Teil des Accelerate Pheno™ Identifikationspanels sind, wurden jeweils in einer Blutkultur nachgewiesen, die zusammen 1,8 % der Sepsis Fälle in unserer Studie entsprachen. Sowohl *H. alvei*, als auch *M. morgani* gehören eher zu den seltenen Sepsis Erregern (Gunthard and Pennekamp, 1996, Diekema et al., 2000), waren in unserer Studie jedoch beide Träger einer chromosomalen *AmpC* - Betalaktamase (Jacoby, 2009). Man nimmt an, dass *H. alvei* und *M. morgani* intrinsisch resistent gegen Ampicillin, Amoxicillin - Clavulansäure und Ampicillin - Sulbactam sind und der Einsatz von Cefotaxim, Ceftriaxon und Ceftazidim als Monotherapie bei *M. morgani* die Gefahr birgt, unterdrückte *AmpC* - resistente Stämme zu selektieren (Leclercq et al., 2013). Zusätzlich geht man davon aus, dass *M. morgani* eine intrinsische Resistenz gegen Colistin aufweist und auch für *H. alvei* ist ein hoher Anteil von Colistin Resistenzen in Wildtyp - Isolaten beschrieben (Leclercq et al., 2013, Abbott et al., 2011), so dass der

Einschluss dieser Spezies in das Accelerate Pheno™ Identifikationspanel durchaus wünschenswert wäre (Marschal et al., 2017).

4.3 Antibiotikaempfindlichkeitstestung und multiresistente Keime

Das Accelerate Pheno™ System führte bei 95 von 104 identifizierten gramnegativen Keimen eine Antibiotikaresistenztestung durch. Bei den restlichen 9 Proben konnte das System keine Empfindlichkeitstestung durchführen. Hierbei handelte es sich um 4 Mischkulturen (3,8 %), eine fehlbestimmte Probe (1,0 %) und 4 Monokulturen (3,8 %), welche drei *E. coli* und einen *K. pneumoniae* Stamm umfassten. Alle vier Bakterienisolate aus den Monokulturen zeigten weder außergewöhnliche morphologische Merkmale, noch spezielle Resistenzmuster. Auch die Zeit vom Positivwerden der Blutkulturen, bis zum Start des Accelerate Pheno™ Systems (8,95, 7,97, 4,98 und 6,13 h) war im Vergleich zum Durchschnitt (8,13 h [IQR = 2,63 – 13,38 h]) nicht verlängert. Dieser Ausfall der Resistenztestung bleibt damit unklar und sollte bei einem möglichen zukünftigen Einsatz des Systems in der Routinediagnostik eng beobachtet werden (Marschal et al., 2017).

Insgesamt betrug die Übereinstimmung der 976 Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse 96,4 % in Bezug auf eine Rate von 1,4 % minor errors, 2,3 % major errors und 1,0 % very major errors. Für Piperacillin - Tazobactam (n = 7) wurden major errors bei *P. aeruginosa* und *Enterobacter* spp. beobachtet. In der neuen Software Version 1.2 wurde die Antibiotikaresistenztestung für Piperacillin - Tazobactam und *P. aeruginosa* bereits optimiert (Marschal et al., 2017).

Die Studie beinhaltete sieben ESBL produzierende *E. coli*, sowie 3 MDR *P. aeruginosa* Stämme. Der Accelerate Pheno™ erbrachte bei diesen Isolaten keine falsch sensiblen Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse, sondern detektierte korrekterweise Piperacillin - Tazobactam, Ceftriaxon und Carbapenem Resistenzen (Tabelle 12 und 13). Diese Tatsache zeigt deutlich das Potential des Accelerate Pheno™ Systems, MDR Phenotypen korrekt und schnell zu identifizieren. Eine korrekte und schnelle Detektion dieser multiresistenten Bakterien wiederum stellt die Voraussetzung dar, dem Patienten schnellstmöglich eine adäquate wirksame Therapie zukommen zu lassen. Die Anzahl der resistenten grampositiven Keime, wie beispielsweise MRSA und VRE, liegt in unserem Krankenhaus zurzeit unter 1 %, weshalb in die Studie nur Sepsisepisoden, die

durch gramnegative Bakterien verursacht wurden, einbezogen wurden (Marschal et al., 2017). Bei den gramnegativen Bakterien verzeichnen MDR, ESBL Bildner und Carbapenemase-bildende Stämme weltweit einen Anstieg und erschweren eine effektive antimikrobielle Therapie (Gaynes and Edwards, 2005, Peleg and Hooper, 2010). Zudem sind Bakteriämien mit gramnegativen Keimen mit einer höheren Mortalität assoziiert verglichen mit Bakteriämien, die durch grampositive Keime verursacht werden (Mayr et al., 2014). So liegt beispielsweise die Mortalitätsrate durch *P. aeruginosa* verursachte Sepsis bei 34 % bei nicht Metallo - β - Laktamase produzierenden und 61 % bei MBL - positiven *P. aeruginosa* Stämmen (Willmann et al., 2013).

Nach Abschluss dieser Studie wurde das Antibiotika Panel des Accelerate PhenoTM Test BC Kit im Zuge der neuen Software Version 1.2 um Ceftazidim und Aztreonam ergänzt. Beide Antibiotika spielen eine wichtige Rolle beim ESBL Screening und der Therapie von Infektionen mit gramnegativen Keimen (Kanj and Kanafani, 2011). Dennoch sind weitere Studien mit einem größeren Anteil an MDR und XDR Stämmen, sowie Colistin - resistenten Isolaten nötig, um das System diesbezüglich weiter austesten und beurteilen zu können (Marschal et al., 2017).

4.4 Einfluss auf Therapie

Die Verfügbarkeit einer schnellen Identifikation und Antibiotikaempfindlichkeitstestung bei Blutbahninfektionen mit gramnegativen Keimen hat einen großen Einfluss auf das Outcome des Patienten, die Länge des Krankenhausaufenthaltes, sowie die Wirksamkeit von Antibiotic Stewardship Programmen. Verschiedene Studien haben diese Aspekte untersucht, um die Behandlung und das Outcome der Patienten zu verbessern. Man fand heraus, dass bis zu 58 % der Patienten mit einer gramnegativen Blutbahninfektion unter einer empirischen Therapie inadäquat behandelt wurden (Bouza et al., 2004), was zu einer verlängerten Krankenhausliegezeit und insbesondere erhöhten Mortalität führte (Bouza et al., 2004, Kumar et al., 2006, Battle et al., 2017). Eine schnelle Identifikation und Antibiotikaresistenztestung führen folglich zu einem schnelleren Beginn einer geeigneten Therapie (Kumar et al., 2006, Sango et al., 2013) und senken die Mortalität in Verbindung mit Antibiotic Stewardship Programmen (Perez et al., 2014). Eine weitere Studie zeigte, dass die Einführung PCR - basierter Blutkulturdiagnostik zur

Erregeridentifikation in Kombination mit Antibiotic Stewardship Programmen zu einer früheren Deeskalation der antibiotischen Therapie führt, als die Antibiotic Stewardship alleine (MacVane and Nolte, 2016, Belknap et al., 2017).

Dennoch fällt ein Vergleich der Studien schwer, da die Wirkung einer schnellen Diagnostik von vielen Faktoren abhängig ist, wie individuellen Patienteneigenschaften, lokalen Therapieschemata und Laborarbeitszeiten und -bedingungen, weshalb die Effizienz der neuen Diagnostik auch unter Berücksichtigung der örtlichen Gegebenheiten überprüft werden muss (Marschal et al., 2017).

4.5 Tauglichkeit des Accelerate Pheno™ Systems in der täglichen Laborroutine Diagnostik

Unsere Studie zeigte, dass der Accelerate Pheno™ die Erregeridentifikation nach positiv werden einer Blutkultur um 27,49 h beschleunigte. Erste Ergebnisse gab es im Schnitt nach 3,58 h im Vergleich zur kulturbasierten Identifikation, die 31,07 h benötigte. Antibiotikaempfindlichkeitsergebnisse waren durchschnittlich nach 8,88 h verfügbar, 40,39 h eher als mit kulturbasierten Standardmethoden (49,27 h) (*Abb. 4*). Diese enorme Zeitersparnis in der Blutkulturdiagnostik zeigt sich besonders deutlich in unserem wissenschaftlichen Mikrobiologielabor, welches nachts eingeschränkten Betrieb hat. Die Laborarbeitszeiten sind werktags von 7.30 Uhr bis 17.30 Uhr und am Wochenende von 7.30 Uhr bis 15.00 Uhr. Die Bearbeitung der Blutkulturen erfolgte jeden Morgen ab 7.30 Uhr und während der Arbeitszeiten sobald sie positiv gemeldet wurden (Marschal et al., 2017). Auch wenn der Trend zum 24 Stunden/7 Tage die Woche Modell geht (Dauwalder and Vandenesch, 2014), ist ein eingeschränkter Nachtbetrieb in vielen mikrobiologischen Laboratorien weltweit Realität, da es häufig an Automatisierung und geschultem Personal mangelt (Dauwalder and Vandenesch, 2014, Bourbeau and Ledebour, 2013, Ledebour and Dallas, 2014). Die Durchführung des Accelerate Pheno™ ist einfach und praktikabel. Die hands - on time beträgt weniger als 2 Minuten. Ein Nachteil jedoch ist, dass das Accelerate Pheno™ System gegenwärtig nur eine Probe pro Modul bearbeiten kann. Das System kann mit vier bis acht Modulen eingerichtet werden und ist somit noch nicht in der Lage größere Probenmengen zu bearbeiten. Zudem benötigt man im Verhältnis zur geringen Probenmenge viel Fläche, um mehrere Module einzurichten. Auch die Lagerung der

Einmalkartuschen nimmt viel Platz in Anspruch. Beim Einsatz des Accelerate Pheno™ fällt eine beträchtliche Menge an Müll an. Die pro Probe eingesetzten Einmalkartuschen bestehen aus Plastik und haben eine Abmessung von 30 cm x 20 cm x 6 cm. Vergleiche zum anfallenden Müll der Routinediagnostik liegen allerdings nicht vor. Ein weiterer Nachteil des Systems sind die derzeit noch vergleichsweise hohen Kosten, die pro Probe anfallen. Allerdings muss auch hierfür eine weiterführende Kostenrechnung aufgestellt werden, sodass gegebenenfalls Liegezeit und Behandlungskosten durch eine schnellere Diagnostik positiv beeinflusst werden könnten (Marschal et al., 2017). Hierzu bedarf es aber noch weiterführender Studien, um die Hypothese zu stützen.

4.6 Vergleich mit weiteren Studien über das Accelerate Pheno™ System

Im Jahr 2018 wurden drei weitere Studien zum Accelerate Pheno™ System veröffentlicht, deren Ergebnisse im Folgenden mit unserer Studie verglichen werden.

An der Emory University School of Medicine (Atlanta, Georgia, USA) und der University of Texas Southwestern Medical Center (Dallas, Georgia, USA) wurden im Zeitraum von Januar 2016 bis einschließlich September 2016 insgesamt 298 positive Blutkulturen mit dem Accelerate Pheno™ System (Software Version 1.0) getestet. Die Proben wurden alle innerhalb von 8 Stunden nach Positivwerden untersucht. In allen positiven Blutkulturen, die Teil der Studie waren, konnte im Grampräparat ein Erreger (grampositiv, gramnegativ oder ein Pilz) nachgewiesen werden. Endgültig für die Studie ausgewertet wurden 277 Proben.

Von diesen 277 Proben konnte der Accelerate Pheno™ 173 (62,5 %) richtig identifizieren, in unserer Studie waren es 88,7 % (102/115). Ein Antibiotikaempfindlichkeitsergebnis erzielte das System in 146 Fällen (87 Fälle bei gramnegativen Erregern) mit einer Übereinstimmung zur Standardmethode von 94,1 % (93,3 % bei den gramnegativen Fällen), vergleichbar mit unserem Ergebnis von 96,4 %. Die Rate der very major und major errors betrug 7,3 % (im gramnegativen Bereich 7,4 %) und 0,5 % (bei den gramnegativen Erregern 0,4 %). Auch hier zeigen sich vergleichbare Werte mit unserer Studie: very major errors 1,0 % und major errors 2,3 % (Lutgring et al., 2018).

An der University of Chicago Medicine (Chicago, Illinois, USA) wurden von März 2016 bis Oktober 2016 von ursprünglich 296 positiven Blutkulturen, die am Accelerate Pheno™ System (Software Version 1.0) getestet wurden, 232 Proben für die endgültige Auswertung der Studie herangezogen. Alle Proben wurden innerhalb von 8 Stunden nach positiv werden mit dem Accelerate Pheno™ untersucht. Bei den getesteten Erregern handelte es sich um grampositive und gramnegative Bakterien sowie um Pilze. Für 151 Isolate erbrachte das Accelerate Pheno™ System ein Antibiotikaempfindlichkeitsergebnis. Mit der Standardmethode kam es hierbei insgesamt in 95,5 % zur Übereinstimmung, im gramnegativen Bereich in 94,2 % (96,4 % in unserer Studie). Die Rate der very major errors betrug insgesamt 0,7 %, die der major errors 0,4 % (Charnot-Katsikas et al., 2018).

In einer dritten Studie wurden an 13 verschiedenen US amerikanischen Kliniken insgesamt 2500 positive Blutkulturen am Accelerate Pheno™ System getestet. Bei den Proben handelte es sich bei der Hälfte um frische, positive Blutkulturen von Patienten und bei der anderen Hälfte um Blutkulturen, die mit Patientenblut befüllt und mit Erregern (grampositiven und gramnegativen Bakterien und Pilzen) beimpft wurden. Alle Proben wurden innerhalb von 8 Stunden nach Positivwerden am Accelerate Pheno™ analysiert. Die Ergebnisse der Antibiotikaempfindlichkeitstestung erbrachten im gramnegativen Bereich eine 95,4 % ige Übereinstimmung mit der Standardmethode (im grampositiven Bereich 97,9 %, Zahlenwerte aller Erreger insgesamt liegen nicht vor). In 0,5 % kam es zu einem very major error, in 0,9 % zu einem major error und in 4,8 % zu einem minor error. Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit den Resultaten unserer Studie (Pancholi et al., 2018).

Das Spektrum der identifizierten Erreger ist bei den drei genannten Studien vergleichbar mit unseren Zahlen (in Klammern aufgeführt). Der Nachweis von *A. baumannii* liegt zwischen 1 % und 9 % (1 %), von *Citrobacter* spp. zwischen 2 % und 13 % (2 %), von *Enterobacter* spp. zwischen 2 % und 15 % (6 %), von *E. coli* zwischen 20 % und 49 % (59 %), von *Klebsiella* spp. zwischen 17 % und 25 % (15 %), von *Proteus* spp. zwischen 4 % und 12 % (2 %), von *P. aeruginosa* zwischen 8 % und 11 % (10 %) und

von *S. marcescens* zwischen 4 % und 8 % (5 %) (Charnot-Katsikas et al., 2018, Lutgring et al., 2018, Pancholi et al., 2018).

Die Häufigkeit des Auftretens von very major errors, major errors und minor errors in Abhängigkeit von Antibiotikum und Erreger lässt sich aufgrund der geringen Fallzahlen und auch der schwierigen Vergleichbarkeit der Daten der einzelnen Studien durch sehr unterschiedliche Präsentation des Datenmaterials nicht aussagekräftig quantifizieren.

Ein eindeutiges Ergebnis zeigt sich jedoch bei der Zeitersparnis, sowohl bei der Identifizierung, als auch bei der Antibiotikaresistenzbestimmung der Erreger. Hier ergeben sich in enger Übereinstimmung Bearbeitungszeiten von 1,4 – 1,5 Stunden bei der Identifizierung (1,35 h) und 6,6 – 7,09 Stunden bei der Resistenztestung (6,65 h).

Die Beschleunigung der Erregeridentifikation und Antibiotikaresistenzbestimmung stellt einen entscheidenden Vorteil für die frühzeitige und gezielte Patientenbehandlung dar (Pancholi et al., 2018, Lutgring et al., 2018, Charnot-Katsikas et al., 2018).

Aufgrund der zwar geringen Fehlerquote und des Versagens des Systems bei der Identifikation mit mehreren Keimen sowie auch der möglichen Notwendigkeit der Testung von Antibiotika außerhalb des Panels des Accelerate PhenosTM, halten die Autoren aller Arbeiten zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine parallele Anwendung konventioneller Testmethoden weiter für sinnvoll.

5 Zusammenfassung

Sepsis stellt eine wichtige Ursache für erhöhte Morbidität und Mortalität dar und geht mit einer verlängerten Krankenhausliegezeit, sowie erhöhten Behandlungskosten einher (Angus et al., 2001, Mayr et al., 2014). Insbesondere vor dem Hintergrund der Zunahme von Infektionen mit multiresistenten Bakterien ist eine schnelle und verlässliche Diagnostik im Rahmen der Sepsisdiagnostik von großer Bedeutung. Eine zeitnahe Identifikation und Resistenztestung des Erregers ermöglichen es einerseits, eine wirksame Therapie bei resistenten Bakterien zu wählen, andererseits bietet es aber auch die Möglichkeit der Antibiotikagabe gerechten Deeskalation, die zur Einsparung von Breitbandantibiotika beitragen kann (Bauer et al., 2014, Savinelli et al., 2004, Willmann et al., 2013).

Das Accelerate PhenoTM System (Accelerate Diagnostics, USA) ist ein vollautomatisiertes Testsystem zur Erregeridentifizierung und Antibiotikaempfindlichkeitstestung häufiger gramnegativer und grampositiver Bakterien, das direkt aus positiven Blutkulturflaschen angewendet werden kann. Es ermöglicht eine Erregeridentifikation innerhalb von 1,35 Stunden und ein Antibiotogramm des Erregers innerhalb von 5,3 weiteren Stunden (Marschal et al., 2017). In unserer Studie wurden insgesamt 115 Blutkulturen eingeschlossen, bei denen die Identifizierung und das Antibiotogramm des Accelerate PhenoTM Systems mit den kultur-basierten Ergebnissen der Routinediagnostik verglichen wurden. Der Fokus wurde dabei auf Sepsisepisoden mit gramnegativen Erregern gelegt, da immer wieder Sepsis Fälle auftreten, die durch ESBL - produzierende Enterobactereaceen oder multiresistente *P. aeruginosa* Stämme verursacht werden (Gaynes and Edwards, 2005, Peleg and Hooper, 2010, Marschal et al., 2017). Die Rate von Sepsisepisoden mit grampositiven Erregern, wie MRSA und VRE ist hingegen derzeit noch sehr gering (Marschal et al., 2017).

Insgesamt wurden 88,7 % (102 von 115) aller Proben durch das Accelerate PhenoTM System richtig identifiziert. Betrachtet man nur Proben mit Erregern, die durch das Identifikationspanel des Accelerate PhenoTM Systems auch abgedeckt sind, so konnten durch das System 97,1 % (102 von 105) aller Isolate korrekt identifiziert werden. In 91,3 % (95 von 104) der Proben, in denen der Accelerate PhenoTM einen gramnegativen

Keim identifizierte, wurde ein Antibiogramm durch das System durchgeführt, wobei insgesamt 976 einzelne Antibiotikaempfindlichkeitsmessungen generiert wurden. Insgesamt betrug die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen für die Antibiotikaempfindlichkeit des Accelerate Pheno™ Systems und der kulturbasierten Methoden 96,4 %. Hierbei kam es in 1,4 % zu minor errors, in 2,3 % zu major errors und in 1,0 % zu very major errors. In Blutkulturproben mit ESBL - bildenden *E. coli* (n = 7) und MDR *P. aeruginosa* (n = 3) Stämmen konnte der Accelerate Pheno™ Ceftriaxon, Piperacillin - Tazobaktam und Carbapenem Resistenzen korrekt nachweisen. Im Vergleich mit den konventionellen Methoden in unserem Labor, konnte mit dem Accelerate Pheno™ System die Zeit bis zum Identifikationsergebnis um 27,49 h ($P < 0,00001$) und bis zum Ergebnis der Antibiotikaempfindlichkeitstestung um 40,39 h ($P < 0,00001$) reduziert werden. Zusammenfassend konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass durch den Einsatz des Accelerate Pheno™ Systems bei der Sepsis durch gramnegative Bakterien in den überwiegenden Fällen eine schnelle Identifizierung und zuverlässige Resistenztestung erstellt werden kann. Der Einsatz des Systems als Ergänzung zur kulturbasierten Diagnostik bei kritisch kranken Patienten sollte daher erwogen werden (Marschal et al., 2017).

6 Literaturverzeichnis

- ABBOTT, S. L., MOLER, S., GREEN, N., TRAN, R. K., WAINWRIGHT, K. & JANDA, J. M. 2011. Clinical and laboratory diagnostic characteristics and cytotoxic potential of *Hafnia alvei* and *Hafnia paralvei* strains. *J Clin Microbiol*, 49, 3122-6.
- ACCELERATE DIAGNOSTICS. 2017. *Accelerate Pheno™ System* [Online]. Available: <http://acceleratediagnostics.com/products/accelerate-pheno-system/> [Accessed 29.10.2017].
- ALTUN, O., ALMUHAYAWI, M., ULLBERG, M. & OZENCI, V. 2013. Clinical evaluation of the FilmArray blood culture identification panel in identification of bacteria and yeasts from positive blood culture bottles. *J Clin Microbiol*, 51, 4130-6.
- ANGUS, D. C., LINDE-ZWIRBLE, W. T., LIDICKER, J., CLERMONT, G., CARCILLO, J. & PINSKY, M. R. 2001. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 29, 1303-10.
- BALK, R. 2011. Roger C. Bone, MD and the evolving paradigms of sepsis. *Contrib Microbiol*, 17, 1-11.
- BANERJEE, R., TENG, C. B., CUNNINGHAM, S. A., IHDE, S. M., STECKELBERG, J. M., MORIARTY, J. P., SHAH, N. D., MANDREKAR, J. N. & PATEL, R. 2015. Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing. *Clin Infect Dis*, 61, 1071-80.
- BATTLE, S. E., BOOKSTAVER, P. B., JUSTO, J. A., KOHN, J., ALBRECHT, H. & AL-HASAN, M. N. 2017. Association between inappropriate empirical antimicrobial therapy and hospital length of stay in Gram-negative bloodstream infections: stratification by prognosis. *J Antimicrob Chemother*, 72, 299-304.
- BAUER, K. A., PEREZ, K. K., FORREST, G. N. & GOFF, D. A. 2014. Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs. *Clin Infect Dis*, 59 Suppl 3, S134-45.
- BELKNAP, A., GROSSER, D. S., HALE, D. A., LANG, B. J., COLLEY, P., BENAVIDES, R. & DHIMAN, N. 2017. Clinical uptake of antimicrobial stewardship recommendations following Nanosphere Verigene Blood Culture Gram-negative reporting. *Proc (Bayl Univ Med Cent)*, 30, 395-399.
- BIOFIRE. 2017. *The BioFire® FilmArray®* [Online]. Available: <https://www.biofire.com/products/filmarray/> [Accessed 15.09.2017].
- BIOMÉRIEUX. 2017. *BIOFIRE® FILMARRAY®* [Online]. Available: <http://www.biomerieux-usa.com/clinical/biofire-film-array> [Accessed 27.08.2017].
- BLASCHKE, A. J., HEYREND, C., BYINGTON, C. L., FISHER, M. A., BARKER, E., GARRONE, N. F., THATCHER, S. A., PAVIA, A. T., BARNEY, T., ALGER, G. D., DALY, J. A., RIRIE, K. M., OTA, I. & PORITZ, M. A. 2012. Rapid identification of pathogens from positive blood cultures by multiplex polymerase chain reaction using the FilmArray system. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 74, 349-55.

- BOURBEAU, P. P. & LEDEBOER, N. A. 2013. Automation in clinical microbiology. *J Clin Microbiol*, 51, 1658-65.
- BOUZA, E., SOUSA, D., MUNOZ, P., RODRIGUEZ-CREIXEMS, M., FRON, C. & LECHUZ, J. G. 2004. Bloodstream infections: a trial of the impact of different methods of reporting positive blood culture results. *Clin Infect Dis*, 39, 1161-9.
- BRUNKHORST, F. M., SEIFERT, H., KAASCH, A. & WELTE, T. 2010. Leitliniengerechte Blutkulturdiagnostik bei Sepsis und schweren Organinfektionen in der Intensivmedizin – ein unterschätztes Defizit. *DIVI*, 50-57.
- CHANTELL, C. 2015. Multiplexed Automated Digital Microscopy for Rapid Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Bacteria and Yeast Directly from Clinical Samples. *Clinical Microbiology Newsletter*, 37, 161-167.
- CHARNOT-KATSIKAS, A., TESIC, V., LOVE, N., HILL, B., BETHEL, C., BOONLAYANGOOR, S. & BEAVIS, K. G. 2018. Use of the Accelerate Pheno System for Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing of Pathogens in Positive Blood Cultures and Impact on Time to Results and Workflow. *J Clin Microbiol*, 56.
- CLERC, O., PROD'HOM, G., VOGNE, C., BIZZINI, A., CALANDRA, T. & GREUB, G. 2013. Impact of matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry on the clinical management of patients with Gram-negative bacteremia: a prospective observational study. *Clin Infect Dis*, 56, 1101-7.
- DAHOUK, S. A. A., I. B.; BARTZ, H.; BECKER, K.; BEYER, W.; BRAUN, R. W.; BREM, S.; BUGERT, J. J.; CASPARI, G.; CLARICI, A.; DEPLAZES, P.; DOERR, H. W.; DÖRRIES, K.; DROSTEN, C.; EIS-HÜBINGER, A. M.; ENDERS, G.; FINGERLE, V.; FLEISCHER, B.; FROSCH, M.; FUNKE, G.; GÄRTNER, B.; GEISS, H. K.; GERLICH, W. H.; GLÜCK, T.; GRÄSER, Y.; GRUNERT, H.-P.; GRUNOW, R.; GÜNTHER, S.; GÜRTLER, L.; HAASE, G.; HAGEDORN, H.-J.; HAMMANN, R.; HAMPRECHT, K.; HARMSSEN, D.; HECKLER, R.; HEIM, A.; HLOBIL, H.; HÖFER, U.; HÖRAUF, A.; HOF, H.; JACOBS, E.; JAHN, G.; KÄHLER, K.; KALKA-MOLL, W. M.; KAPPE, R.; KEMPF, V. A. J.; KIMMIG, P.; KIST, M.; KLENK, H.-D.; KÖNIG, B.; KÖNIG, W.; KRAMME, S.; KRÜGER, D. H.; KÜHN, J.; KUNERT, U.; LIEBERT, U. G.; LÖSCHER, T.; LÜCK, C.; MACK, D.; MAIER, M.; MAIWALD, M.; MATHIS, A.; MATTEN, J.; MAUFF, G.; MEHLHORN, H.; MEISEL, H.; MELLMANN, A.; MÜLLER, T.; MÜLLER-LANTZSCH, N.; MUTTERS, R.; NEUBAUER, H.; NEUMEISTER, B.; NÖCKLER, K.; NOTHDURFT, H.-D.; OEDING, V.; OEHME, R.; PETERS, G.; PETRY, F.; PFSTER, H.; PRAGER, R.; RABENAU, H. F.; REGNATH, T.; REINERT, R. R.; REISSBRODT, R.; REITER-OWONA, I.; RICHTER, E.; RIFELMANN, M.; RIMEK, D.; RODLOF, A. C.; ROGGENDORF, M.; ROß, R. S.; RÜCHEL, R.; RÜSCH-GERDES, S.; SALZBERGER, B.; SAUERBREI, A.; SCHALASTA, G.; SCHAUMANN, R.; SCHÖNBERG, A.; SCHOERNER, C.; SCHOTTELIUS, J.; SCHUBERT, S.; SCHULZ, S.; SCHWARZ, T. F.; SEIFERT, H.; SEITZ, H. M.; SILLER, W.; STACKEBRANDT, E.; STICH, A.; STRAUBE, E.; STRECKERT, H.-J.; SÜSS, J.; TAMMER, I.; TANNICH, E.; THIES, F.; TINTELNOT, K.; TSCHÄPE, H.; VOGEL, U.; VON EICKE, H.; VON POSER-KLEIN, C.; WAGNER-WIENING, C.; WALOCHNIK, J.; WEIG, M. S.; WENDT, C.; WIELAND, U.; WILSKE, B.; VON KÖNIG,

- WIRSING; WUTZLER, P.; YASSIN, A. F.; ZEICHHARDT, H.; ZÖLLER, L. 2009. 8.5 Blutkulturdiagnostik. In: NEUMEISTER, B., GEISS, H. K., BRAUN, R. W. & KIMMIG, P. (eds.) *Mikrobiologische Diagnostik*. 2., vollständig überarbeitete Auflage ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- DAUWALDER, O. & VANDENESCH, F. 2014. Clinical microbiology laboratory: from the Pasteur model to the 24/7 clinical chemistry concept. *Clin Microbiol Infect*, 20, O593-4.
- DEUTSCHES ÄRZTEBLATT. 24.02.2016. *Sepsis-3: Neue Definition stellt Organversagen in den Mittelpunkt* [Online]. Available: <https://www.aerzteblatt.de/nachrichten/65831/Sepsis-3-Neue-Definition-stellt-Organversagen-in-den-Mittelpunkt> [Accessed 02.01.2018].
- DIEKEMA, D. J., PFALLER, M. A., JONES, R. N., DOERN, G. V., KUGLER, K. C., BEACH, M. L. & SADER, H. S. 2000. Trends in antimicrobial susceptibility of bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infections in the USA, Canada and Latin America. SENTRY Participants Group. *Int J Antimicrob Agents*, 13, 257-71.
- DODEMONT, M., DE MENDONCA, R., NONHOFF, C., ROISIN, S. & DENIS, O. 2014. Performance of the Verigene Gram-negative blood culture assay for rapid detection of bacteria and resistance determinants. *J Clin Microbiol*, 52, 3085-7.
- EUCAST. 2016. *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016*. [Online]. Available: <http://www.eucast.org> [Accessed].
- FIORI, B., D'INZEO, T., GIAQUINTO, A., MENCHINELLI, G., LIOTTI, F. M., DE MAIO, F., DE ANGELIS, G., QUARANTA, G., NAGEL, D., TUMBARELLO, M., POSTERARO, B., SANGUINETTI, M. & SPANU, T. 2016. Optimized Use of the MALDI BioTyper System and the FilmArray BCID Panel for Direct Identification of Microbial Pathogens from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*, 54, 576-84.
- FLEISCHMANN, C., THOMAS-RUEDDEL, D. O., HARTMANN, M., HARTOG, C. S., WELTE, T., HEUBLEIN, S., DENNLER, U. & REINHART, K. 2016. Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-Patienten im Krankenhaus. *Deutsches Ärzteblatt*, 113, 159 - 166.
- GAYNES, R. & EDWARDS, J. R. 2005. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis*, 41, 848-54.
- GÜL, F., ARSLANTAS, M. K., CINEL, I. & KUMAR, A. 2017. Changing Definitions of Sepsis. *Turk J Anaesthesiol Reanim*, 45, 129-138.
- GUNTARD, H. & PENNEKAMP, A. 1996. Clinical significance of extraintestinal *Hafnia alvei* isolates from 61 patients and review of the literature. *Clin Infect Dis*, 22, 1040-5.
- HEROLD, G. (ed.) 2016. *Innere Medizin*, Köln: Gerd Herold.
- HILL, J. T., TRAN, K. D., BARTON, K. L., LABRECHE, M. J. & SHARP, S. E. 2014. Evaluation of the nanosphere Verigene BC-GN assay for direct identification of gram-negative bacilli and antibiotic resistance markers from positive blood cultures and potential impact for more-rapid antibiotic interventions. *J Clin Microbiol*, 52, 3805-7.
- JACOBY, G. A. 2009. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*, 22, 161-82, Table of Contents.

- KANJ, S. S. & KANAFANI, Z. A. 2011. Current concepts in antimicrobial therapy against resistant gram-negative organisms: extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, and multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Mayo Clin Proc*, 86, 250-9.
- KUMAR, A., ROBERTS, D., WOOD, K. E., LIGHT, B., PARRILLO, J. E., SHARMA, S., SUPPES, R., FEINSTEIN, D., ZANOTTI, S., TAIBERG, L., GURKA, D., KUMAR, A. & CHEANG, M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med*, 34, 1589-96.
- LA SCOLA, B. & RAOULT, D. 2009. Direct identification of bacteria in positive blood culture bottles by matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One*, 4, e8041.
- LECLERCQ, R., CANTON, R., BROWN, D. F., GISKE, C. G., HEISIG, P., MACGOWAN, A. P., MOUTON, J. W., NORDMANN, P., RODLOFF, A. C., ROSSOLINI, G. M., SOUSSY, C. J., STEINBAKK, M., WINSTANLEY, T. G. & KAHLMETER, G. 2013. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect*, 19, 141-60.
- LEDEBOER, N. A. & DALLAS, S. D. 2014. The automated clinical microbiology laboratory: fact or fantasy? *J Clin Microbiol*, 52, 3140-6.
- LEDEBOER, N. A., LOPANSRI, B. K., DHIMAN, N., CAVAGNOLO, R., CARROLL, K. C., GRANATO, P., THOMSON, R., JR., BUTLER-WU, S. M., BERGER, H., SAMUEL, L., PANCHOLI, P., SWYERS, L., HANSEN, G. T., TRAN, N. K., POLAGE, C. R., THOMSON, K. S., HANSON, N. D., WINEGAR, R. & BUCHAN, B. W. 2015. Identification of Gram-Negative Bacteria and Genetic Resistance Determinants from Positive Blood Culture Broths by Use of the Verigene Gram-Negative Blood Culture Multiplex Microarray-Based Molecular Assay. *J Clin Microbiol*, 53, 2460-72.
- LEVY, M. M., FINK, M. P., MARSHALL, J. C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S. M., VINCENT, J.-L., RAMSAY, G. & CONFERENCE, F. T. I. S. D. 2003. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 29, 530-538.
- LUTGRING, J. D., BITTENCOURT, C., MCELVANIA TEKIPPE, E., CAVUOTI, D., HOLLAWAY, R. & BURD, E. M. 2018. Evaluation of the Accelerate Pheno System: Results from Two Academic Medical Centers. *J Clin Microbiol*, 56.
- MACVANE, S. H. & NOLTE, F. S. 2016. Benefits of Adding a Rapid PCR-Based Blood Culture Identification Panel to an Established Antimicrobial Stewardship Program. *J Clin Microbiol*, 54, 2455-63.
- MANCINI, N., INFURNARI, L., GHIDOLI, N., VALZANO, G., CLEMENTI, N., BURIONI, R. & CLEMENTI, M. 2014. Potential impact of a microarray-based nucleic acid assay for rapid detection of Gram-negative bacteria and resistance markers in positive blood cultures. *J Clin Microbiol*, 52, 1242-5.
- MARSCHAL, M., BACHMAIER, J., AUTENRIETH, I., OBERHETTINGER, P., WILLMANN, M. & PETER, S. 2017. Evaluation of the Accelerate Pheno System for Fast Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing from Positive Blood Cultures in Bloodstream Infections Caused by Gram-Negative Pathogens. *J Clin Microbiol*, 55, 2116-2126.
- MAYR, F. B., YENDE, S. & ANGUS, D. C. 2014. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence*, 5, 4-11.

- NATIONALES REFERENZZENTRUM FÜR SURVEILLANCE VON NOSOKOMIALEN INFEKTIONEN 2017. Infektionssurveillance im Modul ITS-KISS
Referenzdaten Berechnungszeitraum: Januar 2012 bis Dezember 2016
Erstellungsdatum: 28.März 2017.
- NG, L. S., KWANG, L. L., RAO, S. & TAN, T. Y. 2015. Anaerobic bacteraemia revisited: species and susceptibilities. *Ann Acad Med Singapore*, 44, 13-8.
- PANCHOLI, P., CARROLL, K. C., BUCHAN, B. W., CHAN, R. C., DHIMAN, N., FORD, B., GRANATO, P. A., HARRINGTON, A. T., HERNANDEZ, D. R., HUMPHRIES, R. M., JINDRA, M. R., LEDEBOER, N. A., MILLER, S. A., MOCHON, A. B., MORGAN, M. A., PATEL, R., SCHRECKENBERGER, P. C., STAMPER, P. D., SIMNER, P. J., TUCCI, N. E., ZIMMERMAN, C. & WOLK, D. M. 2018. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol*, 56.
- PELEG, A. Y. & HOOPER, D. C. 2010. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. *N Engl J Med*, 362, 1804-13.
- PENCE, M. A., MCELVANIA TEKIPPE, E. & BURNHAM, C. A. 2013. Diagnostic assays for identification of microorganisms and antimicrobial resistance determinants directly from positive blood culture broth. *Clin Lab Med*, 33, 651-84.
- PEREZ, K. K., OLSEN, R. J., MUSICK, W. L., CERNOCH, P. L., DAVIS, J. R., PETERSON, L. E. & MUSSER, J. M. 2014. Integrating rapid diagnostics and antimicrobial stewardship improves outcomes in patients with antibiotic-resistant Gram-negative bacteremia. *J Infect*, 69, 216-25.
- RAND, K. H. & DELANO, J. P. 2014. Direct identification of bacteria in positive blood cultures: comparison of two rapid methods, FilmArray and mass spectrometry. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 79, 293-7.
- REINHART, K., BRUNKHORST, F. M., BONE, H.-G., BARDUTZKY, J., DEMPFLER, C.-E., MANNHEIM, FORST, H., GASTMEIER, P., GERLACH, H., GRÜNDLING, M., JOHN, S., KERN, W., KREYMAN, G., KRÜGER, W., KUJATH, P., MARGGRAF, G., MARTIN, J., MAYER, K., MEIERHELLMANN, A., OPPERT, M., PUTENSEN, C., QUINTEL, M., RAGALLER, M., ROSSAINT, R., SEIFERT, H., SPIES, C., STÜBER, F., WEILER, N., WEIMANN, A., WERDAN, K. & WELTE, T. 2010. Prävention, Diagnose, Therapie und Nachsorge der Sepsis
1. Revision der S-2k Leitlinien der Deutschen Sepsis-Gesellschaft e.V. (DSG) und der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensiv- und Notfallmedizin (DIVI).
- RHODES, A., EVANS, L. E., ALHAZZANI, W., LEVY, M. M., ANTONELLI, M., FERRER, R., KUMAR, A., SEVRANSKY, J. E., SPRUNG, C. L., NUNNALLY, M. E., ROCHWERG, B., RUBENFELD, G. D., ANGUS, D. C., ANNANE, D., BEALE, R. J., BELLINGHAN, G. J., BERNARD, G. R., CHICHE, J. D., COOPERSMITH, C., DE BACKER, D. P., FRENCH, C. J., FUJISHIMA, S., GERLACH, H., HIDALGO, J. L., HOLLENBERG, S. M., JONES, A. E., KARNAD, D. R., KLEINPELL, R. M., KOH, Y., LISBOA, T. C., MACHADO, F. R., MARINI, J. J., MARSHALL, J. C., MAZUSKI, J. E., MCINTYRE, L. A., MCLEAN, A. S., MEHTA, S., MORENO, R. P.,

- MYBURGH, J., NAVALESI, P., NISHIDA, O., OSBORN, T. M., PERNER, A., PLUNKETT, C. M., RANIERI, M., SCHORR, C. A., SECKEL, M. A., SEYMOUR, C. W., SHIEH, L., SHUKRI, K. A., SIMPSON, S. Q., SINGER, M., THOMPSON, B. T., TOWNSEND, S. R., VAN DER POLL, T., VINCENT, J. L., WIERSINGA, W. J., ZIMMERMAN, J. L. & DELLINGER, R. P. 2017. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med*, 43, 304-377.
- ROBERT KOCH INSTITUT 2017a. Prävention von Infektionen, die von Gefäßkathetern ausgehen Hinweise zur Blutkulturdiagnostik. Informativer Anhang 1 zur Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut. *Bundesgesundheitsblatt*, 216-230.
- ROBERT KOCH INSTITUT 2017b. Sepsis – neue Definition, neue Kontroversen. *Epidemiologisches Bulletin RKI*, 415-419.
- SALIMNIA, H., FAIRFAX, M. R., LEPHART, P. R., SCHRECKENBERGER, P., DESJARLAIS, S. M., JOHNSON, J. K., ROBINSON, G., CARROLL, K. C., GREER, A., MORGAN, M., CHAN, R., LOEFFELHOLZ, M., VALENCIA-SHELTON, F., JENKINS, S., SCHUETZ, A. N., DALY, J. A., BARNEY, T., HEMMERT, A. & KANACK, K. J. 2016. Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial. *J Clin Microbiol*, 54, 687-98.
- SANGO, A., MCCARTER, Y. S., JOHNSON, D., FERREIRA, J., GUZMAN, N. & JANKOWSKI, C. A. 2013. Stewardship approach for optimizing antimicrobial therapy through use of a rapid microarray assay on blood cultures positive for Enterococcus species. *J Clin Microbiol*, 51, 4008-11.
- SAVINELLI, T., PARENTEAU, S. & MERMEL, L. A. 2004. What happens when automated blood culture instrument detect growth but there are no technologists in the microbiology laboratory? *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48, 173-4.
- SEIFERT, H. A.-H., M.; FÄTKENHEUSER, G.; GLÜCK, T.; JANSEN, B.; KERN, W. V.; MACK, D.; PLUM, G.; REINERT, R.R.; ROOS, R.; SALZBERGER, B.; SHAH, P. M.; ULLMANN, U.; WEIß, M.; WELTE, T.; WISPLINGHOFF, H. (ed.) 2007. *MiQ 3a* München, Jena: Urban & Fischer.
- SEPNET CRITICAL CARE TRIALS GROUP 2016. Incidence of severe sepsis and septic shock in German intensive care units: the prospective, multicentre INSEP study. *Intensive Care Med*, 42, 1980-1989.
- SEPSIS STIFTUNG. 23.11.2016. *Sepsis Forschung: SepNet Studiengruppe erhält diesjährigen Roger-Bone-Preis der Deutschen Sepsis Gesellschaft* [Online]. Available: <https://www.sepsis-stiftung.eu/blog/sepnet-erhaelt-roger-bone-preis/> [Accessed 20.12.2016].
- SIMON, M. 2012. Blutkulturdiagnostik – Standards und aktuelle Entwicklungen/Blood culture diagnostics: standards and recent developments. *LaboratoriumsMedizin*.
- SOUTHERN, T. R., VANSCHOONEVELD, T. C., BANNISTER, D. L., BROWN, T. L., CRISMON, A. S., BUSS, S. N., IWEN, P. C. & FEY, P. D. 2015. Implementation and performance of the BioFire FilmArray(R) Blood Culture Identification panel with antimicrobial treatment recommendations for bloodstream infections at a midwestern academic tertiary hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 81, 96-101.

- SULLIVAN, K. V., DEBURGER, B., ROUNDTREE, S. S., VENTROLA, C. A., BLECKER-SHELLY, D. L. & MORTENSEN, J. E. 2014. Pediatric multicenter evaluation of the Verigene gram-negative blood culture test for rapid detection of inpatient bacteremia involving gram-negative organisms, extended-spectrum beta-lactamases, and carbapenemases. *J Clin Microbiol*, 52, 2416-21.
- TAN, T. Y., NG, L. S., KWANG, L. L., RAO, S. & ENG, L. C. 2017. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteremia in an acute care hospital. *Anaerobe*, 43, 69-74.
- TOJO, M., FUJITA, T., AINODA, Y., NAGAMATSU, M., HAYAKAWA, K., MEZAKI, K., SAKURAI, A., MASUI, Y., YAZAKI, H., TAKAHASHI, H., MIYOSHI-AKIYAMA, T., TOTSUKA, K., KIRIKAE, T. & OHMAGARI, N. 2014. Evaluation of an automated rapid diagnostic assay for detection of Gram-negative bacteria and their drug-resistance genes in positive blood cultures. *PLoS One*, 9, e94064.
- VLEK, A. L., BONTEN, M. J. & BOEL, C. H. 2012. Direct matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry improves appropriateness of antibiotic treatment of bacteremia. *PLoS One*, 7, e32589.
- WALKER, T., DUMADAG, S., LEE, C. J., LEE, S. H., BENDER, J. M., CUPO ABBOTT, J. & SHE, R. C. 2016. Clinical Impact of Laboratory Implementation of Verigene BC-GN Microarray-Based Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria in Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*, 54, 1789-96.
- WARD, C., STOCKER, K., BEGUM, J., WADE, P., EBRAHIMSA, U. & GOLDENBERG, S. D. 2015. Performance evaluation of the Verigene(R) (Nanosphere) and FilmArray(R) (BioFire(R)) molecular assays for identification of causative organisms in bacterial bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34, 487-96.
- WILLMANN, M., KUEBART, I., MARSCHAL, M., SCHROPPEL, K., VOGEL, W., FLESCHE, I., MARKERT, U., AUTENRIETH, I. B., HOLZL, F. & PETER, S. 2013. Effect of metallo-beta-lactamase production and multidrug resistance on clinical outcomes in patients with *Pseudomonas aeruginosa* bloodstream infection: a retrospective cohort study. *BMC Infect Dis*, 13, 515.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch die Oberärzte PD Dr. med. Silke Peter und Dr. med. Matthias Marschal.

PD Dr. med. Silke Peter hat die Arbeit betreut und das Manuskript korrigiert.

.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Judith Füllemann und Fiona Berger, von mir, mit Unterstützung durch Nadine Hoffmann und Leonhard Schüle bei der Ablesung der Ergebnisse mittels 4 - Augen - Prinzip, durchgeführt und von Dr. med. Matthias Marschal supervidiert. Alle Ergebnisse aus dem Accelerate Pheno™ System, der Routine Diagnostik und den zusätzlich durchgeführten Identifikationen und Resistenztestungen wurden von mir in einer Datentabelle zusammengeführt. Die Zusammenstellung und Auswertung der Daten erfolgte durch mich und PD Dr. med. Silke Peter.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Prof. Dr. med. MSc. Matthias Willmann und PD Dr. med. Silke Peter.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch PD Dr. med. Silke Peter verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Regensburg, den

Johanna Bachmaier

8 Anhang

Tabelle 15 Übersicht der Identifikationsergebnisse des Accelerate Pheno™ Systems und des MALDI - TOFs

Studien- nummer	Zeit vom Positiv- werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
	0 - 8 h						
79	00:08		1			/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
11	00:08				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
33	00:17		1			/	<i>Bacteroides fragilis</i>
81	00:24				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
63	00:24				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
66	00:34				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
34	00:36		1			/	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
69	00:38				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
117	00:45				1	<i>Escherichia coli</i> , Coagulase-negative <i>Staphylococcus</i> spp. unbestimmt	<i>Escherichia coli</i>
95	00:54				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
47	00:55				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
52	00:56				1	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
111	00:56		1			/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
100	00:57				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
8	00:57				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
92	01:02				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
74	01:03				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Anhang

Studien- nummer	Zeit vom Positiv- werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
10	01:08				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
36	01:09				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> spp.ozaenae
5	01:09			1	1	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Candida glabrata</i>	<i>Serratia marcescens</i>
109	01:22		1			/	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
91	01:26			1	1	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
83	01:27				1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i> complex
90	01:35	1		1		<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
62	01:42				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
22	01:44				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
55	01:52				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
73	02:01				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
61	02:04				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
9	02:05				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
26	02:38				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
44	02:39				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
45	02:44				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
82	03:13				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
67	03:24				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
3	03:29		1			<i>Staphylococcus lugdunensis</i> unbestimmt	<i>Bacteroides fragilis</i>
120	03:34				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
29	04:08				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
76	04:51				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
13	04:58				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

Anhang

Studien-nummer	Zeit vom Positiv-werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
57	04:59				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
89	04:59		1			/	<i>Bacteroides fragilis</i>
75	05:00	1		1	1	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter freundii</i>
48	05:05				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
14	05:41				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
86	05:43		1		1	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
93	05:54				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
59	05:59				1	<i>Proteus</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>
84	06:04				1	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
12	06:15				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
23	06:17			1	1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida glabrata</i>	<i>Escherichia coli</i>
35	07:06				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
19	07:09				1	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex
110	07:13				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
103	07:46				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
64	07:47				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
113	07:50				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
					49		
57						keine ID	nicht im Panel
							im Panel falsche ID

Anhang

Studien-nummer	Zeit vom Positiv-werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
							33 79 34 111 109 3 89
	8 h - 16 h						
30	08:02				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
106	08:08				1	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex
107	08:26				1	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
40	08:42				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus simulans</i> , <i>Staphylococcus hominis</i>
115	08:47			1	1	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Citrobacter freundii</i>
15	08:57				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
28	08:57				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
18	10:05				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
54	10:25	1				<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia rubidaea</i>
43	10:29				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
97	11:19				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
101	12:13				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
49	09:36				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
7	10:01				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
88	10:03		1			/	<i>Hafnia alvei</i>

Anhang

Studien-nummer	Zeit vom Positiv-werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
80	10:28				1	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex
27	10:29				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
94	10:35	1	1	1	1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i>
37	10:44				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
51	11:06				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
58	11:17				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
72	11:21				1	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex
50	11:33			1	1	<i>Escherichia coli</i> , <i>Candida glabrata</i>	<i>Escherichia coli</i>
2	11:39				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
31	11:55				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
21	12:12				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Candida krusei</i>
70	12:33				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
41	13:01				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
114	13:19				1	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>
116	13:23				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
46	13:44				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
65	13:48				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
102	13:51				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
60	14:01				1	<i>Proteus</i> spp.	<i>Proteus mirabilis</i>
118	14:01	1				<i>Candida glabrata</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>
4	14:04				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Anhang

Studien-nummer	Zeit vom Positiv-werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
42	14:30		1			/	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
24	14:32			1	1	<i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt, <i>Enterococcus faecalis</i> unbestimmt	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
71	15:09				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
6	15:24				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
56	15:46				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
112	15:47				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>
					38		
42							
16 h - 24 h							
68	16:02				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
20	16:14				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
25	16:18				1	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
53	16:49				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
16	17:20		1			/	<i>Morganella morganii</i>
96	17:36				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
119	17:41				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
32	17:55				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
99	17:57				1	<i>Enterobacter</i> spp.	Enterobacter cloacae Komplex
98	18:07				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
85	18:47				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
17	21:06				1	<i>Enterobacter</i> spp.	Enterobacter cloacae Komplex

Anhang

Studien- nummer	Zeit vom Positiv- werden BK bis Start ACC	falsche ID	keine ID	zusätzliche ID	ID Auswertung	Identifikation	
						Accelerate Pheno™	MALDI-TOF
39	21:24				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
38	16:26				1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
87	18:54			1	1	<i>Escherichia coli, Klebsiella spp.</i>	<i>Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxytoca, Streptococcus lutetiensis</i>
108	19:26				1	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
16					15		

BK = Blutkultur, ACC = Accelerate Pheno™ System, ID = Identifikation

Anhang

Tabelle 16 Übersicht der Laufzeit des Accelerate Pheno™ Systems, der Zeit vom Positivwerden der Blutkultur bis zur Bearbeitung am Accelerate Pheno™ und fehlerhafter Identifikationsergebnisse

Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 0-8 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 8-16 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 16-24 h	Kommentar	
84	06:37	0	06:04	106	06:40	0	08:08		06:40	0	16:02	
11	06:39:16	0	00:08	107	06:38	0	08:26		06:36	0	16:14	
81	06:39	0	00:24	40	06:38	0	08:42		06:39	0	16:18	
63	06:40	0	00:24	115	06:39	0	08:47		06:39	0	16:49	
66	06:38	0	00:34	28	06:43	0	08:57		06:48	0	17:36	
69	06:38	0	00:38	18	06:39	0	10:05		06:39	0	17:41	
117	06:39	0	00:45	54	06:38	0	10:25		06:38	0	17:55	
95	06:41	0	00:54	43	06:39	0	10:29		06:40	0	17:57	
47	06:38	0	00:55	97	06:45	0	11:19		06:40	0	18:07	
52	06:38	0	00:56	101	06:51	0	12:13		06:40	0	18:47	
100	06:38	0	00:57	49	06:37	0	09:36		06:39:11	0	21:06	
8	06:40:08	0	00:57	7	06:44:58	0	10:01		06:38	0	21:24	
74	06:38	0	01:03	80	06:38	0	10:28		06:40	0	16:26	
10	06:39:45	0	01:08	27	06:38	0	10:29		06:39	0	19:26	
36	06:39	0	01:09	37	06:43	0	10:44		01:22:38	1	17:20	keine ID (nicht im Panel)
5	06:38:49	0	01:09	51	06:38	0	11:06		01:20	1	18:54	Mischkultur
91	06:39	0	01:26	58	06:36	0	11:17					
83	06:29	0	01:27	72	06:47	0	11:21					
62	06:38	0	01:42	50	06:38	0	11:33					
22	06:38	0	01:44	2	06:38:54	0	11:39					
55	06:37	0	01:52	31	06:38	0	11:55					
73	06:38	0	02:01	21	06:34:00	0	12:12					
61	06:43	0	02:04	70	06:38	0	12:33					

Anhang

Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 0-8 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 8-16 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 16-24 h	Kommentar
9	06:39:15	0	02:05	41	06:38	0	13:01				
26	06:39	0	02:38	114	06:47	0	13:19				
44	06:38	0	02:39	116	06:38	0	13:23	68			
45	06:39	0	02:44	46	06:38	0	13:44	20			
82	06:33	0	03:13	65	06:33	0	13:48	25			
67	06:39	0	03:24	102	06:46	0	13:51	53			
120	06:33	0	03:34	60	06:47	0	14:01	96			
29	06:39	0	04:08	4	06:46:18	0	14:04	119			
76	06:39	0	04:51	24	06:59	0	14:32	32			
13	06:41:56	0	04:58	71	06:49	0	15:09	99			
48	06:39	0	05:05	6	06:46:54	0	15:24	98			
14	06:39:48	0	05:41	56	06:38	0	15:46	85			
86	06:40	0	05:43	112	06:38	0	15:47	17			
59	06:41	0	05:59	30	06:38	1	08:02	39			Unklar
12	06:38:43	0	06:15	15	01:43	1	08:57	38			Unklar
23	06:38:50	0	06:17	88	01:20	1	10:03	108			keine ID (nicht im Panel)
35	06:39	0	07:06	94	01:20	1	10:35	16			Mischkultur
19	06:41	0	07:09	118	01:21	1	14:01	87			keine ID (nicht im Panel)
110	06:32	0	07:13	42	01:21	1	14:30				keine ID (nicht im Panel)
103	06:39	0	07:46								
64	06:40	0	07:47								
113	06:49	0	07:50								
79	01:20	1	00:08								keine ID (im Panel)

Anhang

Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 0-8 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 8-16 h	Kommentar	Studien- nummer	Laufzeit Accelerate	Zeit bis Start 16-24 h	Kommentar
33	01:20	1	00:17 keine ID (nicht im Panel)								
34	01:20	1	00:36 keine ID (nicht im Panel)								
111	01:21	1	00:56 keine ID (im Panel)								
92	06:37	1	01:02 Mischkultur								
109	01:22	1	01:22 keine ID (nicht im Panel)								
90	01:21	1	01:35 nichtkorrekte ID (im Panel)								
3	01:21	1	03:29 keine ID (nicht im Panel)								
57	06:38	1	04:59 Unklar								
89	01:21	1	04:59 keine ID (nicht im Panel)								
75	01:20	1	05:00 Mischkultur								
93	06:39	1	05:54 Unklar								
ins. 57 12				ins. 42 6				ins. 16 2			

ID = Identifikation, rosa = verkürzte Laufzeit am Accelerate Pheno™ da Fehler bei der Identifikation, lila = Kommentar zum Identifikationsfehler, ins. = insgesamt, 0 = kompletter Durchlauf am Accelerate Pheno™, 1 = kein kompletter Durchlauf am Accelerate Pheno™

Tabelle 17 Übersicht nicht durchgeführter Antibiotikaempfindlichkeitstestungen des Accelerate Pheno™ Systems

Studiennummer	Keine Antibiotikaempfindlichkeitstestung vom Accelerate Pheno™ System durchgeführt	
	Accelerate Pheno™ System	Routine Diagnostik
3	<i>Staphylococcus lugdunensis</i> unbestimmt	<i>Bacteroides fragilis</i>
15	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
16	/	<i>Morganella morganii</i>
30	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
33	/	<i>Bacteroides fragilis</i>
34	/	<i>Acinetobacter radioresistens</i>
42	/	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>
57	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
75	<i>Citrobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Citrobacter freundii</i>
79	/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
87	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Streptococcus lutetiensis</i>
88	/	<i>Hafnia alvei</i>
89	/	<i>Bacteroides fragilis</i>
90	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp.	<i>Escherichia coli</i>
92	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
93	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
94	<i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter</i> spp. unbestimmt	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterococcus casseliflavus</i>
109	/	<i>Sphingomonas paucimobilis</i>
111	/	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
118	<i>Candida glabrata</i>	<i>Rhizobium radiobacter</i>

grün = Erreger nicht identifiziert, obwohl im Accelerate Pheno™ Panel enthalten

Anhang

Tabelle 18 Übersicht der Anzahl an minor, major und very major errors des Accelerate Pheno™ bei der Antibiotikaempfindlichkeitstestung mit Angabe der Zeit vom Positivwerden der Blutkultur bis zur Bearbeitung am Accelerate Pheno™

AB	minor error		major error		very major error	
	Studien-nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start	Studien-nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start	Studien-nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start
SAM			3			
			13	04:58		
			35	07:06		
			61	02:04		
TZP			7			
			17	21:06		
			19	07:09		
			21	12:12		
			22	01:44		
			72	11:21		
			110	07:13		
			120	03:34		
FEP	7		3			
	52	00:56	19	07:09		
	72	11:21	61	02:04		
	80	10:28	120	03:34		
	99	17:57				
	9	02:05				
	13	04:58				
	73	02:01				
CRO			2			
			61	02:04		
			84	06:04		
MEM	1					
	65	13:48				
AMK	1				1	
	31	11:55			65	13:48
GEN			1			
			83	01:27		
TOB	1		1			
	86	05:43	98	18:07		
CIP	4					
	44	02:39				
	51	11:06				
	61	02:04				
	80	10:28				
CST			3			

Anhang

AB	minor error		major error		very major error	
	Studien- nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start	Studien- nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start	Studien- nummer	Zeit BK pos. bis ACC Start
			18	10:05		
			29	04:08		
			67	03:24		

AB = Antibiotikum; SAM = Ampicillin-Sulbactam; TZP = Piperacillin-Tazobactam; FEP = Cefepim; CRO = Ceftriaxon; MEM = Meropenem; AMK = Amikacin; GEN = Gentamicin; TOB = Tobramycin; CIP = Ciprofloxacin; CST = Colistin; BK = Blutkultur; ACC = Accelerate Pheno™ System; rosa = 1-8 h, flieder = 8-16 h, lila = 16-24 h