

Aus dem Department für Diagnostische Labormedizin der  
Universität Tübingen

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

**Molekulare Schnell Diagnostik von positiven Blutkulturen  
im Vergleich zur kulturbasierten Diagnostik am  
Universitätsklinikum Tübingen**

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

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

**vorgelegt von**

**Zieger, Jan**

**2022**

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professorin Dr. S. Peter

2. Berichterstatter: Professorin Dr. V. Mirakaj

Tag der Disputation: 25.05.2022

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	i
Abbildungsverzeichnis .....	ii
Tabellenverzeichnis.....	iv
1) Einleitung.....	1
1.1) Blutstrominfektionen: Begrifflichkeiten und Relevanz .....	1
1.1.1) Sepsis .....	2
1.1.2) Septischer Schock.....	3
1.1.3) Endokarditis .....	3
1.2) Ätiologie von Bakteriämien.....	4
1.2.1) Wichtige grampositive BSI-Erreger .....	6
1.2.2) Wichtige gramnegative BSI-Erreger.....	11
1.2.3) Anaerobier als BSI-Erreger .....	15
1.2.4) BSI durch Pilze .....	16
1.3) Diagnostik von Bakteriämien .....	17
1.3.1) Blutkulturen.....	17
1.3.2) Konventionelle und moderne Methoden zur Diagnostik positiver Blutkulturen.....	19
1.4) Zielsetzung dieser Arbeit.....	24
2) Material und Methoden .....	26
2.1) Studienrahmen, Probenmaterial und Laborbedingungen .....	26
2.2) Materialien .....	27
2.3) Methoden.....	30
2.3.1) Konventionelle Routinediagnostik positiver Blutkulturen am UKT .....	30
2.3.2) Molekulare Blutkulturdiagnostik .....	36
2.3.3) Definition des Goldstandards .....	43
2.3.4) Datensammlung.....	44
2.3.5) Datenanalyse.....	45
2.3.6) Retrospektive Blutkulturenstatistik .....	50
3) Ergebnisse .....	52
3.1) Quantitative Einteilung der eingeschlossen positiven Blutkulturen.....	52
3.2) Identifizierung positiver Blutkulturen .....	53
3.2.1) Identifizierung grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen.....	53
3.2.2) Identifizierung gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen .....	62
3.2.3) Identifizierung von Pilzen aus monomikrobiellen Blutkulturen .....	71
3.2.4) Identifizierung bei polymikrobiellen Blutkulturen.....	72

## Inhaltsverzeichnis

3.3) Antibiotikassuszeptibilität bei positiven Blutkulturen .....	76
3.3.1) Oxacillinresistenz bei Staphylokokken .....	76
3.3.2) Vancomycinresistenz bei Enterokokken .....	78
3.3.3) Antibiotikassuszeptibilität bei gramnegativen Bakterien.....	80
3.4) Zeitliche Aspekte der Blutkulturdiagnostik .....	88
3.4.1) Dauer der Identifizierung – Vergleich der Methoden .....	88
3.4.2) Dauer der antimikrobiellen Suszeptibilitätstestung .....	90
3.5) Statistik der Blutkulturen am UKT in den Jahren 2015 bis 2017 .....	94
3.5.1) Allgemeine Daten zur Blutkulturdiagnostik 2015 bis 2017 .....	94
3.5.2) Verteilung der grampositiven Bakterien 2015 bis 2017 .....	95
3.5.3) Verteilung der gramnegativen Bakterien 2015 bis 2017.....	97
3.5.4) Verteilung der Pilze 2015 bis 2017 .....	99
4) Diskussion .....	101
4.1) Zusammenfassende Darstellung und allgemeine Besonderheiten.....	101
4.2) Aspekte bei der Identifizierung von grampositiven Blutkulturen .....	103
4.3) Besonderheiten bei der Identifizierung von gramnegativen Blutkulturen.....	107
4.4) Potenzial der Schnelltestsysteme bei polymikrobiellen Blutkulturen .....	111
4.5) Analyse der Testung auf antimikrobielle Suszeptibilität und Resistenzgene.....	114
4.6) Beurteilung des Zeitgewinns durch molekulare Schnelldiagnostik .....	117
4.7) Repräsentativität der Studie.....	120
4.8) Zusammenfassende Bewertung und Ausblick .....	124
5) Zusammenfassung .....	128
6) Literaturverzeichnis .....	130
Anhang .....	148
Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift.....	152

## Abkürzungsverzeichnis

3-GC	Cephalosporine der 3. Generation
4-GC	Cephalosporine der 4. Generation
AST	Antimikrobielle Suszeptibilitätstestung
BCID	Blood Culture Identification
BK	Blutkultur
BSI	Blutsrominfektion
CE	Conformité Européene
CE-IVD	Conformité Européene In-Vitro-Diagnostica
CoNS	Koagulase-negative Staphylokokken
CoPS	Koagulase-positive Staphylokokken
DAMPs	Danger-associated molecular patterns
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EPIC	European Prevalence of Infection in Intensive Care
ESBL	Extended spektrum $\beta$ -laktamase
E-Test	Epsilometer test
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FDA	(U.S.) Food and Drug Administration
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FN	False negative/falsch negatives Ergebnis
FP	False positive/falsch positives Ergebnis
GAS	Gruppe A Streptokokken (nach Lancefield)
GIT	Gastrointestinaltrakt
GN	Gramnegativ
GP	Grampositiv
ID	Identifizierung
IL	Interleukin
KPC	<i>Klebsiella-pneumoniae</i> -Carbapenemase
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte Laser Desorptions Ionisation „Time Of Flight“
MHK/MIC	Minimale Hemmkonzentration/Minimal Inhibitory Concentration
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	Massenspektroskopie
MSSA	Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i>
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
(q)SOFA	(quick) Sequential Organ Failure Assessment
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT-PCR	Real-Time-PCR
RUO	Research Use Only
SOP	Standard operating procedure/Standardvorgehensweisen
TN	True negative/korrekt negatives Ergebnis
TNF	Tumornekrosefaktor
TP	True positive/korrekt positives Ergebnis
UKT	Universitätsklinikum Tübingen
Vgl.	Vergleiche
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Überblick und Gruppierung der wichtigsten grampositiven Erreger von BSI unter phylogenetischen Gesichtspunkten	.....6
Abbildung 1.2	Übersicht gängiger und moderner Methoden zur Identifizierung und Suszeptibilitätstestung von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen	.....21
Abbildung 1.3	Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs, modifiziert nach Oberhettinger et al. (2020)	.....25
Abbildung 2.1	Standardablauf der kulturbasierten Routinediagnostik von positiven Blutkulturen am UKT	.....31
Abbildung 2.2	Hierarchie der Goldstandartergebnisse	.....44
Abbildung 3.1	Einteilung und Verteilung der im Rahmen der Studie aus positiven Blutkulturen isolierten Keime	.....52
Abbildung 3.2	Grampositives Keimspektrum bei monomikrobiellen Blutkulturen im Studienrahmen	.....53
Abbildung 3.3	Quantitativer Vergleich der korrekten Identifizierungen grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch das FilmArray® und das ePlex® System	.....58
Abbildung 3.4	Fehlende oder fehlerhafte Identifizierungen grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch das FilmArray® und ePlex® System im Vergleich	.....59
Abbildung 3.5	Gramnegatives Keimspektrum bei monomikrobiellen Blutkulturen im Studienrahmen	.....62
Abbildung 3.6	Quantitativer Vergleich der korrekten Identifizierungen gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch die drei Testsysteme	.....67
Abbildung 3.7	Fehler bei der Identifizierung gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch die Testsysteme FilmArray®, ePlex® und Pheno® im Vergleich	.....69
Abbildung 3.8	Antibiotikabezogene Übereinstimmung der Resistenzkategorie bei VITEK® und Pheno®	.....85

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.9	Vergleich und Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Identifizierungsergebnissen bei ePlex®, FilmArray®, Pheno® und Routinediagnostik bei monomikrobiellen Blutkulturen	.....89
Abbildung 3.10	Vergleich und Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Suszeptibilitätsergebnissen des Pheno® und der kulturbasierten Routinediagnostik	.....91
Abbildung 3.11	Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Antibigrammen bei Staphylokokken und Enterokokken in der kulturbasierten Diagnostik	.....92
Abbildung 3.12	Durchschnittliche Gesamtheit der bearbeiteten Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017	.....94
Abbildung 3.13	Durchschnittliche Verteilung der grampositiven Isolate aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017	.....96
Abbildung 3.14	Durchschnittliche Verteilung der gramnegativen Isolate aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017	.....98
Abbildung 3.15	Durchschnittliche Verteilung der isolierten Pilze aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017	....100

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1	Eingruppierung und Eigenschaften wichtiger $\beta$ -Laktamasen	.....15
Tabelle 2.1	Spezifische kulturbasierte Tests für einzelne Bakteriengruppen und -spezies	.....32
Tabelle 2.2	Enthaltene Antibiotika und Tests auf den verwendeten VITEK® Resistenzkarten	.....34
Tabelle 2.3	Spektrum der im Accelerate PhenoTest™ BC Kit enthaltenen gramnegativen Bakterien	.....37
Tabelle 2.4	AST-Spektrum des Accelerate PhenoTest™ BC Kit für gramnegative Bakterien	.....38
Tabelle 2.5	Keimspektrum des BioFire FilmArray® BCID Panel	.....39
Tabelle 2.6	GenMark ePlex® BCID Panel Spektrum	.....41
Tabelle 2.7	Beurteilung von Diskrepanzen zwischen Accelerate Pheno® und Goldstandard bei der Resistenztestung	.....48
Tabelle 2.8	Auswertungsschema der Resistenzgene	.....49
Tabelle 3.1	Identifizierte grampositive Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch Goldstandarddiagnostik, FilmArray® und ePlex®	.....55
Tabelle 3.2	Sensitivität und Spezifität des FilmArray® und ePlex® bei der Identifizierung grampositiver, monomikrobieller Blutkulturen	.....61
Tabelle 3.3	Identifizierte gramnegative Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch kulturbasierte Diagnostik (Goldstandard), FilmArray®, ePlex® und Pheno®	.....64
Tabelle 3.4	Sensitivität und Spezifität der Testsysteme FilmArray®, ePlex® und Pheno® bei der Identifizierung gramnegativer, monomikrobieller Blutkulturen	.....70
Tabelle 3.5	Identifizierte Pilze aus monomikrobiellen Blutkulturen durch Goldstandarddiagnostik, FilmArray® und ePlex®	.....71
Tabelle 3.6	Identifizierungsergebnisse von FilmArray®, ePlex® und Pheno® bei polymikrobiellen Blutkulturen im Vergleich zur Goldstandardmethode	.....73



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.7	Oxacillinresistenz und <i>mecA</i> Ergebnisse bei Staphylokokken aus monomikrobiellen Blutkulturen	.....77
Tabelle 3.8	Oxacillinsuszeptibilität im VITEK®/E-Test bei Staphylokokken aus polymikrobiellen Blutkulturen	.....78
Tabelle 3.9	Vancomycinresistenz und <i>vanA/B</i> Status bei Enterokokken aus monomikrobiellen Blutkulturen	.....79
Tabelle 3.10	Carbapenemresistenzen und KPC-Gen-Status im FilmArray® und ePlex® System bei gramnegativen Bakterien	.....81
Tabelle 3.11	Cephalosporinsuszeptibilität und ESBL-Status im Vergleich mit dem CTX-M-Ergebnis im ePlex® bei gramnegativen Bakterien	.....82
Tabelle 3.12	Diskrepante Ergebnisse der Suszeptibilitätstestungen im VITEK® und Pheno®	.....86
Anhang-Tabelle 1	Detaillierte Gegenüberstellung von Carbapenemsuszeptibilität und KPC-Status bei der Evaluation durch FilmArray® und ePlex®	.....148
Anhang-Tabelle 2	Detaillierter Vergleich der Suszeptibilität gegenüber relevanten Cephalosporinen mit dem ESBL-Status und dem CTX-M-Ergebnis des ePlex®	.....149
Anhang-Tabelle 3	Ausführlicher Vergleich der AST-Ergebnisse von VITEK® und Pheno®	.....150
Anhang-Tabelle 4	Statistische Auswertung der identifizierten Isolate aus positiven Blutkulturen in den Jahren 2015 bis 2017 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT	.....151

## **1) Einleitung**

### **1.1) Blutstrominfektionen: Begrifflichkeiten und Relevanz**

Blutstrominfektionen (BSI) sind mit einer steigenden Inzidenz, einer sich ändernden Ätiologie und einer hohen assoziierten Mortalität ein weltweit relevantes medizinisches Problem (Bearman and Wenzel, 2005; Laupland, 2013). Sie sind definiert durch das Vorhandensein von lebensfähigen Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilze in der Blutbahn eines Patienten mit klinischen oder laborchemischen Infektionszeichen (Laupland, 2013; Viscoli, 2016). Als Eintrittspforten für sogenannte Bakteriämien kommen unter anderem offene Wunden, iatrogene Manipulationen und einliegende Fremdkörper, insbesondere jegliche Art von Verweilkatheter, in Frage. Weitere Ausgangspunkte für Bakteriämien sind häufige Infektionen wie Pneumonien, Cholangitiden und Harnwegsinfekte. Das Auftreten von Bakteriämien kann akut zu Symptomen führen, sich also als BSI manifestieren, oder aber auch nur sehr kurzzeitig vorliegen und dabei in der Regel asymptomatisch verlaufen. In solch einem Fall spricht man von einer transienten Bakteriämie.

Man unterscheidet zwischen sogenannten ambulant erworbenen Bakteriämien und nosokomial erworbenen Bakteriämien. Kriterium für die Unterscheidung ist dabei das Auftreten der Bakteriämie in Relation zu einem etwaigen vorangegangenen Kontakt des betroffenen Patienten mit medizinischen Einrichtungen (Garner et al., 1988). Als Auslöser lebensbedrohlicher Komplikationen beeinflussen BSI wesentlich die Dauer des Krankenhausaufenthaltes, die Morbidität und die Mortalität von Patienten, die entweder primär wegen einer BSI oder initial aufgrund anderer Erkrankungen behandelt werden (Bearman and Wenzel, 2005). Denn sowohl bei immunkompromittierten als auch bei immunkompetenten Personen kann eine BSI zu einer Sepsis oder in maximaler Ausprägung zu einem septischen Schock führen.

### 1.1.1) Sepsis

Das klinische Syndrom Sepsis ist definiert als lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine fehlregulierte Wirtsantwort auf eine Infektion (Shankar-Hari et al., 2016) und wird klinisch unter Zuhilfenahme des SOFA-/qSOFA-Scores evaluiert (Singer et al., 2016). Mit weltweit etwa 19 Millionen Fällen pro Jahr (Adhikari et al., 2010; Oberhettinger et al., 2020) hat die Sepsis trotz der heutzutage fortgeschrittenen Medizin eine sehr hohe Inzidenz und gilt als eine der häufigsten Todesursachen weltweit (Cawcutt and Peters, 2014). Insgesamt wird eine Mortalität von um 25 % berichtet (Fleischmann et al., 2016; Mayr et al., 2014; Rhodes et al., 2017). Eine multizentrische Studie des Deutschen Kompetenznetzwerks Sepsis (SepNet) zeigte, dass Sepsis die dritthäufigste Todesursache in Deutschland darstellt (Engel et al., 2007).

Die Pathogenese der Sepsis beruht zunächst auf einer überschießenden proinflammatorischen Reaktion des Wirtes auf das Pathogen. Dabei erkennen Faktoren und Zellen des angeborenen Immunsystems bestimmte Merkmale des Pathogens. Dies sind oft sogenannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), auf der Oberfläche des Pathogens, allerdings auch endogene Warnsignale infizierter Zellen, sogenannte DAMPs (danger-associated molecular patterns). Diese und weitere Mechanismen, welche ausführlich von van der Poll und Kollegium (van der Poll and Opal, 2008; van der Poll et al., 2017) beschrieben wurden, können zur massiven Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin 1-beta (IL-1 $\beta$ ), IL-12 und IL-18 führen (van der Poll et al., 2017). Ein daraus unter Umständen entstehendes Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Mechanismen führt im Verlauf zu den Symptomen der Sepsis. Diese sind in erster Linie Fieber, eine Erhöhung der Herzfrequenz sowie der Atemfrequenz, jedoch auch Anzeichen von Organversagen. In der überarbeiteten Definition der Sepsis von 2016 (Singer et al., 2016) wird die Organdysfunktion als maßgebliche Komponente des Krankheitsbildes hervorgehoben. Wird diese erste Phase überlebt, kommt es meist anschließend zu einer Immunsuppression des Wirts (van der Poll and Opal, 2008). Je nach Ausgangspunkt einer Sepsis werden z.B. die durch einen Harnwegsinfekt ausgelöste Urosepsis und die von einer Cholangitis ausgehende Cholangiosepsis unterschieden. Nicht selten jedoch bleibt der Fokus

unklar. Für die Diagnose Sepsis ist der Nachweis eines Infektionserregers nicht obligat, hinsichtlich der anstehenden Behandlung und der Prognose des Patienten jedoch von großer Bedeutung.

### 1.1.2) Septischer Schock

Der septische Schock stellt eine Unterform der Sepsis dar und wird in der aktuellen Definition von 2016 als Komplikation der Sepsis beschrieben, bei der Kreislauf sowie zelluläre und metabolische Prozesse derartig beeinträchtigt sind, dass die Mortalität gegenüber der Sepsis erheblich gesteigert ist (Singer et al., 2016). Die Sterblichkeitsrate kann dabei selbst auf Intensivstationen deutlich über 40 % liegen, während die Sterblichkeitsrate von hospitalisierten septischen Patienten ohne Schock mit über 10 % angegeben wird (Driessen et al., 2018). Klinisch wird von einem septischen Schock gesprochen, wenn im Rahmen einer Sepsis eine trotz eingesetzter Vasopressoren persistierende Hypotension in Kombination mit einem bei adäquater Volumentherapie vorliegenden erhöhten Serumlaktat Spiegel festgestellt werden kann (Singer et al., 2016).

### 1.1.3) Endokarditis

Die infektiöse Endokarditis ist im Vergleich zur Sepsis eine meist weniger akut verlaufende, dennoch sehr schwerwiegende Erkrankung, die in Diagnostik und Therapie einige Ähnlichkeiten zur Sepsis aufweist. Sie ist definiert als Besiedlung des Endokards durch Keime. Am häufigsten ist hierbei die Besiedlung einer oder mehrerer Herzklappen mit daraus resultierender Beeinträchtigung der Funktion und, bei prolongiertem Verlauf, Zerstörung von betroffenen Herzklappen. Interessanterweise wird eine infektiöse Endokarditis in der Regel durch eine oftmals transiente BSI verursacht. Je nach Erreger, Klappenstatus und Immunität des Patienten, kann der Verlauf akut sein und sich ähnlich wie eine Sepsis manifestieren (*Endocarditis acuta*)

oder subakut mit sehr milden Symptomen über einen längeren Zeitraum hinweg bestehen (*Endocarditis lenta*). Unbehandelt verläuft die infektiöse Endokarditis in der Regel letal (Naber et al., 2004). Die Diagnostik ist insbesondere bei der *Endocarditis lenta* oft verzögert, da die Symptome sich regelmäßig unspezifisch darstellen. Die Diagnostik beim Verdacht auf eine infektiöse Endokarditis stützt sich auf zwei Hauptkriterien (Durack et al., 1994; Li et al., 2000): Dies ist erstens der oftmals echokardiographisch erbrachte Nachweis einer endokardialen Beteiligung. Zweitens ist der Erregernachweis im Blut relevant, wenn entweder im zeitlichen Intervall wiederholt Bakteriämien durch denselben Erreger vorliegen oder der direkte Nachweis eines Endokarditis-typischen Erregers gelingt. Der Erregernachweis ist von großem Wert für die Behandlung, da nur in diesem Fall eine antibiogrammgerechte Therapie mit Einsparung potenziell toxischer und Resistenzen fördernder Substanzen erfolgen kann. Allerdings bleibt der Nachweis bei einem hohen Anteil von bis zu 30 % der Endokarditiden aus, was meist an einer bereits begonnenen antibiotischen Therapie oder schwer kultivierbaren Erregern liegt (Mancini et al., 2010; Westphal et al., 2009).

### **1.2) Ätiologie von Bakteriämien**

Viele mikrobielle Pathogene haben ein großes Potenzial, die Abwehrmechanismen des Wirtes zu umgehen und diese zu verändern, was wiederum zu einer erhöhten Virulenz führt und eine invasive Besiedlung des Wirtes begünstigt. Zudem kommen einige Mikroorganismen als natürliche Haut- und Darmflora beim Menschen massenhaft vor. Daraus ergibt sich, dass ein gewisses Spektrum an diagnostisch

nachgewiesenen, Bakteriämie-verursachenden Bakterien und Pilzen wesentlich häufiger beobachtet wird als andere. In den meisten Fällen ist bei Bakteriämien nur ein einzelner Mikroorganismus nachweisbar, die Bakteriämie also monomikrobieller Genese (Bearman and Wenzel, 2005). Es kommen allerdings auch polymikrobielle Bakteriämien mit dem Nachweis von mehr als einer Spezies vor. Lokale Einflussfaktoren auf die Häufigkeit bestimmter Erreger von Bakteriämien sind unter anderem das vorherrschende Klima, der generelle Lebensstandard und die Qualität der medizinischen Versorgung. Auch Verfügbarkeit und Nutzung bestimmter antimikrobieller Substanzen haben Einfluss auf das Erregerspektrum, ein Faktor, der nicht nur die lokalen Unterschiede im Erregerspektrum beeinflusst, sondern auch Einfluss auf den zeitlichen Wandel nimmt. Dieser wiederum unterliegt auch dem Einfluss durch die medizinische Praxis, ausführlich diskutiert von Weinstein und Kollegium (Weinstein et al., 1997) im Rahmen einer Folgestudie zu deren bereits 1983 veröffentlichten Untersuchung zum Spektrum von BSI-Erregern (Weinstein et al., 1983). Insbesondere die Ablösung von *Escherichia coli* durch *Staphylococcus aureus* als häufigster Auslöser von ambulant erworbenen Bakteriämien, der zwischen den 1970ern und 1990ern beobachtet wurde, soll auf den deutlich angestiegenen Einsatz von Verweilkathetern bei ambulanten Patienten zurückzuführen sein (Lark et al., 2001; Steinberg et al., 1996; Weinstein et al., 1997). Demnach ist das Erregerspektrum bei BSI als dynamisch, sowohl zeitlich als auch geographisch, anzusehen. Dennoch können einige Bakterien und Pilze als relevante Erreger von BSI verstanden werden. Eine Zusammenfassung von populationsbezogenen Studien in verschiedenen Regionen weltweit zeigt, dass die häufigsten Erreger von BSI sich international konstant darstellen (Laupland, 2013). Daten bezüglich der global auftretenden Erregerspektren von BSI und deren Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen werden beispielsweise in mikrobiologischen Überwachungsprogrammen, wie der SENTRY-Datenbank, erfasst. Bakterien wie *S. aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae* und *Enterococcus sp.* gehören unter anderen zu den aktuell wichtigsten BSI-Erregern. Auf sie und ihre charakteristischen Eigenschaften wird im Folgenden näher eingegangen.

1.2.1) Wichtige grampositive BSI-Erreger

Generell werden grampositive Bakterien sehr häufig als Erreger von BSI nachgewiesen. Dabei spielen vor allem Staphylokokken eine wesentliche Rolle. Sie gehören zu den häufigsten Bakterien in positiven Blutkulturen und sind insbesondere bei nosokomialen BSI prädominant (Bearman and Wenzel, 2005). Diagnostisch ist hier die Unterscheidung zwischen Koagulase-positiven Staphylokokken (CoPS) und Koagulase-negativen Staphylokokken (CoNS) von wesentlicher Bedeutung (Abbildung 1.1).

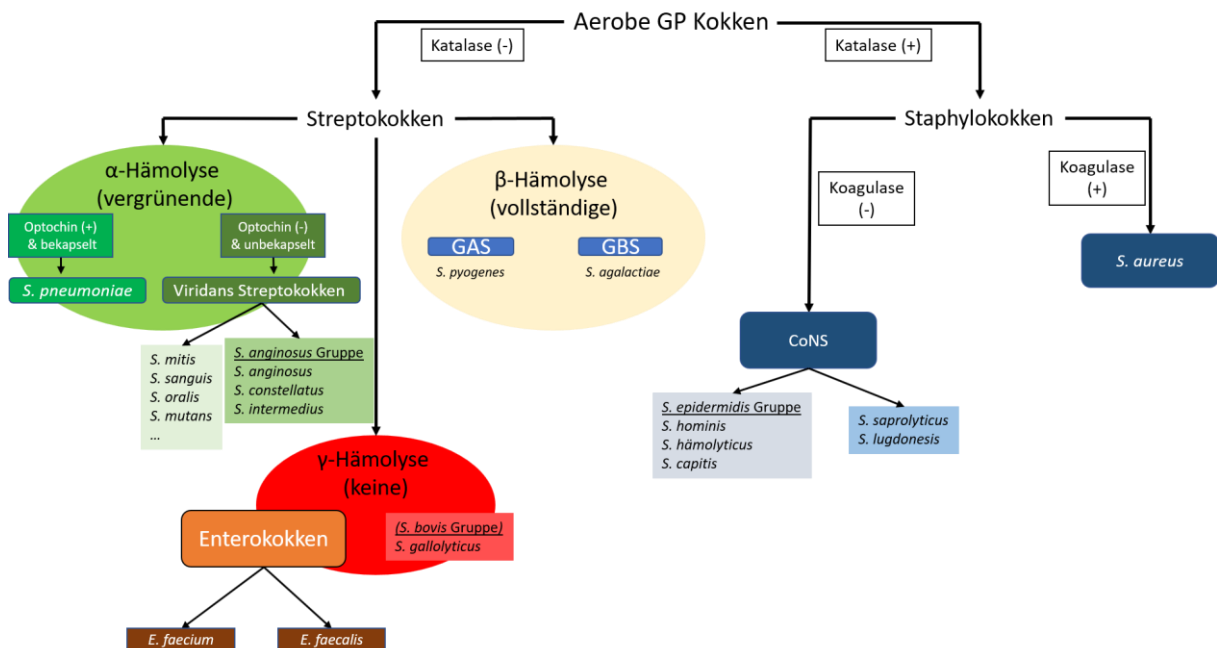


Abbildung 1.1: Überblick und Gruppierung der wichtigsten grampositiven Erreger von BSI unter phylogenetischen Gesichtspunkten. Die Unterscheidungskriterien beruhen auf biochemischen oder morphologischen Tests. Die Informationen stammen aus verschiedenen Übersichtsartikeln zu den einzelnen Gattungen (Becker et al., 2014; Dekker and Lau, 2016; Hardie and Whiley, 1997; Török and Day, 2005) und laborinternen Arbeitsanleitungen. CoNS: Koagulase-negative Staphylokokken; GP: grampositive, (+): positiv/sensitiv; (-): negativ/resistent.

### 1.2.1.1) *Staphylococcus aureus*

Stämme dieser Koagulase-positiven Spezies stellen ein obligat pathogenes Isolat aus Blutkulturen (Kreidl et al., 2019) und den insgesamt zweithäufigsten Erreger von BSI dar (Laupland, 2013; SENTRY-Datenbank Prävalenz 2013 bis 2017). Außerdem ist *S. aureus* ein wichtiger Erreger von mitunter schwer verlaufenden Endokarditiden.

Insbesondere Methicillin-resistente Stämme von *S. aureus* (MRSA) haben in den vergangenen Jahrzehnten als sogenannte Krankenhauskeime für Aufmerksamkeit gesorgt. Seit den 1990ern wurde jedoch auch das Auftreten von ambulant erworbenen MRSA-Infektionen bekannt (Appelbaum, 2007; Mediavilla et al., 2012). Sie zeigen im Gegensatz zu Methicillin-sensiblen *S. aureus* (MSSA) Stämmen eine intrinsische Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktam-Antibiotika, deren Leittestsubstanz ursprünglich Methicillin war, zwischenzeitlich jedoch durch Oxacillin und Cefoxitin ersetzt wurde (Paterson et al., 2014). Es treten allerdings häufig zusätzlich auch Resistenzen gegenüber anderen Antibiotikaklassen bei MRSA auf. Derzeit gelten das Glycopeptid Vancomycin oder das Lipopeptid Daptomycin als Erstlinienantibiotika bei MRSA-assoziierten Bakteriämien (Gould et al., 2012; Hassoun et al., 2017). Da MRSA-Infektionen in aller Regel eine erhöhte Morbidität und Mortalität aufweisen sowie auch ein spezielles Therapieregime erfordern, ist ein zeitnahe Erkennen einer solchen Infektion von großer Bedeutung. Die  $\beta$ -Laktam-Resistenz von MRSA ist in den meisten Fällen auf die Transkription des Genes *mecA* zurückzuführen, welches für ein verändertes Penicillin-Bindungsprotein kodiert. Ein *mecA* Homolog, zwischenzeitlich als *mecC* bezeichnet (Ito et al., 2012), kodiert für ein biochemisch verschiedenes Penicillinbindungsprotein, weist phänotypisch allerdings auch spezifische Resistenzmuster insbesondere gegenüber anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auf (Paterson et al., 2014).

### 1.2.1.2) Koagulase-negative Staphylokokken (CoNS)

CoNS sind überwiegend Bestandteil der menschlichen Hautflora. Häufige Vertreter sind beispielsweise *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, *Staphylococcus hämolyticus* und *Staphylococcus capitis*, die häufig als *S. epidermidis* Gruppe zusammengefasst werden (Abbildung 1.1). *Staphylococcus saprophyticus*



und *Staphylococcus lugdunensis* sind weitere CoNS, welche hinsichtlich ihrer klinischen Relevanz gesondert betrachtet werden. Zum einen können CoNS tatsächlich klinisch relevante Infektionen auslösen, andererseits können sie typischerweise als Kontaminationen während des Abnahmeprozesses der Blutkultur auftreten.

Während *S. saprophyticus* eher als Erreger von Harnwegsinfekten auftritt, ist *S. lugdunensis* bekannt als seltener Auslöser von Endokarditiden, die gegenüber anderen CoNS jedoch meist deutlich schwerere Verläufe zeigen (Becker et al., 2014). Abgesehen von *S. lugdunensis* Endokarditiden gelten CoNS im Vergleich zu *S. aureus* grundsätzlich als weniger pathogen. Dennoch sind sie im Zusammenhang mit in Patienten einliegenden Fremdmaterialien, wie Gefäßkatheter und Endoprothesen, eine wichtige Ursache für BSI. Vertreter der *S. epidermidis* Gruppe gelten als die am häufigsten für eine frühzeitige Prothesenendokarditis ursächlichen Bakterien (Becker et al., 2014). Zudem sind die Vertreter dieser Gruppe häufig bei immunkompromittierten Patienten, wie Frühgeborene und Patienten in Neutropenie, für BSI und Sepsis verantwortlich. CoNS bei hospitalisierten Patienten zeigen gegenüber vielen Antibiotika erhöhte minimale Hemmkonzentrationen (MHK) und Resistenzen. Die meisten nosokomialen Infektionen mit CoNS sind resistent gegenüber Methicillin, was oftmals mit dem Vorhandensein eines der *mec* Gene assoziiert ist (Becker et al., 2014).

Als Kontaminanten beim Abnahmeprozess der Blutkulturen sind CoNS die häufigste Gruppe, noch vor den anaeroben, Biofilm-bildenden Propionibakterien (insbesondere *Propionibacterium acnes*), Corynebakterien und einigen Streptokokken (Kirn and Weinstein, 2013). Gleichzeitig sind sie aber im Falle einer klinisch signifikanten BSI, wie sie bei 15 bis 30 % der Fälle vorliegt (Cockerill et al., 2004; Kirn and Weinstein, 2013; Kreidl et al., 2019; Mirrett et al., 2001; Uslan et al., 2007), dringend effektiv zu behandeln.

### 1.2.1.3) Streptokokken

Die Einteilung von Streptokokken erfolgt unter anderem anhand ihrer Hämolyseeigenschaften (Abbildung 1.1). Streptokokken, die eine unvollständige Hämolyse zeigen, werden als  $\alpha$ -hämolsierende oder vergrünende Streptokokken

bezeichnet und umfassen die Viridans-Gruppe sowie Pneumokokken (*S. pneumoniae*). Als  $\beta$ -hämolisierend werden Streptokokken mit vollständiger Hämolyse definiert,  $\gamma$ -hämolisierende Streptokokken hingegen zeigen keine Hämolyse. Auch beim Nachweis von Streptokokken in der BSI-Diagnostik ist die Interpretation nicht trivial. So kann der Nachweis von Streptokokken im Blut Ausdruck einer transienten Bakteriämie sein, wie sie beispielsweise nach zahnärztlichen Eingriffen vorkommen kann. Im Gegensatz dazu sind Pneumokokken im Blut von Patienten als obligate Pathogene anzusehen. Sie sind einer der wichtigsten Erreger von ambulant erworbenen BSI (Lark et al., 2001). Die Häufigkeit von BSI mit Pneumokokken unterliegt in Abhängigkeit von Durchimpfungsrate und anderen populationsbezogenen Faktoren (Laupland, 2013) lokal großen Unterschieden. Weltweit betrachtet werden Pneumokokken allerdings als einer der zehn häufigsten Erreger von BSI angesehen (Laupland 2013, SENTRY-Datenbank Prävalenz 2013 bis 2017). Hiervon abzugrenzen sind vergrünende Streptokokken der Viridans-Gruppe (Abbildung 1.1), die eine Rolle bei Bakteriämien von neutropenen Patienten spielen und zudem häufige Erreger von Endokarditiden sind (Bearman and Wenzel, 2005; Bochud et al., 1994). Wichtige Spezies, die eine Endokarditis verursachen und eine BSI bei neutropenen Patienten hervorrufen können, sind beispielsweise *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* und *Streptococcus sanguis* (Bochud et al., 1994; Nilson et al., 2016; Roberts et al., 1979). Viridans-Streptokokken der *S. anginosus* Gruppe hingegen sind häufig bei durch abdominelle Infektionen und Läsionen des Gastrointestinaltraktes (GIT) verursachten Bakteriämien beteiligt (Bert et al., 1998).

Auch  $\beta$ -hämolisierende Streptokokken gehören zu den häufigen Erregern von BSI. Dabei spielen *Streptococcus agalactiae* als Vertreter der Gruppe A Streptokokken (GAS) nach der Lancefield-Klassifikation und *Streptococcus pyogenes* als Vertreter der Gruppe B (GBS) die bedeutendsten Rollen (SENTRY-Datenbank Prävalenz 2013 bis 2017). Sie sind insbesondere im Zusammenhang mit teils schweren Sepsen bei Neugeborenen und immunkompromittierten Patienten als typische Erreger zu nennen, *S. pyogenes* löst zudem oft das Wochenbettfieber bei entbundenen Müttern aus (Sunkara et al., 2012; Sriskandan et al.; 2011). Die Häufigkeit solcher Infektionen zeigt regional große Unterschiede.

Streptokokken der *Streptococcus bovis* Gruppe, zu denen unter anderen *Streptococcus gallolyticus* und *Streptococcus infantarius* mit ihren jeweiligen

Subspezies gehören, zeigen keine oder im Falle mancher Stämme eine  $\alpha$ -Hämolyse und werden mit infektiösen Endokarditiden assoziiert (Dekker and Lau, 2016).

Generell weisen Streptokokken eine hohe Suszeptibilität gegenüber Penicillin (G) sowie gängigen Makrolidantibiotika auf. Bei einigen Gruppen und Spezies werden in letzter Zeit jedoch vermehrte Resistenzbildungen beobachtet, ein Phänomen, welches ebenfalls regional verschieden auftritt und in Nordeuropa bislang eher selten ist (Albrich et al., 2004, Gould, 2008; Sunkara et al., 2012).

### 1.2.1.4) Enterokokken

Enterokokken wurden bis in die 1980er Jahre den Streptokokken zugeordnet, bilden aber seitdem ein eigenes Genus (Schleifer and Kilpperbalz, 1984). Sie sind typische Kommensalen der menschlichen und tierischen Darmflora, kommen aber auch ubiquitär in der Umwelt vor. Von großer medizinischer Bedeutung sind die beiden Spezies *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* (Abbildung 1.1). Derzeit wird ein Wechsel beim Stellenwert von Infektionen mit den beiden Spezies beobachtet, wobei die bisher selteneren BSI mit *E. faecium* gegenüber *E. faecalis* aufholen (Orsi and Ciorba, 2013). Zwischen 2013 und 2017 wurden laut SENTRY global noch deutlich mehr BSI durch *E. faecalis* beobachtet. Während *E. faecalis* sowohl bei ambulant erworbenen als auch bei nosokomialen BSI Rang 5 der häufigsten Erreger belegt, ist *E. faecium* nur bei nosokomialer Genese unter den häufigsten zehn Erregern vertreten (Diekema et al., 2019). Die dennoch zunehmende Prävalenz von BSI durch *E. faecium* ist insbesondere besorgniserregend, da Stämme dieser Spezies zahlreiche Resistenzen aufweisen können. Während beide Enterokokken-Entitäten intrinsisch gegen Cephalosporine resistent sind, zeigen *E. faecium* Stämme deutlich häufiger auch verringerte Suszeptibilitäten gegenüber Penicillinen und Aminoglycosiden (Arias and Murray, 2012). Ein weiteres Problem stellen die steigenden Resistenzraten gegenüber Glycopeptiden dar. Als Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) werden Enterokokken bezeichnet, die gegen die Leitsubstanz Vancomycin resistent sind, sie können jedoch nicht selten auch gegen andere Antibiotika Resistenzen aufweisen und sind daher oft als multiresistente Stämme einzustufen. Auch bei den Glycopeptidresistenzen spielen *E. faecalis* gegenüber *E. faecium* eine deutlich untergeordnete Rolle. Für sie verantwortlich sind in den

allermeisten Fällen die Gencluster *vanA* und *vanB*, welche die leicht verschiedenen, meist induzierbaren Resistenzmuster vom VanA- und VanB-Typ vermitteln (Orsi and Ciorba, 2013). Obwohl durch Reserveantibiotika wie Linezolid, Tigecyclin und Daptomycin mittlerweile effektive Therapieregime gegen multiresistente VRE bereitstehen, scheinen VRE Bakteriämien gegenüber solchen durch sensible Enterokokken mit erhöhter Sterblichkeit und verlängertem, kostenintensiverem Krankenhausaufenthalt einherzugehen (Orsi and Ciorba, 2013; Prematunge et al., 2016). In einer aktuellen Erhebung von Remschmidt und Kollegium (Remschmidt et al., 2018) wird eine Zunahme der VRE-assoziierten BSI in Deutschland beschrieben.

### 1.2.2) Wichtige gramnegative BSI-Erreger

Nachdem am Ende des 20. Jahrhunderts grampositive Erreger die zuvor dominierenden gramnegativen Erreger von BSI aufgeholt hatten, erleben gramnegative seit Beginn des 21. Jahrhunderts eine Renaissance (Diekema et al., 2019; Stryjewski and Boucher, 2009; SENTRY-Datenbank). Enterobacterales stellen mit deutlich über 20 000 Isolaten gegenüber den Staphylokokken mit knapp 12 000 Isolaten in der SENTRY BSI Prävalenz 2013 bis 2017 die weltweit häufigste Ursache für BSI dar. Bei Endokarditiden sind gramnegative Bakterien nur sehr selten beteiligt. Einige der häufigsten gramnegativen Pathogene zeichnen sich durch vermehrte Antibiotikaresistenzen und sehr hohe Mortalitätsraten bei vorliegenden BSI aus. Eine zeitnahe Diagnostik und Behandlung sind daher von besonderer Bedeutung (Marschal et al., 2017). Die wichtigsten gramnegativen BSI-Erreger lassen sich in Enterobacterales und Nonfermenter einteilen.

#### 1.2.2.1) Enterobacterales

##### 1.2.2.1.1) *Escherichia coli*

*E. coli* ist ein ubiquitär im GIT von Menschen und Tieren vorkommendes gramnegatives Stäbchen. Bakteriämien gehen häufig sekundär von Infektionen des Urogenitaltraktes und Pneumonien aus. *S. aureus* und *E. coli* stellen gemeinsam die

häufigsten Erreger von BSI weltweit dar, insgesamt sind sie verantwortlich für über 40 % der BSI (Diekema et al., 2019). Laut SENTRY-Datenbank war *E. coli* das zwischen 2013 und 2017 meistnachgewiesene Pathogen bei BSI, wobei diese Spezies bei ambulant erworbenen BSI eine wichtige Rolle spielt. Betroffen sind oft ältere Patienten, bei denen häufig *E. coli* im Zusammenhang mit einer ambulant erworbenen Urosepsis nachgewiesen wird und in dieser Kombination mit einer deutlich erhöhten Mortalität vergesellschaftet ist (Bearman and Wenzel, 2005).

### 1.2.2.1.2.) Klebsiellen und weitere relevante Enterobacterales

Als weitere wichtige Vertreter der Enterobacterales sind insbesondere Klebsiellen zu nennen. Das ubiquitäre Vorkommen dieser gramnegativen Stäbchenbakterien in der Umwelt, aber auch im GIT von Menschen, erklärt möglicherweise die hohe Inzidenz von Infektionen mit Klebsiellen. *K. pneumoniae* findet sich an der dritten Stelle der SENTRY-Datenbank Prävalenz von BSI Isolaten zwischen 2013 und 2017 und gehört insbesondere auf Intensivstationen und im Zusammenhang mit einem Krankenhausaufenthalt zu den wahrscheinlichsten BSI-Erregern. Generell werden invasiven Infektionen mit *K. pneumoniae* eine hohe Mortalität zwischen 17,5 % und 23 % zugeschrieben (Maatallah et al., 2014). Weitere Klebsiellenspezies wie *Klebsiella oxytoca* und *Klebsiella aerogenes* kommen im Rahmen von BSI vor, wenn auch wesentlich seltener als *K. pneumoniae*.

Eine weitere Gattung gramnegativer Stäbchenbakterien, die den menschlichen GIT kolonisieren, ist *Enterobacter*. Phäno- und genotypisch ähnliche Spezies, wie *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii* und diverse Subspezies, werden zusammen mit *Enterobacter cloacae* selbst zum *E. cloacae* Komplex gezählt. Unter den vielen bekannten Spezies zeigen einige eine überwiegend opportunistische Pathogenität bei immunsupprimierten Patienten. Vertreter der *Enterobacter*, an vorderster Stelle ist *E. cloacae* zu nennen, sind in der Lage oftmals nosokomiale Infektionen wie BSI auszulösen (Sanders and Sanders, 1997; Stock et al., 2001) und zählen zu den schwer behandelbaren Erregern (Hilty et al., 2013). Die Spezies *E. cloacae* für sich liegt in der SENTRY Prävalenz 2013 bis 2017 auf Platz 11 der häufigsten BSI-Isolate, die Gesamtheit der Spezies und Subspezies des *E. cloacae* Komplex hingegen stehen an vierter Stelle der häufigsten BSI-Erreger.

Auch weitere Gattungen der Enterobacterales müssen für die Genese von gramnegativen BSI in Betracht gezogen werden. Zu ihnen zählen unter anderen die Gattungen *Proteus*, *Serratia* und *Citrobacter*.

### 1.2.2.1.3) Nonfermenter

Nonfermenter wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* und *Stenotrophomonas maltophilia* sind aerobe, gramnegative Stäbchenbakterien, die ebenfalls zu den wichtigen potenziellen Erregern von BSI gehören. Sie sind ubiquitär vorkommende Umweltkeime, die als Krankenhauskeime besonders auf Intensivstationen gefürchtete, schwere nosokomiale Infektionen hervorrufen. Unter ihnen hat *P. aeruginosa* die größte klinische Bedeutung: Stämme dieser Spezies stellen nach *K. pneumoniae* das dritthäufigste gramnegative Isolat bei BSI dar (Diekema et al., 2019; SENTRY-Datenbank). Infektionen finden sich in der Regel bei immungeschwächten und oftmals bei hospitalisierten Patienten. BSI mit *P. aeruginosa* sind mit einer sehr hohen Mortalität assoziiert. Studien zufolge liegt die Krankenhausmortalität bei über 20 % (Micek et al., 2005), in einigen Hochrisikopopulationen sogar bei bis zu 50 % (Johnson et al., 2009). *P. aeruginosa* und *A. baumannii* zusammen mit je zwei weiteren gramnegativen, beziehungsweise grampositiven Spezies bilden die Gruppe der sogenannten ESKAPE Pathogene (*E. faecium*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* sp.), die für die häufigsten nosokomialen Infektionen mit multiresistenten Bakterien verantwortlich ist (Rice, 2008).

### 1.2.2.2) Herausforderungen bei der Behandlung von gramnegativen BSI

Ein sehr wesentliches Problem bei BSI mit gramnegativen Bakterien sind die in letzter Zeit zunehmend auftretenden Resistenzen gegenüber wichtigen Antibiotikaklassen wie Tetracyklinen, Aminoglycosiden, Fluorquinolonen und insbesondere  $\beta$ -Laktamen. Mechanismen, die zu verringerter Suszeptibilität oder Resistenzen führen sind zum Beispiel membranäre Effluxpumpen, veränderte Porine, modifizierte Angriffspunkte und, häufig bei gramnegativen Bakterien, diverse den Wirkstoff selbst verändernde Enzyme, wie  $\beta$ -Laktamasen (Ruppe et al., 2015; Santajit and Indrawattana, 2016). Verschiedene Klassen von  $\beta$ -Laktamasen sind weit verbreitet und werden intensiv

beforscht. Es existieren viele verschiedene Enzymgruppen, die selbst wiederum eine Vielzahl von verschiedenen  $\beta$ -Laktamasen umfassen. Aufgrund der klinischen Relevanz und ihrer Wertigkeit als diagnostische Targets sind im Folgenden die  $\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkspektrum (ESBL) und die Carbapenemasen stark vereinfacht anhand wichtiger Beispiele beschrieben.

Man unterscheidet Serin- $\beta$ -Laktamasen, die im wesentlichen Resistenz gegenüber Cephalosporinen vermitteln, und Metallo- $\beta$ -Laktamasen, die zusätzlich oft auch gegen Carbapeneme aktiv sind (Übersicht Tabelle 1.1). Des Weiteren werden nach der Ambler-Klassifikation Cephalosporinasen und Oxacillinasen unterschieden (Ambler, 1980). Enzymfamilien innerhalb dieser Klassen können chromosomal, plasmidgebunden oder als Transposons vorliegen. Unter den Serin- $\beta$ -Laktamasen finden sich einfache Penicillinasen, sowie  $\beta$ -Laktamasen mit breitem Wirkspektrum (Extended spectrum  $\beta$ -lactamase = ESBL).

Die verbreitetsten ESBL Enzymfamilien sind CTX-M, SHV und TEM Enzyme, die zu den Serin- $\beta$ -Laktamasen der molekularen Klasse A nach Ambler (Ambler, 1980) gehören. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von Cephalosporinen der 3. Generation (3-GC) und teilweise auch der 4. Generation (4-GC) aus (Tabelle 1.1). Während zunächst die Enzymfamilien TEM und SHV am relevantesten waren, haben CTX-M-Enzyme seit den 1990ern insbesondere in europäischen Ländern an Bedeutung gewonnen (Livermore et al., 2007; Ruppe et al., 2015). Am häufigsten werden ESBL bei *E. coli* und *K. pneumoniae* nachgewiesen (Pitout & Laupland, 2008), die Enzyme kommen jedoch generell bei den meisten Enterobacterales und selten auch bei klinisch wichtigen Nonfermentern wie *P. aeruginosa* und *A. baumannii* vor (Al Naiemi et al., 2006; Pfeifer et al., 2010).

Als wichtigste Carbapenemasen sind sowohl unterschiedliche Klassen von Serin- $\beta$ -Laktamasen wie *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase (KPC) und einige Oxacillinasen, als auch ein großer Teil der Metallo- $\beta$ -Laktamasen bekannt. Allen gemeinsam ist die Fähigkeit zur Hydrolyse von Carbapenemen, die meist zusätzlich zur Resistenz gegenüber vielen anderen  $\beta$ -Laktam-Antibiotika auftritt. Während OXA-48-Varianten bisher exklusiv bei Enterobacterales nachgewiesen wurden (Poirel et al., 2012), sind Carbapenemasen der KPC-Enzymfamilie, sowie die wichtigen Metallo- $\beta$ -Laktamasen vom VIM-, IMP- und NDM-Typ auch bei Nonfermentern vorkommend (Pfeifer et al. 2010). Insbesondere die Metallo- $\beta$ -Laktamasen und KPC-

## Einleitung

Enzyme haben zudem ein sehr breites Spektrum zur Hydrolyse wichtiger  $\beta$ -Laktam-Antibiotika (Tabelle 1.1).

Tabelle 1.1: Eingruppierung und Eigenschaften wichtiger  $\beta$ -Laktamasen. Einteilung der Enzyme nach Art, molekularer Klasse (Ambler, 1980) und funktioneller Gruppe. Multiple Allele der entsprechenden Enzyme mit teilweise nur einzelnen Punktmutationen sind beschrieben. Die hier aufgezählten entsprechen einer NCBI-Datenbankabfrage (Stand Juni 2020) und Literaturangaben (siehe unten). \* Vereinzelt Allel-Nummern wurden nicht vergeben oder bereits zurückgezogen, diese sind aus Darstellungsgründen nicht explizit erwähnt. 3-GC: Cephalosporine der 3. Generation; 4-GC: Cephalosporine der 4. Generation. Tabelle modifiziert nach Pfeifer et al. (2010). Weitere Referenzen: Emeraud et al. (2020), Nordmann et al. (2011), Nordmann & Poirel (2019), Ruppé et al. (2015).

Art:	Klasse:	Gruppe:	Enzym:	Hydrolysespektrum:	Allele:	Vorkommen:
Serin- $\beta$ -Laktamase	A	ESBL	CTX-M	Penicilline, Cephalosporine (3-GC +/- 4-GC)	CTX-M-1 - 236 *	Enterobacterales, Nonfermenter
			TEM		TEM-3 - 242 *	
			SHV		SHV-2 - 10, 12 - 228 *	
	D	Carbapenemasen	KPC	Aminopenicilline, Ureidopenicilline, Monobactam, Carbapeneme	KPC-1 - 57 *	Enterobacterales
OXA-48-Varianten			Penicilline, Carbapeneme (insbesondere Imipenem)	OXA-48, -162, -163, -181, -204, -232, -244, -245		
Metallo- $\beta$ -Laktamase	B	Carbapenemasen	VIM	Aminopenicilline, Ureidopenicilline, Cephalosporine (3-GC & 4-GC), Carbapeneme	VIM-1 - 70 *	Enterobacterales, Nonfermenter
			IMP		IMP-1 - 85 *	
			NDM		NDM-1 - 29	

### 1.2.3) Anaerobier als BSI-Erreger

Unter den strikt anaeroben Bakterien sind im Zusammenhang mit BSI die gramnegative Gattung *Bacteroides* und die grampositiven Clostridien sowie die häufig als Kontaminationen interpretierten Propionibakterien zu nennen. Besonders Spezies der *Bacteroides fragilis* Gruppe stellen mit bis zu 65 % die häufigsten Bakterien in



durch Anaerobier verursachten BSI dar (Goldstein, 1996; Ngo et al., 2013). In vielen Fällen von anaeroben BSI liegt ein spezifischer Fokus – meist maligne Neoplasien, Verletzungen oder iatrogene Manipulationen am GIT – vor, sodass häufig eine empirische Therapie veranlasst wird und der Stellenwert der ohnehin aufwändigen kulturbasierten Diagnostik hierbei als weniger relevant eingestuft wird (Nagy et al., 2011). Nahezu alle *B. fragilis* Stämme sind resistent gegenüber Penicillinen (Soki et al., 2013), hohe Resistenzraten gegenüber Sulbactam-Ampicillin und Fluorchinolonen sowie ein Aufkommen von Resistenzen gegenüber Carbapenemen wurden mehrfach berichtet (Liu et al., 2008; Snyderman et al., 2011). Verringerte Suszeptibilitäten gegenüber Metronidazol als eines der Therapeutika erster Wahl, werden bisher zwar nur in seltenen Fällen beobachtet, allerdings gibt das Vorhandensein solcher Resistenzen wiederum Anlass zur Durchführung von gezielter Diagnostik.

### 1.2.4) BSI durch Pilze

Auch BSI durch fungoide Organismen wie Hefepilze (*Candida*) und Schimmelpilze (*Aspergillus*) sind in ihrer Bedeutung nicht zu vernachlässigen und nehmen tendenziell an Häufigkeit zu (Kirn and Weinstein, 2013). Angaben zur Prävalenz schwanken stark, vermutlich abhängig vom jeweils untersuchten Patientenkollektiv. Insbesondere jedoch Patienten auf Intensivstationen zeigen ein hohes Risiko für invasive Pilzinfektionen. Laut der EPIC (European Prevalence of Infection in Intensive Care) II Studie wurden in Westeuropa bei ca. 20 % der Infektionen von Intensivpatienten Pilze nachgewiesen (Vincent et al., 2009). Dabei sind die meisten der Infektionen durch verschiedene *Candida*spezies bedingt, mit *Candida albicans* an erster Stelle. Durch *Aspergillus* verursachte BSI kommen wesentlich seltener vor, weitere Pilzarten werden nur sporadisch nachgewiesen. *Candida*spezies sind die vierthäufigsten Erreger von nosokomialen BSI in den USA und weisen eine attributable Mortalität von bis zu 50 % auf (Wisplinghoff et al., 2014). Während in den 1980er Jahren noch mehr als 60 % aller nosokomialen *Candida*-BSI durch *C. albicans* verursacht wurden, zeigt sich Anfang des 21. Jahrhunderts ein Rückgang auf 50 % und weniger (Diekema et al., 2012; Wisplinghoff et al., 2014). Es wird dagegen eine Zunahme insbesondere von *Candida glabrata* (Diekema et al., 2012; Seifert et al., 2007) und *Candida parapsilosis*

(Wisplinghoff et al., 2014) beobachtet. Die genannten Candidaspezies inklusive *Candida tropicalis* und *Candida krusei* werden bei 90 % aller invasiven Candidosen beobachtet (Morace and Borghi, 2010). Die klare Differenzierung der Spezies ist hinsichtlich der Initiierung einer antimykotischen Therapie wichtig, da sich unterschiedliche Suszeptibilitätsverhalten zeigen. Oft angewendete Azole wie Fluconazol sind gegen die meisten Candidaspezies gut wirksam. Viele *C. krusei* Stämme dagegen besitzen eine intrinsische Resistenz gegenüber Fluconazol (Morace and Borghi, 2010). Auch zahlreiche *C. glabrata* Stämme weisen ein non-suszeptibles Verhalten gegenüber Fluconazol auf. *C. parapsilosis* Stämme wiederum zeigen gegenüber den oftmals alternativ zu Azolen eingesetzten Echinocandinen in einigen Fällen Resistenzen (Wisplinghoff et al., 2014).

### **1.3) Diagnostik von Bakteriämien**

#### 1.3.1) Blutkulturen

Den Goldstandard bei der Diagnostik von Bakteriämien stellt auch heute noch die Abnahme von sogenannten Blutkulturen dar (Lamy et al., 2016; Mancini et al., 2010; Martinez and Wolk, 2016; Peters et al., 2004; Rodel et al., 2016). Sie bilden die Grundlage bei der Diagnostik von BSI, Sepsis oder Endokarditis und können als ergänzende Diagnostik einen wertvollen Beitrag zur Diagnosestellung weiterer Infektionskrankheiten, wie beispielsweise Pneumonien und Meningitiden, leisten. Bei entsprechend vorliegender Indikation, sollten Blutkulturen noch vor der Einleitung einer kalkulierten Antibiotikatherapie abgenommen werden. Es stehen Blutkulturen mit Medium für das Wachstum aerober und anaerober Organismen zur Verfügung. Außerdem gibt es Blutkulturflaschen mit speziell für Pilze geeignetem Medium, die bei

bestehendem Verdacht mit befüllt werden sollten. Für die Blutentnahme existieren Standards und Empfehlungen, die unter anderen von Kirn und Weinstein (Kirn and Weinstein, 2013) sowie Lamy und Kollegium (Lamy et al., 2016) ausführlich diskutiert wurden. Internationalen Leitlinien entsprechend, sollten mindestens zwei Sets, bestehend aus einer anaeroben und aeroben Blutkulturflasche, mit je 8 bis 10 ml Patientenblut befüllt werden, um eine akzeptable Sensitivität zu gewährleisten (Rhodes et al., 2017). Bei der Suche nach Endokarditiserregern werden aufgrund der eher transient ablaufenden Bakteriämie drei und mehr Sets mit Entnahme an unterschiedlichen Zeitpunkten empfohlen. Bei korrekter Durchführung können Erreger in 80 bis 96 % der Bakteriämien nachgewiesen werden (Opota et al., 2015; Towns et al., 2010). Häufige Ursachen für falsch-negative Ergebnisse sind zu geringe Blutvolumina und eine bereits vor Abnahme der Blutkulturen eingeleitete antiinfektive Therapie (Towns et al., 2010).

Nach Abnahme der Blutkulturen erfolgt zeitnah die anschließende Bebrütung der Blutkulturen in meist kommerziellen Brutschränken. Diese zeichnen sich in der Regel durch die kontinuierliche Messung von Parametern aus, welche mit dem Wachstum von Mikroorganismen vereinbar sind. Die am weitesten verbreiteten Geräte, Bactec (Beckton-Dickinson, USA) und BactAlert/Virtou systems (bioMérieux, Frankreich) messen dabei den pH, welcher in Abhängigkeit der, durch den Stoffwechsel von Mikroorganismen hervorgerufenen, CO<sub>2</sub>-Produktion sinkt (Lamy et al., 2016). Wird eine typische pH Kurve erkannt, so wird die betreffende Blutkulturflasche als positiv deklariert. Normalerweise wird eine Inkubation von fünf bis maximal sieben Tagen durchgeführt. Nur in speziellen Fällen, wie beispielsweise dem Verdacht auf langsam wachsende Mikroorganismen, wird die Inkubationszeit verlängert. Bei Verdacht auf eine infektiöse Endokarditis ist laut S2-Leitlinie eine Inkubation von bis zu 30 Tagen empfohlen (Naber et al., 2004).

### 1.3.2) Konventionelle und moderne Methoden zur Diagnostik positiver Blutkulturen

Sobald Blutkulturen bezüglich eines Wachstums als positiv gemeldet werden, sollten vorhandene Mikroorganismen schnellstmöglich identifiziert werden. Der erste Schritt ist die einfach und schnell durchführbare Anfertigung eines Grampräparates. Hiermit lassen sich die Mikroorganismen in der Regel anhand ihrer Morphologie und des Färbeverhaltens in grampositive Kokken oder Stäbe, gramnegative Stäbe und Kokken, oder Pilze einteilen. Anhand der daraus gewonnenen Informationen können bereits Anpassungen der empirischen Behandlung des betreffenden Patienten erfolgen.

Für die genauere Identifizierung der gewachsenen Keime erfolgt im nächsten Schritt eine Subkultur aus der positiv gemeldeten Blutkulturflasche auf Medien mit verschiedenen selektiven Eigenschaften (Abbildung 1.2). Anschließend werden die gewachsenen Kolonien identifiziert und ein Antibiogramm zur Bestimmung der Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Antibiotika angefertigt. In der Regel wird zusätzlich ein vorläufiges Antibiogramm direkt aus der Blutkulturflasche erstellt. Die Ergebnisse liegen meist bereits am Tag nach Positivmeldung vor, können allerdings nur zur groben Orientierung herangezogen werden, da diese Methode nicht standardisiert ist und die Einsaat der Bakterien starken Variationen unterliegt.

Nach Wachstum von Kolonien auf den Agarplatten erfolgt die Identifizierung in der Regel mittels Massenspektroskopie (MS), zum Teil ergänzt durch die Bestimmung biochemischer Stoffwechseleigenschaften (Abbildung 1.2). Matrix-Assistierte Laser Desorptions Ionisation „Time Of Flight“ MS (MALDI-TOF-MS) gilt als die momentan beste Methode zur schnellen Identifizierung von Bakterien (Opota et al., 2015). Die Technologie beruht auf der Messung von Massenspektren subkultivierter Kolonien und deren Abgleich mit großen Datenbanken zur Identifizierung des jeweiligen Mikroorganismus (Holland et al., 1996). Hierfür werden zunächst Proteine aus ganzen Kolonien innerhalb einer Matrix durch gezielten Beschuss mit einem Laser sublimiert und ionisiert. Anschließend erfolgt die Beschleunigung der geladenen Proteine in einem elektrischen Feld und die Messung der Flugzeit („Time of flight“ – TOF) in einer speziellen Röhre. So ergibt sich eine Auftrennung der geladenen Teilchen nach der Masse pro Ladung, welche als massenspektrometrischer Fingerabdruck dienen kann, ausführlich beschrieben von Clark und Kollegium (Clark et al., 2013). Diese technisch aufwendige Methode ist dank moderner Systeme einfach und in wenigen Schritten zu

bedienen. Als Alternative bei problematischer Identifizierung mittels MALDI-TOF MS, stehen Optionen wie das bis heute in den meisten mikrobiologischen Laboren genutzte automatisierte System VITEK® 2 der Firma bioMérieux zur Verfügung. Es beinhaltet in Form mehrerer erhältlichiger Testkassetten die biochemische Differenzierung eines breiten Spektrums an klinisch relevanten Bakterien und Pilzen. Im direkten Vergleich mit VITEK® 2, konnte MALDI-TOF-MS jedoch eine bessere Genauigkeit, weniger Fehler auf Speziesebene und einen deutlichen Zeitgewinn bei der Identifizierung von Isolaten aus positiven Blutkulturen zeigen (Guo et al., 2014).

Der Standard zur antimikrobiellen Suszeptibilitätstestung (AST) ist eine Verdünnungsreihe antimikrobieller Substanzen in definierten Kulturen, anhand deren eine Minimale Hemmkonzentration (MHK/MIC) *in vitro* bestimmt werden kann, bei der kein Wachstum mehr beobachtet wird. Die Beurteilungen dieser MHK im klinischen Kontext sind anhand von Grenzwerten nach der EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) definiert und werden kontinuierlich erneuert.

In der Routinediagnostik kommen auch für die AST in der Regel automatisierte Testsysteme zum Einsatz. Das VITEK® 2 stellt hier in vielen mikrobiologischen Laboren die Methode der Wahl dar, da neben der Möglichkeit zur Identifikation der Mikroorganismen auch entsprechende Testkassetten zur gezielten AST bereitstehen. Die für das jeweilige Isolat passenden Kassetten testen relevante antimikrobielle Substanzen in Verdünnungsreihen, messen den Zellwachstum automatisch mittels Fluoreszenz und berechnen aus den gewonnenen Daten MHK (indirekt) für die einzelnen Substanzen. Die Methode ist standardisiert, von der amerikanischen FDA (Food and Drug Administration) zugelassen und CE-zertifiziert.

Häufig eingesetzte konventionelle Methoden zur Bestimmung von *in vitro* MHK (direkt) sind beispielsweise der Epsilometerest (E-Test) und der Agardiffusionstest (Abbildung 1.2). Bei diesen eher aufwendigen Tests kann eine MHK direkt abgelesen werden.

Die beschriebenen Methoden werden in der Regel aus Einzelkolonien von Subkulturen der positiven Blutkulturflasche durchgeführt. Bis eine Subkultur aus der positiven Blutkulturflasche vorliegt, vergehen bestenfalls bei schnellwachsenden gramnegativen Stäben einige Stunden. Bei den übrigen Keimen liegt eine Subkultur für eine AST in der Regel erst am nächsten Tag vor. Da dieses Procedere sehr zeitintensiv ist, zielen moderne Methoden auf die Identifizierung direkt aus der positiven Blutkultur ab (Oberhettinger et al., 2020).

## Einleitung

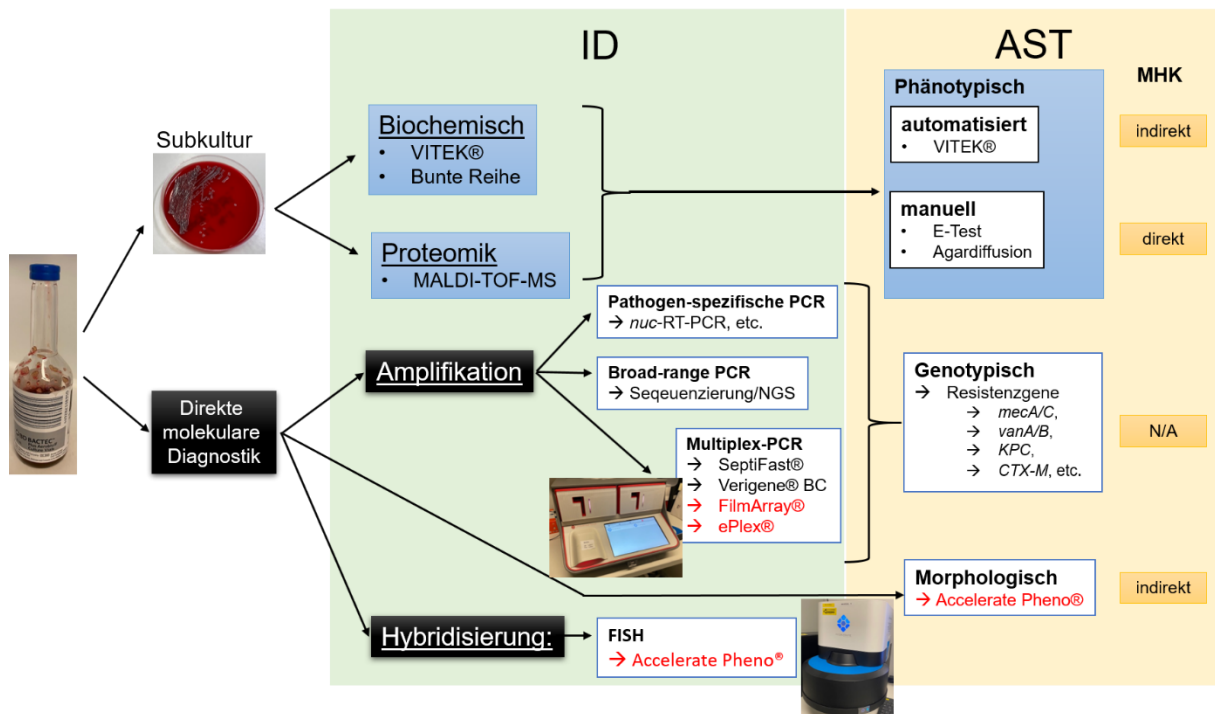


Abbildung 1.2: Übersicht gängiger und moderner Methoden zur Identifizierung (ID) und Suszeptibilitätstestung (AST) von Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen. In Rot gedruckte Systeme wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Modifiziert nach Peters et al. (2004 – Abbildung 2). PCR: Polymerase-Kettenreaktion; FISH: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung; MHK: Minimale Hemmkonzentration; N/A: nicht vorhanden.

Molekulare Methoden basieren hauptsächlich auf dem Nachweis von spezifischen bakteriellen beziehungsweise fungoiden Nukleinsäuren. Dieser kann direkt durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder durch die Amplifikation von DNA- oder RNA-Sequenzen erfolgen (Abbildung 1.2).

### 1.3.2.1) Molekulare Diagnostik durch FISH

Die Abkürzung FISH steht für Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung. Hierbei werden spezifische DNA-Oligonukleotid-Sonden, welche komplementär zu entsprechend konservierten Sequenzen der prokaryotischen ribosomalen RNA (rRNA) sind, mit permeabilisierten Zellen inkubiert. Erfolgt eine Hybridisierung der Sonden mit intrazellulärer rRNA, so werden diese bei den anschließenden Waschschr

entfernt. Die Sonden sind mit fluoreszenten Farbstoffen gekoppelt und können so anschließend durch Fluoreszenzmikroskopie dargestellt werden.

Das Accelerate Pheno® System (Accelerate Diagnostics) in Kombination mit Accelerate PhenoTest™ BC Kit (Accelerate Diagnostics) nutzt FISH zur Erkennung von einigen ausgewählten Bakterien-, beziehungsweise Hefegattungen und -spezies direkt aus positiven Blutkulturen. Nach vorangegangener Gelelektrofiltration zur Extraktion und Aufreinigung von in der Probe enthaltenen Zellen, findet die voll automatisierte FISH zur Identifizierung der enthaltenen Mikroorganismen statt. Die Detektion erfolgt durch digitale Mikroskopie. In einem weiteren Schritt auf derselben Testkassette, wird ebenfalls mittels digitaler Mikroskopie eine morphokinetische Zellanalyse lebender Zellen unter dem Einfluss von verschiedenen, relevanten Antibiotika durchgeführt. Dabei werden durch die Software, mit Hilfe eines Algorithmus, aus den gewonnenen Daten MHK abgeleitet (Pantel et al., 2018). Die Identifizierung und AST von gramnegativen BSI wurde im Rahmen einer 2016 am Universitätsklinikum Tübingen (UKT) durchgeführten Studie erprobt (Marschal et al., 2017). Dabei schnitt das System hinsichtlich des Zeitgewinnes und Qualität der Ergebnisse gut ab, sodass es seither im klinischen Alltag Bestandteil der Diagnostik von gramnegativen BSI bei kritisch kranken Patienten am UKT ist (Oberhettinger et al., 2020).

### 1.3.2.2) Molekulare Diagnostik durch PCR

Für die Amplifikation von Nukleinsäuren existieren mehrere Methoden, die meist genutzte ist jedoch die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR (Peters et al., 2004). Zur Erkennung einer bestimmten Gattung, Spezies oder eines Resistenzgens stehen viele einfache PCR, die eine spezifische DNA-Sequenz amplifizieren, zur Verfügung. Die Detektion erfolgt dabei in aller Regel mit fluoreszenzgekoppelten Primern in Form einer sogenannten Real-Time-PCR (RT-PCR), die einige Vorteile gegenüber konventionellen PCR bietet (Mancini et al., 2010). Verschiedene gängige Testverfahren nutzen diese Technik entweder als Einzeltest oder in Form von multiplex PCR mit mehreren Primerpaaren gleichzeitig (Abbildung 1.2). Dies kann einerseits zur Beantwortung einer bestimmten Fragestellung genutzt werden, wie beispielsweise der Differenzierung von grampositiven Kokken in CoNS, *S. aureus* oder MRSA. Hierfür

werden direkt aus der Blutkultur einige wenige Targets detektiert. Eine Weiterentwicklung dieses Ansatzes bilden weiterhin verschiedene Systeme, die den Nachweis einer Vielzahl von Targets ermöglichen. Die Testsysteme enthalten häufig bereits die vorgeschaltete Probenaufarbeitung und Extraktion der Nukleinsäuren. Beispiele hierfür sind das SeptiFast® (Roche Molecular Diagnostics), Magicplex™ (Seegene) und das mittlerweile CE-gekennzeichnete FilmArray® BCID (Biomerieux).

Im Folgenden werden die Technologien des FilmArray® BCID und ePlex® System (GenMark) genauer beschrieben, da sie zusammen mit dem Accelerate Pheno® System (siehe oben) in dieser Arbeit verglichen wurden. Das FilmArray® BCID vereint in einem für die Proben beladbaren Riegel die geschlossene Aufreinigung, eine zweistufige PCR-Amplifikation und die anschließende Detektion der fluoreszenzbasierten PCR-Schmelzkurven. Diese werden anschließend von der Software des FilmArray® Systems analysiert und interpretiert. Sämtliche gramnegativen und grampositiven Bakterien sowie Pilze werden auf dem gleichen Testriegel erkannt.

Auch das ebenfalls CE-gekennzeichnete ePlex® System basiert auf einer multiplex PCR Amplifikation. Diese wird zusätzlich zur integrierten Nukleinsäure-Extraktion durch eine spezielle „electrowetting“-Technologie komplettiert, die einen schnellen Ablauf der verschiedenen Reaktionsschritte innerhalb der Testkassetten ermöglichen soll. Die anschließende Detektion der Amplifikate erfolgt mittels eSensor®-Technologie (GenMark). Diese kommt ohne Fluoreszenz aus, stattdessen wird amplifizierte Ziel-DNA mit an ein reduzierendes Reagenz gekoppelten Sonden hybridisiert und elektrochemisch per Goldelektrode erkannt. Die weitere Analyse erfolgt durch die Software des Systems. Es stehen BCID Testkassetten jeweils für ein breites Spektrum an grampositiven Bakterien, gramnegativen Bakterien und Pilzen bereit.

Alle diese molekularbasierten Systeme sind derzeit als Zusatzdiagnostik zur konventionellen, kulturbasierten Diagnostik anzusehen. Dies liegt zum einen an der aktuell noch zu geringen Datenmenge bezüglich deren Sicherheit, zum anderen aber auch an den limitierten detektierbaren Erregerspektren und den eingeschränkten Möglichkeiten zur Erstellung eines Antibiogrammes.



#### **1.4) Zielsetzung dieser Arbeit**

Eine schnelle und effiziente Diagnostik von Blutstrominfektionen bildet die Grundlage für eine zeitnahe und adäquate antiinfektive Therapie der daraus resultierenden, lebensbedrohlichen Krankheitsbilder. Neben der kulturbasierten Diagnostik, stehen zunehmend meist molekularbasierte Schnelltests zur Verfügung, die eine sinnvolle Ergänzung zur kulturbasierten Erregeridentifizierung und Resistenztestung darstellen können.

In dieser Arbeit wurde daher die diagnostische Wertigkeit von drei Schnelltestsystemen im Rahmen der Blutkulturdiagnostik evaluiert, wie im schematischen Arbeitsablauf dargestellt (Abbildung 1.3). Die Schnelltestsysteme umfassten das GenMark ePlex® (Diagnostics, Carlsbad, USA) und das Biofire FilmArray® (Biomerieux, Nürtingen) für alle positiven Blutkulturflaschen, bei denen im Grampräparat mikroskopisch ein Erreger nachweisbar war. Das Accelerate PhenoTest® (Accelerate Diagnostics, USA) wurde zusätzlich beim Vorliegen von gramnegativen Bakterien im Grampräparat durchgeführt, da dieses System neben einer Identifizierung auch ein schnelles phänotypisches Antibiogramm generiert. Die im Rahmen der prospektiven Untersuchung generierten Daten, wurden der als Goldstandard definierten, kulturbasierten Routinediagnostik gegenübergestellt um,

- i) die Leistungsfähigkeit der Systeme in Bezug auf die korrekte Identifizierung zu erheben.
- ii) die Übereinstimmung der Ergebnisse für die Resistenzbestimmung zu evaluieren.
- iii) die gewonnene Zeitersparnis bis zum Vorliegen von Ergebnissen zu dokumentieren.

Außerdem wurden die Vor- und Nachteile der verschiedenen Systeme hinsichtlich ihrer Handhabung und Robustheit untersucht.

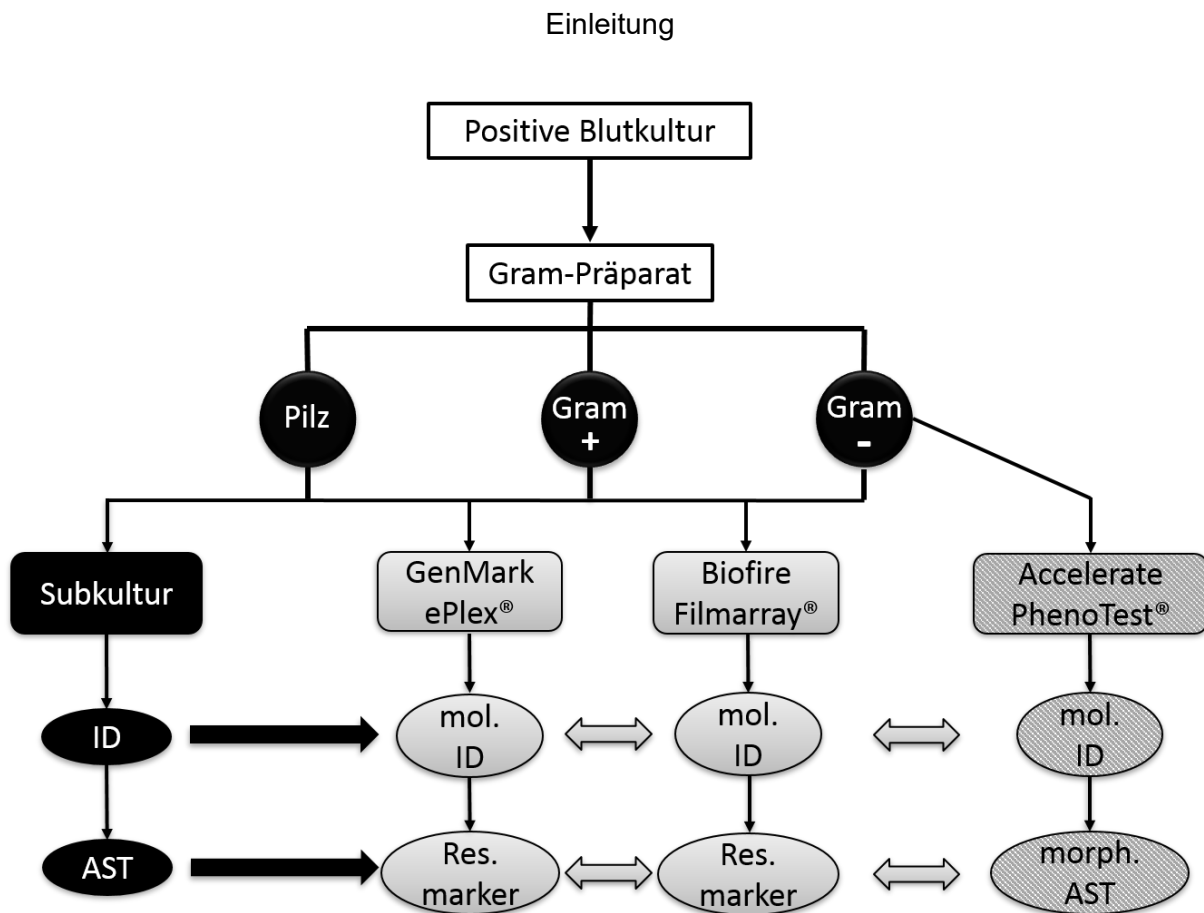


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des Arbeitsablaufs, modifiziert nach Oberhettinger et al. (2020). In schwarz dargestellt ist der standardisierte Routineablauf der Diagnostik von positiven Blutkulturen. Der grau hinterlegte, parallel dazu stattfindende Ablauf wurde im Rahmen dieser Arbeit evaluiert. AST: Antimikrobielle Suszeptibilitätstestung, morph.: morphologische; ID: Identifizierung, mol.: molekulare; Res. marker: Resistenzmarker.

In einem zweiten Schritt wurde die Prävalenz von identifizierten Isolaten aus Blutkulturen am UKT für die Jahre 2015 bis 2017 retrospektiv erhoben und mit dem Spektrum der während des limitierten Studienzeitraums nachgewiesenen Isolate verglichen. Dies sollte eine Einschätzung dazu erlauben, ob die während des Studienzeitraums beobachteten Isolate das durchschnittliche Spektrum am UKT adäquat widerspiegeln.

## **2) Material und Methoden**

### **2.1) Studienrahmen, Probenmaterial und Laborbedingungen**

Die Studie zum Vergleich konventioneller kulturbasierter Blutkulturdiagnostik mit modernen molekularbasierten Systemen wurde am Universitätsklinikum Tübingen, einer Klinik der Maximalversorgung mit mehr als 1500 Betten, im Zeitraum von Mitte November 2017 bis Ende Januar 2018 durchgeführt (Oberhettinger et al., 2020). Blutkulturen des gesamten Patientenkollektivs der Klinik, ambulant sowie stationär, wurden am Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene untersucht. Jeweils die erste positive Blutkultur eines Patienten wurde in die Studie mit einbezogen, sofern die Gramfärbung (siehe 2.3.1) den Hinweis auf eine monomikrobielle Blutkultur ergab. Bei Verdacht auf eine polymikrobielle Kultur wurde die Blutkultur aus der Studie ausgeschlossen. Weitere positive Blutkulturen des jeweiligen Patienten wurden nicht berücksichtigt. Auch Folgeisolate wurden aus der Studie ausgeschlossen. Hinsichtlich der Entnahmestelle der Blutkulturen wurden keine Einschränkungen festgelegt.

Eine Genehmigung seitens der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität zu Tübingen für die durchgeführten Untersuchungen lag unter den Projektnummern 667/2014BO1 und 139/2016BO2 vor. Auf eine explizite Einwilligung der Patienten hinsichtlich der Studie konnte verzichtet werden, da keine patientenbezogenen Daten verwendet wurden. Die direkte Bearbeitung von positiven Blutkulturen fand durch das medizintechnische und ärztliche Personal während der regulären Betriebszeiten des Labors der medizinischen Mikrobiologie statt. Diese waren Montag bis Freitag zwischen 7:30 Uhr und 17:30 Uhr, sowie Samstag und Sonntag von 7:30 Uhr bis 16:00 Uhr (Oberhettinger et al., 2020). Die Bearbeitung von Blutkulturen, welche außerhalb der Betriebszeiten positiv gemeldet wurden, begann direkt am darauffolgenden Betriebsstart.

Als Umfang der Studie wurde das Ziel gesetzt 100 Blutkulturen einzuschließen, bei denen grampositive Organismen mikroskopisch nachgewiesen wurden, sowie alle in diesem Zeitraum anfallenden Blutkulturen, in denen mikroskopisch gramnegative Bakterien oder Pilze nachgewiesen wurden. Für diese Proben wurden neben der

Routinediagnostik (Abschnitt 2.3.1) alle zur Verfügung stehenden Schnelltests durchgeführt (Abschnitt 2.3.2).

Für den Ansatz von Blutkulturen wurden BD BACTEC™ Plus Aerobic/Anaerobic medium und BD BACTEC™ Mycosis-IC/F (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA) Kulturflaschen verwendet. Diese wurden bis zum Transport in das Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene bei Raumtemperatur gelagert. Die Inkubation wurde im Bactec FX blood culture instrument (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA) bei 35 +/- 1,5 °C vorgenommen.

## 2.2) Materialien

### Geräte:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Accelerate Pheno® System	Accelerate Diagnostics, USA
AXIMA Assurance	Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg
Bactec FX blood culture instrument	BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA
BioFire FilmArray® multiplex PCR System	Biomerieux, Nürtingen
Brutschrank Heraeus Function Line	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
DENSICHEK® Plus	bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
ePlex® System	GenMark Diagnostics, Carlsbad, CA, USA
Microflex LT MALDI-TOF MS	Bruker Daltonics, Bremen
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen
VITEK® 2 XL System	bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich

## Material und Methoden

### Kits:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
API® RAPID ID 32 STREP	bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
SLIDEX® Strepto	bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
Staph Plus Latex Kit	DIAMondiaL, Wien, Österreich

### Nährmedien:

<b>Bezeichnung (Besonderheiten)</b>	<b>Bezugsquelle</b>
BBL CHROMagar (Candida)	BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA
Blutagar (Columbia-Agar mit Schafblut)	Oxoid GmbH Deutschland, München
Brain-Heart-Infusions Agar	Oxoid GmbH Deutschland, München
CNA-Agar (Colistin + Nalidixinsäure)	Biomerieux, Nürtingen
DNase-Platte (DNA-haltiger Blutagar)	Institutsinterne Herstellung*
Hefe-Gentamicin-Agar	Institutsinterne Herstellung*
MH-F-Agar (anspruchsvolle Organismen)	Oxoid GmbH Deutschland, München
Müller-Hinton Agar (AST-Testung)	Institutsinterne Herstellung*/Oxoid GmbH
Streptokokken-Agar (Selektiv für $\beta$ -hämolysierende Streptokokken)	Institutsinterne Herstellung*

### Sonstige Verbrauchsmaterialien:

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
0,85 % NaCl-Lösung	Institutsinterne Herstellung*
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Agardiffusion-Testplättchen	Becton Dickinson Cooperation, USA

## Material und Methoden

Sulbactam-Ampicillin, AmpC/ESBL Set	Mast Diagnostica GmbH, Reinfeld
BD BACTEC™ Blutkulturflaschen - BD BACTEC Plus Aerobic medium - BD BACTEC Plus Anaerobic medium - BD BACTEC Myosis-IC/F	BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA
ePlex® RUO** BCID Testkassetten - BCID GN - BCID GP - BCID FP	GenMark Diagnostics, Inc., Carlsbad, USA
E-Teststreifen	Bestbion dx GmbH, Köln
FilmArray® BCID Panel	BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA
Galle Reagenz	Oxoid Ltd., Basingstoke, UK
Microbanks	Bestbion dx GmbH, Köln
Optochin-Plättchen	Oxoid Deutschland GmbH, Wesel
Pheno® Test™ BC Kit Kartuschen	Accelerate Diagnostics, USA
„in-house“-PCR Primer ( <i>mecA</i> , <i>vanA</i> , <i>vanB</i> )	Tib Molbiol GmbH, Berlin
VITEK® 2 GN (Identifizierungskarten)	bioMerieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
VITEK® 2 GP (Identifizierungskarten)	bioMerieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
VITEK® AST-N232 (Resistenzkarten)	bioMerieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
VITEK® AST-P611 (Resistenzkarten)	bioMerieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich
VITEK-Röhrchen (5 ml Tubes)	Sarstedt AG, Nümbrecht

\* Anmerkung: „Institutsinterne Herstellung“ bezieht sich auf die Herstellung in der Nährbodenküche des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen.

\*\* RUO: Research Use Only

## 2.3) Methoden

### 2.3.1) Konventionelle Routinediagnostik positiver Blutkulturen am UKT

Nach erfolgter Positivmeldung einer Blutkulturflasche durch das Bactec FX wurde zunächst durch das Laborpersonal ein Grampräparat erstellt. Grundsätzlich erfolgte die Herstellung von Subkulturen auf speziellen Agarplatten (siehe Kapitel 2.2 – Nährmedien).

Die Isolate aus den Blutkulturen wurden in Microbanks (Bestbion dx GmbH, Köln) bei -80 °C eingefroren und für spätere Analysen archiviert.

Diese sowie alle im Weiteren beschriebenen Arbeitsschritte wurden ausschließlich durch eingewiesenes Fachpersonal und nach den Vorgaben der internen Standardvorgehensweisen (SOP) durchgeführt.

#### 2.3.1.1) Identifikation von Mikroorganismen in der Routinediagnostik

Die Identifikation von Mikroorganismen, welche auf den entsprechenden Subkultur-Agarplatten angewachsen waren, fand in der Regel mittels MALDI-TOF MS auf einem Microflex LT (Bruker Daltonics, Bremen) statt (Abbildung 2.1) (Oberhettinger et al., 2020). Die Messungen erfolgten automatisch nach Start des Teilchenbeschleunigers auf dem MALDI Biotyper System mit der zugehörigen Software MALDI Biotyper RTC (Bruker Daltonics, Bremen). Ein elektronischer Abgleich der Massenspektrogramme erfolgte über die Datenbanken IVD Library, Filamentous funghi Library oder Clinical SR Datenbank.

In manchen Fällen wurde bei nicht validierten Keimen oder bei solchen mit unklaren Ergebnissen in der MALDI-TOF MS eine biochemische Identifizierung des MS Ergebnisses unter Anwendung des VITEK® 2 XL Systems (bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, Frankreich) angestrebt. Hierfür wurden die dafür vorgesehenen Identifizierungskarten VITEK® 2 GN (bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, Frankreich) für gramnegative Stäbchen und VITEK® 2 GP (bioMérieux, SA, Marcy l'Etoile, Frankreich) für grampositive Kokken verwendet. Kulturen der Isolate aus den positiven Blutkulturen wurden den SOP entsprechend durch das Laborpersonal vorbereitet und dann in den

VITEK®-Probenträger geladen. Die auf der jeweiligen Identifizierungskarte enthaltenen biochemischen Tests folgten dem Prinzip einer sogenannten bunten Reihe und liefen in der Regel über Nacht ab. Entsprechende Ergebnisse konnten am nächsten Tag auf dem VITEK® 2 XL System ausgelesen werden. Die 159 identifizierbaren Taxa der GN-Karte und die 115 identifizierbaren Taxa der GP-Karte können der Webseite des Herstellers (<https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/vitek-2-id-karten> [Zugriff zuletzt am 15.02.2019]) entnommen werden.

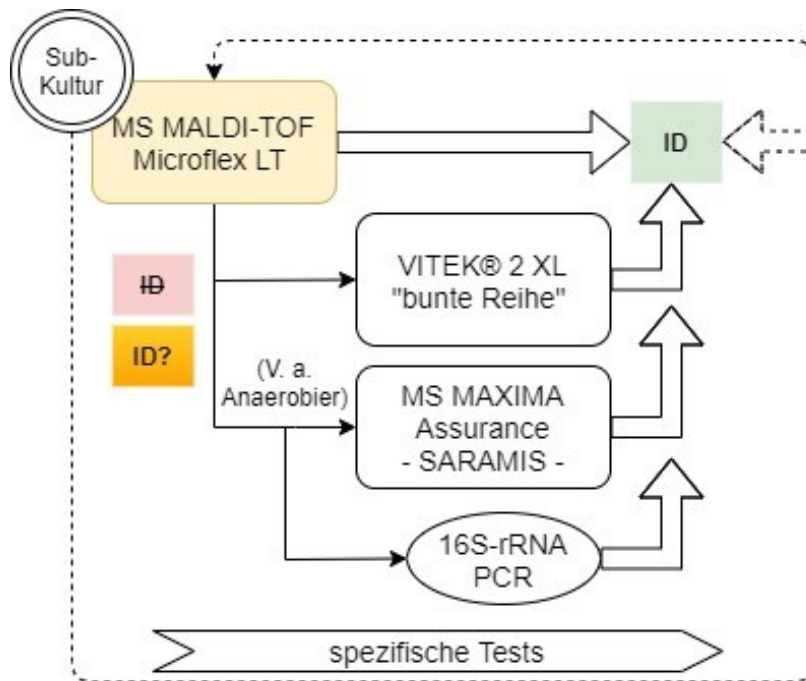


Abbildung 2.1: Standardablauf der kulturbasierten Routinediagnostik von positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT. In der Regel erfolgt die Identifikation (ID) per Massenspektroskopie (MS), bei fraglichen oder ausbleibenden ID-Ergebnissen werden zusätzliche Methoden, teilweise in Abhängigkeit des zu erwartenden Keims, herangezogen. Parallel dazu können spezifische Tests (siehe Tabelle 2.1) die Identifikation bei konkretem Verdacht unterstützen oder frühzeitige Ergebnisübermittlungen ermöglichen.

Vereinzelt wurden MALDI-TOF Identifizierungen auch mit dem MS Gerät AXIMA Assurance (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg) unter Nutzung der Software SARAMIS Premium mit zugehöriger Datenbank (Anagnostec GmbH, Potsdam-Golm) durchgeführt. Dies war insbesondere dann der Fall, wenn die Subkultur bereits das



Vorliegen eines anaeroben Keims nahelegte oder unter Verwendung der anderen Datenbanken und des VITEK® 2 Systems keine eindeutige Identifizierung möglich war (Abbildung 2.1).

Tabelle 2.1: Spezifische kulturbasierte Tests für einzelne Bakteriengruppen und -spezies. Die aufgezählten Tests wurden im Rahmen der Routinediagnostik zur Identifizierung von positiven Blutkulturen am UKT teils ergänzend zur MS angewendet. Genaue Angaben zu den Materialien sind im Abschnitt 2.2 zu finden. BC: biochemischer Test; IM: immunologischer/serologischer Test.

Methoden	Spezifität	BC	IM	Anwendung	Material
<b>DNase-Test</b>	Staphylokokken	x		Screening <i>S. aureus</i>	DNase-Platte
<b><i>S. aureus</i> Agglutination</b>	<i>S. aureus</i>		x	Nachweis <i>S. aureus</i>	Staph Plus Latex Kit
<b>Indolbildung aus Tryptophan</b>	<i>P. acnes</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>K. oxytoca</i> , u. a.	x		Differenzierung verschiedener Spezies	James-Reagenz [4-(N,N-Dimethylamino)- benzaldehyd]
<b>Serologische Gruppenbestimmung</b>	β-hämolyisierende Streptokokken		x	Differenzierung der Gruppen A/B/D	SLIDEX® Strepto Latexreagenzien (A/B/D)
<b>Schnell-Identifikation von Streptokokken</b>	Streptokokken	x		insbesondere Viridans Streptokokken	API® RAPID ID 32 STREP Kit
<b>Optochin-Test</b>	α-hämolyisierende Streptokokken	x		Nachweis <i>S. pneumoniae</i>	Optochin-Plättchen/ Blutagar
<b>Galle-Löslichkeit</b>	α-hämolyisierende Streptokokken	x		Nachweis <i>S. pneumoniae</i>	Galle Reagenz/ Blutagar

Für die Identifikation einiger häufiger Blutkulturisolat standen dem mikrobiologischen Routinelabor außerdem standardisierte, auf biochemischen und immunologischen Methoden beruhende, selektive Tests zur Verfügung. Diese konnten insbesondere zur schnellen Identifizierung von *S. aureus* aus Subkulturen, aber auch zur Differenzierung verschiedener Streptokokken, *Propionibacterium sp.* und *Proteus sp.* herangezogen werden. Diese oftmals auf kommerziell erhältlichen Produkten beruhenden Tests wurden teilweise ergänzend zur MS/VITEK®-Methode herangezogen (Abbildung 2.1). In anderen Fällen konnten sie jedoch auch bei nicht eindeutigen Ergebnissen der

unspezifischen Methoden eine sichere Identifizierung gewährleisten oder eine frühzeitige Übermittlung des Identifizierungsergebnisses an den behandelnden Kliniker ermöglichen. Eine Auflistung relevanter spezifischer Tests sowie deren Einsatzgebiete sind der Tabelle 2.1 zu entnehmen.

Im Falle des Scheiterns aller zuvor beschriebenen Methoden zur Identifizierung des Isolats wurde eine universelle (eubakterielle) 16S-rRNA-PCR und eine anschließende Sequenzierung von gegebenenfalls gewonnenen Amplifikaten zur Identifizierung herangezogen. Die PCR konnte dabei direkt aus der Blutkulturflasche oder von subkultivierten Isolaten erfolgen. Je nach Beurteilung war es möglich, eine Identifikation auf Spezies- oder Gattungsebene herauszugeben.

Den SOP entsprechend wurden bei allen Analysen Reinheitskontrollen mitgeführt, die für die schlussendliche Validierung der Ergebnisse ausschlaggebend waren.

### 2.3.1.1.1) Besonderheiten bei der Blutkulturdiagnostik von Pilzen

Im Falle des lichtmikroskopischen Nachweises eines Pilzes in einer positiven Blutkultur wurden Subkulturen auf speziellen selektiven Nährböden hergestellt. Hierfür wurde in der Regel ein fester Hefe-Gentamicin-Agar verwendet. Die anschließende Inkubation erfolgte dann bei 30 °C im Brutschrank. Die weitere Identifikation der Spezies erfolgte mittels MALDI-TOF MS (siehe 2.3.1.1) und gegebenenfalls unterstützt durch weitere kulturbasierte Differenzierungstests, wie dem BBL CHROMagar (BD Diagnostic Systems, Franklin Lakes, USA) für *Candida* (Oberhettinger et al., 2020).

### 2.3.1.2) Antimikrobielle Suszeptibilitätstestung (AST) in der Routinediagnostik

#### 2.3.1.2.1) VITEK® 2 AST

Die kulturbasierte Testung der Empfindlichkeit von nachgewiesenen Mikroorganismen gegenüber relevanten antimikrobiellen Substanzen (Antibiotika) wurde im Regelfall durch das vollautomatisierte VITEK® 2 XL System (bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich) vorgenommen. Subkultivierte Bakterienkolonien wurden hierfür durch das Laborpersonal den SOP entsprechend vorbereitet. Die verwendeten Resistenzkarten waren für grampositive Kokken AST-P611 (bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile, Frankreich) und für gramnegative Stäbchen AST-N232 (bioMérieux, SA, Marcy-l'Étoile,

Frankreich). Die jeweils enthaltenen Testsubstanzen sind in Tabelle 2.2 zu finden. Nach Start des Programmes mit der zum Isolat passenden Resistenzkarte lieferte das System innerhalb von 4 Stunden eine Minimale Hemmkonzentration (MHK) für alle repräsentierten Antibiotika und die jeweils dazu passende Interpretation nach aktuellem europäischem Standard des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Die Resistenztestung von Pilzspezies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Tabelle 2.2: Enthaltene Antibiotika und Tests auf den verwendeten VITEK® Resistenzkarten. Der abgedeckte Bereich, in dem die Minimale Hemmkonzentration (MHK) bestimmt werden konnte, ist mit angegeben.

AST-N232			AST-P611		
Antibiotikum/Test	MHK-Bereich		Antibiotikum/Test	MHK-Bereich	
	≤	≥		≤	≥
Ampicillin	2	32	Ampicillin	0,25	32
Ampicillin/Sulbactam	2	32	Benzylpenicillin Staph.	0,03	0,5
Piperacillin	4	128	Oxacillin	0,25	4
Piperacillin/Tazobactam	4	128	Imipenem	1	16
Cefuroxim	1	64	Gentamicin	0,5	16
Cefuroxim/Cefur-Axetil	1	64	Ciprofloxacin	0,5	8
Cefotaxim	1	64	Moxifloxacin	0,25	8
Ceftazidim	1	64	Erythromycin	0,25	8
Cefepim	1	64	Clindamycin	0,25	8
Cefpodoxim	0,25	8	Vancomycin	0,5	32
Imipenem	0,25	16	Daptomycin	0,12	8
Meropenem	0,25	16	Tetracycline	1	16
Gentamicin	1	16	Tigecyclin	0,12	2
Tobramycin	1	16	Linezolid	0,5	8
Ciprofloxacin	0,25	4	Fosfomycin	8	128
Levofloxacin	0,12	8	Trimethoprim/Sulfa.	10	320
Tigecyclin	0,5	8	Fusidinsäure	0,5	32
Trimethoprim/Sulfa.	20	320	Rifampicin	0,5	32
			Gentamicin HL	500	
			ICR Test	+/-	+/-
			Cefoxitin Screen	+/-	+/-

### 2.3.1.2.2) Agardiffusionstest

Als Alternative zum VITEK® 2 AST Test, zum Beispiel wenn damit kein Ergebnis erzielt werden konnte, stand bei schnell wachsenden aeroben Bakterien der Agardiffusionstest zur Verfügung. Methode der Wahl war der Agardiffusionstest zudem bei  $\beta$ -hämolyisierenden Streptokokken, mukoid wachsenden Pseudomonaden, Pneumokokken und *Haemophilus influenzae*. Bakterienkulturen wurden mit einer Impföse in eine 0,85%ige Kochsalzlösung überführt und mittels Densitometer (DENSICHEK®, bioMérieux, SA, Frankreich) auf einen Mc Farland von 0,5 eingestellt. Bakteriensuspensionen aus den Subkulturen wurden auf Müller-Hinton-Agar (institutsinterne Herstellung) ausplattiert und anschließend erfolgte das Aufbringen der entsprechenden Testblättchen. Die Mehrzahl einzelner Testblättchen wurde von der Firma BD Diagnostics (Becton Dickinson Cooperation, USA) bezogen, Testblättchen für Sulbactam-Ampicillin wurden wie auch das AmpC und ESBL-Set von Mast Diagnostica GmbH (Reinfeld) erworben. Nach 16 bis 20 Stunden Inkubation bei etwa 35 °C konnten entstandene Hemmzonen ausgemessen werden. Voraussetzung hierfür war das Bestehen eines konfluenten Bakterienrasens. Die Dimension einer Hemmzone korrelierte mit der entsprechenden minimalen Hemmkonzentration (MHK) und konnte mit Hilfe der Labor-EDV nach aktueller EUCAST Richtlinie interpretiert werden. Lagen keine für den Erreger spezifischen „Breakpoints“ vor, so wurden die Ergebnisse als orientierendes Antibiogramm markiert.

### 2.3.1.2.3) Epsilometertests

Epsilometertests (E-Tests) wurden zur Beurteilung der Empfindlichkeit von identifizierten Keimen teilweise ergänzend in der kulturbasierten Routinediagnostik angewandt. Dies war der Fall, wenn in der Resistenztestung durch VITEK® 2 oder Agardiffusion eines Isolates Reserveantibiotika als nicht empfindlich beurteilt wurden. Betroffen waren alle im Rahmen der Studie getesteten Carbapeneme, Tigecyclin und Colistin, sowie bei Staphylokokken und Enterokokken Linezolid. Bei allen Isolaten mit Staphylokokken wurde unabhängig vom Testergebnis ein E-Test für Vancomycin durchgeführt. Des Weiteren führten wir E-Tests bei Diskrepanzen zwischen der MHK Interpretationen des Pheno® Systems und der kulturbasierten VITEK® 2 AST durch, um das korrekte Ergebnis zu eruieren.

Bakterienkulturen wurden mit einer Impföse in eine 0,85%ige Kochsalzlösung überführt und mittels Densitometer (DENSICHEK®, bioMérieux, SA, Frankreich) auf einen Mc Farland von 0,5 eingestellt. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen mit einem sterilen Wattetupfer auf Müller-Hinton-Agar Platten (institutsinterne Herstellung) ausplattiert, sodass ein kontinuierlich dichter Bakterienrasen wachsen konnte. Pro Antibiotikum und Isolat wurden eine Testplatte und eine Reinheitskontrollplatte angelegt. E-Teststreifen wurden von der Firma Bestbion dx (GmbH, Köln) bezogen. Mit einer sterilen Pinzette wurde je ein Teststreifen mittig auf eine beimpfte Agarplatte gelegt. Anschließend wurden die Testplatten bei 37 °C für  $18 \pm 2$  Stunden im Brutschrank Heraeus Function Line (Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold) inkubiert. Das Ablesen des Ergebnisses erfolgte manuell, indem die entstandene Hemmzone bei ansonsten konfluentem Zellrasen beurteilt wurde. Bei bakteriziden Antibiotika wurde die Hemmkonzentration bei vollständiger Wachstumshemmung abgelesen, bei bakteriostatischen dagegen bei einer Wachstumshemmung von 80 %. Die anschließende Interpretation der abgelesenen MHK/MIC erfolgte nach der zum betreffenden Zeitpunkt aktuellen EUCAST Richtlinie für die Interpretation von MICs und Hemmzonendurchmessern (EUCAST, 2018 [Version 8.1]). Tests mit Verunreinigungen in der Kontrolle oder nicht eindeutig beurteilbaren MHK/MIC wurden wiederholt.

### 2.3.2) Molekulare Blutkulturdiagnostik

#### 2.3.2.1) Accelerate Pheno® System

Das Accelerate Pheno® System (Accelerate Diagnostics, USA) war zum Studienzeitraum bereits in der routinemäßigen Diagnostik gramnegativer BSI der Intensivstationen des Universitätsklinikums Tübingen eingebunden. Der Einsatz des Accelerate PhenoTest™ BC Kit (Accelerate Diagnostics, USA) war daher bereits etabliert und wurde mit unten genannter Einschränkung nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Es wurde ein System mit zwei Modulen verwendet, was die zeitgleiche Analyse zweier Blutkulturen ermöglichte.

Laut Herstellerempfehlung sollten positive Blutkulturen innerhalb von 8 Stunden zur Analyse durch das Pheno® System bereitgestellt werden. Da dies aufgrund der Betriebszeiten des Labors nicht immer realisierbar war, wurden Blutkulturen bis zu 24 Stunden nach Positivmeldung verwendet.

Tabelle 2.3: Spektrum der im Accelerate PhenoTest™ BC Kit enthaltenen gramnegativen Bakterien. Die Ausgabe des ID-Ergebnisses enthält in einigen Fällen keine genauere Angabe zur exakten Spezies. Die unter dem jeweiligen Überbegriff zusammengefassten Spezies sind in der rechten Spalte aufgeführt.

ID-Ergebnis Ausgabe	Abgebildete Spezies
<i>Escherichia coli</i>	<i>E. coli</i>
<i>Klebsiella sp.</i>	<i>K. oxytoca</i>
	<i>K. pneumoniae</i>
<i>Enterobacter sp.</i>	<i>E. cloacae</i>
	<i>E. aerogenes</i>
<i>Proteus sp.</i>	<i>P. mirabilis</i>
	<i>P. vulgaris</i>
<i>Citrobacter sp.</i>	<i>C. freundii</i>
	<i>C. koseri</i>
<i>Serratia marcescens</i>	<i>S. marcescens</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>

Die praktische Vorbereitung eines PhenoTest™-Laufes umfasste im Wesentlichen das Öffnen und Einlegen der PhenoTest™ BC Kit-Kartuschen in das System und das Befüllen des Teströhrchens mit 5 ml der positiven Blutkultur. Anschließend mussten die Proben benannt werden und das System begann nach einer kurzen Selbstüberprüfung mit dem Testprogramm. Ab diesem Schritt war keine weitere Bedienung durch den Benutzer mehr notwendig. Die an das System angebundene Software Accelerate Diagnostic Host applications (Version 1.3.1.15; Accelerate Diagnostics, USA) generierte nach abgelaufenem Test des Analyten einen Bericht, der direkt am System angezeigt oder in den gängigsten Formaten heruntergeladen werden

konnte. Dieser Bericht umfasste die Identifikation des Erregers sowie ein Antibiogramm mit MHK/MIC der verschiedenen Antibiotika und die daraus jeweils resultierende Einteilung in resistent, intermediär oder sensibel. Die acht im Keimspektrum des PhenoTest™ BC Kits enthaltenen gramnegativen Bakterien und testbaren Antibiotika sind in Tabelle 2.3 und 2.4 aufgeführt.

Tabelle 2.4: AST-Spektrum des Accelerate PhenoTest™ BC Kit für gramnegative Bakterien. Für die verschiedenen gramnegativen Keime werden die durch ein Kreuz gekennzeichneten Antibiotika per morphokinetischer Zellanalyse bezüglich ihrer MIC getestet. Die Abkürzungen in der oberen Bezeichnungsspalte sind unterhalb der Haupttabelle zum besseren Verständnis ausgeschrieben.

ID-Ergebnis	AST-Spektrum											
	SAM	TZP	FEP	CAZ	CRO	ETP	MEM	AMK	GEN	TOB	CIP	ATM
<i>E. coli</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Klebsiella sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Enterobacter sp.</i>		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Proteus sp.</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Citrobacter sp.</i>		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>S.marcescens</i>		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>		X	X	X			X	X	X	X		
<i>A. baumannii</i>		X						X				
	Sulbactam-Ampicillin	Piperacillin-Tazobactam	Cefepime	Ceftazidime	Ceftriaxone	Ertapenem	Meropenem	Amikacin	Gentamicin	Tobramycin	Ciprofloxacin	Aztreonam

### 2.3.2.2) BioFire FilmArray® multiplex PCR System

Das BioFire FilmArray® multiplex PCR System (Biomerieux, Nürtingen) wurde mit dem speziell für die Blutkulturdiagnostik entwickelten Blood Culture Identification (BCID) Panel (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA) verwendet. Die Firma Biomerieux (Nürtingen) stellte das System und die für die Studie benötigten Reagenzien freundlicherweise zur Verfügung.

Auch der Hersteller des BioFire FilmArray® BCID Panel empfiehlt die positiven Blutkulturen innerhalb von 8 Stunden nach der Positivmeldung durch den Inkubator zu testen. Aus oben beschriebenen Gründen (siehe 2.3.2.1) wurde auch hier die Bedingung für das Zeitfenster auf 24 Stunden ausgeweitet.

Tabelle 2.5: Keimspektrum des BioFire FilmArray® BCID Panel. Aufgelisteten sind alle Ergebnisse, die bei der Analyse von positiven Blutkulturen auftreten konnten. Auch polymikrobielle Ergebnisse waren möglich. Übergeordneten Familien zugehörige Spezies und Gruppen sind eingerückt dargestellt. Einige übergeordnete Ergebnisse bedeuteten das potenzielle Vorliegen mehrerer in die jeweilige Gruppe fallender Bakterien. Informationen diesbezüglich und auch bezüglich möglicher Kreuzreaktionen sind im Bedienungshandbuch des BCID Panels detailliert aufgeführt (zu finden unter <https://www.biomerieux-diagnostics.com/biofirer-filmarray-bcid-panel> [Zugriff 25.06.2020]). Das Testergebnis eines Resistenzgenes (Res.-Gen) wurde nur angegeben, wenn die entsprechend identifizierte Spezies eine signifikante Assoziation dazu aufwies. Ø: keine.

Grampositive Bakterien	Res.-Gen	Gramnegative Bakterien	Res.-Gen	Hefen/Candida
Enterococcus	vanA/B	<i>Acinetobacter baumannii</i>	KPC	<i>C. albicans</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ø	<i>Haemophilus influenzae</i>	Ø	<i>C. glabrata</i>
Staphylococcus	mecA	<i>Neisseria meningitidis</i>	Ø	<i>C. krusei</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	mecA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	KPC	<i>C. parapsilosis</i>
Streptococcus	Ø	Enterobacteriaceae	KPC	<i>C. tropicalis</i>
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Ø	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	KPC	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	Ø	<i>Escherichia coli</i>	KPC	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Ø	<i>Klebsiella oxytoca</i>	KPC	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	KPC	
		Proteus	KPC	
		<i>Serratia marcescens</i>	KPC	

Die Vorbereitung des Analyselaufes einer positiven Blutkultur umfassten die Insertion des Reaktionskammerriegels in die dafür vorgesehene Ladestation und die anschließende Hydrierung der Reaktionskammern, gefolgt von der Herstellung der Testlösung. Für diese wurden 0,2 ml der positiven Blutkultur mit dem im Kit enthaltenen Probenpuffer vorsichtig in einem Injektionsröhrchen für die Probe gemischt. Über die Ladestation wurde die Probenmischung anschließend dem Reaktionskammerriegel



zugeführt, welcher nach erfolgter Befüllung in das FilmArray® System gesetzt wurde. Über die Software FilmArray® 2.0 (BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA) konnte nun die Probe benannt und der Lauf gestartet werden.

Jeder Reaktionskammerriegel enthält zwei interne Kontrollen. Nur wenn beide Kontrollen positiv waren, wurde ein Ergebnis des Laufes ausgegeben, ansonsten wurde das Ergebnis vom System als invalide oder fehlgeschlagen angegeben. Eine Wiederholung des Tests wurde in solchen Fällen, wie vom Hersteller empfohlen, durchgeführt.

Sobald der Lauf beendet war, konnten die Ergebnisse über die Software abgefragt und ein Bericht im PDF-Format heruntergeladen werden. Der Bericht umfasste neben Informationen zum Lauf selbst alle detektierten Gattungen und Spezies (gramnegative/grampositive Bakterien und Hefen). Außerdem waren Informationen über das Vorhandensein von für das Isolat möglichen Resistenzgenen (*KPC*, *mecA*, *vanA/B*) aufgeführt. Die im FilmArray® BCID Panel enthaltenen Mikroorganismen und die jeweils zusätzlich getesteten Resistenzgene sind in Tabelle 2.5 zu finden.

### 2.3.2.3) GenMark ePlex® System

Für das ePlex® System (GenMark Diagnostics, Carlsbad, USA) stand ein Tower mit sechs Teststationen bereit. Diese konnten gleichzeitig mit jeweils einer Testkassette beladen werden, sodass zur gleichen Zeit sechs Blutkulturen über das Gerät bearbeitet werden konnten (Oberhettinger et al., 2020). Für die Blutkulturdiagnostik bietet GenMark drei verschiedene Testkassetten für gramnegative Bakterien (BCID-GN; GenMark Diagnostics, Carlsbad, USA), grampositive Bakterien (BCID-GP; GenMark Diagnostics, Carlsbad, USA) und Pilze (BCID-FP; GenMark Diagnostics, Carlsbad, USA) an. RUO (Research Use Only) -Versionen dieser Testkassetten wurden zusätzlich zum System freundlicherweise von der Firma GenMark Diagnostics (Carlsbad, USA) für die Studie bereitgestellt.

Zusätzlich liefen auf der gramnegativen und der grampositiven Kassette Tests ab, welche das Vorhandensein von Organismen der jeweils anderen Grameigenschaft und Pilzspezies prüften und als sogenanntes PAN-Target im Bericht meldeten. Im Falle eines Fehlers beim Lauf oder einer negativen internen Kontrolle wurde der Lauf im

## Material und Methoden

Bericht als fehlgeschlagen oder invalide angegeben und mit einer neuen Kassette wiederholt. Hierfür war es notwendig, dass die ursprüngliche Blutkultur noch zur Verfügung stand und nicht vorzeitig entsorgt wurde.

Tabelle 2.6: GenMark ePlex® BCID Panel Spektrum. Die Tabelle zeigt alle auf den einzelnen Testkassetten BCID-GP, BCID-GN und BCID-FP detektierbaren Organismen und Resistenzgene. Mehrere Organismen als Ergebnis waren möglich. Übergeordneten Familien zugehörige Spezies und Gruppen sind eingerückt dargestellt. Das Testergebnis der Resistenzgene wurde nur bei Bakterien (B.) im Bericht kommentiert, welche generell in relevanter Weise mit dem betreffenden Resistenzgen assoziiert waren.

BCID-GP (grampositive B.)	BCID-GN (gramnegative B.)	BCID-FP (Pilze)
<b>Organismus</b>	<b>Organismus</b>	<b>Organismus</b>
<i>Bacillus cereus</i> group	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>Bacillus subtilis</i> group	<i>Bacteroides fragilis</i>	<i>Candida auris</i>
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Candida dubliniensis</i>
<i>Cutibacterium acnes</i> ( <i>Propionibacterium acnes</i> )	<i>Cronobacter sakazakii</i>	<i>Candida famata</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Enterobacter (non-cloacae complex)</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Enterobacter cloacae complex</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida kefyr</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Candida krusei</i>
<i>Listeria</i> sp.	<i>Fusobacterium necrophorum</i>	<i>Candida lusitanae</i>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Staphylococcus</i> sp.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Cryptococcus gattii</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Morganella morganii</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Neisseria meningitidis</i>	<i>Fusarium</i>
<i>Staphylococcus lugdunensis</i>	<i>Proteus</i> sp.	<i>Rhodotorula</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	<i>Proteus mirabilis</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i> (GBS)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Streptococcus anginosus</i> group	<i>Salmonella</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Serratia</i> sp.	
<i>Streptococcus pyogenes</i> (GAS)	<i>Serratia marcescens</i>	
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	
<b>Resistenzgene</b>	<b>Resistenzgene</b>	
<i>mecA</i>	CTX-M	
<i>mecC</i>	KPC	
<i>vanA</i>	NDM	
<i>vanB</i>	VIM	
	IMP	
	OXA	

Blutkulturen, die nicht länger als 24 Stunden positiv gemeldet waren und den grundsätzlichen Einschlusskriterien der Studie entsprachen, wurden im ePlex® System getestet. Welche der drei verschiedenen BCID Testkassetten hierbei verwendet wurde, war in erster Linie durch das Ergebnis der Gramfärbung festgelegt. Mit einer Pipette wurden 50 µl aus der Blutkulturflasche in die dafür vorgesehene Öffnung der Kassette geimpft. Anschließend wurde diese verschlossen und die Testkassette in eine der Teststationen am Gerät eingeführt. Die integrierte Software des ePlex® Systems erstellte entsprechende Berichte der einzelnen Läufe vollautomatisch und stellte diese zur direkten Betrachtung am System oder zum Herunterladen in verschiedenen gängigen Formaten bereit. Diese Berichte umfassten die Identifikation des Erregers sowie gegebenenfalls den Nachweis von Resistenzgenen.

Das breite Keimspektrum der BCID Kassetten ist in Tabelle 2.6 dargestellt. Die BCID-GN und BCID-GP Kassetten lieferten auch Ergebnisse hinsichtlich einiger Resistenzgene, diese sind ebenfalls Tabelle 2.6 zu entnehmen.

### 2.3.2.4) *mecA* und *vanA/B* PCR in der Routinediagnostik („in house“)

Bereits etablierte Methoden der molekularen Schnell Diagnostik waren die routinemäßig durchgeführten PCR zur Überprüfung des Vorhandenseins spezifischer Resistenzgene für Oxacillin und Vancomycin. Beim morphologischen Verdacht auf *S. aureus* wurde dabei durch das Laborpersonal sowohl eine PCR zum Nachweis des für *S. aureus* spezifischen *nuc* Genes (Ecker et al., 2010), als auch eine PCR, die das Vorhandensein von *mecA* prüft, von Probenmaterial direkt aus der positiven Blutkultur durchgeführt. Im Falle eines *S. aureus* Nachweises konnte, je nach Nachweisbarkeit des *mecA* Genes, der Vorbefund MSSA oder MRSA an das behandelnde Team übermittelt werden. Isolate aus Blutkulturen mit Verdacht auf *S. aureus*, welche unter anderem am Wochenende nicht mit Hilfe der PCR auf *mecA* untersucht wurden, konnten im Sinne der Studie großteils nachträglich ergänzt werden. Zu diesem Zweck wurden die standardmäßig eingefrorenen Stämme aufgetaut und auf Blutagarplatten kultiviert. Anschließend konnten die entsprechenden PCR durch das Routinelaborpersonal durchgeführt werden.

Beim Vorliegen des phänotypischen Verdachts auf einen VRE wurde in der Routinediagnostik analog zum Vorgehen bei *S. aureus* das Vorhandensein der Resistenzgene *vanA* und *vanB* getestet. Im Rahmen der Studie wurden sämtliche Enterokokken nachträglich auf *vanA* und *vanB* per PCR getestet, um die Ergebnisse der Geräte im Studienarm zu vergleichen.

Alle PCR wurden mit Primern der Firma Tib Molbiol GmbH (Berlin) auf einem T3 Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Die Oligonukleotidsequenzen der *mecA* Primer wurden von Reischl und Kollegium etabliert (Reischl et al., 2000). Primer für *vanA* und *vanB* wurden nach den Sequenzen von Bell und Kollegium synthetisiert (Bell et al., 1998). Die Amplifikate der jeweiligen PCR wurden mittels Gelelektrophorese analysiert.

### 2.3.3) Definition des Goldstandards

Als Goldstandard wurde die kulturbasierte Diagnostik von positiven Blutkulturen definiert (Abbildung 2.2). Diese beinhaltet die Anzucht von Subkulturen und deren Identifizierung mittels MALDI-TOF MS. Wenn in einzelnen Fällen eine Identifizierung über MS nicht möglich war, so wurden weitere diagnostische Tests durchgeführt. Hierzu zählten die VITEK® 2 Identifizierung, die Durchführung standardisierter spezifischer Tests und in letzter Instanz die universelle 16S-rRNA PCR mit anschließender Sequenzierung (Abbildung 2.2 – ID). Diese Definition richtet sich nach dem Standardvorgehen des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT (2.3.1.1; Abbildung 2.1).

Für die Resistenzbestimmung wurden die routinemäßig durchgeführte VITEK® 2 AST (2.3.1.2.1), der Agardiffusionstest (2.3.1.2.2), sowie die E-Tests (2.3.1.2.3), welche letztlich in den Befund der medizinisch mikrobiologischen Diagnostik einfließen, als Goldstandard definiert (Abbildung 2.2 – AST). Alle diese Tests setzten eine vorherige Subkultivierung der positiven Blutkulturen voraus. In der Routinediagnostik teilweise direkt aus positiven Blutkulturen als Schnell diagnostik durchgeführte „in house“ PCR (siehe 2.3.2.4), konnten aufgrund der großen Erfahrung mit diesen Tests als Vergleichswert für die Ergebnisse der nicht etablierten Methoden genutzt werden.

Explizit verwendet wurden in diesem Rahmen die PCR für *mecA*, *vanA* und *vanB*. Sie definieren jedoch nicht das Goldstandartergebnis, da sie nur Vorbefunde für den Kliniker liefern, welche im Anschluss noch validiert werden müssen.

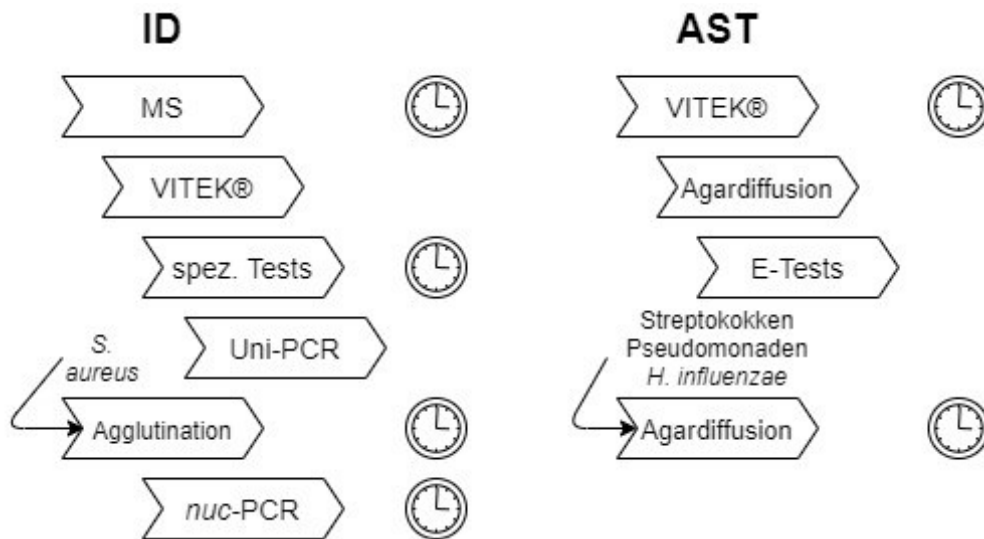


Abbildung 2.2: Hierarchie der Goldstandartergebnisse. Bei ausbleibendem Ergebnis aus der Methode der Wahl, wurden der Reihenfolge nach (von links nach rechts/oben nach unten) Ergebnisse verwendet, die weiter unten in der Hierarchie lagen. Für die Bestimmung der Zeit zum Identifizierungsergebnis (ID), beziehungsweise zum Ergebnis der Suszeptibilitätstestung (AST), wurden mit einer Uhr markierte Ergebnisse als gleichwertig betrachtet und jeweils das hiervon frühzeitige Ergebnis für die Auswertung verwendet. Spez.: spezifische; MS: Massenspektroskopie; PCR: Polymerase-Kettenreaktion; E-Test: Epsilonometer

#### 2.3.4) Datensammlung

Um die in dieser Studie benötigten Daten zu sammeln, wurde eine Tabelle mit Microsoft® Excel (Microsoft® Professional Plus 2010 Version 14.0.7212.5000, Microsoft® Corporation, Redmond, Washington) angelegt. Sämtliche in der Studie eingeschlossenen Blutkulturen wurden in die Tabelle aufgenommen. Als in der Studie eingeschlossene Blutkulturen galten alle, die im FilmArray® und ePlex® getestet wurden. Zusätzlich sollten Blutkulturen mit gramnegativen Organismen auch im

Pheno® getestet worden sein. Über die intern verwendeten Auftragsnummern konnten die Testläufe der betreffenden Blutkultur zugeordnet werden. Die jeweiligen Befunde und Details zum Testlauf konnten auf allen Geräten über die jeweilige Software heruntergeladen werden und manuell in die Tabelle eingepflegt werden. Mehrfache Tests einer einzelnen Blutkultur, beispielsweise aufgrund von invaliden Kontrollen, wurden in die Tabelle vollständig mit aufgenommen. Anschließend wurden anhand der Auftragsnummern die Daten über die eingeschlossenen Blutkulturen aus der institutsinternen SWISLAB Laborinformationsplattform (Roche Deutschland Holding GmbH, Berlin) ausgelesen. Dabei wurden alle wesentlichen Details über die Blutkultur, deren Bearbeitung in der Routinediagnostik sowie deren relevanten Goldstandardergebnisse manuell in die Tabelle aufgenommen. Voraussetzung für die Übernahme von Daten aus der SWISLAB-Plattform war ein für die jeweilige Auftragsnummer vorliegender Endbefund. Diese Information konnte ebenfalls der SWISLAB-Plattform entnommen werden. Es wurden keine patientenbezogenen Daten übernommen und die internen Auftragsnummern wurden pseudonymisiert. Der so entstandene Datensatz wurde als Grundlage für alle weiteren Auswertungsschritte verwendet.

Folgende Daten wurden in der Excel-Tabelle erfasst, welche die Grundlage für die Datenauswertung darstellte: Ergebnisse der Schnelltests und der Goldstandarddiagnostik in Bezug auf Identifikation und Resistenztestung (inklusive MHK/MIC) sowie Zeit bis zum Vorliegen des jeweiligen Ergebnisses.

### 2.3.5) Datenanalyse

#### 2.3.5.1) Vergleich der Identifizierungsergebnisse

Die Ergebnisse der Identifizierungen durch die Schnelltestsysteme ePlex®, FilmArray® und Pheno® wurden mit den entsprechenden Ergebnissen der als Goldstandard definierten Routinediagnostik verglichen. Dabei wurde jeweils die Identifizierung auf Gattungs- und auf Speziesebene separat beurteilt. Bei Übereinstimmung in der betreffenden Kategorie lag ein korrekt positives Ergebnis (TP)

vor. Als korrekt negativ (TN) wurde jedes Ausbleiben eines Identifizierungsergebnisses gewertet, welches nicht durch das Keimspektrum des Testsystems erfassbar war, zuzüglich derer Ergebnisse, die korrekterweise nicht der entsprechenden Überordnung (grampositive/gramnegative Bakterien oder Pilze) zugeordnet wurden. Ein nicht mit dem Goldstandard übereinstimmendes Identifizierungsergebnis dagegen wurde als falsch positive (FP) Identifizierung definiert. Als falsch negatives Ergebnis (FN) wurde eine nicht erfolgte und somit nicht übereinstimmende Identifizierung, bei durch das Keimspektrum abgedeckter Gattung oder Spezies, beurteilt (Oberhettinger et al., 2020).

### 2.3.5.2) Berechnung von Sensitivität und Spezifität der einzelnen Systeme im Vergleich zum kulturbasierten Goldstandard

Die Sensitivität und Spezifität der drei untersuchten Schnelltestsysteme zur Identifizierung von Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen wurden jeweils für gramnegative Bakterien, grampositive Bakterien und Pilze bestimmt. Dabei erfolgte eine Bestimmung der beiden Parameter a) in Bezug auf alle im jeweiligen System getesteten Proben und b) bezogen auf die im Keimspektrum des betreffenden Systems abgedeckten Gattungen und Spezies.

Die Berechnung für die Sensitivität bei a) erfolgte aus der Anzahl der korrekt positiven Ergebnisse (TP) geteilt durch die Anzahl aller im Goldstandard identifizierten Isolate. Für b) ergab sich die Sensitivität als Quotient aus den korrekt identifizierten Ergebnissen (TP) im jeweiligen System und der Summe aus korrekt positiven (TP) und falsch negativen Ergebnissen (FN). Dabei wurde die Sensitivität jeweils für Identifizierungen auf Speziesebene und Gattungsebene berechnet. Zur Berechnung auf Speziesebene wurden nur Blutkulturen eingeschlossen, welche im Goldstandard bis auf Speziesebene identifiziert wurden. Das alleinige Vorliegen der Identifizierung bestimmter Gruppen wurde dabei nicht als Speziesebene gewertet.

Um die Spezifität der Testsysteme zu ermitteln, wurde im Sinne von b) der Quotient aus korrekt negativen Ergebnissen (TN) und der Summe aus korrekt negativen (TN) plus falsch positiven (FP) Ergebnissen gebildet (Oberhettinger et al., 2020). Hier wurde ebenfalls zwischen der Identifizierung auf Gattungsebene und auf Speziesebene

unterschieden. Eine Bestimmung wie in a) beschrieben konnte in dieser Weise nicht erfolgen, da keine im Goldstandard negativen Ergebnisse in der Studie vorlagen.

### 2.3.5.3) Bestimmung der Dauer bis zum Vorliegen von Ergebnissen

Anhand der Zeiten, an denen Bearbeitungen oder Tests starteten, und Zeiten, an denen entsprechende Ergebnisse vorlagen, wurden Bearbeitungszeiten berechnet. Da aus SWISLAB nicht der genaue Zeitpunkt des Bearbeitungsbeginns einer positiven Blutkultur ersichtlich war, wurde hierfür eine 30 Minuten nach dem Zeitpunkt der Positivmeldung liegende Uhrzeit festgelegt. Bei Blutkulturen, die gegen Ende oder außerhalb der Betriebszeiten des Labors positiv gemeldet wurden, konnte der Zeitpunkt des Bearbeitungsbeginns in Korrelation mit dem entsprechenden Zeitpunkt des Ergebnisses der Gramfärbung auf den folgenden Betriebsstart (7:30 Uhr) abgeschätzt werden. Obwohl diese aus Erfahrungen abgeleiteten Näherungen der Realität sehr nahekommen, folgt daraus eine gewisse Ungenauigkeit der berechneten Zeiten, sodass bei der Auswertung die Darstellung in vollendeten Stunden ab Bearbeitungsbeginn gewählt wurde. Ergebnisse, bei denen der genaue Zeitpunkt des entsprechenden Endergebnisses nicht klar nachvollziehbar waren, wurden in diesen Teil der Auswertung nicht miteinbezogen. Für die Berechnung der Zeit bis zum Identifizierungsergebnis der Goldstandardmethode wurde dabei jeweils möglichst der Zeitpunkt gewählt, an welchem das Ergebnis technisch vorlag (Abbildung 2.2). Bei *S. aureus* wurde ein positiver Nachweis des *nuc* Genes durch die entsprechende PCR (2.3.2.4) als maßgebend für den Zeitpunkt der Identifizierung gewählt. Da an Wochenenden diese Diagnostik nicht durchgeführt wurde, galt hier auch der Zeitpunkt des vorliegenden endgültigen Ergebnisses des Agglutinationstests und der MALDI-TOF MS als Goldstandard (Abbildung 2.2). Dieses Ergebnis wurde generell, auch an Werktagen, als Goldstandard der Identifizierung verwendet, musste also das vorläufige Ergebnis der PCR in allen Fällen bestätigen.

Bei ePlex®, FilmArray® und Pheno® wurde die genaue Zeit des Testlaufs zuzüglich der jeweiligen „Hands-on-time“ für das entsprechende Gerät berechnet. Die „Hands-on-time“ wurde dabei nicht explizit gemessen, sondern aus der Erfahrung mit den Systemen auf jeweils zwei Minuten geschätzt. Daraus wurde im Anschluss bestimmt,



wieviel Zeit die einzelnen Tests durchschnittlich bis zum Vorliegen von Ergebnissen benötigten.

#### 2.3.5.4) Vergleich von antimikrobiellen Suszeptibilitätstestungen (AST)

Die Auswertung der Suszeptibilitätstestungen erfolgte getrennt, da das Accelerate Pheno® zellmorphologisch bestimmte MIC (MHK) lieferte und somit direkt mit den AST der Goldstandarddiagnostik verglichen werden konnte. Dies wurde für alle sowohl im Goldstandard als auch im Pheno® erfolgreich getesteten Antibiotika pro Isolat durchgeführt. Voraussetzung dafür war eine korrekte Identifizierung des Isolats. In erster Linie wurde die Interpretation der MIC im Sinne der Kategorie-Übereinstimmung verglichen. Die Beurteilung von Diskrepanzen wurde wie bereits 1980 von Thornsberry und Kollegium beschrieben vorgenommen (Thornsberry et al., 1980). Eine Erläuterung dieser Beurteilung ist in Tabelle 2.7 zu finden.

Tabelle 2.7: Beurteilung von Diskrepanzen zwischen Accelerate Pheno® und Goldstandard bei der Resistenztestung nach der Definition durch Thornsberry und Kollegium (1980).

<b>Fehler Beurteilung</b>	<b>Pheno® Interpretation/Kategorie</b>	<b>Goldstandard Interpretation/Kategorie</b>
sehr schwerwiegender Fehler	sensibel	resistent
schwerwiegender Fehler	resistent	sensibel
geringer Fehler	intermediär	sensibel/resistent
geringer Fehler	sensibel/resistent	intermediär

Dahingegen wurden die Ergebnisse für den Nachweis der Resistenzgene im ePlex® und FilmArray® System einerseits zwischen den beiden Systemen und andererseits mit dem Ergebnis des Goldstandards (kulturbasierte Resistenztestung – AST) der jeweils betreffenden Antibiotika abgeglichen. Dabei wurde überprüft ob bei Vorliegen einer Resistenz (Beurteilung der MIC nach EUCAST „resistent“ oder „intermediär“) ein

entsprechendes Resistenzgen im jeweiligen Testgerät nachgewiesen wurde. Außerdem wurde die Übereinstimmung der Resistenzgenergebnisse zwischen den Systemen geprüft. Bei Staphylokokken wurde das im Goldstandard erfasste Verhalten des Isolats gegenüber Oxacillin mit den Ergebnissen für *mecA* und *mecC* aus FilmArray® und ePlex® ins Verhältnis gesetzt. Analog dazu wurde das Verhalten gegenüber Vancomycin mit den Schnelltestergebnissen für *vanA* und *vanB* abgeglichen. Bei relevanten gramnegativen Bakterien wurden die Ergebnisse für KPC und CTX-M der Empfindlichkeit hinsichtlich gängiger Carbapeneme, beziehungsweise 3-GC und 4-GC, gegenübergestellt. Details hierzu sind der Tabelle 2.8 zu entnehmen.

Tabelle 2.8: Auswertungsschema der Resistenzgene. Die im FilmArray® und ePlex® bei relevanten Keimen getesteten Resistenzgene wurden mit den aus der Tabelle ersichtlichen Antibiotika der Goldstandard-AST abgeglichen. Die Goldstandard-AST ESBL entstammte dem Agardiffusionstest Set AmpC/ESBL und war nur in einzelnen Fällen verfügbar, bei denen eine Resistenz gegenüber Cephalosporinen der 3. Generation (3-GC) im kulturbasierten Antibiogramm vorlag. Ergebnisse hierfür lagen als ESBL-Status positiv (+) oder negativ (-) vor. 4-GC: Cephalosporine der 4. Generation.

Relevante Bakterien	FilmArray®	ePlex®	Goldstandard AST
Enterokokken	<i>vanA/B</i>	<i>vanA</i>	Vancomycin
		<i>vanB</i>	
Staphylokokken	<i>mecA</i>	<i>mecA</i>	Oxacillin
		<i>mecC</i>	
Enterobacterales, Nonfermenter	KPC	KPC	Imipenem
			Meropenem
			Ertapenem
		CTX-M	Cefepim (4-GC)
			Ceftazidim (3-GC)
			ESBL (+/-)

Des Weiteren wurden die Ergebnisse der „in house“ PCR für *mecA*, *vanA* und *vanB* zur Bestätigung der entsprechenden Ergebnisse des ePlex® und FilmArray® herangezogen. Das ePlex® BCID-GN Panel überprüft noch weitere Resistenzgene (NDM, VIM, IMP, OXA), diese wurden jedoch in keiner der Blutkulturen detektiert und wurden daher im Rahmen der Auswertung nicht näher betrachtet. Ebenso wurden Bakterien, die von keiner der Testmethoden identifiziert werden konnten, aus diesem Teil der Auswertung ausgeschlossen.

### 2.3.6) Retrospektive Blutkulturenstatistik

Um zu überprüfen, ob die in der Studie eingeschlossenen Isolate repräsentativ für das Spektrum der lokal häufig in Blutkulturen detektierten Keime waren, wurden die Ergebnisse der Blutkulturdiagnostik für die Jahre 2015, 2016 und 2017 des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT erfasst und ausgewertet. Diese stammten sowohl aus sämtlichen Abteilungen des UKT als auch der BG Unfallklinik Tübingen. Ergebnisse wurden mit Hilfe der Software HyBase®-Klinik (epiNET AG, Bochum) aus der SWISSLAB Laborinformationsplattform (Roche Deutschland Holding GmbH, Berlin) abgefragt und in eine Microsoft® Excel-Tabelle (Microsoft® Professional Plus 2010 Version 14.0.7212.5000, Microsoft Corporation, Redmond, Washington) eingepflegt. Die Abfrage umfasste dabei alle Isolate aus allen Arten von Blutkulturen (keine Unterscheidung zwischen mono-/polymikrobiellen und keine Unterscheidung zwischen aeroben/anaeroben/Pilz Flaschen). Pro Patient wurde jeweils ein gleichartiges Isolat gezählt, selbst wenn derselbe Erreger in mehreren Blutkulturen des Patienten nachgewiesen wurde. Auch die weitere Bearbeitung der erhaltenen Rohdaten erfolgte mit Microsoft® Excel. Zunächst wurden die Ergebnisse in Übergruppen sortiert und namentlich unterschiedliche, jedoch gleichbedeutende Ergebnisse zusammengefasst. Anschließend wurden die Kategorien „Blutkultur positiv“, „Blutkultur negativ“, „Blutkultur positiv ohne Erregernachweis“ und „Blutkultur positiv mit Erregernachweis“ erstellt und entsprechende Ergebnisse zugeordnet. Bei der Kategorie „Blutkultur positiv mit Erregernachweis“ wurden die enthaltenen Ergebnisse anschließend je nach Zugehörigkeit zu gramnegativen Bakterien, grampositiven Bakterien oder Pilzen sortiert. Innerhalb dieser Gruppierungen wurden

größere und relevante Erregerfamilien zusammengefasst und deren quantitatives Vorkommen in den einzelnen Jahren berechnet. Des Weiteren wurde der Durchschnitt berechnet. Klinisch besonders relevante Erreger wie MRSA, VRE, sowie häufige Spezies einer Familie (beispielsweise *K. pneumoniae*) wurden zudem auch separat verglichen. Mit Hilfe der Software wurden die Summen der häufigsten Familien und deren wichtigste Vertreter in allen drei Jahren, im Durchschnitt (Mittelwert) und in den einzelnen Jahren berechnet. Mittelwerte wurden auf die nächste ganze Zahl gerundet. Die Standardabweichung der Grundgesamtheit wurde zu den jeweiligen Mittelwerten bestimmt.

Streptokokken wurden nach ihren Hämolyseeigenschaften gruppiert, Staphylokokken nach dem Vorhandensein von Koagulase sowie einer Methicillin-Resistenz.

Grampositive Isolate aus der Familie Abiotrophia wurden nicht den Streptokokken zugeordnet, sondern separat ausgewertet. Gramnegative Bakterien aus den Familien Flavimonas und Sphingomonas wurden ebenfalls separat betrachtet und nicht der Familie der Pseudomonaden zugerechnet.

Alle Erregerfamilien und -spezies, die in ihrer Gesamtheit  $\leq 2\%$  der maximalen jährlichen Anzahl an identifizierten Erregern einer Gruppe ausmachten, wurden für die Auswertung und Darstellung in die Gruppe „andere“ zusammengefasst. In der Gruppe der Pilze wurde diese Grenze, aufgrund der generell geringeren Häufigkeit von Pilzen in den positiven Blutkulturen, bei weniger als drei Isolaten insgesamt in den Jahren 2015 bis 2017 gesetzt.

,

### 3) Ergebnisse

#### 3.1) Quantitative Einteilung der eingeschlossen positiven Blutkulturen

Insgesamt 158 durch die Routinediagnostik am UKT identifizierte und auf ihre Suszeptibilität gegenüber den gängigen Antibiotika getestete Bakterien und Pilze aus positiven Blutkulturen wurden in die zwischen November 2017 und Januar 2018 durchgeführte Studie aufgenommen. Dabei handelte es sich bei 85 % (n = 134) der Isolate um Bakterien aus monomikrobiellen Reinkulturen (Abbildung 3.1, blaues Segment des großen Kreises). Davon waren 73 % (n = 98) grampositive Bakterien und 27% (n = 36) gramnegative Bakterien. Aus acht (5,4 %) polymikrobiellen Mischkulturen wurden 11 % (n = 18) der Mikroorganismen isoliert, wobei zwei bis vier unterschiedliche Bakterienspezies je Blutkultur identifiziert wurden. Hiervon waren 22 % (n = 4) gramnegativ und 78 % (n = 14) grampositiv. Reinkulturen von Sprosspilzen machten 4 % (n = 6) der identifizierten Mikroorganismen aus (Abbildung 3.1, gelbes Segment des großen Kreises).

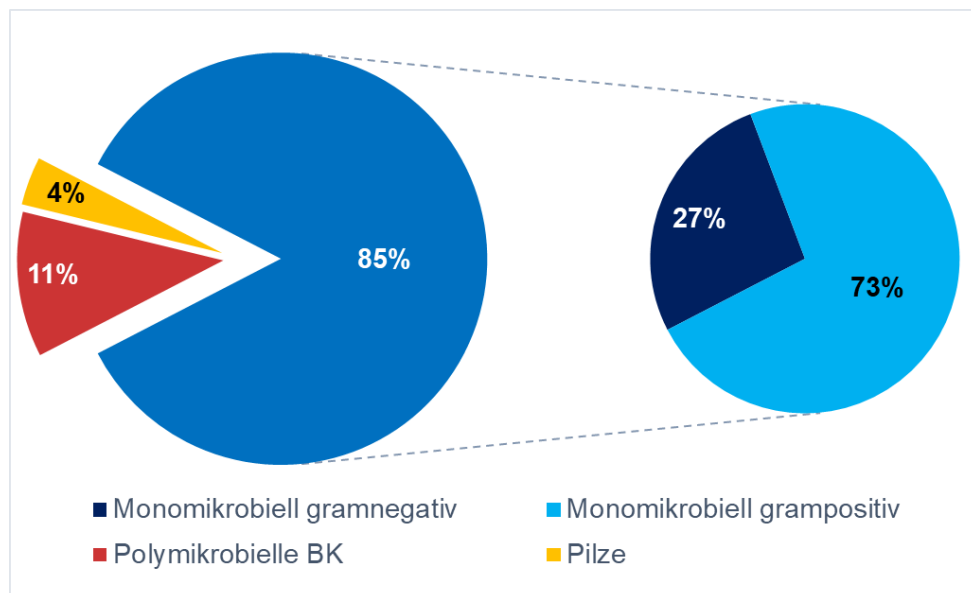


Abbildung 3.1: Einteilung und Verteilung der im Rahmen der Studie aus positiven Blutkulturen (BK) isolierten Keime (n = 158). Dargestellt sind die prozentualen Anteile einzelner Isolate. Die Kategorisierung richtet sich nach der Isolation aus einer mono- oder polymikrobiellen Blutkultur sowie nach den Eigenschaften des Mikroorganismus. Blaues Segment des großen Kreises: Gesamter Anteil der Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen.

### 3.2) Identifizierung positiver Blutkulturen

#### 3.2.1) Identifizierung grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen

##### 3.2.1.1) Spektrum und Verteilung grampositiver Bakterien im Studienrahmen

In die vorliegende Studie wurden insgesamt 98 grampositive Bakterien aus positiven, monomikrobiellen Blutkulturen eingeschlossen. Die Verteilung und das Spektrum dieser Bakterien sind in Abbildung 3.2 dargestellt.

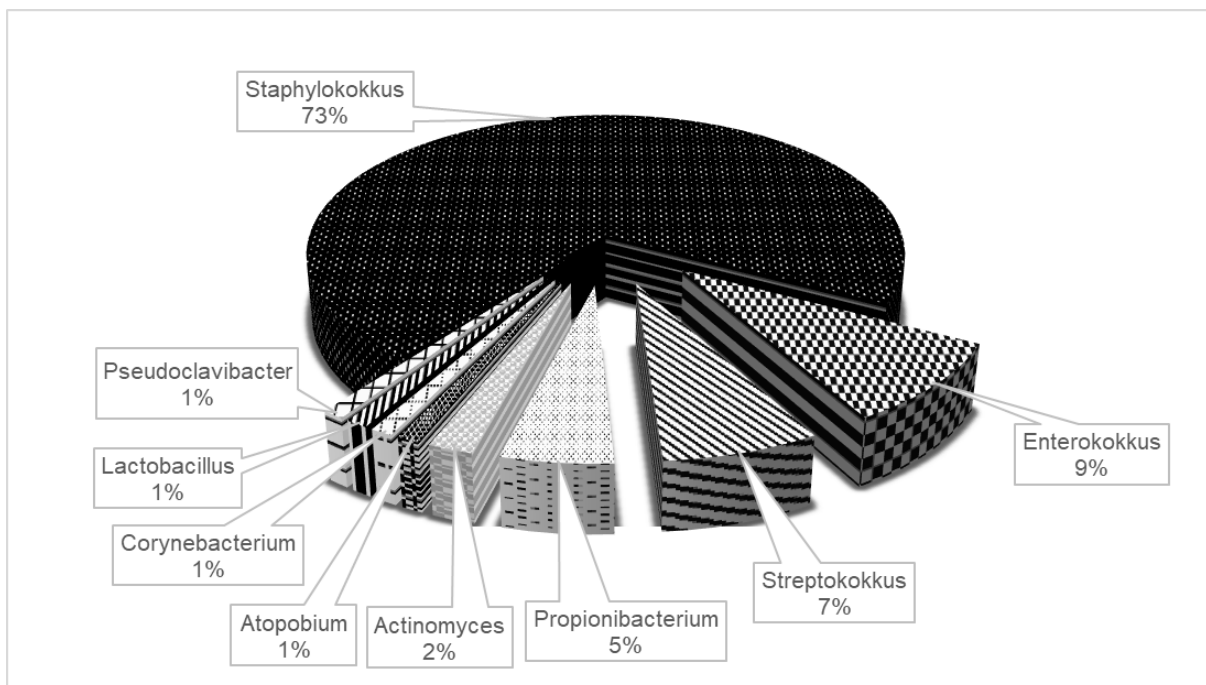


Abbildung 3.2: Grampositives Keimspektrum bei monomikrobiellen Blutkulturen im Studienrahmen. Dargestellt sind das Spektrum und die prozentuale Verteilung der 98 in die Studie eingeschlossenen grampositiven Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen. Die genauen Spezies innerhalb der einzelnen Familien sind Tabelle 3.1 zu entnehmen.

Die mit Abstand am häufigsten identifizierten Isolate entstammten der Familie der Staphylokokken (n = 71; 73 %). Hiervon gehörten knapp über 50 % der Spezies *Staphylococcus epidermidis* an (Tabelle 3.1). Ein Viertel der identifizierten Staphylokokken gehörten zur klinisch sehr relevanten Spezies *Staphylococcus aureus* (n = 18). Des Weiteren enthielten einige Blutkulturen *Staphylococcus haemolyticus* (n = 8) und *Staphylococcus hominis* (n = 6). Aus je zwei Blutkulturen konnte *Staphylococcus capitis* und *Staphylococcus warneri* isoliert werden (Tabelle 3.1).

Die Familie der Enterokokken war mit 9 % (n = 9) am zweithäufigsten vertreten. Dabei wurden etwa gleich häufig die Spezies *Enterococcus faecalis* (n = 5) und die Spezies *Enterococcus faecium* (n = 4) identifiziert (Tabelle 3.1).

Streptokokken wurden in 7 % (n = 7) der grampositiven monomikrobiellen Blutkulturen identifiziert. Es stellte sich eine sehr heterogene Verteilung der einzelnen Streptokokkenspezies dar (Tabelle 3.1). In einer Blutkultur wurde *Streptococcus pneumoniae* identifiziert, des Weiteren wurden vergrünende (orale) Streptokokken sowie Gruppe C und Gruppe D Streptokokken isoliert.

Der klassische Hautkeim *Propionibacterium acnes* wurde in 5 % (n = 5) der positiven monomikrobiellen Blutkulturen festgestellt.

Die verbleibenden 6 % (n = 6) der grampositiven Isolate aus monomikrobiellen Blutkulturen setzen sich aus seltenen Erregern und Bakterien mit eher geringer klinischer Bedeutung zusammen. Sie umfassten *Actinomyces sp.* (n = 2), *Atopobium parvulum* (n = 1), *Corynebacterium sp.* (n = 1), *Lactobacillus sp.* (n = 1) und *Pseudoclavibacter faecalis* (n = 1).

### 3.2.1.2) Identifizierung grampositiver Bakterien in monomikrobiellen Blutkulturen durch FilmArray® und ePlex®

Die Identifizierungsergebnisse bei grampositiven Bakterien in monomikrobiellen Blutkulturen durch die kulturbasierte Routinediagnostik (Goldstandard), das Biofire FilmArray® System und das GenMark ePlex® System sind im Einzelnen Tabelle 3.1 zu entnehmen. Eine übersichtliche Darstellung des Abschneidens beider Systeme bei der Identifizierung grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen ist in Abbildung 3.3 zu finden.

## Ergebnisse

Tabelle 3.1: Identifizierte grampositive Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch Goldstandarddiagnostik, FilmArray® und ePlex®. Alle Bakterienspezies und deren übergeordnete Familien sind abgebildet. Die Anzahl (n) der identifizierten Isolate einer Familie oder Spezies in der Goldstandarddiagnostik ist jeweils den Ergebnissen der Studiengeräten FilmArray® und ePlex® gegenübergestellt. Besonderheiten werden in den jeweiligen Kommentarzeilen erwähnt. „off-Panel“: Die Bakterienspezies und/oder -familie war im Spektrum der Testmodalität nicht enthalten. Gr.: Gruppe; bez.: bezeichnet; zus.: zusätzlich.

ID nach Goldstandard	Goldstandard		Biofire FilmArray®			GenMark ePlex®		
	n	Kommentar	n	%	Kommentar	n	%	Kommentar
<i>Staphylococcus sp.</i>	71		70	98,6	1x <i>S. warneri</i> nicht erkannt	70	98,6	1x <i>S. haemolyticus</i> nicht erkannt
<i>S. aureus</i>	18		18	100		18	100	1x zus. <i>Micrococcus sp.</i> erkannt
<i>S. epidermidis</i>	35		0	0	"off-Panel"	37	100	1x <i>S. hominis</i> , 1x <i>S. warneri</i>
<i>S. capitis</i>	2		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>S. haemolyticus</i>	8		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>S. hominis</i>	6		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>S. warneri</i>	2		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Enterococcus sp.</i>	9		9	100		9	100	
<i>E. faecalis</i>	5		0	0	"off-Panel"	3	60	
<i>E. faecium</i>	4		0	0	"off-Panel"	6	100	2x <i>E. faecalis</i> , 1x zus. <i>Staphylococcus sp.</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	7		7	100		7	100	
<i>S. pneumoniae</i>	1		1	100		1	100	
<i>S. anginosus</i>	1		0	0	"off-Panel"	1	100	<i>S. anginosus</i> Gr.
<i>S. gallolyticus</i>	2		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>S. oralis</i>	1		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>S. mitis</i> Gruppe	1	nicht näher bez.	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
β-häm. Gruppe C	1	nicht näher bez.	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Propionibacterium acnes</i>	5		0	0	"off-Panel"	5	100	
<i>Actinomyces sp.</i>	2	1x <i>A. meyeri</i> , 1x Gattungsebene	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel", gramneg. PAN
<i>Atopobium parvulum</i>	1		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Corynebacterium sp.</i>	1	Gattungsebene	0	0	"off-Panel"	1	100	
<i>Lactobacillus sp.</i>	1	Gattungsebene	0	0	"off-Panel"	1	100	
<i>Pseudoclavibacter faecalis</i>	1	ID via Uni-PCR	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<b># erkannte Grampositive</b>	<b>98</b>		<b>86</b>	<b>87,8</b>		<b>93</b>	<b>94,9</b>	



### 3.2.1.2.1) Staphylokokken

Von den 71 Bakterien der Familie Staphylokokkus erkannten sowohl das FilmArray® System als auch das ePlex® System 98,6 % (n = 70). Dabei konnte das FilmArray® ein Bakterium der Spezies *S. warneri* nicht detektieren, das ePlex® erkannte in einer anderen Blutkultur das Bakterium *S. haemolyticus* nicht. *S. aureus* wurde hingegen von beiden Systemen immer erkannt (n = 18). In einer der monomikrobiellen Blutkulturen mit *S. aureus* erkannte das ePlex® System zusätzlich ein Bakterium der Familie Mikrokokkus.

Das ePlex® kann im Gegensatz zum FilmArray® die Spezies *Staphylococcus epidermidis* identifizieren. Dies gelang in 100 % der Fälle, allerdings wurden ein *S. hominis* und ein *S. warneri* irrtümlich als *S. epidermidis* identifiziert. Alle weiteren Spezies (n = 18; 25 % der identifizierten Staphylokokken) wurden von beiden Systemen nur als *Staphylococcus sp.* identifiziert.

### 3.2.1.2.2) Enterokokken

Sowohl das FilmArray® als auch das ePlex® konnten alle neun Enterokokken erfolgreich identifizieren. Das ePlex® System bietet hier zusätzlich die Möglichkeit zur Identifizierung der beiden vertretenen Spezies *E. faecalis* und *E. faecium*. Allerdings wurden zwei von fünf (40 %) der *E. faecalis* fälschlicherweise als *E. faecium* erkannt (Oberhettinger et al., 2020) (Tabelle 3.1), was die Genauigkeit der Differenzierung hier in Frage stellt und aufgrund der unterschiedlichen Therapieregime von klinischer Relevanz sein kann.

### 3.2.1.2.3) Streptokokken

Auch bei den Streptokokken lieferten beide Systeme gute Ergebnisse und erkannten alle Vertreter der Familie Streptokokkus als solche. Die in einer Blutkultur detektierten Pneumokokken wurden von beiden Systemen erfolgreich auf Speziesebene identifiziert. Alle weiteren Streptokokken konnte das FilmArray® per se nicht auf Speziesebene detektieren, da diese im abgebildeten Keimspektrum nicht enthalten sind. Das ePlex® System kann zusätzlich Vertreter der *Streptococcus anginosus* Gruppe identifizieren. Dies gelang bei einem Isolat, das in der kulturbasierten Goldstandarddiagnostik als *S. anginosus* identifiziert wurde (Tabelle 3.1).

#### 3.2.1.2.4) Weitere grampositive Bakterien

Keine der übrigen Bakterienfamilien und Spezies (n = 11) waren im Keimspektrum des FilmArray® BCID enthalten, sodass hier erwartungsgemäß in keiner der Blutkulturen ein Keim identifiziert wurde. Bei allen insgesamt fünf monomikrobiellen Blutkulturen, in welchen nach Goldstandard *Propionibacterium acnes* nachgewiesen wurde, kam das ePlex® zur korrekten Identifizierung auf Speziesebene. Außerdem konnten die auf der BCID-GP Kassette abgedeckten Bakterien der Familien Corynebacteriaceae und Lactobacillaceae jeweils korrekt erkannt werden (Tabelle 3.1). Die verbleibenden 4 % der Blutkulturen führten auch beim ePlex® zu keiner Identifizierung, da sie im Keimspektrum nicht vorhanden waren. Bei einem per MS als *Actinomyces meyeri* identifizierten Bakterium erkannte das ePlex® den Hinweis auf einen gramnegativen Organismus, welcher allerdings in keiner anderen Methode nachgewiesen wurde.

#### 3.2.1.2.5) Vergleich der Gesamtergebnisse bei grampositiven Bakterien

Insgesamt konnte das FilmArray® BCID bei 87,8 % der grampositiven monomikrobiellen Blutkulturen eine korrekte Identifizierung mindestens auf Familienebene erreichen (Oberhettinger et al., 2020). Dem ePlex® System gelang dies in 94,9 % der Fälle, wobei sich dieser Vorteil durch das gegenüber dem FilmArray® erweiterte Keimspektrum ergab (vgl. Tabelle 3.1 und Abbildung 3.3). Bei den von beiden Systemen detektierbaren Staphylokokken, Enterokokken und Streptokokken zeigte keines der Geräte einen Vorteil auf Familienebene. Beide konnten 98,6 % der Staphylokokken sowie 100 % der Enterokokken und Streptokokken erkennen. Die im erweiterten Keimspektrum des ePlex® BCID-GP enthaltenen Bakterienfamilien wurden zuverlässig erkannt (vgl. Abbildung 3.3). Eine Identifizierung auf Speziesebene konnte durch das FilmArray® in 20 % (n = 19) der durch die Goldstandardmethode erkannten Spezies (n = 93) erfolgen. Beim ePlex® konnten abzüglich der vier Fehlidentifizierungen auf Speziesebene bei *E. faecalis* und *S. hominis*, beziehungsweise *S. warneri*, 70 % (n = 66) der Spezies korrekt identifiziert werden. Das Ergebnis der *S. anginosus* Gruppe (siehe Tabelle 3.1) wurde dabei nicht als Identifizierung auf Speziesebene gewertet, da es sich um eine Gruppe von Spezies und ergo nicht um eine Speziesidentifizierung an sich handelte.

Kein Identifizierungsergebnis lag beim FilmArray® in 12,2 % (n = 12) der grampositiven monomikrobiellen Blutkulturen vor. Allerdings waren 11,1 % (n = 11)

## Ergebnisse

der Bakterien im verfügbaren Keimspektrum nicht enthalten. Nur ein einziges grampositives Bakterium wurde trotz erkennbarer Familie nicht detektiert (*S. warneri*). Fehlerhafte Identifizierungen wurden durch das FilmArray® System nicht herausgegeben (Abbildung 3.4).

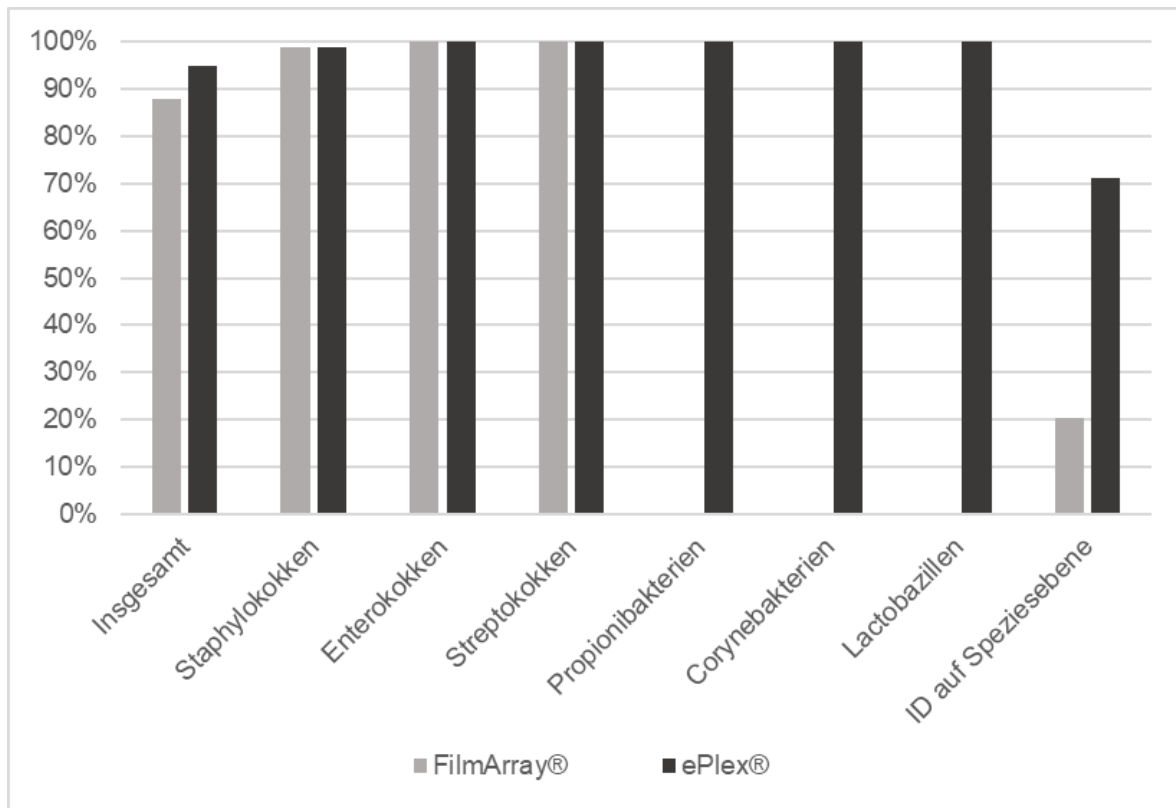


Abbildung 3.3: Quantitativer Vergleich der korrekten Identifizierungen grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch das FilmArray® und das ePlex® System. Es ist jeweils der prozentuale Anteil an der Gesamtheit, der durch den Goldstandard identifizierte Bakterienfamilien dargestellt. Die Identifikation (ID) auf Speziesebene durch die beiden Systeme errechnet sich als prozentualer Anteil der Anzahl an Speziesidentifikationen im Goldstandard ( $n = 94 \cong 100\%$ ).

Das ePlex® konnte bei 5,1 % ( $n = 5$ ) der grampositiven monomikrobiellen Blutkulturen kein Bakterium identifizieren, wobei 4,1 % ( $n = 4$ ) der Isolate nicht Teil des Keimspektrums der BCID-GP Kassette waren. Wie auch beim FilmArray®, wurde vom ePlex® ein Bakterium (*S. haemolyticus*) nicht detektiert, das auf Familienebene hätte

## Ergebnisse

erkannt werden können. In zwei Blutkulturen wurde jeweils ein zusätzliches grampositives Bakterium identifiziert (FP), welches laut Goldstandardmethode nicht vorlag (Abbildung 3.4 „falsche ID“). Die falsche Spezies, bei korrekter Familie, wurde vom ePlex® bei knapp 4 % (n = 4) der untersuchten Blutkulturen ausgegeben. Diese Fehlidentifizierungen fanden bei Bakterien statt, bei denen durch das Vergleichssystem FilmArray® keine Unterscheidung auf Speziesebene möglich war.

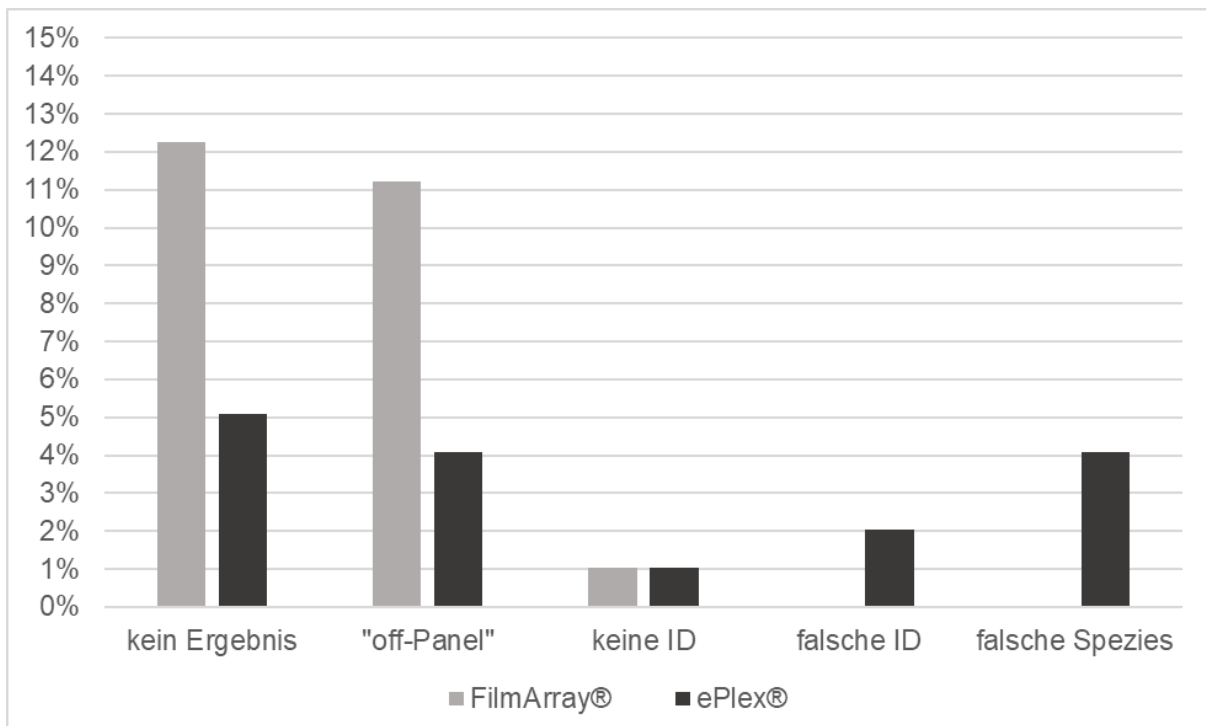


Abbildung 3.4: Fehlende oder fehlerhafte Identifizierungen grampositiver Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch das FilmArray® und ePlex® System im Vergleich. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Gesamtheit, der im Goldstandard identifizierten grampositiven Bakterien. Falsche Identifizierungen (ID) kamen ausschließlich dadurch zustande, dass neben dem korrekt identifizierten Bakterium ein weiteres, nicht kulturell nachgewiesenes Bakterium durch die Systeme identifiziert wurde. Der Terminus falsche Spezies bezieht sich auf Proben, bei denen der Genus korrekt, aber die Spezies falsch identifiziert wurde. Tests, die kein Ergebnis lieferten, setzten sich zusammen aus denen, welche nicht im Spektrum des betreffenden Testgeräts enthalten waren („off-Panel“) und den Tests, die keine Identifizierung (ID) bei im Spektrum enthaltenem Bakterium lieferten.

Bei 6,5 % (n = 6) der Blutkulturen war im ePlex® eine Wiederholung des ersten Testlaufs notwendig, um die korrekte Identifizierung zu erzielen, wobei es sich in der Studie um RUO Versionen der Kassetten handelte. Dies war dreimal bei *S. epidermidis* und jeweils einmal bei *S. aureus*, *Streptococcus sp.* und *E. faecium* der Fall. Das FilmArray® konnte dagegen alle Identifizierungen bereits im initialen Test erbringen.

### 3.2.1.2.6) Sensitivität und Spezifität der Testsysteme bei grampositiven, monomikrobiellen Blutkulturen

Für die beiden Testsysteme ePlex® und FilmArray® wurden die aus den Studienergebnissen hervorgehende Sensitivität und Spezifität aus verschiedenen Gesichtspunkten ermittelt (siehe Tabelle 3.2 und Methoden Teil 2.3.5.2).

Bezüglich der Sensitivität auf Genusebene schnitten beide Systeme mit knapp 99 % gleichermaßen gut ab, wenn nur die Erreger betrachtet werden, die im jeweiligen Panel abgedeckt waren. In Hinsicht auf alle, im Rahmen der Studie vorkommenden, grampositiven Isolate aus monomikrobiellen Blutkulturen, zeigte das ePlex® mit 95 % gegenüber dem FilmArray® mit 88 % eine höhere Sensitivität. Die Spezifität in Bezug auf die Identifizierung auf Genusebene lag für das FilmArray® System bei 100 % (Oberhettinger et al., 2020). Aufgrund zweier zusätzlicher Identifizierungen, welche nicht mit dem Goldstandard übereinstimmten, erreichte das ePlex® hier nur eine Spezifität von 95,8 % (*Micrococcus sp.* und *Staphylococcus sp.*; vgl. Tabelle 3.1 und Tabelle 3.2).

Wurde die Identifizierung auf Speziesebene als Kriterium gesetzt, so zeigte das FilmArray® eine Sensitivität von 100 % innerhalb der durch das Keimspektrum definierten Möglichkeiten, wobei das ePlex® eine Sensitivität von 97 % erreichte. Die Spezifität des FilmArray® konnte auch hier 100 % in der Studie erreichen, das ePlex® zeigte mit knapp 94 % Spezifität demgegenüber erneut leichte Schwächen (Tabelle 3.2). Allerdings erreichte das ePlex® auch auf Speziesebene eine Sensitivität von 71 % in Bezug auf alle in der Studie vorkommenden grampositiven Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen, wohingegen das FilmArray® hier mit 20 % deutlich schlechter abschnitt. Dieses Verhältnis spiegelt direkt die Fähigkeiten der unterschiedlichen Keimspektren wider, die in den beiden Systemen eine Identifizierung auf Speziesebene erlauben. Insbesondere die Fähigkeit des ePlex® CoNS teilweise auf Speziesebene identifizieren zu können, ermöglichte hier im Gegensatz zum

## Ergebnisse

FilmArray® bei 35 Isolaten die Identifizierung von *S. epidermidis*. Des Weiteren wird auch die im Rahmen der Studie zweithäufigste Familie der Enterokokken (n = 9) nur im ePlex® auf Speziesebene differenziert. Einen weiteren Einfluss hat die zusätzlich mögliche Speziesidentifizierung von insgesamt fünf *P. aeruginosa*.

Tabelle 3.2: Sensitivität und Spezifität des FilmArray® und ePlex® bei der Identifizierung grampositiver, monomikrobieller Blutkulturen. Es fand jeweils eine Berechnung für die Identifizierung auf Genus- und auf Speziesebene statt. Die absoluten Zahlen zur Berechnung sind jeweils auf der rechten Seite der Tabelle aufgeführt. n[GS]: Anzahl aller im Goldstandard identifizierten Bakterien; n [TP]: Anzahl der korrekt positiven, n [TN]: korrekt negativen, n [FP]: falsch positiven und n [FN]: falsch negativen Identifizierungen durch das betreffende Testsystem. Die Sensitivität konnte sowohl bezüglich des im jeweiligen System abgedeckten Keimspektrums als auch bezüglich aller im Rahmen der Studie vorgekommenen grampositiven Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen (BK) angegeben werden. Dabei ist die aufgrund des Keimspektrums maximal erreichbare Sensitivität jeweils in Klammern angegeben.

<b>Grampositive Genusebene</b>	FilmArray®	ePlex®	Bezug auf Keimspektrum	FilmArray®	ePlex®
<b>n[alle Proben]</b>	140	140			
n [GS]	98	98	Sensitivität	98,9%	98,9%
n [TP]	86	93	Spezifität	100%	95,8%
n [TN]	53	46	Bezug auf alle BK		
n [FP]	0	2			
n [FN]	1	1	Sensitivität	87,8% (88,8%)	94,9% (95,9%)
<b>Grampositive Speziesebene</b>	FilmArray®	ePlex®	Bezug auf Keimspektrum	FilmArray®	ePlex®
<b>n[alle Proben]</b>	132	132			
n [GS]	93	93	Sensitivität	100%	97%
n [TP]	19	66	Spezifität	100%	93,9%
n [TN]	113	62	Bezug auf alle BK		
n [FP]	0	4			
n [FN]	0	2	Sensitivität	20,4% (20,4%)	70,9% (73,1%)

### 3.2.2) Identifizierung gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen

#### 3.2.2.1) Spektrum und Verteilung gramnegativer Bakterien im Studienrahmen

Im Rahmen der Studie wurden mittels kulturbasierter Diagnostik in der Routine (Goldstandard) 36 gramnegative Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen identifiziert. Die genaue Auflistung der Identifizierungsergebnisse, inklusive der Identifizierung auf Speziesebene, ist Tabelle 3.3 zu entnehmen.

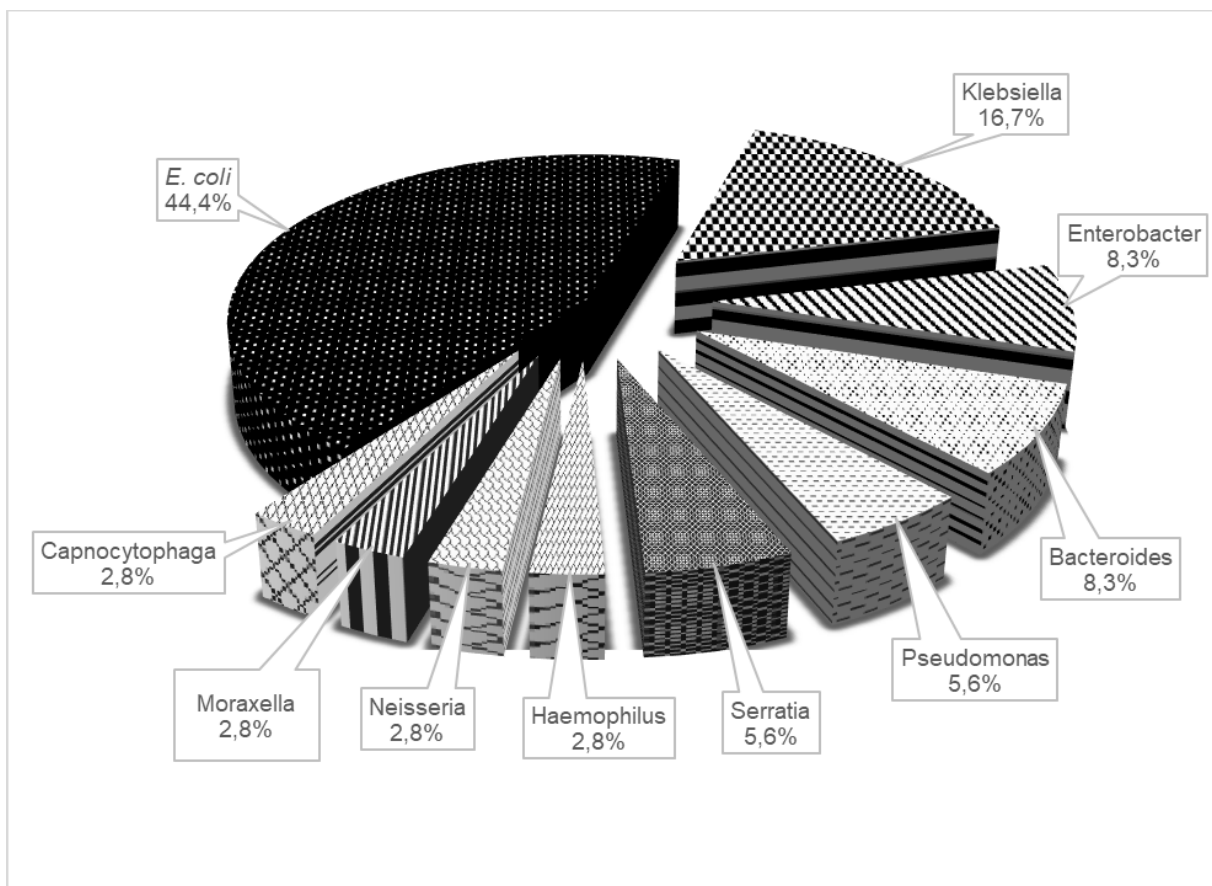


Abbildung 3.5: Gramnegatives Keimspektrum bei monomikrobiellen Blutkulturen im Studienrahmen. Dargestellt sind das Spektrum der 36 in die Studie eingeschlossenen, gramnegativen und monomikrobiellen Blutkulturen und deren prozentualer Anteil an der Gesamtheit.

*Escherichia coli* wurde in knapp der Hälfte (n = 16; 44 %) der positiven Blutkulturen mit gramnegativen Erregern gefunden. Als am zweithäufigsten vertretene Gruppe wurden Klebsiellen in 17 % der Isolate erkannt (n = 6). Vertreter dieser Gruppe waren *K. pneumoniae* (n = 3), *K. variicola* (n = 2) und *K. oxytoca* (n = 1).

Jeweils drei Bakterien (8 %) der Familien Enterobacter und Bacteroides wurden identifiziert. Bei den Enterobacter waren Spezies des *E. cloacae* Komplex (n = 2) und *E. ludwigii* (n = 1) vertreten. Die Bacteroides setzten sich aus *B. fragilis* (n = 2) und *B. vulgatus* (n = 1) zusammen.

*P. aeruginosa* und *Serratia marcescens* machten mit jeweils zwei Isolaten je 6 % der identifizierten Bakterien aus.

Des Weiteren wurde während des Studienzeitraums jeweils eine gramnegative monomikrobielle Blutkultur mit *Haemophilus influenzae*, *Neisseria polysacchariae*, *Moraxella liquefaciens* und *Capnocytophaga canimorsus* nachgewiesen. Eine Darstellung der Verteilung ist in Abbildung 3.5 zu finden.

### 3.2.2.2) Identifizierung gramnegativer Bakterien in monomikrobiellen Blutkulturen durch FilmArray®, ePlex® und Pheno®

Analog zu den Ergebnissen bei grampositiven Bakterien, sind die Ergebnisse der Identifizierungen gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch die kulturbasierte Routinediagnostik (Goldstandard) und die einzelnen Testsysteme in der Tabelle 3.3 ausführlich gegenübergestellt. Zusätzlich zum ePlex® und FilmArray® System wurden gramnegative Blutkulturen auch im Accelerate Pheno® System analysiert. Das Abschneiden aller drei Systeme bei der Identifizierung gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen ist in Abbildung 3.6 zusammenfassend dargestellt.



## Ergebnisse

Tabelle 3.3: Identifizierte gramnegative Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch kulturbasierte Diagnostik (Goldstandard), FilmArray®, ePlex® und Pheno®. Alle Bakterienspezies und deren übergeordnete Familien sind abgebildet. Die Anzahl (n) der identifizierten Isolate einer Familie oder Spezies wurde vergleichend gegenübergestellt. Besonderheiten sind in den jeweiligen Kommentarzeilen erwähnt. Beim Pheno® wurde eine Blutkultur mit *E. cloacae* Komplex (comp.) nicht getestet, sodass nur insgesamt 35 Isolate beurteilbar sind. „off-Panel“: Die Bakterienspezies und/oder -familie war im Spektrum der Testmodalität nicht enthalten; NRZ: Nationales Referenzzentrum; Wdh.: Wiederholung.

ID nach Goldstandard	Goldstandard		Biofire FilmArray®			GenMark ePlex®			Accelerate Pheno®		
	n	Kommentar	n	%	Kommentar	n	%	Kommentar	n	%	Kommentar
<i>Escherichia coli</i>	16		16	100		16	100		14	88	1x "Run Status failed", 1x nicht erkannt
<i>Klebsiella sp.</i>	6		6	100		6	100		6	100	
<i>K. pneumoniae</i>	3		5	100	<i>K. pneumoniae</i> statt <i>K. variicola</i>	5	100	<i>K. pneumoniae</i> statt <i>K. variicola</i>	0	0	"off-Panel"
<i>K. variicola</i>	2		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>K. oxytoca</i>	1		1	100		1	100		0	0	"off-Panel"
<i>Enterobacter sp.</i>	3		3	100		3	100		2	100	1x kein Lauf
<i>E. cloacae</i> Komplex	2		3	100	<i>E. cloacae</i> comp. statt <i>E. ludwigii</i>	3	100	<i>E. cloacae</i> comp. statt <i>E. ludwigii</i>	0	0	"off-Panel"
<i>E. ludwigii</i>	1		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Bacteroides sp.</i>	3		0	0	"off-Panel"	2	67		0	0	"off-Panel"
<i>B. fragilis</i>	2		0	0	"off-Panel"	2	100		0	0	"off-Panel"
<i>B. vulgatus</i>	1		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2		2	100		1	50	1x Invalid, Wdh. nicht möglich	1	50	1x nicht identifiziert
<i>Serratia marcescens</i>	2	1x VITEK2® ID	2	100		2	100		2	100	
<i>Haemophilus influenzae</i>	1		1	100		1	100		0	0	"off-Panel"
<i>Neisseria polysacchariae</i>	1	ID via NRZ	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Moraxella liquefaciens</i>	1		0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>	1	ID via Uni-PCR	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"	0	0	"off-Panel"
# erkannte Gramnegative	36		30	83		31	86		25	71	

### 3.2.2.2.1) *Escherichia coli*

Von den 16 durch die Routinediagnostik identifizierten *E. coli* Isolaten wurden alle (100 %) durch das FilmArray® und ePlex® korrekt nachgewiesen. Lediglich im Pheno® konnten zwei (12,5 %) der *E. coli* nicht erkannt werden. In einem Fall wurde trotz fehlerlosem Testlauf kein Bakterium identifiziert, in dem anderen Fall scheiterte der Testlauf wegen eines nicht näher bezeichneten Fehlers.

### 3.2.2.2.2) Klebsiellen

Gramnegative Bakterien der Familie Klebsiella wurden in allen Systemen zu 100 % korrekt identifiziert. Unterschiede zeigten sich nur in der Identifizierung auf Speziesebene (Tabelle 3.3). Während das Pheno® keine nähere Differenzierung der Klebsiellen ermöglicht, war beim FilmArray® und beim ePlex® eine genauere Unterscheidung von *K. pneumoniae* und *K. oxytoca* möglich. Es wurden alle Bakterien dieser beiden Spezies korrekt identifiziert. Allerdings deklarierten beide Systeme die zwei getesteten *K. variicola* als *K. pneumoniae* (Oberhettinger et al., 2020).

### 3.2.2.2.3) Enterobacter

Auch bei den Blutkulturen mit Vertretern des Taxon Enterobacter gelang den Testgeräten in allen Fällen die korrekte Identifizierung auf Familienebene. Für das Pheno® System stand eine der beiden Blutkulturflaschen, die im Goldstandard mit *E. cloacae* Komplex identifiziert wurden, nicht mehr zur Testung zur Verfügung. Daraus ergibt sich, dass die im Pheno® System getesteten zwei Blutkulturen beide erkannt wurden ( $\cong$  100 %, vgl. Tabelle 3.3). Eine weitere Unterscheidung auf spezifischerer Ebene ist mit Hilfe des Pheno® nicht möglich. ePlex® und FilmArray® jedoch, bieten die Möglichkeit gesondert den *E. cloacae* Komplex zu identifizieren. Diese Identifikation war in beiden Fällen erfolgreich. Der *E. ludwigii* wurde ebenfalls von beiden Systemen als *E. cloacae* Komplex erkannt, wobei die Spezies *E. ludwigii* in keinem der Keimspektren enthalten war.

### 3.2.2.2.4) Bacteroides

Bakterien der Familie Bacteroides waren nur im Spektrum des ePlex® BCID-GN abgedeckt. Außerdem war auch hier nur die Spezies *B. fragilis* enthalten, welche allerdings zwei Drittel der in der Studie eingeschlossenen *Bacteroides sp.* (n = 3)

ausmachte. Diese wurden zuverlässig erkannt (100 %). Der Vertreter der Spezies *B. vulgatus* wurde vom ePlex® System nicht identifiziert. Das FilmArray® und das Pheno® System erkannten erwartungsgemäß keine Mikroorganismen in allen betreffenden Blutkulturen.

### 3.2.2.2.5) Pseudomonaden

Von den zwei Blutkulturen mit *P. aeruginosa* wurden beide (100 %) vom FilmArray® erkannt. Das ePlex® konnte nur in einer der beiden Blutkulturen eine korrekte Identifizierung liefern, bei der anderen Blutkultur war der Testlauf durch eine gescheiterte interne Kontrolle invalide. Eine Wiederholung des Tests fand aufgrund der Laborbetriebszeiten nicht statt. Auch das Pheno® konnte nur eine der beiden *P. aeruginosa* aus positiven Blutkulturen erkennen. Allerdings wurde hier vom System keine Fehlermeldung ausgegeben, sondern das Ergebnis, dass kein Bakterium identifiziert wurde (Tabelle 3.3). Es handelte sich dabei nicht um dieselbe Blutkultur, bei dem das ePlex® kein valides Ergebnis erzielen konnte.

### 3.2.2.2.6) Weitere gramnegative Bakterien

Bakterien der klinisch relevanten Spezies *S. marcescens* wurden von allen Testsystemen im Keimspektrum abgedeckt und zu 100 % erkannt. Ebenfalls konnten das FilmArray® und das ePlex® *H. influenzae* in einem Fall identifizieren (100 %). Im Spektrum des Pheno® Test BC Kit war dieses Bakterium nicht enthalten.

Die eher seltenen Bakterien *N. polysacchariae*, *M. liquefaciens* und *C. canimorsus* waren bei keinem der Testsysteme im Spektrum abgedeckt. Sie wurden somit nicht in den betreffenden Blutkulturen identifiziert. Bei der Blutkultur, die *N. polysacchariae* enthielt, war auch die eindeutige Identifikation in der Routinediagnostik (Goldstandard) nicht problemlos möglich, sodass die endgültige Identifizierung durch das Nationale Referenzzentrum erfolgte. *C. canimorsus* wurde erst sicher durch die universelle PCR erkannt, die direkt aus der positiven Blutkulturflasche durchgeführt wurde (Oberhettinger et al., 2020).

### 3.2.2.2.7) Vergleich der Gesamtergebnisse bei gramnegativen Bakterien

In der Zusammenschau konnte das ePlex® System bei den gramnegativen Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen die meisten korrekten Ergebnisse erzielen. Es erkannte insgesamt 86 % der durch die Routinediagnostik identifizierten Bakterien.

## Ergebnisse

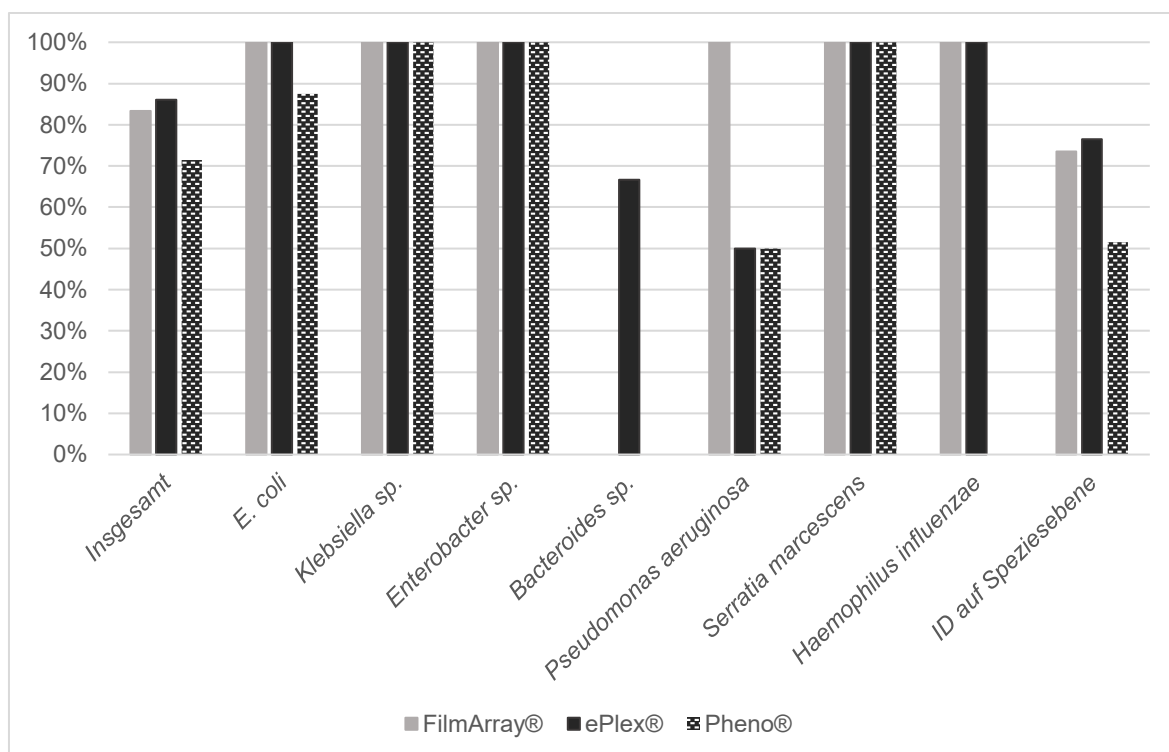


Abbildung 3.6: Quantitativer Vergleich der korrekten Identifizierungen gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch die drei Testsysteme. Die Werte sind prozentual zur Anzahl der im Goldstandard identifizierten Bakterien dargestellt. Beim Pheno® wurde eine Blutkultur weniger getestet. In der als Goldstandard dienenden kulturbasierten Routinediagnostik wurden 34 von 36 Isolaten auf Speziesebene identifiziert, *E. cloacae* Komplex wurde nicht als Speziesebene gewertet. Die Kategorie „ID auf Speziesebene“ geht daher von einer Gesamtheit von 34 Isolaten aus.

Das FilmArray® System lag mit 83 % der identifizierten Bakterien, hauptsächlich aufgrund des Fehlens von *Bacteroides* im Keimspektrum, knapp unter dem Gesamtergebnis des ePlex® (Abbildung 3.6). Generell zeigte sich das FilmArray® als sehr zuverlässig, da alle im Spektrum enthaltenen gramnegativen Bakterien auch erkannt wurden. Sämtliche Blutkulturen, bei denen kein Ergebnis ausgegeben wurde, waren nicht unterstützt („off-Panel“ – Abbildung 3.7). Das Pheno® System erzielte mit 71 % aller routinemäßig diagnostizierten Bakterien im Vergleich das schlechteste Ergebnis. Auch hier spielte das Fehlen von *Bacteroides* im abgedeckten Spektrum eine Rolle gegenüber dem ePlex®. Des Weiteren zeigten sich auch Schwächen bei den sehr häufig vorkommenden *E. coli*, wovon 12,5 % ( $n = 2$ ) nicht identifiziert wurden. Das ePlex® und das Pheno® erkannten jeweils nur einen von insgesamt zwei *P.*

*aeruginosa*, während das FilmArray® beide erkannte. Zudem enthält das Keimspektrum des PhenoTest™ BC Kit kein *H. influenzae*, wodurch gegenüber den anderen beiden Systemen eine weitere Blutkultur nicht identifiziert werden konnte.

Bezüglich der Identifizierung von gramnegativen Bakterien auf Speziesebene unterschieden sich das ePlex® (n = 28; 76 %) und das FilmArray® (n = 27; 74 %) nur unwesentlich. Sämtliche erkannte Bakterien wurden vom FilmArray® auch auf Speziesebene ausgegeben, allerdings wurden nicht im Spektrum enthaltene Spezies wie *E. ludwigii* als *E. cloacae* Komplex ausgegeben und *K. variicola* als *K. pneumoniae*. Dies war analog dazu beim ePlex® der Fall, außerdem konnte *B. vulgatus* nicht auf Speziesebene identifiziert werden, da dieses Bakterium nicht abgedeckt war. Deutlich weniger Identifizierungen der genauen Spezies konnte das Pheno® liefern (n = 17; 51,5 %, siehe Abbildung 3.6).

Eine Gegenüberstellung der Fehlerursachen bei den jeweiligen Testsystemen ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Von den knapp 28 % (n = 10) der im Pheno® getesteten (n = 35) Blutkulturen, bei denen das System kein Ergebnis lieferte, war in sieben Fällen (20 %) das Bakterium nicht im Keimspektrum enthalten. In weiteren drei Blutkulturen (8,5 %) wurde kein Keim gefunden, obwohl das betreffende Bakterium hätte erkannt werden können.

Das ePlex® scheiterte nur bei einem identifizierbaren Bakterium (*P. aeruginosa*), bei dem ein Wiederholungslauf nach initial invalidem Ergebnis ausblieb. Die verbleibenden vier nicht identifizierten Bakterien waren im Keimspektrum nicht enthalten. Vom FilmArray® wurden ausschließlich solche Bakterien nicht erkannt, die im Spektrum nicht abgedeckt waren. Keines der Testsysteme lieferte bei gramnegativen Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen falsche Identifizierungen. Wie bereits oben beschrieben, wurden bei zwei Blutkulturen mit *K. variicola* (6 %) vom ePlex® und FilmArray® eine nicht mit dem Goldstandard übereinstimmende Spezies ID ausgegeben („falsche Spezies“, Abbildung 3.7). Das ePlex® erzielte bei drei der 31 identifizierten gramnegativen Bakterien das Ergebnis erst in einem wiederholten Lauf, da zuvor Fehler auftraten oder keine Identifizierung im ersten Lauf gelang, wobei wie bereits erwähnt, in der Studie vorab freigegebene RUO Kassetten evaluiert wurden.

## Ergebnisse

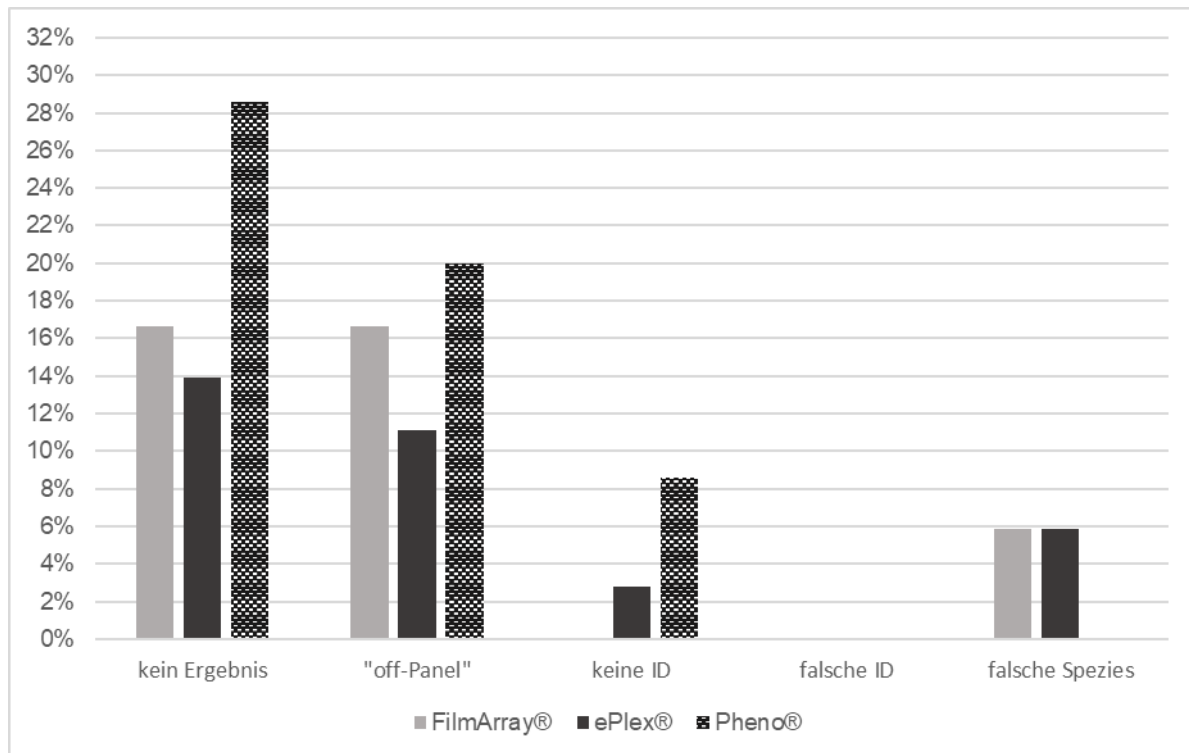


Abbildung 3.7: Fehler bei der Identifizierung gramnegativer Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen durch die Testsysteme FilmArray®, ePlex® und Pheno® im Vergleich. Die prozentualen Anteile beziehen sich auf die Gesamtheit der im Goldstandard identifizierten grampositiven Bakterien, die im jeweiligen Testgerät überprüft wurden (FilmArray®/ePlex® n = 36, Pheno® n = 35). Der Terminus falsche Spezies bezieht sich auf Proben, bei denen der Genus korrekt, aber die Spezies falsch identifiziert wurde. Tests, die kein Ergebnis lieferten, setzen sich zusammen aus denen, welche nicht im Spektrum des betreffenden Testgeräts enthalten waren („off-Panel“) und Tests, die keine Identifikation (ID), bei im jeweiligen Keimspektrum erhaltenen Bakterium, lieferten.

### 3.2.2.2.8) Sensitivität und Spezifität der Testsysteme bei gramnegativen, monomikrobiellen Blutkulturen

Bei den gramnegativen, monomikrobiellen Blutkulturen erreichte die Sensitivität des FilmArray® 100 % auf Gattungs- wie auf Speziesebene in Bezug auf die im Keimspektrum enthaltenen Bakterien. Das ePlex® erreichte hier gleichermaßen knapp 97 % Sensitivität, wobei einmal *P. aeruginosa* nicht erkannt wurde. Beim Pheno® lag auf Gattungsebene eine Sensitivität von 89 % und auf Speziesebene von 85 % vor. Alle drei Testsysteme zeigten eine Spezifität von 100 % innerhalb des jeweils

## Ergebnisse

abgedeckten Keimspektrums, sowohl auf Gattungs- als auch auf Speziesebene (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: Sensitivität und Spezifität der Testsysteme FilmArray®, ePlex® und Pheno® bei der Identifizierung gramnegativer, monomikrobieller Blutkulturen. Es fand jeweils eine Berechnung für die Identifizierung auf Genus- und auf Speziesebene statt. Die absoluten Zahlen zur Berechnung sind jeweils auf der rechten Seite aufgeführt. n[GS]: Anzahl aller im Goldstandard identifizierten Bakterien; n [TP]: Anzahl der korrekt positiven, n [TN]: korrekt negativen, n [FP]: falsch positiven und n [FN]: falsch negativen Identifizierungen durch das betreffende Testsystem. Die Sensitivität konnte sowohl bezüglich des im jeweiligen Testsystems abgedeckten Keimspektrums als auch bezüglich aller im Rahmen der Studie vorgekommenen gramnegativen Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen (BK) angegeben werden. Dabei ist die aufgrund des Keimspektrums maximal erreichbare Sensitivität jeweils in Klammern angegeben.

<b>Gramnegative Genusebene</b>	FilmArray®	ePlex®	Pheno®	Bezug auf Keimspektrum	FilmArray®	ePlex®	Pheno®
<b>n[alle Proben]</b>	140	140	139				
n [GS]	36	36	35	Sensitivität	100%	96,9%	89,3%
n [TP]	30	31	25	Spezifität	100%	100%	100%
n [TN]	110	108	111	Bezug auf alle BK			
n [FP]	0	0	0				
n [FN]	0	1	3	Sensitivität	83,3% (83,3%)	86,1% (88,9%)	71,4% (80%)
<b>Gramnegative Speziesebene</b>	FilmArray®	ePlex®	Pheno®	Bezug auf Keimspektrum	FilmArray®	ePlex®	Pheno®
<b>n[alle Proben]</b>	132	132	132				
n [GS]	34	34	34	Sensitivität	100%	96,6%	85%
n [TP]	27	28	17	Spezifität	100%	100%	100%
n [TN]	105	105	112	Bezug auf alle BK			
n [FP]	0	0	0				
n [FN]	0	1	3	Sensitivität	79,4% (79,4%)	82,4% (85,3%)	50% (58,8%)

Hinsichtlich der Sensitivität in Bezug auf sämtliche in die Studie eingeschlossene gramnegative Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen, zeigte sich das ePlex® den anderen Systemen gegenüber mit 86 % auf Gattung- und 82 % auf Speziesebene überlegen (Tabelle 3.4). Das FilmArray® kam mit 83 % und 79 % allerdings sehr dicht an die Sensitivität des ePlex® heran. Die Sensitivität des Pheno® wurde in dieser Kategorie mit 71 % auf Gattungs- und 50 % auf Speziesebene ermittelt (Tabelle 3.4).

### 3.2.3) Identifizierung von Pilzen aus monomikrobiellen Blutkulturen

Bei den insgesamt sechs in die vorliegende Studie eingeschlossenen Blutkulturen, aus denen Pilze isoliert wurden, handelte es sich in allen Fällen um Hefepilze der Gruppe *Candida*. *C. albicans* und *C. glabrata* machten mit jeweils zwei Isolaten insgesamt zwei Drittel der identifizierten Pilze aus, während *C. parapsilosis* und *C. tropicalis* in nur jeweils einer Blutkultur vorlagen (Tabelle 3.5).

Sowohl das FilmArray® als auch das ePlex® erkannten alle eingeschlossenen Pilze aus den Blutkulturen ohne Probleme, sodass bei allen Spezies die korrekte Identifizierung vorlag (Oberhettinger et al., 2020) (Tabelle 3.5). Fehlidentifikationen oder nicht im Keimspektrum enthaltene Pilzspezies wurden im Rahmen der Studie bei den Pilzen nicht beobachtet. Daraus ergab sich hier für beide Testsysteme eine Sensitivität von 100 %.

Tabelle 3.5: Identifizierte Pilze aus monomikrobiellen Blutkulturen durch Goldstandarddiagnostik, FilmArray® und ePlex®. Angegeben sind jeweils die Anzahl n der verschiedenen Spezies sowie bei den Schnelltestsystemen FilmArray® und ePlex® der prozentuale Anteil an den im Goldstandard identifizierten Pilzen der jeweiligen Spezies.

ID nach Goldstandard	Goldstandard	Biofire FilmArray®		GenMark ePlex®	
	n	n	%	n	%
<i>Candida albicans</i>	2	2	100	2	100
<i>Candida glabrata</i>	2	2	100	2	100
<i>Candida parapsilosis</i>	1	1	100	1	100
<i>Candida tropicalis</i>	1	1	100	1	100
# erkannte Pilze	6	6	100	6	100



### 3.2.4) Identifizierung bei polymikrobiellen Blutkulturen

Die Studie umfasste insgesamt acht Blutkulturen, welche sich im Grampräparat zunächst als monomikrobielle Kulturen darstellten. Sechs dieser Blutkulturen wiesen ein grampositives Färbeverhalten auf, die anderen zwei Blutkulturen zeigten initial ein gramnegatives Färbeverhalten (Tabelle 3.6). Da diese Blutkulturen aufgrund des zunächst vorliegenden Verdachtes auf eine monomikrobielle Blutkultur in den Studiengeräten getestet wurden, fiel die Entscheidung auch diese Ergebnisse mit auszuwerten und in dieser Arbeit darzustellen.

In den meisten Fällen (n = 7) wurde in den betreffenden Blutkulturen das Vorliegen einer weiteren Spezies nachgewiesen, in einer Blutkultur jedoch sogar insgesamt vier Bakterienspezies. Das Identifizierungsergebnis der zusätzlich angewachsenen Isolate lag dabei in der Regel erst nach mehr als 48 Stunden ab Beginn der Bearbeitung der positiv gemeldeten Blutkultur vor.

Die beiden im Grampräparat zunächst als gramnegativ befundenen Blutkulturen BSK63 und BSK96 stellten sich im Verlauf als polymikrobielle Mischkulturen mit je einer gramnegativen und einer grampositiven Spezies heraus (Tabelle 3.6). In der Mischkultur BSK63 wurde im Rahmen der Goldstandarddiagnostik *S. epidermidis* und ein Vertreter des Genus *Klebsiella* sicher identifiziert. Eine weitere Unterscheidung der *Klebsiella* war in der massenspektrometrischen Analyse nur als B-Klassifikation mit unsicherem Ergebnis bezüglich des Vorliegens von *K. variicola* oder *K. pneumoniae* möglich. Die beiden Testsysteme ePlex® und FilmArray®, welche nur die Speziesidentifizierung von *K. pneumoniae*, nicht aber *K. variicola* ermöglichten, erkannten im Testlauf jeweils *K. pneumoniae*. Das Pheno® lieferte *Klebsiella sp.* als Ergebnis, was laut Herstellerangaben bei Vorliegen von *K. pneumoniae* oder *K. oxytoca* ausgegeben wird. Im FilmArray® wurde der *S. epidermidis* im selben Testlauf problemlos als *Staphylococcus sp.* ohne genauere Bezeichnung erkannt. Das ePlex® erkannte auf der BCID-GN Kassette korrekterweise ein positives PAN-Target. Gemäß dem Studienprotokoll wurde dies allerdings, bei fehlender Kenntnis über das tatsächliche Vorhandensein mehrerer Bakterien in der betreffenden Blutkultur zum Zeitpunkt des vorliegenden ePlex® Testergebnisses, nicht weiter mit einem Test in der BCID-GP Kassette verfolgt. Da das verwendete PhenoTest™ BC Kit keine

## Ergebnisse

grampositiven Bakterien abdeckte, konnte auch hier keine Identifizierung des *S. epidermidis* erwartet werden.

Tabelle 3.6: Identifizierungsergebnisse von FilmArray®, ePlex® und Pheno® bei polymikrobiellen Blutkulturen im Vergleich zur Goldstandardmethode. Die Wahl der BCID-Kassette beim ePlex® und die Testung im Pheno® fanden in Abhängigkeit vom initialen Grampräparat (Gram-Präp.) statt. Korrekte Identifizierungen (ID) des Genus oder auf Speziesebene durch die einzelnen Testsysteme sind mit „✓“ gekennzeichnet, ausgebliebene Identifizierungen dagegen mit „✗“. Nicht im Keimspektrum enthaltene Ergebnisse sind mit „off-p.“ bezeichnet. Wäre eine Identifizierung auf der nicht getesteten Kassette im ePlex® (BCID-GN/BCID-GP) möglich gewesen, wurde „off-p.“ in Klammern gesetzt. Bei BSK132 wurde das PAN-Target (PAN) im ePlex® nicht positiv (pos.) erkannt, obwohl gramnegative Bakterien vorlagen ([neg.]). In der BSK154 wurde im ePlex® *S. constellatus* als *S. anginosus* Gruppe genauer eingegrenzt (✓), wobei eine ID auf Speziesebene aufgrund des Keimspektrums nicht erreichbar war. B-klass.: MS-ID Ergebnis B-klassifiziert; neg.: negativ; N/A: Kein Test gelaufen.

Blutkultur	Gram-Präp.	Goldstandard		FilmArray® IDs		ePlex® IDs			Pheno® IDs	
		IDs	Kommentar	Genus	Spezies	Genus	Spezies	PAN	Genus	Spezies
BSK16	+	<i>Streptococcus vestibularis</i>		✓	off-p.	✓	off-p.	neg.	N/A	N/A
		<i>Streptococcus salivarius</i>	> 4 d bis ID	✓	off-p.	✓	off-p.		N/A	N/A
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	✓		N/A	N/A
		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	> 10 d bis ID	off-p.		off-p.			N/A	N/A
BSK33	+	<i>Staphylococcus hominis</i>		✓	off-p.	✓	off-p.	neg.	N/A	N/A
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	✓		N/A	N/A
BSK63	-	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>K. variicola</i> / <i>K. pneumoniae</i> B-klass.	✓	✓	✓	✓	pos.	✓	off-p.
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>		✓	off-p.	(off-p.)			off-p.	
BSK96	-	<i>Proteus mirabilis</i>	Indol-Test ID	✓	off-p.	✓	✗	pos.	✓	off-p.
		<i>Streptococcus constellatus</i>	> 9 d bis ID	✗	off-p.	(off-p.)			off-p.	
BSK98	+	<i>Staphylococcus hominis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	off-p.	neg.	N/A	N/A
		<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	✓		N/A	N/A
BSK124	+	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	✓	neg.	N/A	N/A
		<i>Rothia mucilaginosa</i>	> 2 d bis ID	off-p.		off-p.			N/A	N/A
BSK132	+	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	> 2 d bis ID	off-p.		off-p.		[neg.]	N/A	N/A
		<i>Dialister pneumosintens</i>	> 3 d bis ID	off-p.		off-p.			N/A	N/A
BSK154	+	<i>Streptococcus parasangunis</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	off-p.	neg.	N/A	N/A
		<i>Streptococcus constellatus</i>	> 2 d bis ID	✓	off-p.	✓	(✓)		N/A	N/A

## Ergebnisse

Die polymikrobielle Blutkultur BSK96 enthielt primär das gramnegative Bakterium *Proteus mirabilis*, welches bereits innerhalb von ca. 24 Stunden nach Bearbeitungsbeginn im Rahmen der Routinediagnostik durch den Indoltest erkannt wurde. Auch jedes der drei Testgeräte erkannte einen Vertreter der Familie Proteus im entsprechenden Testlauf (Tabelle 3.6). Beim FilmArray® war eine nähere Unterscheidung der Spezies, bedingt durch das Keimspektrum, nicht möglich. Das ePlex® dagegen wäre grundsätzlich in der Lage gewesen *P. mirabilis* zu erkennen. Die Identifizierung auf Speziesebene gelang hier jedoch nicht. Zu dem Identifizierungsergebnis *Proteus sp.* beim Pheno® konnte entweder das Vorliegen von *P. mirabilis* oder *Proteus vulgaris* führen. Es lag demnach formal eine korrekte Identifizierung auf Familienebene vor. Das grampositive Bakterium *Streptococcus constellatus* wurde in der Routinediagnostik mittels MS nach mehr als neun Tagen identifiziert. Beim FilmArray® hätte das Vorliegen eines Bakteriums des Genus Streptokokkus erkannt werden können, ein solches Ergebnis lag jedoch nicht vor. Bei den beiden anderen Systemen, ePlex® und Pheno®, verhielt es sich analog zu der Blutkultur BSK63 (siehe oben).

Bei zwei der Blutkulturen wurden in der kulturbasierten Diagnostik *S. epidermidis* und *S. hominis* erkannt (BSK33 und BSK96, Tabelle 3.6). Bei beiden wurde vom FilmArray® der Genus Staphylokokkus erkannt. Eine nähere Differenzierung konnte hier aufgrund der Limitierungen im Keimspektrum nicht erfolgen. Auch das Vorliegen von mehr als einem Bakterium der Familie Staphylokokkus ging daher nicht aus dem Ergebnis hervor. Die ePlex® BCID-GP Kassette ermöglichte die Identifizierung der Spezies *S. epidermidis*, nicht jedoch von *S. hominis*. Als Ergebnis gab das ePlex® in beiden Fällen das Vorliegen von *Staphylococcus sp.* und *S. epidermidis* aus. Dieses Ergebnis ließ keine Rückschlüsse auf das Vorhandensein eines weiteren Bakteriums der Familie Staphylokokkus zu, da im Falle einer monomikrobiellen *S. epidermidis* Blutkultur das identische Ergebnis zu erwarten wäre. Demzufolge ist das ePlex® hier nur im Sinne einer Identifizierung der Spezies *S. epidermidis* gegenüber dem FilmArray® überlegen. Analog dazu war dies bei der polymikrobiellen Blutkultur BSK154 mit zwei verschiedenen *Streptococcus sp.* der Fall. Hier konnte das ePlex® noch eine nähere Differenzierung von *S. constellatus* als Mitglied der *S. anginosus* Gruppe liefern.

## Ergebnisse

In der polymikrobiellen Blutkultur BSK124 (Tabelle 3.6) wurde von den Testsystemen jeweils der im Keimspektrum enthaltene Staphylokokkus (*S. epidermidis*) erkannt. Das zusätzliche Vorhandensein von *Rothia mucilaginosa* konnte, wie bei fehlender Spektrumabdeckung zu erwarten war, in keinem der Systeme detektiert werden.

Interessanterweise wurden in der polymikrobiellen Blutkultur BSK16 tatsächlich sowohl vom ePlex® als auch vom FilmArray® das Vorliegen von mindestens zwei Isolaten korrekt erkannt. Zusätzlich zum zuerst in der Goldstandarddiagnostik identifizierten *Streptococcus vestibularis*, welcher von beiden Systemen nur auf Familienebene erkannt werden konnte, identifizierten das ePlex® und das FilmArray® auch ein Bakterium der Familie Staphylokokkus (Tabelle 3.6). Im ePlex® konnte dieser auch korrekt auf Speziesebene als *S. epidermidis* erkannt werden. Da sowohl *S. vestibularis* als auch *Streptococcus salivarius* in dieser Blutkultur vorlagen, jedoch keiner davon auf Speziesebene durch eines der beiden Systeme abgedeckt war, lässt sich anhand der Ergebnisse keine Aussage darüber treffen, ob *S. vestibularis*, *S. salivarius* oder sogar beide erkannt wurden. Der zusätzlich nach zehn Tagen durch die kulturbasierte Routinediagnostik identifizierte *Actinomyces odontolyticus* wurde weder vom ePlex®, noch vom FilmArray® erkannt. Beide Systeme beinhalten dieses Bakterium nicht im jeweiligen Keimspektrum des Tests.

In der rein gramnegativen polymikrobiellen Blutkultur BSK132 wurde im Goldstandard mittels MS das Vorhandensein von *Fusobacterium nucleatum* und *Dialister pneumosintens* nachgewiesen. Die Identifizierungsergebnisse lagen nach mehr als 48 Stunden für *F. nucleatum* und 72 Stunden für *D. pneumosintens* vor. Das ePlex® und das FilmArray® zeigten kein Ergebnis, da die beiden in Blutkulturen sehr selten vorkommenden Bakterien im Keimspektrum beider Systeme nicht vorhanden waren. Im Pheno® fand kein Test statt, da die Blutkultur im ursprünglichen Grampräparat als positiv beurteilt wurde. Auch beim ePlex® wurde aufgrund dessen die BCID-GP Kassette verwendet. Auffällig war dabei, dass das PAN-Target negativ blieb (Oberhettinger et al., 2020) (Tabelle 3.6).

### 3.3) Antibiotikasuszeptibilität bei positiven Blutkulturen

#### 3.3.1) Oxacillinresistenz bei Staphylokokken

Die beiden evaluierten Geräte FilmArray® und ePlex® boten bei grampositiven Bakterien die Möglichkeit, ein potenziell vorhandenes *mecA* Gen bei in der Blutkultur vorliegenden Bakterien zu erkennen, welches wie diverse andere Gene des *mec*-Clusters als Hinweis auf eine Oxacillinresistenz dienen kann. Das ePlex® beinhaltet ebenfalls die Möglichkeit das *mecC* Gen zu detektieren. Dieses wurde jedoch im Rahmen der Studie in keiner der Blutkulturen nachgewiesen.

Bei den 71 Staphylokokken aus monomikrobiellen Blutkulturen wurde in knapp über der Hälfte (n = 38) eine Oxacillinresistenz nachgewiesen. Während im Studienzeitraum kein *S. aureus* mit Oxacillinresistenz auftrat, fand sich beim überwiegenden Anteil der CoNS eine Resistenz gegenüber Oxacillin (Tabelle 3.7). Insbesondere bei *S. haemolyticus* und *S. hominis* zeigte sich ein Großteil der Isolate resistent.

Die „in house“ *mecA* PCR wurde im Rahmen der Routinediagnostik bereits am UKT angewendet. Sie wurde hier als zusätzliche Referenz zur PCR-basierten Bestimmung durch das FilmArray® und ePlex® System herangezogen. Bedingt durch die Laboröffnungszeiten und den diagnostischen Algorithmus konnte bei fünf Isolaten keine „in house“ PCR durchgeführt werden (Oberhettinger et al., 2020) (siehe Tabelle 3.7). Bei allen Oxacillin-sensiblen *S. aureus* wurde in keinem PCR-basierten System ein *mecA* Gen nachgewiesen (Tabelle 3.7). Dies galt auch für die CoNS, sodass festgehalten werden kann, dass bei allen Oxacillin-sensiblen Staphylokokken in keinem der Systeme ein *mecA* Gen nachgewiesen wurde (siehe Tabelle 3.7).

In einer Blutkultur, die den Nachweis von *S. hominis* ergab, wurde bei vorliegender Oxacillinresistenz durch alle drei PCR-basierten Vergleichstests kein *mecA* Gen detektiert. Das FilmArray® System erkannte zudem bei einer Blutkultur mit Oxacillin-resistentem *S. epidermidis* kein *mecA* Gen. Die „in house“ PCR und auch das ePlex® dagegen erkannten hier das *mecA* Gen (Oberhettinger et al., 2020). Keine Aussage über das Vorliegen eines *mecA* Genes konnte bei den beiden Testgeräten FilmArray®

## Ergebnisse

und ePlex® in jeweils einer Blutkultur bei fehlender Identifizierung getroffen werden (Tabelle 3.7).

Tabelle 3.7: Oxacillinresistenz und *mecA* Ergebnisse bei Staphylokokken aus monomikrobiellen Blutkulturen. Die Aufteilung der einzelnen Gruppen und Spezies erfolgte anhand der Interpretation der Oxacillin (OXA)-MHK im VITEK2®. Die Anzahl (n) der positiven (+) und negativen (-) Ergebnisse für *mecA* und *mecC* in den jeweiligen Testmodalitäten sind dem OXA-Status gegenübergestellt. Auffällige Ergebnisse sind fett gedruckt. Die negativen Ergebnisse für *mecA* bei der „in house“ PCR, FilmArray® und ePlex® wurden beim selben OXA-resistenten *S. hominis* beobachtet. CoNS: Koagulase negative Staphylokokken.

<b><i>Staphylococcus sp.</i></b> <b>(n = 71)</b>	<b>n</b> <b>(VITEK®)</b>	<b>"in house"</b> <b>PCR <i>mecA</i></b>		<b>FilmArray®</b> <b><i>mecA</i></b>		<b>ePlex®</b> <b><i>mecA</i></b>		<b>ePlex®</b> <b><i>mecC</i></b>	
		<b>n (+)</b>	<b>n (-)</b>	<b>n (+)</b>	<b>n (-)</b>	<b>n (+)</b>	<b>n (-)</b>	<b>n (+)</b>	<b>n (-)</b>
<i>S. aureus</i>	18	18		18		18		18	
OXA resistent	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OXA sensibel	18	0	18	0	18	0	18	0	18
CoNS	53	48		52		52		52	
OXA resistent	38	33	<b>1</b>	35	<b>2</b>	36	<b>1</b>	0	37
OXA sensibel	15	0	14	0	15	0	15	0	15
<i>S. epidermidis</i>	35	33		35		35		35	
OXA resistent	24	23	0	23	<b>1</b>	24	0	0	24
OXA sensibel	11	0	10	0	11	0	11	0	11
<i>S. haemolyticus</i>	8	7		8		7		7	
OXA resistent	7	6	0	7	0	6	0	0	6
OXA sensibel	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>S. hominis</i>	6	4		6		6		6	
OXA resistent	5	2	<b>1</b>	4	<b>1</b>	4	<b>1</b>	0	5
OXA sensibel	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>S. warneri</i>	2	2		1		2		2	
OXA resistent	1	1	0	0	0	1	0	0	1
OXA sensibel	1	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>S. capitis</i>	2	2		2		2		2	
OXA resistent	1	1	0	1	0	1	0	0	1
OXA sensibel	1	0	1	0	1	0	1	0	1

## Ergebnisse

Auch bei den polymikrobiellen Blutkulturen, die Staphylokokken enthielten, korrelierte der Nachweis des *mecA* Genes im FilmArray® und im ePlex® stark mit dem Vorliegen einer Oxacillinresistenz (Tabelle 3.8). Allerdings können beide Systeme bei zwei oder mehr unterschiedlichen Staphylokokkenspezies in einer Probe technisch bedingt keine Differenzierung zwischen den Spezies bezüglich ihres *mecA* Status liefern. Dies wurde bei einer der getesteten polymikrobiellen Blutkulturen, die den Nachweis von *S. hominis* und *S. epidermidis* erbrachte, deutlich (Tabelle 3.8 – Blutkultur BSK98). In der diagnostischen Routine wird aus Mischkulturen keine „in house“ PCR für das Vorliegen des *mecA* Genes durchgeführt, sodass hier bei der überwiegenden Mehrzahl der Proben kein Ergebnis für die „in-house“ PCR vorliegt.

Tabelle 3.8: Oxacillinsuszeptibilität im VITEK®/E-Test bei Staphylokokken aus polymikrobiellen Blutkulturen. Ergebnisse der „in house“ *mecA* PCR und ePlex®, beziehungsweise FilmArray® *mecA* Status in Gegenüberstellung mit den Ergebnissen der phänotypischen Resistenztestung des VITEK®/E-Tests, welche als Goldstandard in dieser Studie definiert waren. Auffällige Ergebnisse sind fett gedruckt. (+): positives Ergebnis; (-): negatives Ergebnis; N/A: nicht durchgeführt; MIC: Minimale inhibitorische Konzentration.

BSK Nr.	<i>Staphylococcus</i> <i>sp.</i>	Oxacillin		<i>mecA</i>		
		MIC	Interpretation	"in house" PCR	FilmArray®	ePlex®
BSK16-2	<i>S. epidermidis</i>	≥4	resistent	N/A	(+)	(+)
BSK33-1	<i>S. hominis</i>	≤0,25	sensitiv	N/A	(-)	(-)
BSK33-2	<i>S. epidermidis</i>	N/A	sensitiv	N/A	(-)	(-)
BSK63-2	<i>S. epidermidis</i>	≥4	resistent	N/A	(+)	N/A
BSK98-1	<i>S. hominis</i>	2	resistent	N/A	(+)	(+)
BSK98-2	<i>S. epidermidis</i>	≤0,25	sensitiv	N/A	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>
BSK124-1	<i>S. epidermidis</i>	≤0,25	sensitiv	(-)	(-)	(-)

### 3.3.2) Vancomycinresistenz bei Enterokokken

Im Falle der Identifizierung von Bakterien der Familie Enterokokkus in einer positiven Blutkultur, wurde beim ePlex® und beim FilmArray® zusätzlich das Vorhandensein des *vanA* und *vanB* Genes, als Hinweis auf eine potenzielle Vancomycinresistenz,

## Ergebnisse

getestet. Während das ePlex® System bei der Ausgabe der Ergebnisse zwischen dem Vorliegen von *vanA* und *vanB* differenzierte, fasste die Ausgabesoftware des FilmArray® beide Gene unter der Bezeichnung *vanA/B* zusammen.

Insgesamt zeigte einer der neun Enterokokken, die im Studienzeitraum identifiziert wurden, im VITEK® eine Resistenz gegenüber Vancomycin und war daher als VRE einzustufen. Das betreffende Bakterium gehörte der Spezies *E. faecium* an. Beim FilmArray® wurde in dieser Blutkultur *vanA/B* erkannt. Im ePlex® konnte das Vorliegen von *vanB* in dieser Blutkultur nachgewiesen werden, *vanA* dagegen nicht (Tabelle 3.9, Anhang-Tabelle 3). In sämtlichen acht Blutkulturen, in denen der diagnostische Goldstandard Vancomycin-sensible Enterokokken identifizierte, zeigten das FilmArray® und das ePlex® durchweg ein dazu passendes negatives Ergebnis in den *vanA/B*-Tests. Die seitens der Routinediagnostik durchgeführte *vanA* und *vanB* PCR korrelierten dabei gleichfalls mit den Ergebnissen der Goldstandard-AST für Vancomycin (Oberhettinger et al., 2020). Polymikrobielle Blutkulturen mit Nachweis von Enterokokken lagen nicht vor.

Tabelle 3.9: Vancomycinresistenz und *vanA/B* Status bei Enterokokken aus monomikrobiellen Blutkulturen. Die Aufteilung der einzelnen Gruppen und Spezies erfolgte anhand der Interpretation der phänotypischen, kulturbasierten Vancomycin (VANCO)-MHK aus dem VITEK2®. Die Anzahl (n) der positiven (+) und negativen (-) Ergebnisse für *vanA* und *vanB* in den jeweiligen Testmodalitäten sind dem VANCO-Status gegenübergestellt.

<i>Enterococcus sp.</i> (n = 9)	n (VITEK®)	"in house" PCR <i>vanA</i>		"in house" PCR <i>vanB</i>		FilmArray® <i>vanA/B</i>		ePlex® <i>vanA</i>		ePlex® <i>vanB</i>	
		n (+)	n (-)	n (+)	n (-)	n (+)	n (-)	n (+)	n (-)	n (+)	n (-)
<i>E. faecalis</i>	5	5		5		5		5		5	
VANCO resistent	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VANCO sensibel	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
<i>E. faecium</i>	4	4		4		4		4		4	
VANCO resistent	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0
VANCO sensibel	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3



### 3.3.3) Antibiotikasuszeptibilität bei gramnegativen Bakterien

Während das FilmArray® BCID Panel bei allen Enterobacterales sowie *A. baumannii* und *P. aeruginosa* das Vorhandensein von KPC als wichtigen Marker für eine Carbapenemresistenz prüft, stellt die ePlex® BCID-GN Kassette die Testung des wichtigen ESBL-Gen-Clusters CTX-M zusätzlich zu einigen Carbapenemasen bereit. Diese umfassen sowohl KPC als auch NDM, VIM, IMP und OXA. Die 4 zuletzt genannten Carbapenemasen wurden vom ePlex® bei keinem der Studienisolate detektiert.

#### 3.3.3.1) KPC-Gen Screening und Carbapenemresistenz

Insgesamt konnten bei zwei Isolaten Resistenzen gegenüber jeweils einem Carbapenem nachgewiesen werden. Das erste Isolat war ein *P. aeruginosa*, bei dem eine Resistenz gegenüber Imipenem in der phänotypischen Resistenztestung festgestellt wurde. Das zweite Isolat war ein *Bacteroides fragilis*, der eine Resistenz gegenüber Meropenem aufwies, wobei jedoch keine Identifizierung durch die Testsysteme vorlag (Anhang-Tabelle 1). Die Tabelle 3.10 gibt einen Überblick über die Ergebnisse der phänotypischen Resistenztestung bei Carbapenemen. Keines der vorliegenden Resistenzmuster gab Anhalt für das Vorliegen einer KPC-vermittelten Resistenz, was vereinbar mit den negativen Ergebnissen im FilmArray® und ePlex® System war (Oberhettinger et al., 2020) (Tabelle 3.10). Die Auswahl der getesteten Carbapeneme in der Routinediagnostik ergab sich zum einen durch die Erregeridentifikation, zum anderen aus vorliegenden Ko-Resistenzen. So wird beispielsweise Ertapenem bei *P. aeruginosa* nicht getestet, da eine intrinsische Resistenz vorliegt. Liegt dagegen zum Beispiel bei *E. coli* eine Resistenz gegenüber 3-GC vor, so umfasst die erweiterte Resistenztestung Ertapenem.

Eine ausführliche Auflistung der Ergebnisse ist in Anhang-Tabelle 1 zu finden.

## Ergebnisse

Tabelle 3.10: Carbapenemresistenzen und KPC-Gen-Status im FilmArray® und ePlex® System bei gramnegativen Bakterien. Betreffende Gruppen und Spezies sind anhand der Interpretation der Carbapenem (CBP)-AST aus der Goldstandardmethode VITEK2®, E-Test oder Agardiffusion aufgeteilt. Die getesteten Carbapeneme Meropenem (MEM), Imipenem (IPM) und Ertapenem (ETP) sind zusätzlich aufgeschlüsselt. Die Anzahl (n) der positiven (+) und negativen (-) Ergebnisse für KPC im FilmArray® und ePlex® sind dem CBP-Status gegenübergestellt. Auffällige Ergebnisse sind fett gedruckt. Bei gramnegativen (GN) Anaerobiern und *H. influenzae* wurden keine Carbapenemasen getestet. Details sind der Anhang-Tabelle 1 zu entnehmen. n(GS) = Gesamtanzahl.

GN Bakterien (n = 32)	n (GS)	Carbapeneme			FilmArray® KPC		ePlex® KPC	
		MEM	IPM	ETP	n (+)	n (-)	n (+)	n (-)
Enterobacterales	27	27	24	6	27		27	
CBP resistent	0	0	0	0	0	0	0	0
CBP sensibel	27	27	24	6	0	27	0	27
Nonfermenter	2	2	2	0	2		1	
<i>P. aeruginosa</i>								
CBP resistent	1	0	1	0	<b>1</b>	0	0	
CBP sensibel	1	2	1	0	0	1	0	1

### 3.3.3.2) CTX-M-Gen Screening, ESBL und Cephalosporinresistenz

Das ePlex® BCID-GN beinhaltet den Test auf das Vorhandensein einer  $\beta$ -Laktamase mit breitem Wirkspektrum (ESBL) vom Typ CTX-M. Diese sind bei Enterobacterales weit verbreitet und führen hier unter anderem zu einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber 3-GC. Der Vergleich des Nachweises von CTX-M mit dem in der Goldstandardmethode untersuchten Cephalosporinsuszeptibilitäten für Cefepim (4-GC) und Ceftazidim (3-GC) erbrachte vielversprechende Ergebnisse. Von den 32 ausgewerteten monomikrobiellen Blutkulturen mit gramnegativen Bakterien waren 27 Enterobacterales und 2 Pseudomonaden für das CTX-M Screening relevant. Insgesamt wiesen 26 Isolate keine klaren Resistenzen gegenüber den betreffenden Cephalosporinen auf. Bei diesen allen fehlte auch beim ePlex® der Nachweis eines

## Ergebnisse

Tabelle 3.11: Cephalosporinsuszeptibilität und ESBL-Status im Vergleich mit dem CTX-M-Ergebnis im ePlex® bei gramnegativen Bakterien. Ausgewertet wurden nach dem Cephalosporin der 3. Generation (3-GC) Ceftazidim (CAZ) und dem Cephalosporin der 4. Generation (4-GC) Cefepim (FEP), welche nach VITEK®, E-Test oder Agardiffusion den Goldstandard darstellten. Ein nach EUCAST intermediäres Resistenzverhalten wurde, sofern bei keinem der anderen 3/4-GC ein resistentes Verhalten vorlag, als sensibel gezählt. Die Wertung von intermediärem Verhalten als resistent dagegen wurde durch n\* markiert. Die Anzahl (n) der positiven (+) und negativen (-) Ergebnisse für CTX-M im ePlex® sind dem 3/4-GC-Status gegenübergestellt. Zudem sind Ergebnisse des teilweise durchgeführten Agardiffusions Test für ESBL gezeigt. Bei gramnegativen Anaerobiern und *H. influenzae* wurde nicht nach CTX-M geprüft. Details sind der Anhang-Tabelle 2 zu entnehmen. n(GS) = Gesamtanzahl.

GN Bakterien (n = 32)	n (GS)	3/4-GC		ESBL-Status		ePlex® CTX-M	
		CAZ	FEP	n (+)	n (-)	n (+)	n (-)
Enterobacterales	27	27	27	6		27	
3/4-GC resistent	3	3	3	3	0	3	0
3/4-GC sensibel	24	24	24	0	3	0	24
<i>E. coli</i>	16	16	16	5		16	
3/4-GC resistent	2	2	2	2	0	2	0
3/4-GC sensibel	14	14	14	0	3	0	14
<i>Enterobacter sp.</i>	3	3	3	0		3	
3/4-GC resistent	0	0	0	0	0	0	0
3/4-GC sensibel	3	3	3	0	0	0	3
<i>Klebsiella sp.</i>	6	6	6	1		6	
3/4-GC resistent	1	1	1*	1	0	1	0
3/4-GC sensibel	5	5	5	0	0	0	5
<i>S. marcescens</i>	2	2	2	0		2	
3/4-GC resistent	0	0	0	0	0	0	0
3/4-GC sensibel	2	2	2	0	0	0	2
Nonfermenter	2	2	2	0		1	
<i>P. aeruginosa</i>							
3/4-GC resistent							
3/4-GC sensibel	2	2	2	0	0	0	1

CTX-M-Genes, ein Bakterium (*P. aeruginosa*) wurde jedoch nicht erkannt (Vergleich Tabelle 3.11). Bei *B. fragilis* und *H. influenzae* fand sowohl in der Routinediagnostik als auch im ePlex® kein Test auf die ESBL-Gene beziehungsweise die relevanten

Cephalosporine statt, da hier in der Regel andere Resistenzmechanismen und intrinsische Resistenzen vorkommen. Zwei *E. coli* wiesen gegenüber allen getesteten Cephalosporinen Resistenzen auf. Bei den entsprechenden Blutkulturen wurden im ePlex® passenderweise CTX-M-positive *E. coli* erkannt (siehe Tabelle 3.11). Bei einer Blutkultur, die den Nachweis von *K. pneumoniae* erbrachte, wurde eine Resistenz gegenüber Ceftazidim im VITEK® erkannt, gegenüber Cefepim zeigte das Bakterium ein intermediäres Resistenzverhalten nach EUCAST. In dieser Blutkultur erkannte das ePlex® System das Vorhandensein eines CTX-M-positiven *K. pneumoniae* (Oberhettinger et al., 2020).

Des Weiteren standen etablierte Methoden für die Detektion eines ESBL-Status durch Agardiffusion zur Verfügung. Die Ergebnisse des ESBL-Tests waren in allen sechs Fällen, in denen der Test durchgeführt wurde, entsprechend dem CTX-M-Testergebnis des ePlex® Systems (Anhang-Tabelle 2).

Bei einem weiteren *E. coli* wurde bei sensiblem Verhalten gegenüber Cefepim, ein intermediäres Resistenzverhalten gegenüber Ceftazidim im VITEK® erkannt. Bei diesem Bakterium wurde jedoch weder ein positiver ESBL-Status noch das CTX-M-Gen durch das ePlex® detektiert.

### 3.3.3.3) Resistenztestung im Accelerate Pheno®

Da das Pheno® System in der Lage war, die erkannten gramnegativen Bakterien auf deren *in vitro* Suszeptibilität zu testen und dabei sogar die entsprechenden MHK/MIC ausgab, konnten hier detaillierte Vergleiche mit den Ergebnissen aus der Goldstandardmethode VITEK® 2 AST stattfinden. Diese sind im Folgenden beschrieben.

Das vom Pheno® generierte Antibiogramm ist nicht komplett deckungsgleich mit der Auswahl an Antibiotika, die regelmäßig in der Routinediagnostik getestet wurden. Daher standen für die folgenden Antibiotika Messergebnisse aus beiden Ansätzen zur Verfügung: Sulbactam-Ampicillin, Piperacillin-Tazobactam, Cefepim, Ceftazidim, Meropenem, Gentamicin, Tobramycin und Ciprofloxacin. Die Suszeptibilität für Amikacin und Ertapenem wurde in der Routinediagnostik nur in seltenen Fällen per

## Ergebnisse

zusätzlichem Testverfahren geprüft, sodass für diese Substanzen keine quantitativen Aussagen zu treffen waren.

Bei 188 Messpunkten des VITEK® stimmten in 175 Fällen (93 %) die kategorische Resistenzinterpretation (S/I/R) mit den Ergebnissen des Pheno® überein. Bei insgesamt 13 (7 %) Suszeptibilitätstestungen wurden unterschiedliche Ergebnisse erzielt, wovon vier (2,1 %) als geringe Fehler, sechs (3,2 %) als schwerwiegende Fehler und drei (1,6 %) als sehr schwerwiegender Fehler beurteilt wurden. Eine detaillierte Darstellung der einzelnen Fehler ist in Tabelle 3.12 aufgeführt.

Bei Sulbactam-Ampicillin konnten insgesamt 14 Antibiogramme verglichen werden, da lediglich bei *E. coli* im Accelerate Pheno® eine Testung erfolgte. Nur bei einer der betreffenden Blutkulturen (7 %) trat eine Diskrepanz im Sinne eines schwerwiegenden Fehlers auf, alle anderen stimmten in der Kategorie überein (vgl. Tabelle 3.12 und Abbildung 3.8).

Für alle anderen Antibiotika konnten je 25 vergleichbare Antibiogramme ausgewertet werden, mit Ausnahme von Tobramycin, bei dem die VITEK® AST einer Blutkultur mit *S. marcescens* nicht vorlag (Abbildung 3.8, Anhang-Tabelle 3). Meropenem und Ciprofloxacin stellten sich mit keinerlei Diskrepanzen in der Kategorie-Übereinstimmung als zuverlässigste Tests im Pheno® dar. Insgesamt wurden bei Cefepim mit 84 % Übereinstimmung in der Kategorie die meisten Abweichungen im Pheno® gegenüber dem VITEK® gefunden. Allerdings waren drei der insgesamt vier Fehler als geringe Fehler zu werten. Beim Antibiogramm einer Blutkultur mit *K. pneumoniae* wurde zudem im anschließend durchgeführten E-Test das Kategorie-Ergebnis des Pheno® bestätigt. Die im E-Test bestimmte MIC lag allerdings näher an der MIC des VITEK® (siehe Tabelle 3.12).

Der einzige sehr schwerwiegende Fehler wurde bei der AST einer mit *E. coli* identifizierten Blutkultur gegenüber Piperacillin-Tazobactam gefunden. Jedoch bestätigte sich auch hier im nachträglich durchgeführten E-Test das Ergebnis des Pheno®. Des Weiteren zeigte das Pheno® bei einem *P. aeruginosa* hinsichtlich Piperacillin-Tazobactam einen schwerwiegenden Fehler, welcher im E-Test bestätigt wurde. Ein geringer Fehler hingegen konnte im E-Test ebenfalls nicht bestätigt werden (Tabelle 3.12). Es handelte sich dabei um dieselbe mit *K. pneumoniae* identifizierte Blutkultur, die bei Cefepim mit einem Konflikt im E-Test auffiel. Ein weiteres Ergebnis dieser Art wurde noch bei einem geringen Fehler in der Suszeptibilitätstestung einer

## Ergebnisse

Blutkultur mit *E. coli* bezüglich Gentamicin beobachtet (Tabelle 3.12 und Anhang-Tabelle 3).

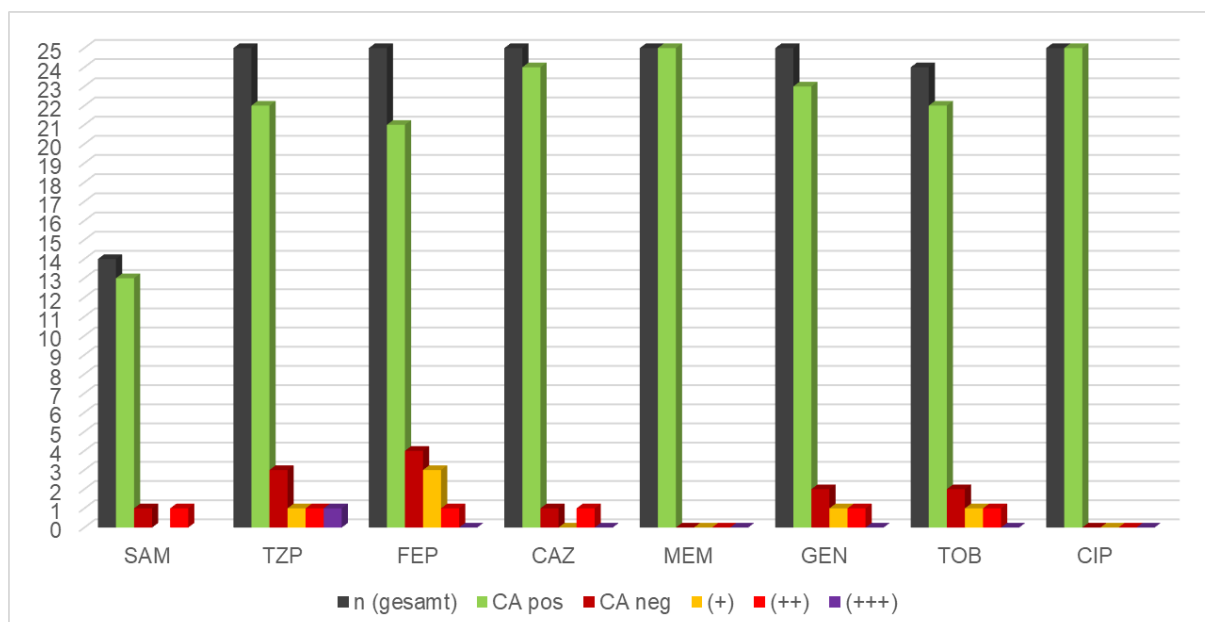


Abbildung 3.8: Antibiotikabezogene Übereinstimmung der Resistenzkategorie bei VITEK® und Pheno®. Für die ausgewerteten AST Vergleiche sind jeweils die Gesamtanzahl der vergleichbaren Ergebnisse zwischen VITEK® und Pheno® [n(gesamt)], sowie die Anzahl der in der Kategorie (Sensibel [S]/Intermediär [I]/Resistent [R]) übereinstimmenden Ergebnisse (CA pos = „Category Agreement“ übereinstimmend) und abweichenden Ergebnisse (CA neg = „Category Agreement“ diskrepant), gezeigt. Die abweichenden Ergebnisse sind des Weiteren aufgrund der Beurteilung des jeweiligen Fehlers aufgeschlüsselt, der Klassifikation nach Thornsberry (Thornsberry et al., 1980) folgend: (+) = geringer Fehler [S<->I/I<->R], (++) = schwerwiegender Fehler [R statt S], (+++) = sehr schwerwiegender Fehler [S statt R]. Das Ergebnis im VITEK® stellt dabei den Goldstandard dar. Diskrepante Ergebnisse, die in der E-Test-Kontrolle nicht bestätigt wurden, sind in dieser Darstellung nicht berücksichtigt. Nähere Informationen hierzu sind der Tabelle 3.12 zu entnehmen. SAM: Sulbactam-Ampicillin; TZP: Piperacillin-Tazobactam; FEP: Cefepim; CAZ: Ceftazidim; MEM: Meropenem; GEN: Gentamicin; TOB: Tobramycin; CIP: Ciprofloxacin.

Bei 36 % (n = 9) der 25 Blutkulturen trat mindestens ein Fehler im Vergleich Pheno® gegenüber VITEK® auf. Vernachlässigt man allerdings Ergebnisse des VITEK®, die

## Ergebnisse

im E-Test nicht bestätigt werden konnten, waren es noch 24 % (n = 6) der Blutkulturen. Mit mindestens einem schwerwiegenden Fehler im Antibiogramm zeigten sich primär 20 % (n = 5) der untersuchten Blutkulturen, nach E-Test Kontrolle machten diese noch 16 % (n = 4) aus. Die eine Blutkultur mit einem sehr schwerwiegenden Fehler entsprach 4 % (n = 1) der verglichenen Blutkulturen, jedoch wurde dieser Fehler im E-Test nicht bestätigt (siehe oben).

Tabelle 3.12: Diskrepante Ergebnisse der Suszeptibilitätstestungen im VITEK® und Pheno®. Die Auflistung ist geordnet nach dem betreffenden Antibiotikum (SAM: Sulbactam-Ampicillin, TZP: Piperacillin-Tazobactam, FEP: Cefepim, CAZ: Ceftazidim, GEN: Gentamicin, TOB: Tobramycin) und dem aus der Blutkultur identifizierten Bakterium (ID). Die Beurteilung der Schwere des Fehlers erfolgte nach Thornsberry (Thornsberry et al., 1980): (+) = geringer Fehler [S<->I/I<->R], (++) = schwerwiegender Fehler [R statt S], (+++) = sehr schwerwiegender Fehler [S statt R]. Das VITEK®-Ergebnis als Goldstandard (Goldstnd.) im Vergleich wurde mittels E-Test beurteilt. Sofern die Suszeptibilitätskategorie des E-Tests nicht mit dem Ergebnis des VITEK® übereinstimmte, wurde dies als Konflikt angegeben und der entsprechende Fall grau hinterlegt. MIC: Minimale Inhibitorische Konzentration; S = Sensitiv; I = Intermediär; R = Resistent.

AB	n	ID	VITEK®		Pheno®		Fehler	E-Test		Goldstnd. Beurteilung
			MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	
SAM	1	<i>E. coli</i>	3	S	16	R	(++)	4	S	OK
TZP	3	<i>E. coli</i>	≥128	R	8	S	(+++)	8	S	Konflikt
		<i>K. pneumoniae</i>	16	I	≤4	S	(+)	6	S	Konflikt
		<i>P. aeruginosa</i>	≤4	S	≥64	R	(++)	1	S	OK
FEP	4	<i>E. coli</i>	≤1	S	2	I	(+)	0,06	S	OK
		<i>E. coli</i>	≤2	S	2	I	(+)	0,05	S	OK
		<i>K. pneumoniae</i>	2	I	≥32	R	(+)	6	R	Konflikt
		<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	16	R	(++)	0,75	S	OK
CAZ	1	<i>P. aeruginosa</i>	≤1	S	≥64	R	(++)	1	S	OK
GEN	2	<i>E. coli</i>	4	I	2	S	(+)	1,5	S	Konflikt
		<i>S. marcescens</i>	≤1	S	8	R	(++)	0,5	S	OK
TOB	2	<i>K. pneumoniae</i>	8	R	4	I	(+)	12	R	OK
		<i>E. coli</i>	≤1	S	8	R	(++)	2	S	OK

## Ergebnisse

Mit insgesamt drei im E-Test bestätigten, schwerwiegenden Fehlern bei der AST-Bestimmung von Piperacillin-Tazobactam, Cefepim und Ceftazidim, traten beim Nachweis von *P. aeruginosa* in der Blutkultur am häufigsten schwerwiegende Fehler auf. Allerdings handelte es sich nur um ein Isolat, bei dem diese Fehler beobachtet wurden.



### 3.4) Zeitliche Aspekte der Blutkulturdiagnostik

#### 3.4.1) Dauer der Identifizierung – Vergleich der Methoden

Für die Berechnung der Identifizierungszeit lagen bei insgesamt 137 Isolaten (97 grampositive Bakterien, 34 gramnegative Bakterien, 6 Pilze) aus monomikrobiellen Blutkulturen entsprechende Daten aus der Routinediagnostik vor. Diese wurden mit den Zeiten verglichen, die von den Schnelltestsystemen zur Identifizierung benötigt wurden.

Die ermittelten Zeitspannen bis zur Identifizierung der Bakterien und Pilze aus positiven Blutkulturen unterschieden sich sehr deutlich zwischen den kulturbasierten Methoden der Routinediagnostik (Goldstandard) und den direkt aus der Blutkultur durchgeführten molekularen Methoden.

Identifizierungsergebnisse aus MS, VITEK® und den serologischen Tests lagen in der Gesamtheit aller im Rahmen der Studie ausgewerteten monomikrobiellen Blutkulturen nach durchschnittlich 32 Stunden vor (Abbildung 3.9). Dabei war bei einer Blutkultur das Ergebnis *K. pneumoniae* bereits nach vier Stunden eingetragen. Das Ergebnis einiger Blutkulturen mit *S. aureus* lag bereits nach fünf bis sechs Stunden vor. Zwischen sechs und zehn Stunden nach Bearbeitungsbeginn waren vereinzelt Ergebnisse der Identifizierung von gramnegativen Bakterien wie *E. coli* und *K. pneumoniae* verfügbar. Einige weitere Staphylokokken, sowie ein Streptokokkus waren noch vor Ablauf von 24 Stunden identifiziert. Für den Großteil der Isolate (57 %; n = 78) lag eine Identifizierung zwischen 24 und 48 Stunden nach Bearbeitungsbeginn vor (Abbildung 3.9). In diesem Zeitfenster waren auch das Identifizierungsergebnis sämtlicher Pilze verfügbar. Mehr als 48 Stunden musste man auf ein Ergebnis bei einzelnen, eher seltenen und oftmals erst via universeller PCR erfolgreich zugeordneten Bakterien warten (15 %; n = 21). Dazu gehörten unter anderem *P. acnes*, Actinomyceten, *B. fragilis*, *Atopobium parvulum* und *Capnocytophaga canimorsus*. Auch ein *E. coli*, einzelne Vertreter der *S. epidermidis* Gruppe und ein Streptokokkus der *S. anginosus* Gruppe wurden erst nach mehr als 48 Stunden identifiziert.

## Ergebnisse

Hingegen lagen alle Ergebnisse beim FilmArray® bereits nach knapp über einer Stunde vor. Das ePlex® und der Pheno® lieferten ihre Identifizierungsergebnisse nach knapp über 1,5 Stunden, wobei das eingeschränkte Spektrum an nachweisbaren Erregern bei allen molekular basierten Identifikationsmethoden berücksichtigt werden muss. Die individuelle Abweichung bei allen Geräten lag im Bereich weniger Minuten, die „Hands-on-time“ miteinbezogen.

Bis zum Vorliegen der Identifizierungsergebnisse polymikrobieller Blutkulturen dauerte es, mit durchschnittlich knapp 70 Stunden, mehr als doppelt so lang als bei den monomikrobiellen Blutkulturen. Gründe hierfür könnten zusätzlich notwendige Subkulturen und eine starke Diskrepanz in der vorhandenen Menge der verschiedenen Bakterien in der Blutkulturflasche darstellen.

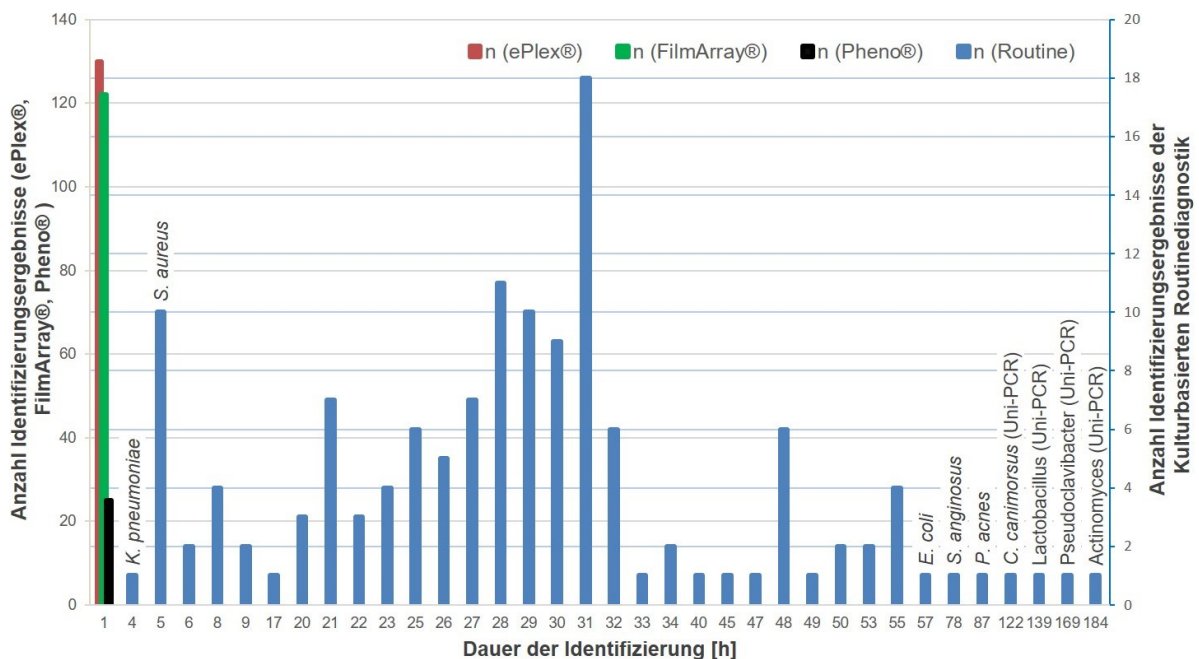


Abbildung 3.9: Vergleich und Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Identifizierungsergebnissen bei ePlex®, FilmArray®, Pheno® und Routinediagnostik bei monomikrobiellen Blutkulturen (n = 137). In der Grafik ist auf der x-Achse die benötigte Zeit bis zum Identifizierungsergebnis in vollendeten Stunden dargestellt. Es sind nur Zeiten gezeigt, bei denen Ergebnisse vorlagen, die x-Achse ist daher nicht kontinuierlich. Die y-Achse links bezieht sich auf die Anzahl der Ergebnisse bei ePlex®, FilmArray®, und Pheno®. Analog dazu sind Ergebnisse der Routinediagnostik auf der rechten y-Achse (in blau dargestellt) abzulesen. Bei besonders kurzen und besonders langen Zeiten sind weitere Informationen zum Bakterium und ggf. der Identifizierungsmethode angegeben.

### 3.4.2) Dauer der antimikrobiellen Suszeptibilitätstestung

#### 3.4.2.1) AST-Dauer bei Accelerate Pheno® und kulturbasierten Methoden

Eine direkte Vergleichbarkeit von Ergebnissen der AST-Testung lag im Rahmen der Studie nur bei gramnegativen Bakterien vor, die auch vom Pheno® erkannt wurden. Insgesamt konnten 25 Proben, bei denen AST-Ergebnisse durch das Pheno® vorlagen, in die Auswertung mit einbezogen werden (Abbildung 3.10). Das Endergebnis inklusive ermitteltem Antibiogramm des Pheno® lag im Durchschnitt nach sechs Stunden und 50 Minuten vor. Die dokumentierten Schwankungen befanden sich dabei zwischen 404 Minuten (6 h 44 min) und 420 Minuten (7 h). Bei einer großzügig bemessenen „Hands-on-time“ von zwei Minuten kann somit eine durchschnittliche Dauer von um die sieben Stunden als Richtwert gesetzt werden. Bei allen 31 monomikrobiellen Blutkulturen mit gramnegativen Bakterien, von denen der Zeitpunkt des Vorliegens eines endgültigen AST-Ergebnisses aus der Routinediagnostik ermittelt werden konnte, wurden Bearbeitungszeiten berechnet (Abbildung 3.10). Nur bei einer Blutkultur wurde ein Ergebnis früher als 20 Stunden nach Bearbeitungsbeginn erfasst. Dabei handelte es sich um das Antibiogramm eines *E. coli*, das bereits nach neun Stunden vorlag. Knapp die Hälfte der Ergebnisse (n = 14; 44 %) der Suszeptibilitätstestung durch die kulturbasierte Routinediagnostik lagen im Zeitraum zwischen 20 und 40 Stunden vor. Nach 48 und 49 Stunden konnten nochmals eine große Anzahl an AST-Ergebnissen ermittelt werden (n = 11; 35,5 %; Abbildung 3.10). Das Antibiogramm eines *E. coli* lag erst nach über drei Tagen (73 Stunden) vor, das eines *B. fragilis* erst nach über fünf Tagen (128 Stunden). Dabei korrelierte die Dauer des AST-Ergebnisses in beiden Fällen nicht mit der Dauer bis zum Identifizierungsergebnis. Dieses lag jeweils mit etwas über 24 Stunden im Normalbereich. Im Durchschnitt lagen die 31 AST-Ergebnisse der Routine nach 40 Stunden und 42 Minuten vor und die 25 Ergebnisse des Pheno® nach sechs Stunden und 48 Minuten.

## Ergebnisse

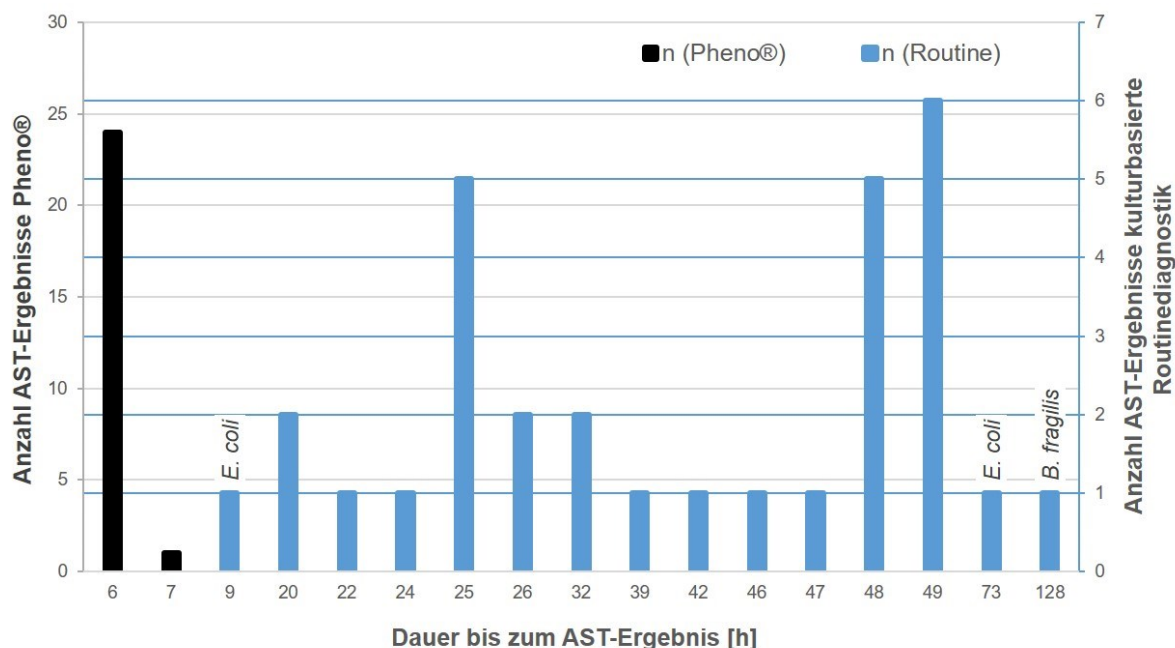


Abbildung 3.10: Vergleich und Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Suszeptibilitätsergebnissen des Pheno® und der kulturbasierten Routinediagnostik. Alle 25 durch das Pheno® erfolgreich erkannten sowie alle 31 in der Routinediagnostik analysierten gramnegativen Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen mit nachvollziehbarem Zeitverlauf sind nach der Dauer bis zum Vorliegen eines AST-Ergebnis aufgetragen. Dabei sind vollendete Stunden ab Beginn der Bearbeitung durch das Laborpersonal angegeben. Beim Pheno® zählte die Startzeit des Geräts zuzüglich zwei Minuten „Hands-on-time“. Die linke y-Achse bezieht sich auf die Häufigkeit der Ergebnisse beim Pheno® (schwarz), die rechte auf die der Routinediagnostik (blau). Die x-Achse ist nicht kontinuierlich, sondern gibt vorhandene Zeiten nach Größe geordnet an. Bei besonders frühzeitigen oder späten AST-Ergebnissen ist das Identifizierungsergebnis der betreffenden Blutkultur zusätzlich angegeben.

### 3.4.2.2) AST-Dauer bei Staphylokokken und Enterokokken

Staphylokokken und Enterokokken machten über 80 % der in die Studie eingeschlossenen grampositiven Bakterien aus monomikrobiellen Blutkulturen aus. Da FilmArray® und ePlex® bei Staphylokokken und Enterokokken Hinweise auf das Vorliegen der relevanten und häufigen Resistenzen gegenüber Oxacillin und

## Ergebnisse

Vancomycin erbringen können, erfolgte auch bei diesen Bakterien eine Berechnung der Dauer bis zum Vorliegen eines Antibiotogrammes in der kulturbasierten Diagnostik.

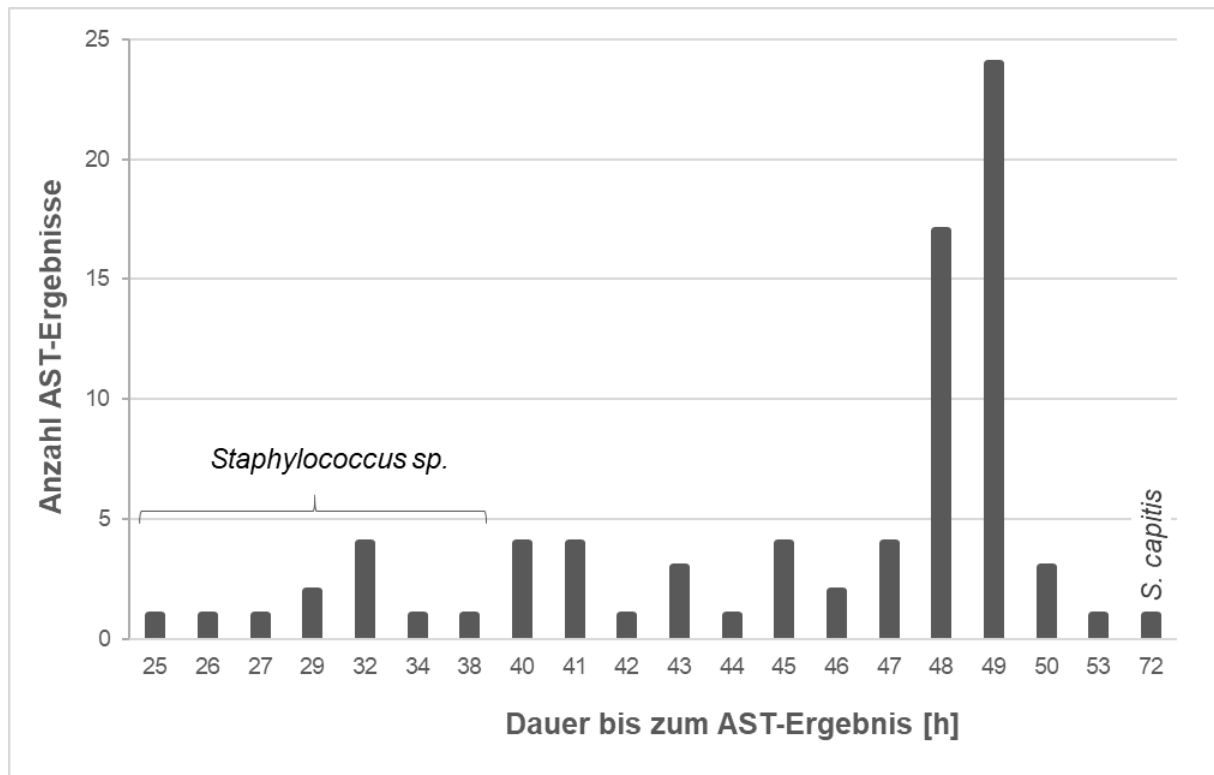


Abbildung 3.11: Verteilung der Dauer bis zum Vorliegen von Antibiotogrammen bei Staphylokokken und Enterokokken (n = 80) in der kulturbasierten Diagnostik. Dargestellt ist die absolute Häufigkeit von Blutkulturen nach der Zeit, die von Bearbeitungsbeginn bis zum endgültigen AST-Ergebnis benötigt wurde. Vollendete Stunden sind angegeben. Die x-Achse ist nicht kontinuierlich, sondern zeigt lediglich aufgetretene Zeiten. Nähere Angaben zu besonders frühzeitigen und späten Ergebnissen sind dem Diagramm beigegefügt.

Es zeigte sich, dass ein endgültiges Antibiotogramm frühestens nach 25 Stunden ab Bearbeitungsbeginn vorlag (Abbildung 3.11). Vereinzelt Endergebnisse wurden verstreut im Zeitfenster zwischen 25 und 48 Stunden beobachtet, wobei diese nur bei Staphylokokken früher als nach 40 Stunden vorlagen. Über die Hälfte (n = 46; 58 %) der AST waren allerdings erst nach 48 Stunden beendet. Dabei zeigte sich, wie bei den gramnegativen Bakterien ein Maximum der Häufigkeit bei 48 und 49 Stunden

## Ergebnisse

(n = 41; 51 %). Das Antibiogramm mit der längsten Bearbeitungszeit dauerte drei Tage und betraf eine Blutkultur mit *S. capitis*. Die Identifizierung der Spezies dauerte mit 31 Stunden nicht überdurchschnittlich lang. Die Ergebnisse der Schnelltestsysteme, inklusive der relevanten Resistenzgene, lagen nach etwa einer Stunde beim FilmArray® und 1,5 Stunden beim ePlex® vor.

### 3.5) Statistik der Blutkulturen am UKT in den Jahren 2015 bis 2017

#### 3.5.1) Allgemeine Daten zur Blutkulturdiagnostik 2015 bis 2017

In den Jahren 2015, 2016 und 2017 wurden insgesamt 15 444 Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen untersucht, was einem jährlichen Durchschnitt von 5148 Blutkulturen entspricht.

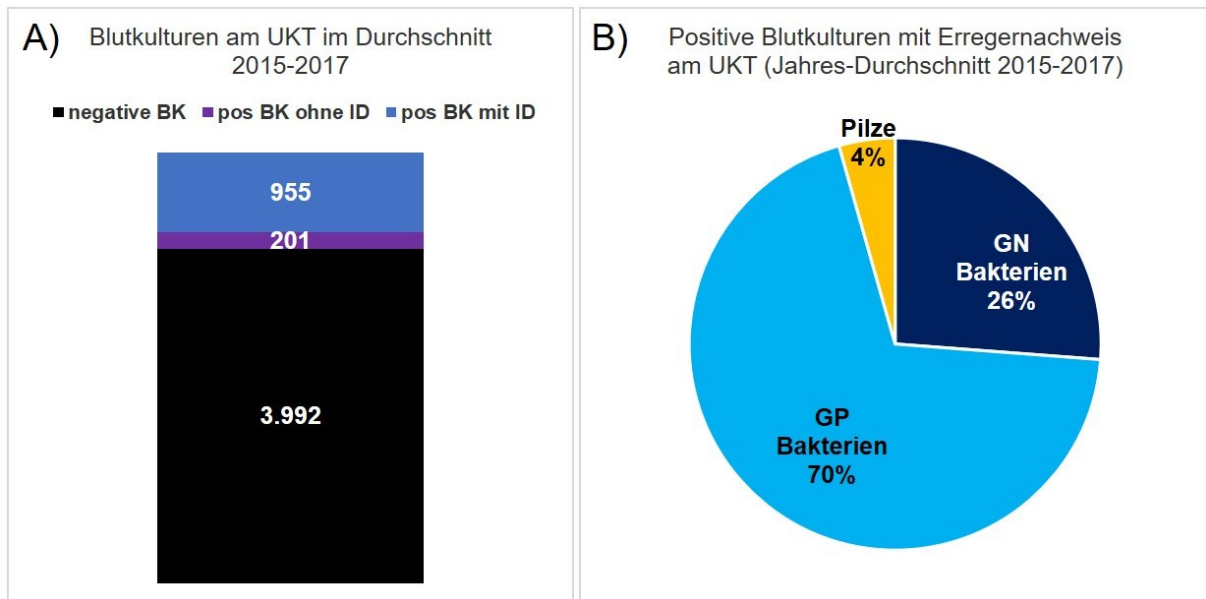


Abbildung 3.12: Durchschnittliche Gesamtheit der bearbeiteten Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017. A) Mit einer Standardabweichung von 265 wurden jährlich im Durchschnitt näherungsweise 5148 Blutkulturen untersucht. Die Abbildung zeigt die Aufteilung in Blutkulturen (BK) ohne nachgewiesenes Wachstum (negative BK) und solche mit Wachstum von Mikroorganismen (pos BK). Diese unterteilen sich wiederum in positive Blutkulturen, bei denen die Identifikation mindestens eines Mikroorganismus gelang (mit ID) und solchen bei denen kein Erreger nachgewiesen werden konnte (ohne ID). Die angegebenen Zahlen sind als absolute Durchschnittswerte zu verstehen. B) Durchschnittliche Aufteilung der Isolate in gramnegative (GN), grampositive (GP) Bakterien und Pilze. Angegebene Prozentwerte beziehen sich auf den jährlichen Durchschnitt der drei untersuchten Jahre.

Davon wurde bei durchschnittlich knapp 4000 Blutkulturen kein Bakterienwachstum im Inkubator beobachtet. Von den als positiv gemeldeten Blutkulturen, konnten bei durchschnittlich 82 % mindestens ein Mikroorganismus nachgewiesen werden. Bei durchschnittlich etwa 17 % der positiven Blutkulturen gelang kein Nachweis eines entsprechenden potenziellen Pathogens (Abbildung 3.12 A). Gezählt wurde ein Blutkulturisolat je Patient, unabhängig von der Anzahl an positiven Blutkulturen mit demselben Isolat. Eine Unterscheidung zwischen polymikrobiellen und monomikrobiellen Blutkulturen fand in der Datenbankabfrage nicht statt.

Bei den durchschnittlich 955 identifizierten Mikroorganismen aus positiven Blutkulturen pro Jahr handelte es sich bei 250 (26 %) um gramnegative Bakterien, während im Durchschnitt 663 (70 %) grampositive Bakterien identifiziert wurden. Pilze stellten mit nur 42 Isolaten etwa 4 % der Isolate aus positiven Blutkulturen dar (siehe Abbildung 3.12 B).

### 3.5.2) Verteilung der grampositiven Bakterien 2015 bis 2017

Über die drei untersuchten Jahre unterschied sich die Verteilung in den größten vertretenen Gruppen der grampositiven Bakterien aus positiven Blutkulturen nur geringfügig. Eine detaillierte Darstellung der Zahlen ist in Anhang-Tabelle 4 zu finden. Es wurden in den Jahren 2015 bis 2017 durchschnittlich 430 Staphylokokken identifiziert, was 65 % der grampositiven Isolate entsprach (Abbildung 3.13). Die meisten Staphylokokken gehörten zu den CoNS (78 %), von denen wiederum ein Großteil der Spezies *S. epidermidis* zuzuordnen war (Anhang-Tabelle 4). MSSA wurden bei durchschnittlich 87 Isolaten erkannt, ein MRSA wurde in den drei Jahren nur insgesamt zwölfmal identifiziert, im Jahre 2017 sogar nur einmal (Anhang-Tabelle 4).

Als zweithäufigste Vertreter der grampositiven Bakterien traten Enterokokken mit durchschnittlich 79 Isolaten pro Jahr bei positiven Blutkulturen auf. Dies entsprach 12 % der identifizierten grampositiven Bakterien. Der Großteil dieser Gruppe setzte sich aus *E. faecium* und *E. faecalis* zusammen (96 %), wobei *E. faecium* etwas häufiger vorkam. Im Jahre 2015 fand sich kein VRE in positiven Blutkulturen, in den



## Ergebnisse

Jahren 2016 und 2017 waren es jeweils 13 Isolate, was 13 % beziehungsweise 17 % aller identifizierten Enterokokken in diesen Jahren entsprach (vgl. Anhang-Tabelle 4). Sämtliche VRE gehörten zur Spezies *E. faecium*.

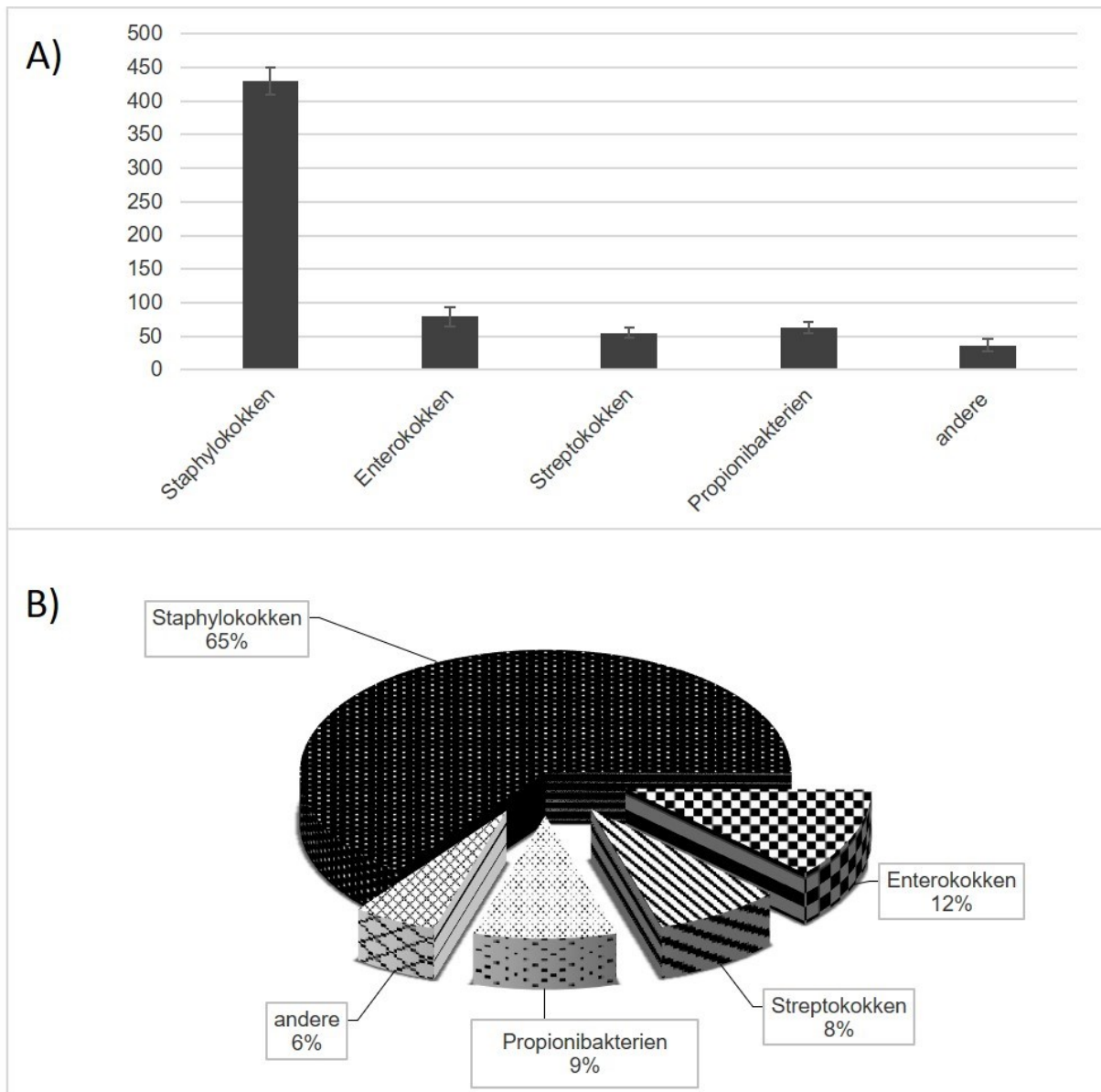


Abbildung 3.13: Durchschnittliche Verteilung der grampositiven Isolate aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017. A) Darstellung der absoluten Häufigkeit der wichtigsten Vertreter und die zugehörige Standardabweichung zwischen den drei untersuchten Jahren. B) Darstellung des prozentualen Anteils der Bakterienfamilien an der Gesamtheit der Isolate. Die Kategorie „andere“ setzt sich aus allen Bakterienfamilien zusammen, die nur in  $\leq 2$  % der Isolate pro Jahr vorlagen.

Mit durchschnittlich 62 Isolaten pro Jahr stellten Propionibakterien eine weitere häufige Gruppe bei den grampositiven Bakterien dar. Davon konnte bei 78 % der identifizierten Propionibakterien die Zugehörigkeit zur Spezies *P. acnes* nachgewiesen werden.

Streptokokken bildeten mit 55 Isolaten im jährlichen Durchschnitt in ihrer Gesamtheit 8 % der grampositiven Bakterien aus positiven Blutkulturen ab (Abbildung 3.13). Mit knapp 70 % der Streptokokken wurden am häufigsten  $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken identifiziert, welche überwiegend durch *S. pneumoniae* repräsentiert waren (Anhang-Tabelle 4). Weitere 24 % der Streptokokken zählten zur Gruppe der  $\beta$ -hämolyisierenden, während  $\gamma$ -hämolyisierende Streptokokken mit 7 % eher selten isoliert wurden.

Eine große Varietät an seltenen grampositiven Bakterien verschiedener Taxa machten zwischen 4 % und 7 % der jährlich identifizierten grampositiven Isolate aus positiven Blutkulturen aus (Abbildung 3.13 und Anhang-Tabelle 4).

### 3.5.3) Verteilung der gramnegativen Bakterien 2015 bis 2017

In den Jahren 2015, 2016 und 2017 waren bei den gramnegativen Isolaten am häufigsten *E. coli* identifiziert. Es zeigte sich im Verlauf ein Rückgang des Anteils von *E. coli* an der Gesamtheit der gramnegativen Bakterien von 58 % im Jahre 2015 auf 46 % im Jahre 2017 (Anhang-Tabelle 4). Insgesamt wurden in den drei Jahren 380 *E. coli* identifiziert, dies machte mit 51 % etwa die Hälfte, der im Durchschnitt jährlich isolierten gramnegativen Bakterien aus (siehe Abbildung 3.14).

Im Gegensatz dazu hielt sich der Anteil der Klebsiellen über die untersuchten Jahre mit durchschnittlich 17 % beziehungsweise 43 Isolaten eher konstant (Abbildung 3.14, Anhang-Tabelle 4). Die Klebsiellen umfassten zu 67 % die Spezies *K. pneumoniae*, während der Großteil der verbleibenden Klebsiellen als *K. oxytoca* identifiziert wurden. Im Jahre 2017 war der Unterschied der Nachweishäufigkeit der beiden Spezies mit 15 Isolaten *K. oxytoca* und 22 Isolaten *K. pneumoniae* deutlich geringer. In diesem Jahr wurden auch erstmalig zwei Isolate von *K. variicola* identifiziert (Anhang-Tabelle 4), die in den Jahren zuvor in der Routinediagnostik von *K. pneumoniae* nicht abgrenzt wurden.

## Ergebnisse

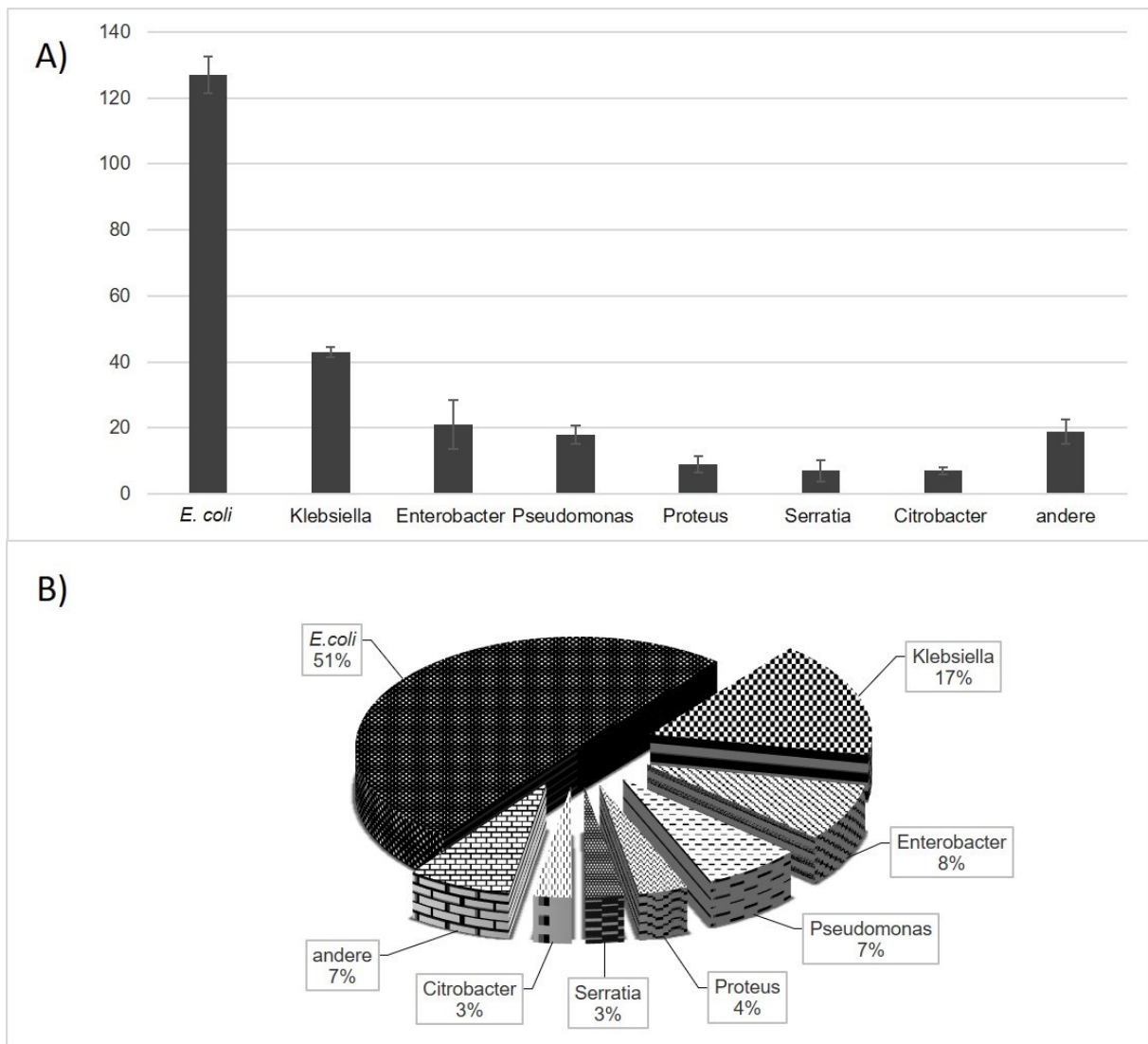


Abbildung 3.14: Durchschnittliche Verteilung der gramnegativen Isolate aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017. A) Darstellung der absoluten Häufigkeit der wichtigsten Vertreter und die zugehörige Standardabweichung zwischen den drei untersuchten Jahren. B) Darstellung des prozentualen Anteils der Bakterienfamilien an der Gesamtheit der Isolate. Die Kategorie „andere“ setzt sich aus allen Bakterienfamilien zusammen, die nur in  $\leq 2\%$  der Isolate pro Jahr vorlagen.

Im Untersuchungszeitraum von drei Jahren waren Bakterien aus der Familie Enterobacter mit 8 % die dritthäufigsten gramnegativen Isolate. Hier zeigte sich eine gegenläufige Tendenz zu den *E. coli*. So waren es 2015 lediglich 5 %, im Jahre 2016 schon 8 % und 2017 wurden 11 % aller gramnegativen Isolate als *Enterobacter sp.* identifiziert. Insgesamt wurden 2015 bis 2017 in 63 positiven Blutkulturen Vertreter der Enterobacter gefunden (vgl. Anhang-Tabelle 4). Hiervon gehörten über 85 % dem *E. cloacae* Komplex an.

Pseudomonaden stellten mit 6 % bis 8 % Anteil an der Gesamtheit der gramnegativen Bakterien in den Jahren 2015, 2016 und 2017 ebenfalls eine relevante Gruppe in dieser Kategorie dar. Dabei waren die betreffenden Bakterien nur in vereinzelt Ausnahmen (~ 7 %) nicht sicher der Spezies *P. aeruginosa* zuzuordnen.

Des Weiteren machten Bakterien aus den Familien Proteus, Citrobacter und Serratia (fast ausschließlich *S. marcescens*) regelmäßig je 3 % bis 4 % des jährlichen Anteils an gramnegativen Isolaten aus. *Bacteroides sp.* und *Acinetobacter sp.* waren nur in jeweils einem Jahr mit mindestens 2 % vertreten (Anhang-Tabelle 4). Andere gramnegative Bakterien, wie beispielsweise Neisserien, traten in allen beobachteten Jahren nur sporadisch auf.

### 3.5.4) Verteilung der Pilze 2015 bis 2017

Von Anfang 2015 bis Ende 2017 wurden insgesamt 126 Pilze aus positiven Blutkulturen isoliert. Nur ein Pilzisolat war nicht aus der Candida-Gruppe, sondern wurde als *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert. *Candida albicans* machte im Durchschnitt knapp die Hälfte der Pilzorganismen in positiven Blutkulturen aus. Die Spezies *Candida glabrata* wurde bei durchschnittlich einem Viertel der jährlich isolierten Pilze identifiziert (Abbildung 3.15).

## Ergebnisse

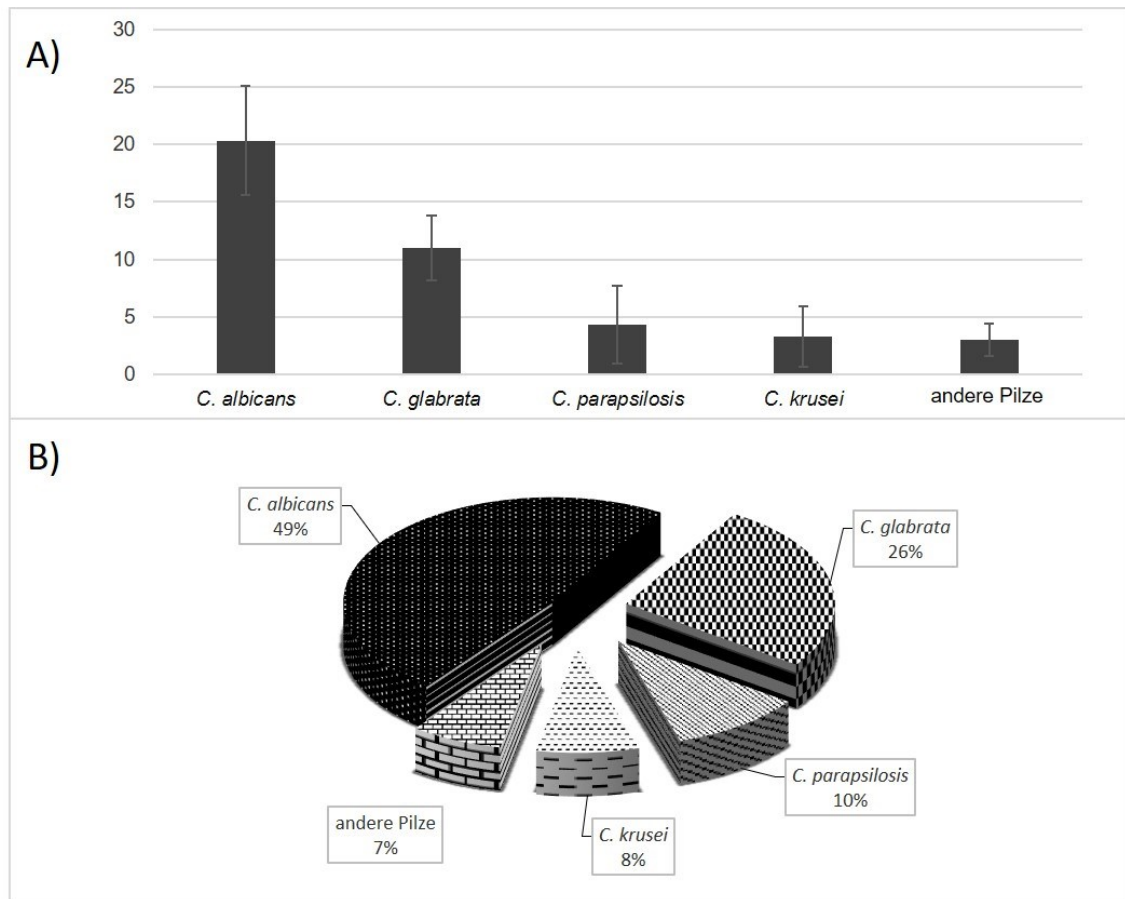


Abbildung 3.15: Durchschnittliche Verteilung der isolierten Pilze aus positiven Blutkulturen am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT in den Jahren 2015, 2016 und 2017. A) Darstellung der absoluten Häufigkeit der wichtigsten Pilzorganismen und die zugehörige Standardabweichung zwischen den drei untersuchten Jahren. B) Darstellung des prozentualen Anteils der Spezies an der Gesamtheit der Isolate. Die Kategorie „andere Pilze“ setzt sich aus allen Pilzen zusammen, die nicht in jedem der beobachteten Jahre mindestens einmal identifiziert wurden.

## **4) Diskussion**

In dieser Arbeit wurde im Rahmen einer prospektiven, dreimonatigen Studie (Oberhettinger et al., 2020) die Evaluation eines neuen Algorithmus zum Zwecke einer zeitsparenden Diagnostik positiver Blutkulturen durchgeführt. Dabei wurde die Leistung drei verschiedener Schnelltestsysteme hinsichtlich Genauigkeit der Identifizierung, der Fähigkeit zur Voraussage von Resistenzmustern und eines potenziellen Zeitgewinns analysiert. Die Systeme wurden untereinander und gegenüber der als Goldstandard geltenden, konventionellen Routinediagnostik am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen, anhand von insgesamt 140 monomikrobiellen Blutkulturen, verglichen. Des Weiteren erfolgte eine retrospektive Erfassung des lokalen Erregerspektrums, zur Beurteilung der Repräsentativität dieser Studie.

### **4.1) Zusammenfassende Darstellung und allgemeine Besonderheiten**

Insbesondere die zwei neu evaluierten Geräte FilmArray® und ePlex® zeigten durchweg sehr gute Identifizierungsergebnisse innerhalb ihrer jeweiligen Keimspektren, mit Sensitivitäten und Spezifitäten zwischen 93 % und 100 % in allen ausgewerteten Kategorien. Solche vielversprechenden Ergebnisse werden auch in der bereits veröffentlichten Literatur berichtet (Altun et al., 2013; Blaschke et al., 2012; Huang et al., 2019; Salimnia et al., 2016). Für das Pheno® System, welches bereits in einer Studie von Marschal und Kollegium am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT evaluiert wurde und, aufgrund der überzeugenden Ergebnisse (Marschal et al., 2017), zum Zeitpunkt der hier vorgestellten Studie bereits fest in den erweiterten Routineablauf zur Diagnostik gramnegativer Blutkulturen bei Hochrisikopatienten integriert war, wurden weitere Daten ermittelt. Hierbei zeigten sich, mit je nach Kategorie zwischen 85 % und 90 % liegenden Sensitivitäten bei der Identifizierung von gramnegativen Blutkulturen mit im Keimspektrum enthaltenen Bakterien, leichte Defizite gegenüber den beiden auf multiplex PCR beruhenden

Schnelltestsystemen. Der wesentliche Vorteil des Pheno® jedoch, ist die Fähigkeit zur Generierung eines Antibiogrammes auf Basis von *in vitro* Suszeptibilitätsbestimmungen. Hierbei konnte in der vorliegenden Studie eine hohe Kategorie-Übereinstimmung von 93 % nachgewiesen werden. Dies stellt insbesondere bei den oftmals mit komplexen Resistenzmustern und -mechanismen vorkommenden, gramnegativen BSI (Ruppe et al., 2015; She and Bender, 2019; Stryjewski and Boucher, 2009) einen vielversprechenden Vorteil des Pheno® gegenüber ePlex® und FilmArray® dar, die hier entsprechend weniger Informationen bieten konnten.

Die in dieser Arbeit errechneten Sensitivitäten und Spezifitäten unterscheiden sich geringfügig gegenüber denen, welche aus Teilen dieser Studie veröffentlicht wurden (Oberhettinger et al., 2020). Dies beruht auf den leicht abgeänderten Einschlusskriterien zugunsten der Datenmenge und der strikten Differenzierung zwischen der Identifizierung auf Genusebene und auf Speziesebene. Diese wurde in der Publikation aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in gleicher Form umgesetzt. Stattdessen wurde grundsätzlich die Identifizierungstiefe, die für das jeweilige Testsystem möglich war, in dem Studiendesign als erreichbarer Standard definiert (Oberhettinger et al., 2020). Die durch modifizierte Ausschlusskriterien entstandene Abweichung bezieht sich insbesondere auf eine gramnegative Blutkultur mit *P. aeruginosa*, die in der Veröffentlichung von der Auswertung ausgeschlossen wurde, da kein dem Studienprotokoll entsprechender Wiederholungslauf nach initial invalidem Test im ePlex® stattgefunden hatte. In dieser Arbeit wurde die betreffende Blutkultur miteinbezogen, um in erster Linie den bei gramnegativen Bakterien und vor allem hinsichtlich Nonfermentern ohnehin schmäleren Datensatz nicht weiter zu verringern. Zudem konnten die Mehrheit der Schnelltestsysteme, nämlich das Pheno® und das FilmArray®, das Bakterium im ersten Testlauf erkennen. Die Auswirkung auf die errechnete Sensitivität des ePlex® im gramnegativen Bereich ist mit der in dieser Arbeit erfolgten Einbeziehung der betreffenden Blutkultur allerdings kritisch zu betrachten, da ein Wiederholungslauf des ePlex® möglicherweise zu einer Sensitivität von 100% geführt hätte. In der Realität jedoch sind Wiederholungstests manchmal aus verschiedenen Gründen, wie auch in diesem Fall, nicht durchführbar. So bildet die hier ermittelte Sensitivität gegebenenfalls sogar besser die Realität ab, insbesondere weil Wiederholungsläufe beim ePlex® deutlich häufiger nötig waren. Dies wiederum

ist unter Umständen auf den Einsatz der RUO-Versionen zurückzuführen. Die Häufigkeit von invaliden Ergebnissen soll laut Hersteller im neuen CE-IVD (*In-Vitro-Diagnostica*) Format der Kassetten nochmals deutlich reduziert worden sein (Oberhettinger et al., 2020). Huang und Kollegium (Huang et al., 2019) berichteten bereits von Verbesserungen hinsichtlich der Häufigkeit invalider Ergebnisse bei neueren Beständen der RUO-Kassetten gegenüber den vorherigen, hinweisend auf ein tatsächlich vorliegendes Verbesserungspotenzial.

Die in dieser Arbeit und der zugehörigen Publikation (Oberhettinger et al., 2020) gewählte Definition von korrekt negativen Ergebnissen weicht von der Definition anderer AutorInnen ab, die auch durch den Goldstandard nicht identifizierte Blutkulturen mit analysierten (Lutgring et al., 2018). Da diese Studie keine im Goldstandard negativen Blutkulturen beinhaltete, wurden korrekt negative Ergebnisse als Ereignisse definiert, bei denen bedingt durch das Keimspektrum des jeweiligen Tests in der entsprechenden Kategorie – in solch einem Fall korrekterweise – kein Identifizierungsergebnis vorlag (siehe 2.3.5.1 für Details). Im Umkehrschluss wurden ausbleibende „off-Panel“-Identifizierungen dann nicht als falsch negativ gewertet, wie es beispielsweise in der Studie von Burnham und Kollegium der Fall war (Burnham et al., 2019). Dies muss beim Vergleich von Parametern, wie der Spezifität und auch des positiven Vorhersagewertes zwischen verschiedenen Studien dieser Art beachtet werden.

Im Nachfolgenden werden die unterschiedlichen, im Rahmen der Studie vorgekommenen, BSI-Erreger und ihre Bedeutung vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur eingehend beleuchtet.

### **4.2) Aspekte bei der Identifizierung von grampositiven Blutkulturen**

Sowohl ePlex® als auch FilmArray® konnten bei der Identifizierung grampositiver, monomikrobieller Blutkulturen bis auf Speziesebene eine Sensitivität  $\geq 97\%$  zeigen. Die Abdeckung der in dieser Kategorie im Goldstandard nachgewiesenen Isolate durch das jeweilige Keimspektrum lag beim ePlex® BCID-GP bei knapp 96 % und beim FilmArray® BCID bei knapp 89 % auf Genusebene. Während das bezüglich der



Breite des Keimspektrums sparsamer aufgestellte FilmArray® eine Spezifität von 100 % erreichte, schnitt das ePlex® in der Spezifität durch zwei falsch positive Identifizierungen auf Gattungsebene und vier falsch positive Spezies mit 96 %, beziehungsweise 94 %, schlechter ab. Es handelte sich in einem Fall um einen *Mikrokokkus sp.*, der zusätzlich zum korrekt identifizierten *S. aureus* erkannt wurde. Die klinische Relevanz dieser falsch positiven Identifizierung kann als vernachlässigbar eingestuft werden, da dieser als wenig pathogen geltender Genus in der Regel eine Kontamination darstellt (Bates et al., 1991; Bekkeris et al., 2005; Dawson, 2014; Oberhettinger et al., 2020). In einer weiteren Blutkultur wurde dagegen, zusätzlich zu einem auch im Goldstandard identifizierten Enterokokkus, das Vorliegen eines Staphylokokkus berichtet. Dieses Ergebnis ohne weitere Hinweise dagegen, hätte hinsichtlich der einzuleitenden Therapie eher Probleme bereiten können: Beide Bakterien können manifeste Infektionen auslösen und weisen oftmals, besonders im Falle des hier zusätzlich auf Speziesebene fälschlich nachgewiesenen *E. faecium*, unterschiedliche Resistenzmuster auf. Prinzipiell kann bei dem gewählten Studienansatz nicht ausgeschlossen werden, dass das zusätzlich auf molekularer Ebene nachgewiesene Bakterium in der Blutkultur vorlag. Eine mögliche Erklärung für ein solches, zusätzlich molekular nachgewiesenes Bakterium, könnte einerseits das Vorliegen von entsprechender DNA nicht replizierbarer prokaryotischer Zellen in der Probe sein. Andererseits ist aber auch das Vorliegen einer sehr geringen Konzentration des zusätzlichen Bakteriums denkbar, welches dann beim kulturbasierten Ansatz nicht von dem überwiegenden Bakterienwachstum differenziert werden kann. Daher können falsch positive Ergebnisse tatsächlich den Nachweis von in sehr geringer Anzahl vorliegenden Bakterien der entsprechenden Familie oder Spezies bedeuten. Dies wäre mit einer höheren Sensitivität der direkten PCR-Methode gegenüber dem kulturbasierten Ansatz zu erklären. So berichten andere AutorInnen von teils zusätzlich erkannten Isolaten durch ePlex® und FilmArray®, welche in der initialen Standardmethode nicht entdeckt wurden, allerdings bei gezielter nachträglicher Subkultivierung dann nachgewiesen werden konnten (Altun et al., 2013; Huang et al., 2019). Insbesondere im Falle des Mikrokokkus wäre dies plausibel, da das FilmArray® über keine Sonden für solche typischen Kontaminanten wie *Micrococcus sp.*, *Propionibacterium sp.* und *Corynebacterium sp.* verfügt und somit keinen Vergleich bietet. Generell stellt die beim ePlex® vorhandene Erweiterung des Keimspektrums um diese Genus möglicherweise einen Vorteil dar, da ein solches

Ergebnis den Kliniker unter entsprechenden Umständen bereits zu einer Deeskalation oder gar zum Verzicht auf eine antibiotische Therapie sowie das in Betracht ziehen anderer Foki bewegen könnte. Das wiederum kann ein besseres Therapieergebnis fördern und zur Reduktion der unnötigen Gabe von (Breitband-)Antibiotika führen (Dawson, 2014). Im FilmArray® wird bei solchen Blutkulturen keine ID ausgegeben, was bei mikroskopisch nachgewiesenen, grampositiven Kokken den Verdacht auf diese, als Auslöser der Symptomatik, nicht hinreichend entkräften würde. Nicht zuletzt können solche, als Kontaminanten angesehene Bakterien, jedoch in gewissen Kontexten auch manifeste BSI auslösen (El Rafei et al., 2016; Park et al., 2011). Insbesondere die häufig in Blutkulturen identifizierten und regelhaft als Kontaminationen angesehenen Propionibakterien (Kirn and Weinstein, 2013; Kreidl et al., 2019) spielen zum Beispiel im Zusammenhang mit verschiedenen implantierten, kardialen Unterstützungssystemen (wie implantierbare Kardioverter/Defibrillatoren und Herzschrittmacher) eine Rolle und sollten insbesondere bei entsprechenden Patientenpopulationen als BSI-Erreger in Betracht gezogen werden (El Rafei et al., 2016). Obwohl invasive Infektionen mit *P. acnes* meist subklinisch verlaufen, scheint gerade die Biofilmbildung durch diese Bakterien ein entscheidender Virulenzfaktor zu sein, der auch schwere Verläufe hervorrufen kann, besonders wenn solche Infektionen längere Zeit unentdeckt bleiben (Holmberg et al., 2009; Park et al., 2011). Die Therapie hingegen ist aufgrund der guten Suszeptibilität von Propionibakterien gegenüber Penicillinen und Cephalosporinen unkompliziert und erfolgversprechend (El Rafei et al., 2016). Die Verwendung von Reserveantibiotika wie Vancomycin, die der Nachweis grampositiver Kokken mitunter nach sich zieht, könnte durch eine adäquate und schnelle Diagnostik verringert werden. Dies stellt also einen potenziellen Vorteil des erweiterten Keimspektrums im ePlex® BCID-GP dar, welches in dieser Studie eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100 % für *P. acnes* erzielte. Zu beachten gilt hier jedoch die geringe Fallzahl (n = 5), welche in Folgestudien noch ausgebaut werden sollte.

Auf Speziesebene wurden durch das ePlex® zwei CoNS fälschlich als *S. epidermidis* identifiziert. Namentlich handelte es sich um *S. hominis* und *S. warneri*, beides Vertreter der *S. epidermidis* Gruppe. Hier ist möglicherweise die Trennschärfe der Sonden nicht für die genaue Unterscheidung ausgelegt, sodass es zu Kreuzreaktionen kommen könnte. Da die Subspezies der *S. epidermidis* Gruppe zur normalen Hautflora des Menschen gehören und sich in ihrer Pathogenität nicht wesentlich unterscheiden

(Becker et al., 2014), kann eine genaue Differenzierung als irrelevant angesehen werden (Oberhettinger et al., 2020). Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Abnahme ebenfalls geringe Mengen von *S. epidermidis* oder lediglich DNA von *S. epidermidis* in die Blutkulturflasche inokuliert wurden, da diese hier nachgewiesene Spezies zur normalen Hautflora gehört.

Als diagnostisch sehr wertvoll könnte sich der im ePlex® BCID-GP Keimspektrum abgedeckte *S. lugdunensis* herausstellen, da infektiöse Endokarditiden durch diesen Erreger gegenüber anderen CoNS wesentlich schwerere Verläufe und eine mit *S. aureus* vergleichbare Pathogenität in diesem Zusammenhang aufweisen (Anguera et al., 2005; Becker et al., 2014; Oberhettinger et al., 2020; Sabe et al., 2014). Mit nur vier *S. lugdunensis* Isolaten, entsprechend 0,4 % aller CoNS aus positiven Blutkulturen in den Jahren 2015 bis 2017 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT (eigene unveröffentlichte Daten), ist eine BSI mit diesem Erreger hier als sehr selten einzuordnen. Diese niedrige Prävalenz deckt sich auch mit internationalen Daten (Frank et al., 2008; Pfaller et al., 1999). Daher ist es nicht überraschend, dass innerhalb der hier durchgeführten dreimonatigen Studie keine Isolate von *S. lugdunensis* vorkamen, weshalb auch keine Schlüsse auf die Sensitivität des Tests für diese Spezies gezogen werden können. Auch in Folgestudien am UKT bleibt eine eher geringe Fallzahl zu erwarten.

Fehlidentifizierungen auf Speziesebene bei Enterokokken, wie sie bei zwei von neun Enterokokken (22 %) im ePlex® auftraten, können problematisch sein. Generell ist die Möglichkeit der Differenzierung von *E. faecium* und *E. faecalis*, welche vom FilmArray® BCID nicht bereitgestellt wird, eine sinnvolle Erweiterung des ePlex® BCID-GP. Aufgrund der häufig bei *E. faecium* auftretenden Resistenz gegenüber Ampicillin, insbesondere bei nosokomial erworbenen Stämmen (~ 90 %), sowie auch gegenüber Glykopeptiden und hochdosierten Aminoglykosiden, legt die Identifizierung dieser Spezies gegenüber *E. faecalis* in der Regel eine größere therapeutische Herausforderung nahe (Arias and Murray, 2012; Gagetti et al., 2019; Oberhettinger et al., 2020). Selbst bei negativem Test auf *vanA/B*, die auch vom FilmArray® gewährleistet wird, kann die Unterscheidung von *E. faecalis* und *E. faecium* daher eine wertvolle Information hinsichtlich erster therapeutischer Entscheidungen liefern. Die Belastbarkeit dieser Differenzierung im ePlex® zeigte sich in der vorliegenden Studie jedoch als nicht zufriedenstellend. Dabei muss auch hier beachtet werden, dass es

sich bei den verwendeten Kassetten um RUO-Kassetten handelte. Laut Hersteller zeigten klinische Studien mit den CE-IVD und FDA-freigegebenen Kassetten eine hohe Sensitivität und Spezifität bei der Identifizierung dieser Enterokokkenspezies (Oberhettinger et al., 2020). Eine andere Gruppe, die ebenfalls mit den RUO-Versionen arbeitete, zeigte in einer klinischen Studie auch mit diesen Versionen exzellente Ergebnisse mit einer Sensitivität und Spezifität von 100 % bei insgesamt 30 analysierten Enterokokken (Huang et al., 2019). Ein Fehler bei der Goldstandardidentifizierung der betreffenden *E. faecalis* Isolate im Rahmen unserer Studie wurde mittels Sequenzierung des gesamten Genoms der betreffenden Isolate ausgeschlossen (Oberhettinger et al., 2020). Zur weiteren Bewertung der Identifizierung von Enterokokkenspezies wäre die Erhebung eines größeren Datensatzes in Folgestudien zielführend.

Falsch negative Ergebnisse erbrachten sowohl FilmArray® als auch ePlex® lediglich bei jeweils einem CoNS, namentlich *S. warneri* im FilmArray® und *S. haemolyticus* im Plex®. Auch andere AutorInnen berichten von selten auftretenden, falsch negativen Ergebnissen bei CoNS in beiden Geräten, wohingegen die hinsichtlich Pathogenität und klinischer Relevanz in der Regel problematischeren Stämme von *S. aureus* immer zuverlässig mit einer Sensitivität von 100 % erkannt wurden (Altun et al., 2013; Blaschke et al., 2012; Huang et al., 2019).

### **4.3) Besonderheiten bei der Identifizierung von gramnegativen Blutkulturen**

Bei den gramnegativen, monomikrobiellen Blutkulturen konnte ein Vergleich der auf multiplex PCR basierenden Systeme FilmArray® und ePlex® sowie zusätzlich dem auf FISH basierenden Pheno® stattfinden. Während alle drei Module eine hervorragende Spezifität von 100 % sowohl auf Genus- als auch auf Speziesebene erzielten, zeigten sich hinsichtlich der Sensitivität Unterschiede. Dabei konnte das FilmArray® mit 100 % Sensitivität und einer Abdeckung des Spektrums an gramnegativen Isolaten von 83 % überzeugen. Obwohl das ePlex® auch im gramnegativen Bereich ein deutlich breiteres Keimspektrum abdeckt als das FilmArray®, wirkte sich im Rahmen der Studie nur das anaerobe Bakterium *B. fragilis*

positiv auf die Spektrumabdeckung des ePlex® aus (Oberhettinger et al., 2020). Immerhin wurde so eine Abdeckung von knapp 89 % erreicht. Beide Isolate mit *B. fragilis* wurden problemlos identifiziert. Die zusätzlich in einer Blutkultur via Goldstandarddiagnostik detektierte Spezies *B. vulgatus* wurde vom ePlex® nicht als *B. fragilis* fehlidentifiziert. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine gute Spezifität der verwendeten *B. fragilis* Sonden, welche aber aufgrund der geringen Datenmenge nicht sicher angegeben werden kann.

Bezüglich der Relevanz von anaeroben Bakterien bei der Diagnostik von BSI herrscht Uneinigkeit. Während man in den 1970ern von einer Inzidenz anaerober Erreger bei BSI von bis zu 20 % ausging (Goldstein, 1996; Vena et al., 2015), beobachteten einige AutorInnen deutlich niedrigere Inzidenzen und postulierten insgesamt einen Rückgang (Fenner et al., 2008; Lombardi and Engleberg, 1992; Neu et al., 1990). Eine neuere Studie an einer spanischen Klinik zwischen 2003 und 2012 wies hingegen eine konstante Inzidenz von anaeroben BSI nach, stattdessen wurde ein Anstieg der Gesamtinzidenz von BSI beobachtet (Vena et al., 2015). Aufgrund des zudem beschriebenen, vermehrten Auftretens von Resistenzen in dieser Gruppe, sprachen sich die AutorInnen für die gezielte Diagnostik von anaeroben Bakterien bei BSI aus (Vena et al., 2015). Einen konstanten Anteil anaerober Isolate aus Blutkulturen, der zwischen 2 % und 5 % lag, wurde ebenfalls in diesem Zeitfenster in Singapur beobachtet (Ng et al., 2015). In beiden Studien wurden Vertreter der *B. fragilis* Gruppe als die prädominanten Bakterienspezies bei anaeroben Bakteriämien beschrieben, wobei Ng und Kollegium im Gegensatz zu anderen AutorInnen (Fenner et al., 2008; Lazarovitch et al., 2010) einen Rückgang des Anteils von *Bacteroides sp.* an der Gesamtheit der Anaerobier beobachteten. Am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT wurden in den Jahren 2015 und 2016 jeweils nur ein *Bacteroides sp.* aus positiven Blutkulturen identifiziert (Anhang-Tabelle 4). Im Jahre 2017 waren es insgesamt sechs *Bacteroides sp.* Isolate, wovon drei *B. fragilis* waren (eigene unveröffentlichte Daten). Der Anteil an durch *B. fragilis* verursachte BSI scheint aufgrund der erhobenen Daten am UKT durchschnittlich niedrig zu sein. Um genauer zu beurteilen, ob das vermehrte Auftreten von *Bacteroides sp.* im Jahre 2017 einen Ausreißer darstellt, müsste allerdings eine längere Zeitspanne analysiert werden.

Während die geringfügig verminderte Sensitivität des ePlex® maßgeblich auf einen nicht wiederholten, invaliden Testlauf bei einer Blutkultur mit *P. aeruginosa* zurückzuführen war (siehe Abschnitt 4.1), büßte das Pheno® an Sensitivität bei der Identifizierung von *E. coli* (n = 2) und *P. aeruginosa* (n = 1) ein. Diese Beobachtung steht nicht in Einklang mit den Ergebnissen der zuvor im selben Labor durchgeführten Studie (Marschal et al., 2017), bei der alle *E. coli* (n = 58) und *P. aeruginosa* (n = 8) Isolate korrekt erkannt wurden. In dieser Studie, bei der ältere Versionen der Accelerate Software und der PhenoTest™ BC Kit Kartuschen verwendet worden waren, wurde mit insgesamt 97,1 % korrekt positiven Identifizierungen bei 105 gramnegativen Isolaten, eine generell sehr hohe Sensitivität beobachtet. Mit einigen falsch positiven Identifizierungen jedoch, lag die Spezifität unter den in dieser Studie erreichten 100 %. Generell wird in einigen, teilweise auch multizentrisch angelegten Studien, von vereinzelt auftretenden Sensitivitätsproblemen bei im Keimspektrum enthaltenen, gramnegativen Bakterien berichtet (Brazelton de Cárdenas et al., 2017; Burnham et al., 2019; Charnot-Katsikas et al., 2018; Descours et al., 2018; Pancholi et al., 2018). Dabei wurde die Spezifität auch in anderen Studien mit etwa 99 % stets als hoch ermittelt (Charnot-Katsikas et al., 2018; Lutgring et al., 2018).

Auch auf Speziesebene zeigten die drei Systeme nur unwesentlich schlechtere Ergebnisse hinsichtlich der Sensitivität, bezogen auf das jeweils eigene gramnegative Keimspektrum. Die Vorteile des ePlex® gegenüber dem FilmArray® überwiegen insbesondere auch in Relation zur Gesamtheit der im Goldstandard auf Speziesebene identifizierten Isolate hier nicht so deutlich, wie bei den grampositiven Bakterien. Das ist zum einen dadurch zu erklären, dass das mit Abstand häufigste gramnegative Bakterium, *E. coli* (44 %), von beiden Systemen auf Speziesebene erkannt wird, während die den Großteil der grampositiven Bakterien abbildenden CoNS nur im ePlex® auf Speziesebene weiter differenziert werden. Zum anderen aber deckt auch das FilmArray® BCID generell einen Großteil der am häufigsten gramnegative BSI vermittelnden Enterobacterales und Nonfermenter in Speziestiefe ab.

Zwei Blutkulturen mit *K. variicola* wurden sowohl vom ePlex® als auch vom FilmArray® als *K. pneumoniae* identifiziert. Die Unterscheidung dieser Spezies, vorher auch als Phylogruppe *K. pneumoniae* III bezeichnet (Maatallah et al., 2014; Rosenblueth et al., 2004), ist aufgrund der großen genetischen Übereinstimmung als schwierig anzusehen und die Unterscheidung mittels MALDI-TOF MS wurde erst vor Kurzem etabliert

(Dinkelacker et al., 2018). Sonden für die spezifische Erkennung von *K. variicola* stehen bislang in keinem der beiden BCID-Systeme zur Verfügung. Aus diesen Gründen wurde die Diskrepanz bei *K. variicola* im Rahmen der Studie toleriert und als korrekte Identifizierung gewertet (Oberhettinger et al., 2020). Allerdings könnte eine Differenzierung dieser beiden Spezies in zukünftigen Versionen von Vorteil sein, da *K. variicola* neueren Daten zufolge einen wesentlichen Anteil der vorher als *K. pneumoniae* deklarierten Isolate bei BSI ausmacht und möglicherweise mit einer höheren Mortalität assoziiert ist (Maatallah et al., 2014). Obwohl in der Studie von Maatallah und Kollegium im Vergleich zu *K. pneumoniae* eine niedrigere Rate an Resistenzen bei *K. variicola* beobachtet wurde, konnten bereits einige Hochrisikoresistenzgene bei Stämmen dieser Spezies beschrieben werden (Oberhettinger et al., 2020; Potter et al., 2018). Solche Beobachtungen suggerieren noch deutlicher die Relevanz einer Differenzierung der beiden Spezies.

*Enterobacter* sp. stehen an dritter Stelle, der am häufigsten aus positiven Blutkulturen isolierten gramnegativen Bakterien am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT. Sie sind daher weitere BSI-Erreger, deren zuverlässige Identifizierung eine wichtige Rolle spielt. Sämtliche *Enterobacter* sp., die im Rahmen der Studie auftraten, wurden von allen Systemen korrekt erkannt. Eine Blutkultur mit *E. cloacae* Komplex konnte im Pheno® nicht getestet werden, was dort zu einer verringerten Fallzahl (n = 2) führte. Aufgrund der generell niedrigen Fallzahlen bei den gramnegativen Bakterien wurde die betreffende Blutkultur in dieser Arbeit dennoch mit in die Auswertung genommen. Während im Pheno® System keine Differenzierung von *Enterobacter* auf Speziesebene möglich ist, können ePlex® und FilmArray® zusätzlich den *E. cloacae* Komplex identifizieren, was zuverlässig gelang. Der im Goldstandard identifizierte *E. ludwigii* gehört zum selten vorkommenden Cluster V des *E. cloacae* Komplex (Hoffmann et al., 2005; Kremer and Hoffmann, 2012) und wurde folgerichtig in ePlex® und FilmArray® als *E. cloacae* Komplex identifiziert. Dieses Ergebnis wurde allerdings nicht als Identifizierung auf Speziesebene gewertet. Generell werden auch in der MALDI-TOF MS nur äußerst selten Speziesidentifizierungen bei dieser Gruppe erzielt (unveröffentlichte eigene Daten). Der *E. cloacae* Komplex macht mit 87 % (n = 55; Anhang-Tabelle 4) der in den Jahren 2015 bis 2017 aus Blutkulturen an unserem Institut identifizierten Isolate den Großteil der *Enterobacter* hier aus. In dieser Studie waren alle *Enterobacter* Mitglieder des *E. cloacae* Komplex. Es ist daher fraglich, inwiefern die zusätzliche Angabe dieser Information durch ePlex® und

FilmArray® für die Diagnostik als relevant eingestuft werden kann. Da das Pheno® ein Antibiogramm zur Identifizierung bereitstellt, kann auf diese genauere Klassifizierung auch im Hinblick verschiedener Therapieregime vermutlich verzichtet werden.

#### 4.4) Potenzial der Schnelltestsysteme bei polymikrobiellen Blutkulturen

Die Testung polymikrobieller Blutkulturen war im Design dieser Studie zunächst nicht vorgesehen. Initial im Grampräparat als monomikrobiell deklarierte Blutkulturen, die sich aber im Anschluss in der Diagnostik als polymikrobiell herausstellten, betrafen acht der insgesamt 148 untersuchten Blutkulturen ( $\pm 5,4\%$ ). Da sie aber in der Routinediagnostik von Blutkulturen immer wieder vorkommen, wurden die Ergebnisse im Rahmen dieser Arbeit mit analysiert. Generell wiesen sich FilmArray® und ePlex® als limitiert gut einsetzbar bei polymikrobiellen Blutkulturen aus. Im Keimspektrum enthaltene Bakterien wurden mit hoher Zuverlässigkeit erkannt. Beim FilmArray® waren dies 13 der 14 im Goldstandard identifizierten Bakterien (93%), welche meistens jedoch auf Genusebene identifiziert wurden (Oberhettinger et al., 2020). In lediglich zwei Blutkulturen gab das Identifizierungsergebnis den Hinweis auf mehr als ein Isolat, was vor allem auf das häufige Vorkommen zweier unterschiedlicher Spezies an CoNS oder Streptokokken zurückzuführen war. Bei diesen Gruppen wird im FilmArray® keine tiefere Identifizierung ermöglicht. Auch beim ePlex® wäre in diesen Fällen, trotz Speziesidentifizierung von *S. epidermidis* und zusätzlichem Erkennen von *S. constellatus* als Mitglied der *S. anginosus* Gruppe, kein Nachweis des Vorliegens mehrerer Bakterien ohne weiteren Kontext möglich gewesen, da das jeweils andere Bakterium nur auf der entsprechenden Genusebene angegeben werden konnte. Bei einer Blutkultur wurde vom FilmArray® das zusätzliche grampositive Bakterium (*Streptococcus sp.*) nicht identifiziert, was zu einer geringen Quote der vollständigen Identifikation von nur 50% bei den erkennbaren Blutkulturen mit sowohl grampositiven als auch gramnegativen Bakterien führte. In der kulturbasierten Diagnostik zeigte sich ein sehr langsames Wachstum des betreffenden *S. constellatus* mit nur wenigen Kolonien, bis zur ID durch MS dauerte es mehr als neun Tage. Es lässt sich daher vermuten, dass eine nur sehr geringe Konzentration dieses Bakteriums in der



Blutkultur vorlag (Oberhettinger et al., 2020). Beim ePlex® hatte keine Testung in der Kassette für grampositive Bakterien stattgefunden, allerdings wurde in der BCID-GN ein PAN-Target erkannt. Ob die Sensitivität auch für die Identifizierung des Genus oder sogar der *S. anginosus* Gruppe ausreichend gewesen wäre, lässt sich daher nicht beurteilen. Hierfür sind weitere Studien notwendig, bei denen der Fokus mehr auf polymikrobiellen Blutkulturen liegt. Dies ist insbesondere interessant, da einige AutorInnen Schwächen bei der Identifizierung aller detektierbaren Isolate aus positiven Blutkulturen bei beiden Systemen beobachteten (Banerjee et al., 2015; Blaschke et al., 2012; Huang et al., 2019; Ward et al., 2015), während andere AutorInnen auch bei polymikrobiellen Blutkulturen eher von guten Ergebnissen berichteten (Fiori et al., 2016; Peker et al., 2018). Das ePlex® erkannte in der hier präsentierten Studie alle zwölf (100 %) im jeweils verwendeten BCID-Spektrum detektierbaren Bakterien auf Familienebene und abgesehen von *P. mirabilis* in einer Mischkultur auch alle (fünf von sechs) abgedeckten Spezies. Das PAN-Target erwies sich bei den beiden Mischkulturen als zuverlässig und ermöglichte somit bei allen betreffenden Blutkulturen den Hinweis auf das Vorliegen mehrerer Arten von Erreger. In der Blutkultur mit *F. nucleatum* und *D. pneumointens* wurde das PAN-Target hingegen nicht erkannt (Oberhettinger et al., 2020). Interessanterweise wurden die beiden gramnegativen Stäbchenbakterien auch im Grampräparat nicht als gramnegativ, sondern grampositiv gewertet. In Zusammenschau mit der verhältnismäßig langen Kulturzeit bis zur Identifizierung via Massenspektroskopie (mehr als zwei Tage bei *F. nucleatum*, mehr als drei Tage bei *D. pneumointens*) spricht auch dies wiederum für eine, möglicherweise aufgrund niedriger Dichte an Bakterien, eher ungeeignete Blutkultur für die molekulare Schnelltestung. Generell wären auch mehr Daten zur Bewertung der Zuverlässigkeit und des diagnostischen Wertes des PAN-Targets in zukünftigen Datenerhebungen wünschenswert. Im direkten Vergleich mit dem FilmArray® liegt möglicherweise ein Vorteil im „All-in-One“-Konzept des FilmArray® BCID, welches weniger Ressourcen verbraucht und unter Umständen schneller zu eindeutigeren Ergebnissen bei polymikrobiellen oder hinsichtlich des Grampräparates nicht sicher zuordenbaren Blutkulturen gelangt. Sicherlich werden für die Fähigkeit, alle Organismen in einem Testansatz abzudecken, Abstriche bezüglich der Größe des gesamten Keimspektrums in Kauf genommen. Inwieweit diese jedoch im Einsatz klinisch relevant sind, ist unter anderem stark von den lokalen Erregermustern und

auch den angebotenen Abteilungen abhängig. Für unser Institut wird dies genauer in Kapitel 4.7 erörtert.

Hinsichtlich polymikrobieller Blutkulturen konnten für das PhenoTest™ BC Kit im getesteten Umfang keine Vorteile eruiert werden, da es nur mit der Kassette für gramnegative Bakterien genutzt wurde und in der Studie keine Blutkulturen mit mehr als einem gramnegativen Isolat vorkamen. Im Keimspektrum enthaltene, gramnegative Bakterien wurden jedoch in zwei von zwei Fällen problemlos erkannt, unabhängig vom Vorliegen weiterer Bakterien. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen in der Studie von Marschall und Kollegium (Marschal et al., 2017) und spricht dafür, dass das zusätzliche Vorhandensein von anderen Bakterien die Identifikation der im PhenoTest™ BC Kit abgebildeten, gramnegativen Bakterien nicht stört. Andere AutorInnen beobachteten auch bei zusätzlicher Verwendung des BC Kit für grampositive Bakterien eine eher geringe Sensitivität für polymikrobielle Blutkulturen (Descours et al., 2018; Lutgring et al., 2018). Eine mögliche Erklärung für die oftmals beschriebenen Schwierigkeiten der molekularen Schnelltestsysteme bei polymikrobiellen Blutkulturen wäre ein potenziell vorliegender Konzentrationsgradient zwischen den verschiedenen Pathogenen. So wäre es denkbar, dass ein im Wachstum dominanter Erreger die Positivmeldung der Blutkultur triggert, während andere Erreger noch in deutlich geringer Dichte vorliegen. Diese könnten dann noch unterhalb der Sensitivitätsschwelle der molekularen Methoden liegen, während eine selektive Kultur nach einem unter Umständen prolongierten Zeitraum die Identifikation dieser Bakterien ermöglichen würde (Blaschke et al., 2012).

Die Repräsentativität der Daten in dieser Studie ist aufgrund des weiter oben bereits erwähnten Designs für polymikrobielle Blutkulturen nicht direkt aussagekräftig. Einerseits sind wenige solcher Blutkulturen eingeschlossen, andererseits bilden diese eine spezielle Population, im Grampräparat nicht als polymikrobiell erkennbarer Blutkulturen, ab. Eine Ursache hierfür ist das Vorliegen von morphologisch und auch teils phylogenetisch ähnlichen Bakterien in zumindest vier (50 %) der polymikrobiellen Blutkulturen, die sich auch in der jeweiligen Pathogenität und Behandlung nicht wesentlich unterscheiden. Außerdem wurden beim ePlex® dem Studienprotokoll entsprechend keine PAN-Targets weiterverfolgt. Aufbauende Studien, mit einem auch auf polymikrobielle Blutkulturen fokussiertem Ablauf, sollten durchgeführt werden, besonders da polymikrobielle BSI mit tendenziell schlechteren Therapieergebnissen

und längeren Behandlungsdauern bei betroffenen Patienten einhergehen (Lee et al., 2017; Pavlaki et al., 2013; Sancho et al., 2012).

#### **4.5) Analyse der Testung auf antimikrobielle Suszeptibilität und Resistenzgene**

Da BSI nicht selten durch spezifische Pathogene mit Resistenzen gegenüber den entsprechenden Erstlinienantibiotika ausgelöst werden, ist ein zeitnaher und sicherer Informationsgewinn diesbezüglich oft ebenso wichtig, wie die Identifikation des Pathogens selbst. Bisherige Goldstandardmethoden sind allesamt von einem *in vitro* Wachstum der Isolate in Subkulturen abhängig. Vorläufige Antibiogramme, die direkt aus den positiven Blutkulturen gefertigt werden, sind einerseits zeitlich vom Wachstum der Keime abhängig und andererseits nicht standardisiert. In den letzten Jahren gelang es, genetische Marker für häufige Resistenzgene zu identifizieren, *mecA* und *vanA/vanB* sind die prominentesten Beispiele. Das Screening nach diesen Genen mittels oftmals laboreigenen PCR wird seit längerer Zeit in vielen mikrobiologischen Laboren bei morphologischem Verdacht auf Staphylokokken oder Enterokokken direkt aus positiven Blutkulturen durchgeführt. Die Methode ist jedoch von vorhandenem Personal abhängig, wobei in der Regel der Ansatz des Tests einmal pro Tag und nicht kontinuierlich erfolgt. Molekulare Schnelltestsysteme wie das ePlex® und das FilmArray® setzten genau auf diese Methode und automatisieren den Ablauf, was mit geringerem technischem und personellem Aufwand einhergeht. Die Ergebnisse hinsichtlich *mecA* zeigten bei beiden Systemen eine hohe Zuverlässigkeit von 100 % zum Ausschluss einer Oxacillinresistenz. Ebenso wurde bei den meisten gegenüber Oxacillin resistenten Staphylokokken *mecA* nachgewiesen. Lediglich ein Isolat der Spezies *S. epidermidis* (3 %) wurde vom FilmArray® fälschlicherweise als negativ für *mecA* berichtet (Oberhettinger et al., 2020). Bei dem Oxacillin-resistenten *S. hominis*, bei dem alle PCR-Varianten keinen Nachweis von *mecA* oder *mecC* erbrachten, liegt die Vermutung nahe, dass ein anderer Mechanismus der Resistenz zugrunde lag. Dies zeigt, dass Resistenzgene generell zwar gute Marker für das Vorliegen der entsprechenden Resistenz sind, jedoch nicht vollständig die AST ersetzen können.

Bei den Resistenzgenen für eine Vancomycinresistenz lagen beide Systeme in allen Fällen richtig, wobei hinsichtlich der Sensitivität zu beachten ist, dass nur ein VRE (11 % aller Enterokokken) im Rahmen der Studie auftrat (Oberhettinger et al., 2020).

Wesentliche Unterschiede zeigten ePlex® und FilmArray® bei den für gramnegative Bakterien zur Verfügung stehenden Markern: Während FilmArray® nur KPC zur Verfügung stellt, bringt das ePlex® hier mit einem wesentlich breiteren Spektrum potenzielle Vorteile bei der Erkennung von ESBL sowie auch von Metallo- $\beta$ -Laktamasen, welche bei klinisch wichtigen Nonfermentern oftmals vorliegen. In dieser Studie konnte dabei nur ein Vorteil durch den beim ePlex® zusätzlichen Test auf den ESBL-Marker CTX-M eruiert werden, welcher bei allen drei Enterobacterales mit einem entsprechenden Resistenzmuster positiv war und so eine hohe Sensitivität suggeriert. Auch in der Studie von Huang und Kollegium wurden sehr verlässliche Ergebnisse bei der Testung auf die unterstützten Resistenzgene bestätigt, hier wurden fünf von fünf CTX-M-Typ ESBL erkannt (Huang et al., 2019). Auch hier kam CTX-M nur bei Enterobacterales vor. Generell spielt CTX-M bei *P. aeruginosa* eine untergeordnete Rolle (persönliche Kommunikation mit Apl. Prof. Dr. S. Peter), dennoch testet das ePlex® bei dieser Spezies. Inwieweit CTX-M als einziger ESBL-Marker tatsächlich weite Teile des lokalen Erregerspektrums erfassen kann, bleibt ebenfalls durch weiterführende Studien zu eruieren.

Enterobacterales mit Carbapenemresistenz kamen in der Studie nicht vor, sodass der im Assay enthaltene Nachweis des KPC-Genes nicht beurteilt werden konnte. Ein *P. aeruginosa* zeigte zwar eine Resistenz gegenüber Imipenem, nicht jedoch gegenüber Meropenem. Zudem wurden KPC-positive *P. aeruginosa* bislang am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT noch nicht beobachtet (persönliche Kommunikation mit Apl. Prof. Dr. S. Peter). Generell ist der Nachweis von Carbapenemresistenzen bei gramnegativen Bakterien am UKT, wie auch an vergleichbaren akademischen Krankenhäusern der Maximalversorgung in Deutschland und Europa, derzeit noch sehr selten (Katchanov et al., 2018; Oberhettinger et al., 2020; Pfeifer et al., 2010). Von dem alleinigen Testen auf KPC bei gramnegativen BSI im FilmArray® ist aus epidemiologischer Sicht daher aktuell wenig Zusatzgewinn hinsichtlich Resistenzen bei solchen BSI zu erwarten. Das ePlex® dagegen deckt die am meisten verbreiteten, Carbapenemresistenzen vermittelnden, Gene ab (Nordmann et al., 2011; Oberhettinger et al., 2020). Anhand der in dieser

Arbeit gewonnen Daten sowie auch der belgischen ePlex® Evaluation (Huang et al., 2019) können jedoch, aufgrund der lokal niedrigen Prävalenz von Carbapenemase-bildenden Bakterien in BSI, keine Aussagen über die Qualität der Tests getroffen werden. Für eine solche Beurteilung würden Langzeitbeobachtungen oder Daten aus Regionen mit höheren Prävalenzen nötig sein.

Das AST-Profil eines Isolates, aufgrund dessen Therapieentscheidungen getroffen werden, kann, wie bereits oben erwähnt, jedoch insbesondere bei gramnegativen Bakterien nicht sicher über die Testung einer begrenzten Anzahl an Resistenzgenen vorausgesagt werden (Lutgring et al., 2018). Beispielsweise werden Carbapenemresistenzen, insbesondere bei dem häufigen BSI Erreger *E. coli*, in teilweise über 50 % durch andere Mechanismen als den oben beschriebenen, genetisch nachweisbaren Carbapenemasen hervorgerufen (Nordmann and Poirel, 2019). Dies stellt eine der wohl noch schwerwiegendsten Limitationen der multiplex PCR-basierten Systeme in der BSI Diagnostik dar. Accelerate Diagnostics setzt mit dem Pheno® dagegen auf eine Methode, die mittels automatisierter, digitaler Fluoreszenzmikroskopie in Echtzeit *in vitro* AST für viele relevante Antibiotika innerhalb weniger Stunden ermöglicht. Dabei zeigten sich gute Ergebnisse bezüglich der Kategorie-Übereinstimmung mit der Goldstandardmethode VITEK® 2 AST. In dieser Studie lag sie bei 93 % und deckt sich damit gut mit den Ergebnissen ähnlicher Studien (Brazelton de Cárdenas et al., 2017; Charnot-Katsikas et al., 2018; Descours et al., 2018; Lutgring et al., 2018; Marschal et al., 2017). Bei der niedrigeren Fallzahl an im Pheno® getesteten Blutkulturen in dieser Arbeit ist die Möglichkeit zur Ableitung von Aussagen bezüglich konkreter Schwächen limitiert. Dies lag auch nicht im zentralen Fokus der vorliegenden Studie und wurde in vorangegangenen Arbeiten, unter anderem am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT, genauer evaluiert. Hier zeigten sich am ehesten bei Enterobacterales und *P. aeruginosa* Diskrepanzen zwischen Pheno® und Goldstandard (Descours et al., 2018; Marschal et al., 2017). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden bei dem getesteten *P. aeruginosa* insgesamt drei schwerwiegende Fehler gefunden, die alle mittels E-Test bestätigt wurden und in dieser Konstellation eine Übertherapie mit Reserveantibiotika triggern hätten können. Da nur ein einziger *P. aeruginosa* getestet werden konnte, ist die Aussagekraft dennoch stark begrenzt. Descours und Kollegium berichten allerdings ebenso von einer schwächeren Leistung des Pheno® bei *P. aeruginosa* und hinsichtlich  $\beta$ -Laktamen, wie Ceftazidim, Cefepim und Piperacillin-Tazobactam,

welche im Rahmen einer neuen Software-Version (v1.3.2) verbessert werden sollen (Descours et al., 2018). Gezielte Studien diesbezüglich unter Nutzung der neuen Software-Version bleiben abzuwarten. In diesem Rahmen wäre sicher auch die Evaluation der Leistung des PhenoTest™ BC Kit hinsichtlich Colistin und Amikacin AST interessant, da bisher keine BSI-Erreger mit Vergleichsantibiogrammen aus der kulturbasierten Goldstandarddiagnostik untersucht wurden.

Eine erneute Testung diskrepanter Ergebnisse zwischen Pheno® und Laborstandard AST-Methode, ähnlich wie in unserer Studie mittels E-Test erfolgt, wurde auch von Descours und Kollegium (VITEK® 2) (Descours et al., 2018) sowie Lutgring und Kollegium (MicroScan WalkAway®-96 plus, Beckman Coulter Diagnostics, USA) (Lutgring et al., 2018) in vergleichbarer Form durchgeführt. Dabei zeigten sich ebenfalls bei beiden Methoden Diskrepanzen der Kontrollmethode im Vergleich mit dem Goldstandard, wobei gegenüber dem VITEK® 2 das Pheno® deutlich schlechter abschnitt (Descours et al., 2018). Gegenüber dem MicroScan hingegen konnte bei sehr schwerwiegenden Fehlern häufig das Pheno®-Ergebnis bestätigt werden, während bei schweren Fehlern das Ergebnis des MicroScan als Standardmethode meist bestätigt wurde. Eine mögliche Ursache für das Auftreten solcher Diskrepanzen, welche dann auch nur uneinheitlich mittels erneuter Testung aufgeschlüsselt werden können, ist das potenzielle Vorliegen von mehreren Stämmen, die sich hinsichtlich ihrem Resistenzverhalten unterscheiden, morphologisch jedoch auf der Agarplatte nicht differenzierbar sind. Welcher Stamm für die Diagnostik, beziehungsweise für die Archivierung abgenommen wird, wäre dann zufallsbedingt. In solch einem Fall stellt die Diagnostik direkt aus der positiven Blutkultur einen erheblichen Vorteil dar, da keine Selektion in etwaigen Subkulturen erfolgt, sondern der tatsächliche Status innerhalb der Blutkultur erfasst werden kann.

#### **4.6) Beurteilung des Zeitgewinns durch molekulare Schnelldiagnostik**

Mit einem durchschnittlichen Zeitgewinn von ca. 30 Stunden bei der Identifizierung von 137 monomikrobiellen Isolaten zeigten sich die Schnelltestsysteme erwartungsgemäß klar überlegen. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit dem von anderen AutorInnen

gegenüber Standardmethoden beschriebenen Zeitgewinn von zwischen 23 und 42 Stunden (Bhatti et al., 2014; Brazelton de Cárdenas et al., 2017; Charnot-Katsikas et al., 2018; Lutgring et al., 2018; MacVane and Nolte, 2016; Marschal et al., 2017; Ward et al., 2015). Besonders erwähnenswert ist, dass bei *S. aureus* Isolaten bereits das Vorliegen der Ergebnisse aus der laboreigenen PCR als Zeitpunkt der Identifizierung durch den Goldstandard gewertet werden musste. Damit lagen Ergebnisse oft schon nach fünf bis sechs Stunden vor, was auch hier wiederum den eindeutigen Zeitgewinn durch den kulturunabhängigen, molekularen Ansatz bestätigt. Da die laboreigenen PCR technisch und personell aufwändiger sind, können ePlex® und FilmArray® selbst demgegenüber einen zusätzlichen Zeitgewinn von etwa vier Stunden ermöglichen, wobei hinsichtlich der Zuverlässigkeit keine Abstriche gemacht werden müssen (siehe Kapitel 3.3.1 und 4.5). Aufgrund des Personalaufwandes werden die laboreigenen PCR nur in den Kernarbeitszeiten durchgeführt. Auch diese Limitation kann beim Einsatz der Schnelltestsysteme, der mit einer „Hands-on-time“ von zwei Minuten auch ohne spezialisiertes Fachpersonal möglich ist, als überbrückbar angesehen werden. Einen Einsatz über 24 Stunden an sieben Tagen die Woche scheint daher realisierbar. Bei einem *K. pneumoniae* wurde ein weiterer Ausreißer hin zu kurzen Identifizierungszeiten in der Standarddiagnostik mit einbezogen. Das bei dieser Blutkultur nach nur vier Stunden vorliegende Identifizierungsergebnis kann durch eine MALDI-TOF MS Identifizierung von bereits nach kurzer Subkultivierung gewachsenen, kleinsten Kolonien entstanden sein. Dieses Vorgehen wird in unserem Routinelabor nur selten angewendet, zeigte aber in Studien akzeptable Ergebnisse mit 70 % bis 80 % korrekter Identifizierungen und zählt in anderen Laboren zur Routinediagnostik (Huang et al., 2019; Kohlmann et al., 2015; Verroken et al., 2015). Huang und Kollegium berichteten dennoch von demgegenüber teilweise mehr als drei Stunden früher erzielten Ergebnissen beim ePlex®. Die Schnelltestplattformen FilmArray®, ePlex® und Pheno® sind also sowohl bezüglich Sensitivität als auch der Zeit bis zum Ergebnis überlegen. Eine andere Erklärung für das frühzeitige Identifizierungsergebnis dieses *K. pneumoniae* wäre ein Fehleintrag in der EDV aufgrund des zu dieser Zeit bereits vorliegenden und übermittelten Pheno® Ergebnisses. Aufgrund der erhobenen Daten war keine der beiden Szenarien sicher nachvollziehbar.

Aussagen bezüglich Resistenzgenen konnten innerhalb weniger als zwei Stunden durch ePlex® und FilmArray® getroffen werden. Dies spielt insbesondere an unserem Institut, an welchem positive Blutkulturen mit Staphylokokken und Enterokokken

überdurchschnittlich oft vorkommen (siehe Kapitel 3.6 und 4.7), eine wichtige Rolle. Da die häufigsten klinisch relevanten Resistenzen bei diesen Genus durch *mecA* und *vanA/vanB* hervorgerufen werden, kann die bei den Schnelltestsystemen im Durchschnitt mehr als 24 Stunden vor dem endgültigen Antibiotogramm vorliegende Kenntnis über diese Marker einen deutlichen Zusatznutzen darstellen. Dieser Vorteil stellt auch gegenüber den nur innerhalb der Kernarbeitszeiten nach etwa fünf bis sechs Stunden vorliegenden Ergebnissen der laboreigenen PCR eine erhebliche Verbesserung dar (unveröffentlichte eigene Daten).

Die Zeit bis zur verlässlichen Identifizierung und AST bei klassischen, phänotypischen Methoden ist stark abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Metabolismus des betreffenden Keims. In der Literatur wird meist eine durchschnittliche Bearbeitungszeit von 48 bis 72 Stunden beschrieben (Banerjee et al., 2015; Bauer et al., 2014; Buehler et al., 2016; MacVane and Nolte, 2016; Mancini et al., 2010; Peters et al., 2004). Diese Studie zeigte ebenfalls einen Großteil der AST-Ergebnisse nach 48 Stunden, wobei auch öfters nach 20 bis 40 Stunden Ergebnisse vorlagen (siehe Abbildung 3.11). Die Zeit bis zum AST-Ergebnis kann aber auch beispielsweise im Falle schwer anzüchtbarer Mikroorganismen, wie Anaerobiern, und auch bei polymikrobiellen Blutkulturen deutlich länger ausfallen. Diese waren im Rahmen der vorliegenden Arbeit selten, beziehungsweise wurden nicht mit ausgewertet.

Die durchschnittliche Zeitersparnis der Pheno® AST gegenüber der kulturbasierten AST lag in dieser Arbeit bei 33 Stunden und 54 Minuten. Bei vergleichbaren Studien wurden sogar Differenzen zwischen 40 und 48 Stunden beschrieben (Brazelton de Cárdenas et al., 2017; Charnot-Katsikas et al., 2018; Lutgring et al., 2018; Marschal et al., 2017). Dies ist zum einen durch geringfügige Unterschiede in der Berechnung der Zeiten erklärbar, zum anderen wurden im Rahmen dieser Arbeit nur monomikrobielle Blutkulturen der Zeiten-Auswertung zugrunde gelegt. Bei anderen AutorInnen wurden auch polymikrobielle Blutkulturen mit einbezogen, bei denen oftmals mindestens eines der Isolate ein verlangsamtes Wachstum zeigt.



#### 4.7) Repräsentativität der Studie

Da in einer zeitlich begrenzten Studie, wie der hier zugrundeliegenden, nur eine Momentaufnahme der tatsächlichen Bandbreite von Anforderungen an die neuen Diagnostiksysteme erfasst werden kann, ist die Frage nach der Repräsentativität der Studie zu erörtern. Um dies zu erleichtern, wurden die Isolate aus positiven Blutkulturen in den zwei Jahren vor der Studie und dem gesamten Jahr, in welchem die Studie selbst startete, retrospektiv erfasst. Dabei zeigte sich insgesamt ein durch die Studie gut repräsentiertes Kollektiv. Die Abbildung der Anteile an grampositiven Bakterien (71 % in der Studie, 70 % im Durchschnitt 2015 bis 2017), gramnegativen Bakterien (25 % in der Studie, 26 % im Durchschnitt 2015 bis 2017) und Pilzen (jeweils 4 %) war sogar nahezu perfekt. Ebenso wurden in beiden Zeiträumen 94 % der grampositiven Bakterien von Staphylokokken, Enterokokken, Streptokokken und Propionibakterien gebildet (vgl. Abb. 3.2 und 3.13B). Hierbei zeigte sich im Rahmen der Studie eine leichte Überrepräsentation von Staphylokokken, wobei *S. aureus* in der Studie 25,3 % und im Jahresdurchschnitt 20,3 % ausmachten. Die CoNS wurden gleichermaßen zu zwei Drittel durch *S. epidermidis* repräsentiert.

Bei den Enterokokken zeigten sich im Studienzeitraum wie auch in der Jahresstatistik die deutliche Dominanz der Spezies *E. faecium* und *E. faecalis*, wobei Unterschiede in der Häufigkeit der beiden Spezies eher gering ausfielen und sich zwischen Studie und Statistik nicht deckten. Interessanterweise entspricht die geringe Prävalenz an VRE in der Studie mit 11 % (n = 1) exakt der in den drei Jahren beobachteten Häufigkeit (insgesamt 26 von 237). Dabei muss jedoch beachtet werden, dass der Anteil an VRE in den Jahren 2015 bis 2017 sukzessive zunahm. Alle VRE waren *E. faecium*, die bekanntermaßen besondere Problematik dieser Spezies hervorhebend.

Die Streptokokken wurden im Rahmen der Studie wesentlich durch Viridans-Gruppe, *S. bovis* Gruppe und *S. pneumoniae* repräsentiert, wobei *S. pneumoniae* gegenüber den anderen Streptokokken nicht häufiger auftrat. In den Jahren 2015 und 2016 waren Isolate von *S. pneumoniae* häufiger als solche mit anderen Streptokokkenspezies und -gruppen. Im Jahre 2017 dagegen war *S. pneumoniae* seltener, allerdings zusammen mit *S. oralis* dennoch eine der meistnachgewiesenen Spezies. Möglicherweise ist ein Rückgang der *S. pneumoniae* assoziierten BSI, sofern der beobachtete Rückgang

eine Tendenz und keinen Ausreißer darstellt, am ehesten als lokale Besonderheit durch zwischenzeitlich höhere Durchimpfungsraten, insbesondere bei Risikopatienten, zu erklären. Aufgrund des Status von *S. pneumoniae* als obligates Pathogen bei Blutkulturen im Gegensatz zu anderen  $\alpha$ -hämolytischen Streptokokken, welche eher als fakultative Erreger angesehen werden (Kreidl et al., 2019), ist die Ergänzung der Keimspektren von ePlex® und FilmArray® allerdings als sinnvoll zu beurteilen. Über die Sensitivität dieser Diskrimination lässt sich aufgrund der niedrigen Fallzahl von Streptokokken und insbesondere *S. pneumoniae* (n = 1) keine Aussage treffen. Hierfür werden in Zukunft weitere Datenerhebungen nötig sein, wobei vergleichbare Arbeiten sowohl exzellente Sensitivitäten als auch Spezifitäten bei den nachweisbaren Streptokokken auf beiden Plattformen zeigten (Altun et al., 2013; Huang et al., 2019).

Sowohl im Rahmen der Studie als auch in der retrospektiven Prävalenzbetrachtung zeigen sich *Propionibacterium sp.* als häufig aus positiven Blutkulturen isolierte Bakterien. Dabei zeigt sich in der Studie eine Unterrepräsentation im Vergleich zur Statistik 2015 bis 2017, bei der Propionibakterien sogar noch knapp häufiger als Streptokokken isoliert wurden. Dies erhärtet nochmals den in Kapitel 4.2 diskutierten Vorteil des ePlex® BCID-GP durch die Fähigkeit zur Erkennung von *P. acnes*. Es enthält nur eine Sonde für die Spezies *P. acnes*, dies ist jedoch an unserem Institut mit > 75 % der am häufigsten isolierte Vertreter der Propionibakterien. In dieser Studie lag der Anteil sogar bei 100 %, daher bleibt die Spezifität für *P. acnes* auf Speziesebene zunächst unklar.

Die verbleibenden 6 % der jährlich aus Blutkulturen isolierten grampositiven Bakterien verteilen sich eher heterogen auf selten vorkommende, oftmals auch primär als Kontaminanten geltende Genus und Spezies, was sich ebenfalls sehr gut mit den in die Studie eingeflossenen Blutkulturen vereinbaren lässt.

Auch bei den gramnegativen Bakterien zeigte sich eine gute Übereinstimmung der am häufigsten aus positiven Blutkulturen isolierten Bakterien zwischen Studie und Dreijahresprävalenz. Während in der Prävalenz 83 % der gramnegativen Bakterien von *E. coli*, Klebsiellen, Enterobacter und Pseudomonaden abgedeckt wurden, zeigte das Studienkollektiv eine im Vergleich noch etwas heterogenere Verteilung, in welcher 75 % der Isolate durch diese einheitlich gut in den Keimspektren der drei Schnelltestsysteme erfassten Bakterien repräsentiert wurden. Der Unterschied ist im Wesentlichen einerseits auf einen etwas geringeren Anteil an *E. coli* in der Studie und

zum anderen auf eine dagegen eher hohe Rate an Anaerobiern der Familie *Bacteroides* zurückzuführen. Diese lagen in den drei retrospektiv untersuchten Jahren nie bei mehr als 2 % der Gesamtheit an Isolaten, in der Studie dagegen bei 8,3 %. Das höchste Auftreten von Isolaten an *Bacteroides* wurde im Jahre 2017, in welchem auch die Studie startete, beobachtet. In den vorherigen Jahren waren mit jeweils einem Isolat der Anteil vernachlässigbar gering (siehe hierzu auch Kapitel 4.3).

Vertreter der Serratien, hauptsächlich repräsentiert durch *S. marcescens*, zeigten ebenfalls ein gegenüber den Vorjahren erhöhtes Auftreten (Anhang-Tabelle 4), passend zu der leichten Überrepräsentation im Rahmen der Studie mit 5,6 % gegenüber einem jährlichen Durchschnitt von etwa 3 %. *Serratia marcescens* wird von den Keimspektren aller drei Schnelltestsysteme erkannt.

Die beiden den Enterobacterales zugehörigen Familien *Citrobacter* und *Proteus* zeigten in der retrospektiven Betrachtung mit einem konstanten jährlichen Anteil von zwischen 3 % bis 4 % eine Rolle, welche in der Studie nicht abgebildet wurde. Lediglich in einer polymikrobiellen Blutkultur konnte ein *P. mirabilis* vom ePlex® nicht identifiziert werden, während das FilmArray® und Pheno® zumindest den Genus erkannten. So kann jedoch aus den vorliegenden Daten keine Aussage über die Sensitivität bei diesen zum Großteil in den Keimspektren der drei evaluierten Systeme abgedeckten Familien getroffen werden. Daten anderer AutorInnen suggerieren allerdings in der Zusammenschau eine gute Sensitivität für *Proteus* und *Citrobacter* beim Pheno® und ePlex® (Huang et al., 2019; Lutgring et al., 2018; Marschal et al., 2017; Pancholi et al., 2018), sowie für *Proteus* beim FilmArray® (Altun et al., 2013; Salimnia et al., 2016).

Generell war die Fallzahl an gramnegativen Bakterien in der vorliegenden Studie geringer als die der grampositiven, sodass als Konsequenz auch die Repräsentativität etwas geringer ausfallen kann. Eine weitere Erklärung wären mögliche Hinweise auf eine erhöhte Dynamik beim Spektrum der gramnegativen BSI-Erreger, die am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT isoliert werden. Um dies genauer zu beurteilen, wären Betrachtungen über längere Zeitspannen notwendig.

Von den 126 aus positiven Blutkulturen isolierten Pilzen in den Jahren 2015 bis 2017 handelte es sich in 75 % um *C. albicans* und *C. glabrata*, welche zwei Drittel der identifizierten Pilze in der dieser Arbeit zugrundeliegenden Studie ausmachten. Die Dominanz dieser beiden Spezies bei Pilz-assoziierten BSI, wird auch in internationalen

Arbeiten mit wesentlich größeren, zugrundeliegenden Datensätzen beschrieben (Diekema et al., 2012; Wisplinghoff et al., 2014). Alle im Rahmen der Studie aufgetretenen Pilze waren in den Keimspektren beider Systeme enthalten und wurden korrekt identifiziert. Bei einer geringen Datenmenge, die zwar die relative Häufigkeit von Pilzen in positiven Blutkulturen an unserem Institut sehr gut repräsentiert, allerdings mit Vorsicht bezüglich der Aussagekraft betrachtet werden muss, ist der Vergleich zur Statistik hier besonders interessant. Die großen Gruppen an Pilzisolaten (siehe Abbildung 3.15) werden von beiden Schnelltestsystemen abgedeckt. Bei den selten auftretenden Pilzen in den Jahren 2015 bis 2017 waren nur zwei Pilze (*Candida catenulata* und *Saccharomyces cerevisiae*) nicht im Keimspektrum des ePlex® enthalten, wodurch theoretisch eine Abdeckung von 98 % erreicht werden hätte können. Das FilmArray® Spektrum enthielt, trotz der gegenüber dem ePlex® deutlich reduzierten Bandbreite, 94 % der Isolate. Dabei ist zu erwähnen, dass alle nicht abgedeckten Spezies nur jeweils einmal oder zweimal im betreffenden Jahr vorkamen. Diese Betrachtung spricht für eine sehr geeignete Auswahl der detektierbaren Pilzspezies in beiden Systemen, was auch aus den Beobachtungen in anderen Arbeiten hervorgeht (Fiori et al., 2016; Huang et al., 2019; Salimnia et al., 2016).

Die in dem Studienzeitraum nachgewiesenen Bakterien und Pilze spiegeln somit das lokale Erregerspektrum sehr gut wider, was von allen drei Schnelltestsystemen in adäquater Weise abgedeckt wurde. Im gramnegativen Bereich kann so eine Abdeckung des Spektrums von etwa 90 % erwartet werden, mit dabei vermutlich geringen Einbußen des FilmArray® durch das Fehlen von *Citrobacter* im BCID. Diese Annahme ist vereinbar mit den in einer französischen Studie zur Evaluation des Pheno® mit größerer Datenmenge genannten Zahlen (Pantel et al., 2018). Auch bei den grampositiven Bakterien ist eine Abdeckung des am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT vorkommenden Keimspektrums aus positiven Blutkulturen von mehr als 80 % beim FilmArray® zu erwarten. Durch die zur Verfügung stehende Identifikation von Kontaminanten wie unter anderen *P. acnes* könnte das ePlex® sogar über 90 % der anfallenden grampositiven Isolate erkennen. Huang und Kollegium beschreiben diesbezüglich eine Abdeckung der BSI verursachenden Mikroorganismen von mindestens 98 % in Belgien, wobei nicht hervorgeht, ob nur manifeste BSI oder auch potenziell kontaminierte Blutkulturen in diese Einschätzung miteingingen (Huang et al., 2019).

Die Erhebung der Daten zur Erstellung der hier zugrunde liegenden Statistik weist potenziell technisch bedingte Quellen für Ungenauigkeiten auf. Anhand der getätigten Datenbankabfrage werden Ergebnisse, die in SWISSLAB erscheinen, aufgezählt und zusammengefasst. Da bei polymikrobiellen Blutkulturen mehrere Ergebnisse (Isolate) gezählt werden, ohne dass ein Rückschluss auf die genaue Anzahl der Blutkulturflaschen möglich ist, kann keine genaue Angabe zur Gesamtzahl an positiven Blutkulturen gemacht werden. Zudem ist ein weiterer Störfaktor, dass bei Patienten mit mehreren positiven Blutkulturen mit demselben Keim nur jeweils eine davon gezählt wurde. Diese Diskrepanzen beeinflussen allerdings nicht die Zusammensetzung des Keimspektrums, sodass sie für die hier durchgeführte Analyse akzeptiert wurden, um die Abdeckung des Keimspektrums zu beurteilen.

### **4.8) Zusammenfassende Bewertung und Ausblick**

Die Zeit zur adäquaten antiinfektiven Behandlung von Patienten mit symptomatischen BSI, insbesondere im Falle einer Sepsis und beim septischen Schock, entscheidet maßgeblich über den Therapieerfolg, die Dauer des Krankenhausaufenthaltes sowie die resultierende Morbidität und Mortalität (Kumar, 2014; Kumar et al., 2006; Rhodes et al., 2017). Aus diesem Grund ist die Entwicklung und der Einsatz von neuen Methoden und Geräten zur beschleunigten Diagnostik bezüglich Erreger und Resistenzlage von großem klinischem und wissenschaftlichem Interesse. Beim Verdacht auf eine Sepsis sollte die empirische Therapie bereits innerhalb der ersten Stunde eingeleitet werden und dabei möglichst ein breites Spektrum an in Frage kommender Erreger abdecken (Lee et al., 2017; Rhodes et al., 2017), da bekanntermaßen die Mortalität in den ersten Stunden nach der Manifestation einer Sepsis ohne adäquate Antibiotikatherapie linear ansteigt (Ferrer et al., 2014; Kumar et al., 2006). Die empirische Therapie kann also allein aufgrund der Dauer bis zum Vorliegen der positiven Blutkultur, die in der Regel erst frühestens am Beginn einer symptomatischen BSI abgenommen wird, nicht durch Blutkulturabhängige Methoden direkt adressiert werden. Verschiedene Ansätze für die proteomische oder molekulare Diagnostik direkt aus Patientenblut werden zwar erprobt, Hinweise auf eine zu geringe Sensitivität sowie hohe Kosten und das Fehlen von standardisierten Vorgehensweisen

führen jedoch zu einem aktuell geringeren Stellenwert dieser Herangehensweise für den breiten Einsatz im klinischen Routinearbeitsablauf (Martinez and Wolk, 2016; Peker et al., 2018; Ramanan et al., 2018; Rodel et al., 2016). Um jedoch eine Verkürzung der Zeit bis zur gezielten Therapie zu erreichen, können die hier untersuchten Methoden zur Schnelldiagnostik direkt aus positiven Blutkulturen einen wesentlichen Beitrag leisten. Verschiedenen Studien zufolge werden bis zu 40 % der Patienten mit BSI bis zum Vorliegen der mikrobiologischen Ergebnisse durch die empirische Therapie initial nicht korrekt behandelt (Buehler et al., 2016). Dies zeigt, dass häufig eine Deeskalation oder Eskalation der empirischen Therapie durch die sichere Identifizierung des Erregers und dessen Resistenzmuster notwendig ist. Der deutliche Zeitgewinn von molekularen Schnelltestsystemen gegenüber derzeitigen Standardmethoden, bei zudem hoher Sensitivität und guter Abdeckung der lokalen Erregerspektren, konnte in dieser Arbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT veranschaulicht werden. Ähnlich vielversprechende Ergebnisse mit den untersuchten Schnelltestsystemen an anderen Kliniken und auch aus multizentrischen Studien, wie sie der Literatur zu entnehmen sind, bestätigen die hier gezeigten Beobachtungen. Dabei offenbaren die Daten auch Vor- und Nachteile der einzelnen Geräte, welche für einen geplanten klinischen Einsatz zur Entscheidungsfindung beitragen können und gegebenenfalls den kritischen Umgang mit den Ergebnissen erleichtern. Idealerweise würden außerdem nachgewiesene Schwachstellen der Systeme einen Anreiz für gezielte Anpassungen und Verbesserungen durch die Hersteller darstellen.

Die Aussagekraft dieser Arbeit beinhaltet verschiedene Einschränkungen. So kamen einige wichtige BSI-Erreger zu selten im Zeitraum der Studie vor, um fundierte Aussagen zur Sicherheit der Systeme bei diesen treffen zu können. Betroffen waren dabei besonders *P. aeruginosa* und *S. pneumoniae*, aber auch seltenere Erreger von BSI. Des Weiteren war die Fallzahl an (multi-)resistenten Bakterien gering, was zwar die lokale Situation widerspiegelt, allerdings auch hier die Beantwortung von Fragen bezüglich der Sensitivität und Spezifität nur eingeschränkt zulässt. Dies betrifft besonders multiresistente, gramnegative Bakterien und VRE. Es sind weitere Daten für bessere Einschätzungen diesbezüglich notwendig. Solche können einerseits über entsprechende Langzeitbeobachtungen generiert werden, eine andere Herangehensweise könnte allerdings auch die Herstellung künstlicher Blutkulturen mit archivierten Erregern dieser Art sein. Ein solches als „Spiking“ oder „Seeding“

bezeichnetes Vorgehen wurde in anderen Studien angewandt (Pancholi et al., 2018; Pantel et al., 2018; Salimnia et al., 2016) und ein entsprechendes Protokoll konnte bereits an unserem Institut etabliert werden.

Relevante Faktoren, die im Rahmen dieser Arbeit nicht adressiert wurden, sind die entstehenden Kosten durch den Einsatz solcher Schnelltestsysteme und der tatsächliche Zeitgewinn durch einen möglichen 24/7-Einsatz der Geräte. Dabei erzwingen die aktuell noch erheblichen Kosten der Systeme eine gründliche Kosten-Nutzen-Abwägung, insbesondere an Zentren, denen keine Drittmittel zur Verfügung stehen. Dagegen könnte der Zeitgewinn bei möglicherweise gleichzeitiger Einsparung von Fachpersonal noch deutlicher ausfallen, wenn Schnelltestsysteme rund um die Uhr und unabhängig von Kernarbeitszeiten im Einsatz wären.

Die kulturabhängige Standarddiagnostik kann derzeit nicht von Schnelltestsystemen ersetzt werden (Peker et al., 2018), was schon durch die eingeschränkten Keimspektren und der bei den beiden PCR-basierten Systemen fehlenden Fähigkeit zur Generierung eines aussagekräftigen Antibioogrammes zu erwarten ist. Der in dieser Arbeit evaluierte Algorithmus erscheint aufgrund der erzielten Ergebnisse aber als eine sehr sinnvolle Ergänzung der kulturbasierten Diagnostik. So können Identifizierungsergebnisse, mit im gramnegativen Bereich sogar doppelter Sicherheit, frühzeitig übermittelt werden und Anpassungen der Therapie, falls nötig, auch noch bei einem Versagen der Schnelldiagnostik aufgrund der kulturabhängigen Ergebnisse nachher erfolgen. Da Resistenzen bei wichtigen grampositiven Bakterien, abweichend von den meist durch *mecA* und *vanA/B* erkennbaren, besonders am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT selten sind, wird vermutlich die Einleitung von passenden, gezielten Antibiotikatherapien in vielen Fällen von grampositiven BSI anhand der Diagnostik mittels ePlex® oder FilmArray® erfolgen können. Im komplexeren, gramnegativen Bereich hingegen, können die AST-Ergebnisse des Pheno® bereits zu den frühzeitigen Optimierungen der geeigneten Antibiotikatherapien führen, welche eher seltener aufgrund der im ePlex® und besonders im FilmArray® gescreenten Resistenzgene möglich wären.

Inwieweit sich durch diesen Algorithmus Mortalität, Morbidität, die Länge des Krankenaufenthalts, Therapiekosten und andere wichtige Determinanten beeinflussen lassen, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Verschiedene Studien haben bereits den Einfluss einiger molekularer Schnelldiagnostikplattformen auf die

genannten Parameter im klinischen Einsatz untersucht und dabei besonders im Zusammenhang mit einem „Antibiotic Stewardship Programm“ wesentliche Vorteile aufzeigen können (Banerjee et al., 2015; Bauer et al., 2014; MacVane and Nolte, 2016). Dabei wurde vor allem eine frühzeitige Deeskalation von Breitbandantibiotika als wesentlicher, günstiger Effekt der Nutzung von molekularer Schnell Diagnostik erfasst. Die Tatsache, dass unter anderem in der kontrolliert randomisierten Studie von Banerjee und Kollegium (Banerjee et al., 2015), keine signifikante Überlegenheit hinsichtlich solcher Endpunkte wie Länge des Krankenhausaufenthaltes, Mortalität und Kosten gezeigt werden konnte, ist sehr wahrscheinlich dadurch begründet, dass auch die kalkulierte Behandlung mit Breitbandantibiotika in vielen Fällen effektiv ist. Generell hat aber bereits die Deeskalation der empirischen Therapie bei kritisch kranken Patienten mit BSI, selbst wenn diese adäquat für den Erreger war, einen positiven Effekt auf die Mortalität (Garnacho-Montero et al., 2014). Außerdem könnte auf lange Sicht ein reduzierter, unnötiger Einsatz von Breitbandantibiotika eine bessere Kontrolle von weiteren Resistenzentwicklungen gegen diese sehr wichtigen Wirkstoffe zur Folge haben. Die Ergebnisse weiterer, größerer Datenerhebungen unter dem hier vorgestellten Diagnostikalgorithmus im klinischen Einsatz, sollten in Zukunft interessante Rückschlüsse auf den tatsächlichen Nutzen der vorgestellten Schnelltestsysteme für die Patienten, das behandelnde Personal und die Wirtschaftlichkeit der Kliniken zulassen.



## **5) Zusammenfassung**

Blutstrominfektionen (BSI) sind ein ernstzunehmendes medizinisches Problem mit weltweit hoher Inzidenz und, auch in Zeiten moderner antiinfektiver Therapien, besorgniserregender Morbidität und Mortalität. Besonders bei den häufig durch BSI ausgelösten Symptomkomplexen Sepsis und septischer Schock ist eine frühzeitige Identifikation der verursachenden Pathogene und die Bestimmung deren Empfindlichkeit gegenüber den zur Verfügung stehenden Antibiotika für eine erfolgreiche, gezielte Therapie wegweisend. Derzeit gängigste, kulturbasierte Standardmethoden zur Identifizierung und Empfindlichkeitstestung (AST) beanspruchen viel Zeit. Eine wertvolle Ergänzung zu dieser Routinediagnostik können daher überwiegend molekularbasierte Plattformen darstellen, welche die Möglichkeit zur schnelleren und direkt aus bewachsenen Blutkulturflaschen durchführbaren Diagnostik bieten. Die auf dem Konzept der multiplex Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) beruhenden Schnelltestsysteme Biofire FilmArray® und Genmark ePlex® ermöglichen eine Identifikation von Bakterien und Pilzen sowie den Nachweis einer Auswahl an Antibiotikaresistenzgenen, wobei die Ergebnisse innerhalb von ein bis zwei Stunden vorliegen. Das auf Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) basierende Accelerate Pheno® ermöglicht Identifizierungsergebnisse nach weniger als zwei Stunden und detaillierte Ergebnisse der indirekten, phänotypischen Empfindlichkeitstestung nach insgesamt etwa sieben Stunden.

Die drei beschriebenen Schnelltestsysteme wurden in dieser Arbeit hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit und ihrer klinischen Anwendbarkeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen (UKT) geprüft. Hierfür wurden in einer dreimonatigen Studie insgesamt 158 positive Blutkulturen im ePlex® und FilmArray® untersucht. Beide Systeme lieferten eine zuverlässige Identifizierung von grampositiven Bakterien mit einer Sensitivität von 99 % und einer Spezifität von 100 % für das FilmArray® sowie einer Sensitivität von 99 % bei einer Spezifität von 96 % für das ePlex®, jeweils in Bezug auf das im Test abgedeckte Keimspektrum. Bezogen auf alle in der Studie vorkommenden grampositiven Bakterien konnten Sensitivitäten von 88 % (FilmArray®) und 95 % (ePlex®) bestimmt werden. Bei gramnegativen Blutkulturen wurde in Bezug auf die vom jeweiligen System

abgedeckten Keimspektren eine Sensitivität von 100 % für das FilmArray® und 97 % für das ePlex® mit jeweils einer Spezifität von 100 % ermittelt. Die Sensitivität bezüglich aller in der Studie vorkommenden gramnegativen Blutkulturen war mit 83 % (FilmArray®) und 86 % (ePlex®), im Vergleich zur Sensitivität für die Identifikation grampositiver Blutkulturisolate, etwas geringer. Bei den 36 Episoden von Blutkulturen mit gramnegativen Bakterien zeigte das für diesen Bereich bereits etablierte Pheno® eine Sensitivität von 89 % bei 100 % Spezifität in Bezug auf das im System abgebildete Keimspektrum, sowie eine Sensitivität von 71 %, wenn alle im Studienzeitraum nachgewiesenen, gramnegativen Bakterien einbezogen werden. Der überzeugende Vorteil bei der Anwendung des Systems liegt in der zusätzlichen Durchführung einer Empfindlichkeitstestung, bei der eine kategorische Übereinstimmung von mehr als 93 % im Vergleich zum kulturbasierten Antibiogramm beobachtet werden konnte.

Der durch den Einsatz der Schnelltestsysteeme erreichbare Zeitgewinn wurde gegenüber den Standardmethoden ermittelt und fiel erwartungsgemäß mit über 24 Stunden früher vorliegenden Identifizierungs- und Empfindlichkeitstestergebnissen sehr deutlich aus.

Um zu beurteilen, ob das im Studienzeitraum beobachtete Erregerspektrum repräsentativ für die regelmäßig am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT identifizierten Isolate aus Blutkulturen war, wurde eine Statistik zu den Nachweisen der Jahre 2015 bis 2017 erstellt. Dabei zeigte sich, dass der Studienzeitraum die epidemiologische Situation vor Ort über die letzten Jahre sehr gut widerspiegelte.

In der Zusammenschau stellten die getesteten Plattformen sehr vielversprechende Ergänzungen der kulturbasierten Standardmethoden im Rahmen der Blutkulturdiagnostik dar, die insbesondere bei kritisch kranken Patienten von großem Nutzen sein könnten. Der hier angewendete Algorithmus mit dem Einsatz von ePlex® oder FilmArray® für die Testung aller positiven Blutkulturen, ergänzt durch die Anwendung des Pheno® zur zusätzlichen Generierung eines schnellen Ergebnisses der Empfindlichkeitstestung beim Vorliegen von gramnegativen BSI, erscheint dabei in Anbetracht der lokalen Epidemiologie von BSI besonders sinnvoll. Sowohl das FilmArray® als auch das Pheno® sind in die Blutkulturdiagnostik am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene eingeführt worden.

## **6) Literaturverzeichnis**

- Adhikari, N.K., Fowler, R.A., Bhagwanjee, S. and Rubenfeld, G.D. (2010) *Critical care and the global burden of critical illness in adults*. Lancet. 376: 1339-46.
- Al Naiemi, N., Duim, B. and Bart, A. (2006) *A CTX-M extended-spectrum beta-lactamase in Pseudomonas aeruginosa and Stenotrophomonas maltophilia*. J Med Microbiol. 55, 1607-08.
- Altun, O., Almuhayawi, M., Ullberg, M. and 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: 4130-06.
- Ambler, R.P. (1980) *The structure of beta-lactamases*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 289: 321-31.
- Anguera, I., Del Río, A., Miró, J.M., Matínez-Lacasa, X., Marco, F., Gumá, J.R., Quaglio, G., Claramonte, X., Moreno, A., Mestres, C.A., Mauri, E., Azqueta, M., Benito, N., García-de la María, C., Almela, M., Jiménez-Expósito, M.J., Sued, O., De Lazzari, E. and Gatell, J.M. (2005) *Staphylococcus lugdunensis infective endocarditis: description of 10 cases and analysis of native valve, prosthetic valve, and pacemaker lead endocarditis clinical profiles*. Heart. 9: e10.
- Appelbaum, P.C. (2007) *Microbiology of antibiotic resistance in Staphylococcus aureus*. Clin Infect Dis. 45 Suppl 3: 165-70.
- Arias, C.A. and Murray, B.E. (2012) *The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance*. Nat Rev Microbiol. 10: 266-78.
- Banerjee, R., Teng, C.B., Cunningham, S.A., Ihde, S.M., Steckelberg, J.M., Moriarty, J.P., Shah, N.D., Mandrekar, J.N. and Patel, R. (2015) *Randomized Trial of Rapid Multiplex Polymerase Chain Reaction-Based Blood Culture Identification and Susceptibility Testing*. Clin Infect Dis. 61: 1071-80.
- Bates, D.W., Goldman, L. and Lee, T.H. (1991) *Contaminant blood cultures and resource utilization. The true consequences of false-positive results*. JAMA. 265: 365-09.

- Bauer, K.A., Perez, K.K., Forrest, G.N. and Goff, D.A. (2014) *Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs*. Clin Infect Dis. 59 Suppl 3: 134-45.
- Bearman, G.M. and Wenzel, R.P. (2005) *Bacteremias: a leading cause of death*. Arch Med Res. 36: 646-59.
- Becker, K., Heilmann, C. and Peters, G. (2014) *Coagulase-negative staphylococci*. Clin Microbiol Rev. 27: 870-926.
- Bekeris, L.G., Tworek, J.A., Walsh, M.K. and Valenstein, P.N. (2005) *Trends in blood culture contamination: a College of American Pathologists Q-Tracks study of 356 institutions*. Arch Pathol Lab Med. 129: 1222-05.
- Bell, J.M., Paton, J.C. and Turnidge, J. (1998) *Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates*. J Clin Microbiol. 36: 2187-90.
- Bert, F., Bariou-Lancelin, M. and Lambert-Zechovsky, N. (1998) *Clinical significance of bacteremia involving the "Streptococcus milleri" group: 51 cases and review*. Clin Infect Dis. 27: 385-87.
- Bhatti, M.M., Boonlayangoor, S., Beavis, K.G. and Tesic, V. (2014) *Evaluation of FilmArray and Verigene systems for rapid identification of positive blood cultures*. J Clin Microbiol. 52: 3433-36.
- 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. and 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.
- Bochud, P.Y., Calandra, T. and Francioli, P. (1994) *Bacteremia due to viridans streptococci in neutropenic patients: a review*. Am J Med. 97: 256-64.
- Brazelton de Cárdenas, J.N., Su, Y., Rodriguez, A., Hewitt, C., Tang, L., Garner, C.D. and Hayden, R.T. (2017) *Evaluation of rapid phenotypic identification and antimicrobial susceptibility testing in a pediatric oncology center*. Diagn Microbiol Infect Dis. 89: 52-57.

- Buehler, S.S., Madison, B., Snyder, S.R., Derzon, J.H., Cornish, N.E., Saubolle, M.A., Weissfeld, A.S., Weinstein, M.P., Liebow, E.B. and Wolk, D.M. (2016) *Effectiveness of Practices To Increase Timeliness of Providing Targeted Therapy for Inpatients with Bloodstream Infections: a Laboratory Medicine Best Practices Systematic Review and Meta-analysis*. Clin Microbiol Rev. 29: 59-103.
- Burnham, J.P., Wallace, M.A., Fuller, B.M., Shupe, A., Burnham, C.D. and Kollef, M.H. (2019) *Clinical Effect of Expedited Pathogen Identification and Susceptibility Testing for Gram-Negative Bacteremia and Candidemia by Use of the Accelerate Pheno™ System*. J Appl Lab Med. 3: 569-79.
- Cawcutt, K.A. and Peters, S.G. (2014) *Severe sepsis and septic shock: clinical overview and update on management*. Mayo Clin Proc. 89: 1572-08.
- Charnot-Katsikas, A., Tesic, V., Love, N., Hill, B., Bethel, C., Boonlayangoor, S. and 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: e01166-17.
- Clark, A.E., Kaleta, E.J., Arora, A. and Wolk, D.M. (2013) *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: a fundamental shift in the routine practice of clinical microbiology*. Clin Microbiol Rev. 26: 547-603.
- Cockerill, F.R., 3rd, Wilson, J.W., Vetter, E.A., Goodman, K.M., Torgerson, C.A., Harmsen, W.S., Schleck, C.D., Ilstrup, D.M., Washington, J.A., 2nd and Wilson, W.R. (2004) *Optimal testing parameters for blood cultures*. Clin Infect Dis. 38: 1724-30.
- Dawson, S. (2014) *Blood culture contaminants*. J Hosp Infect. 87: 1-10.
- Dekker, J.P. and Lau, A.F. (2016) *An Update on the Streptococcus bovis Group: Classification, Identification, and Disease Associations*. J Clin Microbiol. 54: 1694-99.

- Descours, G., Desmurs, L., Hoang, T.L.T., Ibranosyan, M., Baume, M., Ranc, A.G., Fuhrmann, C., Dauwalder, O., Salka, W. and Vandenesch, F. (2018) *Evaluation of the Accelerate Pheno system for rapid identification and antimicrobial susceptibility testing of Gram-negative bacteria in bloodstream infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 37: 1573-83.
- Diekema, D., Arbefeville, S., Boyken, L., Kroeger, J. and Pfaller, M. (2012) *The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades*. Diagn Microbiol Infect Dis. 73: 45-48.
- Diekema, D.J., Hsueh, P.R., Mendes, R.E., Pfaller, M.A., Rolston, K.V., Sader, H.S. and Jones, R.N. (2019) *The Microbiology of Bloodstream Infection: 20-Year Trends from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*. Antimicrob Agents Chemother. 63: e00355-19.
- Dinkelacker, A.G., Vogt, S., Oberhettinger, P., Mauder, N., Rau, J., Kostrzewa, M., Rossen, J.W.A., Autenrieth, I.B., Peter, S. and Liese, J. (2018) *Typing and Species Identification of Clinical Klebsiella Isolates by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. J Clin Microbiol. 56: e00843-18.
- Driessen, R.G.H., van de Poll, M.C.G., Mol, M.F., van Mook, W. and Schnabel, R.M. (2018) *The influence of a change in septic shock definitions on intensive care epidemiology and outcome: comparison of sepsis-2 and sepsis-3 definitions*. Infect Dis (Lond). 50: 207-13.
- Durack, D.T., Lukes, A.S. and Bright, D.K. (1994) *New criteria for diagnosis of infective endocarditis: utilization of specific echocardiographic findings*. Duke Endocarditis Service. Am J Med. 96: 200-09.
- Ecker, D.J., Sampath, R., Li, H., Massire, C., Matthews, H.E., Toleno, D., Hall, T.A., Blyn, L.B., Eshoo, M.W., Ranken, R., Hofstadler, S.A. and Tang, Y.W. (2010) *New technology for rapid molecular diagnosis of bloodstream infections*. Expert Rev Mol Diagn. 10: 399-415.

- El Rafei, A., Desimone, D.C., Sohail, M.R., Desimone, C.V., Steckelberg, J.M., Wilson, W.R. and Baddour, L.M. (2016) *Cardiovascular Implantable Electronic Device Infections due to Propionibacterium Species*. Pacing Clin Electrophysiol. 39: 522-30.
- Engel, C., Brunkhorst, F.M., Bone, H.G., Brunkhorst, R., Gerlach, H., Grond, S., Gruendling, M., Huhle, G., Jaschinski, U., John, S., Mayer, K., Oppert, M., Olthoff, D., Quintel, M., Ragaller, M., Rossaint, R., Stuber, F., Weiler, N., Welte, T., Bogatsch, H., Hartog, C., Loeffler, M. and Reinhart, K. (2007) *Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study*. Intensive Care Med. 33: 606-18.
- Fenner, L., Widmer, A.F., Straub, C. and Frei, R. (2008) *Is the incidence of anaerobic bacteremia decreasing? Analysis of 114,000 blood cultures over a ten-year period*. J Clin Microbiol. 46: 2432-34.
- Ferrer, R., Martin-Loeches, I., Phillips, G., Osborn, T.M., Townsend, S., Dellinger, R.P., Artigas, A., Schorr, C. and Levy, M.M. (2014) *Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program*. Crit Care Med. 42: 1749-55.
- 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. and 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., Scherag, A., Adhikari, N.K., Hartog, C.S., Tsaganos, T., Schlattmann, P., Angus, D.C., Reinhart, K. and International Forum of Acute Care, T. (2016) *Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations*. Am J Respir Crit Care Med. 193: 259-72.
- Frank, K.L., Del Pozo, J.L. and Patel, R. (2008) *From clinical microbiology to infection pathogenesis: how daring to be different works for Staphylococcus lugdunensis*. Clin Microbiol Rev. 21: 111-33.

- Gagetti, P., Bonofiglio, L., García Gabarrot, G., Kaufman, S., Mollerach, M., Vigliarolo, L., von Specht, M., Toresani, I. and Lopardo, H.A. (2019) *Resistance to  $\beta$ -lactams in enterococci*. Rev Argent Microbiol. 51: 179-83.
- Garnacho-Montero, J., Gutiérrez-Pizarra, A., Escobedo-Ortega, A., Corcia-Palomo, Y., Fernández-Delgado, E., Herrera-Melero, I., Ortiz-Leyba, C. and Márquez-Vácaro, J.A. (2014) *De-escalation of empirical therapy is associated with lower mortality in patients with severe sepsis and septic shock*. Intensive Care Med. 40: 32-40.
- Garner, J.S., Jarvis, W.R., Emori, T.G., Horan, T.C. and Hughes, J.M. (1988) *CDC definitions for nosocomial infections, 1988*. Am J Infect Control. 16: 128-40.
- Goldstein, E.J. (1996) *Anaerobic bacteremia*. Clin Infect Dis. 23 Suppl 1: 97-101.
- Gould, I.M., David, M.Z., Esposito, S., Garau, J., Lina, G., Mazzei, T. and Peters, G. (2012) *New insights into meticillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) pathogenesis, treatment and resistance*. Int J Antimicrob Agents. 39: 96-104.
- Guo, L., Ye, L., Zhao, Q., Ma, Y., Yang, J. and Luo, Y. (2014) *Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification*. J Thorac Dis. 6: 534-38.
- Hardie, J.M. and Whitley, R.A. (1997) *Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus*. J Appl Microbiol. 83: 1-11.
- Hassoun, A., Linden, P.K. and Friedman, B. (2017) *Incidence, prevalence, and management of MRSA bacteremia across patient populations-a review of recent developments in MRSA management and treatment*. Crit Care. 21: 211.
- Hilty, M., Sendi, P., Seiffert, S.N., Droz, S., Perreten, V., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Muhlemann, K. and Endimiani, A. (2013) *Characterisation and clinical features of Enterobacter cloacae bloodstream infections occurring at a tertiary care university hospital in Switzerland: is cefepime adequate therapy?* Int J Antimicrob Agents. 41: 236-49.
- Hoffmann, H., Stindl, S., Stumpf, A., Mehlen, A., Monget, D., Heesemann, J., Schleifer, K.H. and Roggenkamp, A. (2005) *Description of Enterobacter ludwigii sp. nov., a novel Enterobacter species of clinical relevance*. Syst Appl Microbiol. 28: 206-12.



- Holland, R.D., Wilkes, J.G., Rafii, F., Sutherland, J.B., Persons, C.C., Voorhees, K.J. and Lay, J.O., Jr. (1996) *Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry*. Rapid Commun Mass Spectrom. 10: 1227-32.
- Holmberg, A., Lood, R., Mörgelin, M., Söderquist, B., Holst, E., Collin, M., Christensson, B. and Rasmussen, M. (2009). *Biofilm formation by Propionibacterium acnes is a characteristic of invasive isolates*. Clin Microbiol Infect. 15: 787-95.
- Huang, T.D., Melnik, E., Bogaerts, P., Evrard, S. and Glupczynski, Y. (2019) *Evaluation of the ePlex Blood Culture Identification Panels for Detection of Pathogens in Bloodstream Infections*. J Clin Microbiol. 57: e01597-18
- Ito, T., Hiramatsu, K., Tomasz, A., de Lencastre, H., Perreten, V., Holden, M.T., Coleman, D.C., Goering, R., Giffard, P.M., Skov, R.L., Zhang, K., Westh, H., O'Brien, F., Tenover, F.C., Oliveira, D.C., Boyle-Vavra, S., Laurent, F., Kearns, A.M., Kreiswirth, B., Ko, K.S., Grundmann, H., Sollid, J.E., John, J.F., Jr., Daum, R., Soderquist, B., Buist, G. and International Working Group on the Classification of Staphylococcal Cassette Chromosome Elements (2012) *Guidelines for reporting novel mecA gene homologues*. Antimicrob Agents Chemother. 56: 4997-99.
- Johnson, L.E., D'Agata, E.M., Paterson, D.L., Clarke, L., Qureshi, Z.A., Potoski, B.A. and Peleg, A.Y. (2009) *Pseudomonas aeruginosa bacteremia over a 10-year period: multidrug resistance and outcomes in transplant recipients*. Transpl Infect Dis. 11: 227-34.
- Katchanov, J., Asar, L., Klupp, E.M., Both, A., Rothe, C., Konig, C., Rohde, H., Kluge, S. and Maurer, F.P. (2018) *Carbapenem-resistant Gram-negative pathogens in a German university medical center: Prevalence, clinical implications and the role of novel beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations*. PLoS One. 13: e0195757.
- Kirn, T.J. and Weinstein, M.P. (2013) *Update on blood cultures: how to obtain, process, report, and interpret*. Clin Microbiol Infect. 19: 513-20.

- Kohlmann, R., Hoffmann, A., Geis, G. and Gatermann, S. (2015) *MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures*. Int J Med Microbiol. 305: 469-79.
- Kreidl, P., Kirchner, T., Fille, M., Heller, I., Lass-Flörl, C. and Orth-Holler, D. (2019) *Antibiotic resistance of blood cultures in regional and tertiary hospital settings of Tyrol, Austria (2006-2015): Impacts & trends*. PLoS One. 14: e0223467.
- Kremer, A. and Hoffmann, H. (2012) *Prevalences of the Enterobacter cloacae complex and its phylogenetic derivatives in the nosocomial environment*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31: 2951-55.
- 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. and 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.
- Kumar, A. (2014) *Antimicrobial delay and outcome in severe sepsis*. Crit Care Med. 42: e802.
- Lamy, B., Dargere, S., Arendrup, M.C., Parienti, J.J. and Tattévin, P. (2016) *How to Optimize the Use of Blood Cultures for the Diagnosis of Bloodstream Infections? A State-of-the Art*. Front Microbiol. 7: 697.
- Lark, R.L., Saint, S., Chenoweth, C., Zemencuk, J.K., Lipsky, B.A. and Plorde, J.J. (2001) *Four-year prospective evaluation of community-acquired bacteremia: epidemiology, microbiology, and patient outcome*. Diagn Microbiol Infect Dis. 41: 15-22.
- Laupland, K.B. (2013) *Incidence of bloodstream infection: a review of population-based studies*. Clin Microbiol Infect. 19: 492-500.
- Lazarovitch, T., Freimann, S., Shapira, G. and Blank, H. (2010) *Decrease in anaerobe-related bacteraemias and increase in Bacteroides species isolation rate from 1998 to 2007: a retrospective study*. Anaerobe. 16: 201-05.

- Lee, C.C., Lee, C.H., Hong, M.Y., Tang, H.J. and Ko, W.C. (2017) *Timing of appropriate empirical antimicrobial administration and outcome of adults with community-onset bacteremia*. Crit Care. 21: 119.
- Li, J.S., Sexton, D.J., Mick, N., Nettles, R., Fowler, V.G., Jr., Ryan, T., Bashore, T. and Corey, G.R. (2000) *Proposed modifications to the Duke criteria for the diagnosis of infective endocarditis*. Clin Infect Dis. 30: 633-38.
- Liu, C.Y., Huang, Y.T., Liao, C.H., Yen, L.C., Lin, H.Y. and Hsueh, P.R. (2008) *Increasing trends in antimicrobial resistance among clinically important anaerobes and Bacteroides fragilis isolates causing nosocomial infections: emerging resistance to carbapenems*. Antimicrob Agents Chemother. 52: 3161-68.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. (2007) *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. J Antimicrob Chemother. 59: 165-74.
- Lombardi, D.P. and Engleberg, N.C. (1992) *Anaerobic bacteremia: incidence, patient characteristics, and clinical significance*. Am J Med. 92: 53-60.
- Lutgring, J.D., Bittencourt, C., McElvania TeKippe, E., Cavuoti, D., Hollaway, R. and Burd, E.M. (2018) *Evaluation of the Accelerate Pheno System: Results from Two Academic Medical Centers*. J Clin Microbiol. 56: e01672-17
- Maatallah, M., Vading, M., Kabir, M.H., Bakhrouf, A., Kalin, M., Naucner, P., Brisse, S. and Giske, C.G. (2014) *Klebsiella variicola is a frequent cause of bloodstream infection in the stockholm area, and associated with higher mortality compared to K. pneumoniae*. PLoS One. 9: e113539.
- MacVane, S.H. and 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., Carletti, S., Ghidoli, N., Cichero, P., Burioni, R. and Clementi, M. (2010) *The era of molecular and other non-culture-based methods in diagnosis of sepsis*. Clin Microbiol Rev. 23: 235-51.

- Marschal, M., Bachmaier, J., Autenrieth, I., Oberhettinger, P., Willmann, M. and 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: 2116-26.
- Martinez, R.M. and Wolk, D.M. (2016) *Bloodstream Infections*. Microbiol Spectr. 4.
- Mayr, F.B., Yende, S. and Angus, D.C. (2014) *Epidemiology of severe sepsis*. Virulence. 5: 4-11.
- Mediavilla, J.R., Chen, L., Mathema, B. and Kreiswirth, B.N. (2012) *Global epidemiology of community-associated methicillin resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA)*. Curr Opin Microbiol. 15: 588-95.
- Micek, S.T., Lloyd, A.E., Ritchie, D.J., Reichley, R.M., Fraser, V.J. and Kollef, M.H. (2005) *Pseudomonas aeruginosa bloodstream infection: importance of appropriate initial antimicrobial treatment*. Antimicrob Agents Chemother. 49: 1306-11.
- Mirrett, S., Weinstein, M.P., Reimer, L.G., Wilson, M.L. and Reller, L.B. (2001) *Relevance of the number of positive bottles in determining clinical significance of coagulase-negative staphylococci in blood cultures*. J Clin Microbiol. 39: 3279-81.
- Morace, G. and Borghi, E. (2010) *Fungal infections in ICU patients: epidemiology and the role of diagnostics*. Minerva Anesthesiol. 76: 950-56.
- Naber, C.K., Bauhofer, A., Block, M., Buerke, M., Erbel, R., Graninger, W., Hermann, M., Horstkotte D., Kern, H., Lode, H., Mehlhorn, U., Meyer, J., Mügge A., Niebel, J., Peters, G., Shah, P.M., and Werdan, K. (2004) *S2-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie der infektiösen Endokarditis. Finale Version 5.0 08/2004 [S2 guideline for infectious endocarditis]*. MMW Fortschr Med. 146 Suppl 3-4: 123-35
- Nagy, E., Urban, E., Nord, C.E., and Escmid Study Group on Antimicrobial Resistance in Anaerobic Bacteria (2011) *Antimicrobial susceptibility of Bacteroides fragilis group isolates in Europe: 20 years of experience*. Clin Microbiol Infect. 17: 371-79.

- Neu, H.C., Fracaro, M., Bopp, H., O'Keefe, M. and O'Connor, J. (1990) *Bacteraemia-- a New York perception*. J Antimicrob Chemother. 25 Suppl C: 107-13.
- Ng, L.S., Kwang, L.L., Rao, S. and Tan, T.Y. (2015) *Anaerobic bacteraemia revisited: species and susceptibilities*. Ann Acad Med Singap. 44: 13-18.
- Ngo, J.T., Parkins, M.D., Gregson, D.B., Pitout, J.D., Ross, T., Church, D.L. and Laupland, K.B. (2013) *Population-based assessment of the incidence, risk factors, and outcomes of anaerobic bloodstream infections*. Infection. 41: 41-48.
- Nilson, B., Olaison, L. and Rasmussen, M. (2016) *Clinical presentation of infective endocarditis caused by different groups of non-beta haemolytic streptococci*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 35: 215-18.
- Nordmann, P., Naas, T. and Poirel, L. (2011) *Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 17: 1791-98.
- Nordmann, P. and Poirel, L. (2019) *Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria*. Clin Infect Dis. 69 Suppl 7: 521-28.
- Oberhettinger, P., Zieger, J., Autenrieth, I., Marschal, M. and Peter, S. (2020) *Evaluation of two rapid molecular test systems to establish an algorithm for fast identification of bacterial pathogens from positive blood cultures*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 39: 1147-57.
- Opota, O., Croxatto, A., Prod'hom, G. and Greub, G. (2015) *Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art*. Clin Microbiol Infect. 21: 313-22.
- Orsi, G.B. and Ciorba, V. (2013) *Vancomycin resistant enterococci healthcare associated infections*. Ann Ig. 25: 485-92.
- 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., Ledebor, 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. and 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: e01329-17

- Pantel, A., Monier, J. and Lavigne, J.P. (2018) *Performance of the Accelerate Pheno system for identification and antimicrobial susceptibility testing of a panel of multidrug-resistant Gram-negative bacilli directly from positive blood cultures*. J Antimicrob Chemother. 73: 1546-52.
- Park, H.J., Na, S., Park, S.Y., Moon, S.M., Cho, O.H., Park, K.H., Chong, Y.P., Kim, S.H., Lee, S.O., Kim, Y.S., Woo, J.H., Kim, M.N. and Choi, S.H. (2011) *Clinical significance of Propionibacterium acnes recovered from blood cultures: analysis of 524 episodes*. J Clin Microbiol. 49: 1598-601.
- Paterson, G.K., Harrison, E.M. and Holmes, M.A. (2014) *The emergence of mecC methicillin-resistant Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 22: 42-47.
- Pavlaki, M., Poulakou, G., Drimousis, P., Adamis, G., Apostolidou, E., Gatselis, N.K., Kritselis, I., Mega, A., Mylona, V., Papatsoris, A., Pappas, A., Prekates, A., Raftogiannis, M., Rigaki, K., Sereti, K., Sinapidis, D., Tsangaris, I., Tzanetakou, V., Veldekis, D., Mandragos, K., Giamarellou, H. and Dimopoulos, G. (2013) *Polymicrobial bloodstream infections: Epidemiology and impact on mortality*. J Glob Antimicrob Resist. 1: 207-12.
- Peker, N., Couto, N., Sinha, B. and Rossen, J.W. (2018) *Diagnosis of bloodstream infections from positive blood cultures and directly from blood samples: recent developments in molecular approaches*. Clin Microbiol Infect. 24: 944-55.
- Peters, R.P., van Agtmael, M.A., Danner, S.A., Savelkoul, P.H. and Vandembroucke-Grauls, C.M. (2004) *New developments in the diagnosis of bloodstream infections*. Lancet Infect Dis. 4: 751-60.
- Pfaller, M.A., Jones, R.N., Doern, G.V., Sader, H.S., Kugler, K.C. and Beach, M.L. (1999) *Survey of blood stream infections attributable to gram-positive cocci: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in 1997 in the United States, Canada, and Latin America from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. SENTRY Participants Group*. Diagn Microbiol Infect Dis. 33: 283-97.
- Pfeifer, Y., Cullik, A. and Witte, W. (2010) *Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens*. Int J Med Microbiol. 300: 371-79.

- Potter, R.F., Lainhart, W., Twentyman, J., Wallace, M.A., Wang, B., Burnham, C.A., Rosen, D.A. and Dantas, G. (2018) *Population Structure, Antibiotic Resistance, and Uropathogenicity of Klebsiella variicola*. mBio. 9: e02481-18
- Prematunge, C., MacDougall, C., Johnstone, J., Adomako, K., Lam, F., Robertson, J. and Garber, G. (2016) *VRE and VSE Bacteremia Outcomes in the Era of Effective VRE Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis*. Infect Control Hosp Epidemiol. 37: 26-35.
- Ramanan, P., Bryson, A.L., Binnicker, M.J., Pritt, B.S. and Patel, R. (2018) *Syndromic Panel-Based Testing in Clinical Microbiology*. Clin Microbiol Rev. 31: e00024-17
- Reischl, U., Linde, H.-J., Metz, M., Leppmeier, B. and Lehn, N. (2000) *Rapid Identification of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus and Simultaneous Species Confirmation Using Real-Time Fluorescence PCR*. Journal of Clinical Microbiology. 38: 2429-33.
- Renschmidt, C., Schroder, C., Behnke, M., Gastmeier, P., Geffers, C. and Kramer, T.S. (2018) *Continuous increase of vancomycin resistance in enterococci causing nosocomial infections in Germany - 10 years of surveillance*. Antimicrob Resist Infect Control. 7: 54.
- 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., Rochweg, B., Rubinfeld, G.D., Angus, D.C., Annane, D., Beale, R.J., Bellingham, 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. and Dellinger, R.P. (2017). *Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016*. Intensive Care Med. 43: 304-77.

- Rice, L.B. (2008) *Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE*. J Infect Dis. 197: 1079-81.
- Roberts, R.B., Krieger, A.G., Schiller, N.L. and Gross, K.C. (1979) *Viridans streptococcal endocarditis: the role of various species, including pyridoxal-dependent streptococci*. Rev Infect Dis. 1: 955-66.
- Rodel, J., Karrasch, M., Edel, B., Stoll, S., Bohnert, J., Löffler, B., Saupe, A. and Pfister, W. (2016) *Antibiotic treatment algorithm development based on a microarray nucleic acid assay for rapid bacterial identification and resistance determination from positive blood cultures*. Diagn Microbiol Infect Dis. 84: 252-57.
- Rosenblueth, M., Martínez, L., Silva, J. and Martínez-Romero, E. (2004) *Klebsiella variicola, a novel species with clinical and plant-associated isolates*. Syst Appl Microbiol. 27: 27-35.
- Ruppe, E., Woerther, P.L. and Barbier, F. (2015) *Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli*. Ann Intensive Care. 5: 61.
- Sabe, M.A., Shrestha, N.K., Gordon, S. and Menon, V. (2014) *Staphylococcus lugdunensis: a rare but destructive cause of coagulase-negative staphylococcus infective endocarditis*. Eur Heart J Acute Cardiovasc Care. 3: 275-80.
- 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. and Kanack, K.J. (2016) *Evaluation of the FilmArray Blood Culture Identification Panel: Results of a Multicenter Controlled Trial*. J Clin Microbiol. 54: 687-98.
- Sancho, S., Artero, A., Zaragoza, R., Camarena, J.J., González, R. and Nogueira, J.M. (2012) *Impact of nosocomial polymicrobial bloodstream infections on the outcome in critically ill patients*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 31: 1791-96.
- Sanders, W.E., Jr. and Sanders, C.C. (1997) *Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century*. Clin Microbiol Rev. 10: 220-41.
- Santajit, S. and Indrawattana, N. (2016) *Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens*. Biomed Res Int. 2016: 2475067.



- Schleifer, K.H. and Kilpperbalz, R. (1984) *Transfer of Streptococcus faecalis and Streptococcus faecium to the Genus Enterococcus Nom Rev as Enterococcus faecalis Comb Nov and Enterococcus faecium Comb Nov*. Int J Syst Bacteriol. 34: 31-34.
- Seifert, H., Aurbach, U., Stefanik, D. and Cornely, O. (2007) *In vitro activities of isavuconazole and other antifungal agents against Candida bloodstream isolates*. Antimicrob Agents Chemother. 51: 1818-21.
- SENTRY (2019) Antimicrobial Surveillance Program, <https://sentry-mvp.jmilabs.com> [Zugriff zwischen 09/2019 und 03/2020].
- Shankar-Hari, M., Phillips, G.S., Levy, M.L., Seymour, C.W., Liu, V.X., Deutschman, C.S., Angus, D.C., Rubenfeld, G.D., Singer, M. and Sepsis Definitions Task Force (2016) *Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA. 315: 775-87.
- She, R.C. and Bender, J.M. (2019) *Advances in Rapid Molecular Blood Culture Diagnostics: Healthcare Impact, Laboratory Implications, and Multiplex Technologies*. J Appl Lab Med. 3: 617-30.
- Singer, M., Deutschman, C.S., Seymour, C.W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G.R., Chiche, J.D., Cooper-Smith, C.M., Hotchkiss, R.S., Levy, M.M., Marshall, J.C., Martin, G.S., Opal, S.M., Rubenfeld, G.D., van der Poll, T., Vincent, J.L. and Angus, D.C. (2016) *The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)*. JAMA. 315: 801-10.
- Snydman, D.R., Jacobus, N.V., McDermott, L.A., Golan, Y., Goldstein, E.J., Harrell, L., Jenkins, S., Newton, D., Pierson, C., Rosenblatt, J., Venezia, R., Gorbach, S.L., Queenan, A.M. and Hecht, D.W. (2011) *Update on resistance of Bacteroides fragilis group and related species with special attention to carbapenems 2006-2009*. Anaerobe. 17: 147-51.

- Soki, J., Eitel, Z., Urban, E., Nagy, E. and Escmid Study Group on Anaerobic Infections (2013) *Molecular analysis of the carbapenem and metronidazole resistance mechanisms of Bacteroides strains reported in a Europe-wide antibiotic resistance survey*. Int J Antimicrob Agents. 41: 122-25.
- Steinberg, J.P., Clark, C.C. and Hackman, B.O. (1996) *Nosocomial and community-acquired Staphylococcus aureus bacteremias from 1980 to 1993: impact of intravascular devices and methicillin resistance*. Clin Infect Dis. 23: 255-59.
- Stock, I., Gruger, T. and Wiedemann, B. (2001) *Natural antibiotic susceptibility of strains of the Enterobacter cloacae complex*. Int J Antimicrob Agents. 18: 537-45.
- Stryjewski, M.E. and Boucher, H.W. (2009) *Gram-negative bloodstream infections*. Int J Antimicrob Agents. 34 Suppl 4: 21-25.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2018) Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.1, <http://www.eucast.org> [Zugriff zuletzt 14.07.2018].
- Thornsberry, C., Anhalt, J.P., Washington, J.A., 2nd, McCarthy, L.R., Schoenknecht, F.D., Sherris, J.C. and Spencer, H.J. (1980) *Clinical laboratory evaluation of the Abbott MS-2 automated antimicrobial susceptibility testing system: report of a collaborative study*. J Clin Microbiol. 12: 375-90.
- Török, E. and Day, N. (2005) *Staphylococcal and streptococcal infections*. Medicine. 33: 97-100.
- Towns, M.L., Jarvis, W.R. and Hsueh, P.R. (2010) *Guidelines on blood cultures*. J Microbiol Immunol Infect. 43: 347-49.
- Uslan, D.Z., Crane, S.J., Steckelberg, J.M., Cockerill, F.R., 3rd, St Sauver, J.L., Wilson, W.R. and Baddour, L.M. (2007) *Age- and sex-associated trends in bloodstream infection: a population-based study in Olmsted County, Minnesota*. Arch Intern Med. 167: 834-39.
- van der Poll, T. and Opal, S.M. (2008) *Host-pathogen interactions in sepsis*. Lancet Infect Dis. 8: 32-43.

- van der Poll, T., van de Veerdonk, F.L., Scicluna, B.P. and Netea, M.G. (2017) *The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets*. Nat Rev Immunol. 17: 407-20.
- Vena, A., Munoz, P., Alcala, L., Fernandez-Cruz, A., Sanchez, C., Valerio, M. and Bouza, E. (2015) *Are incidence and epidemiology of anaerobic bacteremia really changing?* Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34: 1621-29.
- Verroken, A., Defourny, L., Lechgar, L., Magnette, A., Delmée, M. and Glupczynski, Y. (2015) *Reducing time to identification of positive blood cultures with MALDI-TOF MS analysis after a 5-h subculture*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34: 405-13.
- Vincent, J.L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K. and Epic li Group of Investigators (2009) *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. JAMA. 302: 2323-29.
- Viscoli, C. (2016) *Bloodstream Infections: The peak of the iceberg*. Virulence. 7: 248-51.
- Ward, C., Stocker, K., Begum, J., Wade, P., Ebrahimsa, U. and Goldenberg, S.D. (2015) *Performance evaluation of the Verigene® (Nanosphere) and FilmArray® (BioFire®) molecular assays for identification of causative organisms in bacterial bloodstream infections*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 34: 487-96.
- Weinstein, M.P., Reller, L.B., Murphy, J.R. and Lichtenstein, K.A. (1983) *The clinical significance of positive blood cultures: a comprehensive analysis of 500 episodes of bacteremia and fungemia in adults. I. Laboratory and epidemiologic observations*. Rev Infect Dis. 5: 35-53.
- Weinstein, M.P., Towns, M.L., Quartey, S.M., Mirrett, S., Reimer, L.G., Parmigiani, G. and Reller, L.B. (1997) *The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: a prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults*. Clin Infect Dis. 24: 584-602.
- Westphal, N., Plicht, B. and Naber, C. (2009) *Infective endocarditis--prophylaxis, diagnostic criteria, and treatment*. Dtsch Arztebl Int. 106: 481-89.

## Literaturverzeichnis

Wisplinghoff, H., Ebbers, J., Geurtz, L., Stefanik, D., Major, Y., Edmond, M.B., Wenzel, R.P. and Seifert, H. (2014) *Nosocomial bloodstream infections due to Candida spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities*. Int J Antimicrob Agents. 43: 78-81.

## Anhang

Anhang-Tabelle 1: Detaillierte Gegenüberstellung von Carbapenemsuszeptibilität und KPC-Status bei der Evaluation durch FilmArray® und ePlex®. Die Ergebnisse sind nach ID sortiert, zusätzlich erfolgte eine Zusammenfassung von identischen Ergebniskonstellationen. Die Anzahl (n) der jeweiligen Ergebniskonstellationen ist der linken Spalte zu entnehmen. Auffällige Ergebnisse sind in fetter Schrift dargestellt. (-): negatives Ergebnis; N/A: kein Ergebnis; IPM: Imipenem, ETP: Ertapenem, MEM: Meropenem; ID: Identifizierungsergebnis des Goldstandards; *pneu.*: *pneumoniae*; *var.*: *variicola*.

n (32)	ID	KPC Status		Goldstandard AST Interpretation		
		FilmArray®	ePlex®	IPM	ETP	MEM
3	<i>Enterobacter sp.</i>	(-)	(-)	sensibel	N/A	sensibel
11	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	sensibel	N/A	sensibel
3	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	sensibel	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	N/A	N/A	sensibel
1	<i>H. influenzae</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	sensibel
1	<i>K. oxytoca</i>	(-)	(-)	N/A	sensibel	sensibel
4	<i>K. pneu./ K. var.</i>	(-)	(-)	sensibel	N/A	sensibel
1	<i>K. pneumoniae</i>	(-)	(-)	sensibel	sensibel	sensibel
1	<i>P. aeruginosa</i>	(-)	(-)	sensibel	N/A	sensibel
1	<i>P. aeruginosa</i>	(-)	N/A	<b>resistent</b>	N/A	sensibel
2	<i>S. marcescens</i>	(-)	(-)	sensibel	N/A	sensibel
1	<i>B. fragilis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	sensibel
1	<i>B. fragilis</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	<b>resistent</b>

## Anhang

Anhang-Tabelle 2: Detaillierter Vergleich der Suszeptibilität gegenüber relevanten Cephalosporinen mit dem ESBL-Status und dem CTX-M-Ergebnis des ePlex®. Der Auswertung zugrunde lag die in der Goldstandardmethode eruierte Interpretation der MHK von Ceftazidim (CAZ) und Cefepim (FEP) nach EUCAST. Die Ergebnisse sind nach den identifizierten Bakterien sortiert, zusätzlich erfolgte eine Zusammenfassung von identischen Ergebniskonstellationen. Die Anzahl (n) der jeweiligen Ergebniskonstellationen ist der linken Spalte zu entnehmen. (+): positives Ergebnis; (-): negatives Ergebnis; (N/A): kein Ergebnis; ID: Identifizierungsergebnis des Goldstandards; *pneu.*: *pneumoniae*; *var.*: *variicola*.

n (30)	ID	ePlex® CTX-M	ESBL Status	Goldstandard AST Interpretation	
				FEP	CAZ
3	<i>Enterobacter sp.</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
10	<i>E. coli</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	sensibel	intermed.
1	<i>E. coli</i>	(-)	(-)	sensibel	sensibel
1	<i>E. coli</i>	(+)	(+)	resistent	resistent
1	<i>E. coli</i>	(+)	(+)	resistent	resistent
1	<i>H. influenzae</i>	N/A	N/A	N/A	N/A
4	<i>K. pneu./var.</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>K. oxytoca</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>K. pneumoniae</i>	(+)	(+)	intermed.	resistent
1	<i>P. aeruginosa</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel
1	<i>P. aeruginosa</i>	N/A	N/A	sensibel	sensibel
2	<i>S. marcescens</i>	(-)	N/A	sensibel	sensibel

## Anhang

Anhang-Tabelle 3: Ausführlicher Vergleich der AST-Ergebnisse von VITEK® und Pheno®. Dargestellt ist eine detaillierte Auflistung der Minimalen Inhibitorischen Konzentration (MIC) sowie der entsprechenden Beurteilung in den Kategorien S (= Sensitiv), I (= Intermediär) und R (= Resistent). Diskrepanzen in der Kategorie sind in der Spalte „F“ mit „+“ (geringer Fehler [S<->I, I<->R]), „++“ (schwerwiegender Fehler [R statt S]) und „+++“ (sehr schwerwiegender Fehler [S statt R]) gekennzeichnet, ausgehend vom Ergebnis des VITEK® als Goldstandard. E-Test Kontrollen sind in dieser Tabelle nicht miteinbezogen. N/A: Kein Ergebnis vorliegend; ID: Identifizierungsergebnis; *Enterob.*: *Enterobacter*; Komp.: Komplex.

ID	Sulbactam-Ampicillin				Piperacillin-Tazobactam				Cefepim				Ceftazidime				Meropenem				Gentamicin				Tobramycin				Ciprofloxacin											
	VITEK®		Pheno®		F	VITEK®		Pheno®		F	VITEK®		Pheno®		F	VITEK®		Pheno®		F	VITEK®		Pheno®		F	VITEK®		Pheno®		F										
	MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R		MIC	S/I/R	MIC	S/I/R	MIC	S/I/R				
<i>E. cloacae</i> Komp.	N/A	N/A	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. ludwigii</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	≤2	S		≤4	S	8	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		4	I	2	S	+	≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	≤2	S		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		2	S	≤1	S		2	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	4	S		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	8	S		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≥4	R	≥8	R	
<i>E. coli</i>	≤2	S	4	S		≤4	S	8	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	4	S		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≥32	R	≥64	R		≥128	R	8	S	+++	≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	2	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	16	R	32	R		≤4	S	≤4	S		≥64	R	16	R		16	R	≥16	R		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≥4	R	≥8	R	
<i>E. coli</i>	≤2	S	8	S		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	16	R	16	R		≤4	S	8	S		≤1	S	2	I	+	≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≤2	S	16	R	++	≤4	S	8	S		≤1	S	2	I	+	≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≥32	R	32	R		≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	≥32	R	32	R		8	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>E. coli</i>	16	R	32	R		≤4	S	≤4	S		≥64	R	16	R		16	R	8	R		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	8	R	++	≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>K. oxytoca</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		<01	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>K. pneumoniae</i>	≥32	R	N/A	N/A	/	16	I	≤4	S	+	2	I	≥32	R	+	16	R	8	R		≤0.25	S	≤0.25	S		≥16	R	16	R		≥16	R	≥32	R		2	R	≥8	R	
<i>K. pneumoniae</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		8	R	4	I	+	2	R	≥8	R	
<i>K. varicola</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>K. varicola</i>	≤2	S	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S	
<i>P. aeruginosa</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	/	≤4	S	≥64	R	++	≤1	S	16	R	++	≤1	S	≥64	R	++	1	S	1	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		2	R	2	R	
<i>S. marcescens</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	/	≤4	S	≤4	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	8	R	++	≤1	S	2	S		≤0.25	S	0.5	S	
<i>S. marcescens</i>	N/A	N/A	N/A	N/A	/	≤4	S	8	S		≤1	S	≤1	S		≤1	S	≤1	S		≤0.25	S	≤0.25	S		≤1	S	≤1	S		N/A	N/A	≤1	S	/	≤0.25	S	≤0.25	S	

## Anhang

Anhang-Tabelle 4: Statistische Auswertung der identifizierten Isolate aus positiven Blutkulturen in den Jahren 2015 bis 2017 am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des UKT. Quantitative Darstellung relevanter Familien und Spezies in den verschiedenen ausgewerteten Kategorien. Absolute Zahlen sind angegeben (n = Anzahl). Der jährliche Durchschnitt ist auf ganze Zahlen gerundet, Varianz (VAR.P) und Standardabweichung (StdABW.N) zwischen den Jahren auf eine Nachkommastelle.

		Jahr:	2015	2016	2017	Gesamt	Durchschnitt	VAR.P	StdABW.N
<b>Blutkulturen</b>	<b>n (gesamt)</b>		<b>5308</b>	<b>5362</b>	<b>4774</b>	<b>15444</b>	<b>5148</b>	<b>70424,0</b>	<b>265,4</b>
	<b>positiv</b>		1000	1301	1167	3468	1156	15160,7	123,1
	<b>positiv mit ID</b>		878	1016	972	2866	955	3312,9	57,6
	<b>GN Bakterien</b>		219	270	262	751	250	501,6	22,4
	<b>GP Bakterien</b>		623	692	674	1989	663	854,0	29,2
	<b>Pilze</b>		36	54	36	126	42	72,0	8,5
<b>grampositive Bakterien</b>	<b>Streptokokken</b>		<b>50</b>	<b>65</b>	<b>50</b>	<b>165</b>	<b>55</b>	<b>75,0</b>	<b>7,1</b>
	alpha häm ( <i>S. pneu.</i> + andere)		39	36	37	112	37	2,3	1,2
	beta häm		10	19	10	39	13	27,0	4,2
	gama häm (ohne Enterokokken)		1	8	3	12	4	13,0	2,9
	<b>Enterokokken</b>		<b>63</b>	<b>98</b>	<b>76</b>	<b>237</b>	<b>79</b>	<b>313,0</b>	<b>14,4</b>
	<i>E. faecalis</i>		29	44	30	103	34	70,3	6,8
	<i>E. faecium</i> gesamt		31	48	40	119	40	72,3	6,9
	<i>E. faecium</i> (VRE)		0	13	13	26	9	56,3	6,1
	<i>E. faecium</i> (VSE)		31	35	27	93	31	16,0	3,3
	<b>Staphylokokken</b>		<b>402</b>	<b>439</b>	<b>449</b>	<b>1290</b>	<b>430</b>	<b>613,0</b>	<b>20,2</b>
	<i>S. aureus</i> gesamt		82	86	105	273	91	151,0	10,0
	<i>S. aureus</i> (MSSA)		78	79	103	260	87	200,3	11,6
	<i>S. aureus</i> (MRSA)		4	7	1	12	4	9,0	2,4
	<i>S. aureus</i> (Res. undef.)		0	0	1	1	0	0,3	0,5
	CoNS		320	353	344	1017	339	291,0	13,9
	<i>S. epidermidis</i>		214	223	216	653	218	22,3	3,9
	<b>Propionibacterium</b>		<b>71</b>	<b>65</b>	<b>51</b>	<b>187</b>	<b>62</b>	<b>105,3</b>	<b>8,4</b>
	<i>P. acnes</i>		50	46	50	146	49	5,3	1,9
<i>Propionibacterium</i> sp.		21	19	1	41	14	121,3	9,0	
<b>Andere:</b>		<b>37</b>	<b>25</b>	<b>48</b>	<b>110</b>	<b>37</b>	<b>132,3</b>	<b>9,4</b>	
<b>gramnegative Bakterien</b>	<b><i>Escherichia coli</i></b>		<b>125</b>	<b>134</b>	<b>121</b>	<b>380</b>	<b>127</b>	<b>29,6</b>	<b>5,4</b>
	<b>Klebsiella</b>		<b>42</b>	<b>42</b>	<b>45</b>	<b>129</b>	<b>43</b>	<b>2,0</b>	<b>1,4</b>
	<i>K. pneumoniae</i>		32	33	22	87	29	24,7	5,0
	<i>K. variicola</i>		0	0	2	2	1	0,9	0,9
	<i>K. oxytoca</i>		9	9	15	33	11	8,0	2,8
	<b>Enterobacter</b>		<b>11</b>	<b>23</b>	<b>29</b>	<b>63</b>	<b>21</b>	<b>56,0</b>	<b>7,5</b>
	<i>E. cloacae</i> sp.		9	21	24	54	18	42,0	6,5
	<i>E. ludwigii</i>		0	0	1	1	0	0,2	0,5
	<b>Bacteroides</b>		<b>1</b>	<b>1</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	<b>3</b>	<b>5,6</b>	<b>2,4</b>
	<b>Pseudomonas</b>		<b>16</b>	<b>22</b>	<b>16</b>	<b>54</b>	<b>18</b>	<b>8,0</b>	<b>2,8</b>
	<i>P. aeruginosa</i>		15	20	15	50	17	5,6	2,4
	<i>Pseudomonas</i> sp.		1	2	1	4	1	0,2	0,5
	<b>Proteus</b>		<b>6</b>	<b>12</b>	<b>9</b>	<b>27</b>	<b>9</b>	<b>6,0</b>	<b>2,4</b>
	<b>Serratia</b>		<b>3</b>	<b>8</b>	<b>11</b>	<b>22</b>	<b>7</b>	<b>10,9</b>	<b>3,3</b>
	<i>S. marcescens</i>		3	7	9	19	6	6,2	2,5
	<b>Citrobacter</b>		<b>6</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	<b>20</b>	<b>7</b>	<b>0,9</b>	<b>0,9</b>
	<i>C. freundii</i>		2	4	3	9	3	0,7	0,8
<b>Acinetobacter</b>		<b>1</b>	<b>6</b>	<b>3</b>	<b>10</b>	<b>3</b>	<b>4,2</b>	<b>2,1</b>	
<i>A. baumannii</i> Gruppe		1	3	0	4	1	1,6	1,2	
<b>Andere:</b>		<b>8</b>	<b>14</b>	<b>16</b>	<b>38</b>	<b>13</b>	<b>11,6</b>	<b>3,4</b>	
<b>Pilze</b>	<i>C. albicans</i>		17	27	17	61	20	22,2	4,7
	<i>C. glabrata</i>		15	9	9	33	11	8,0	2,8
	<i>C. parapsilosis</i>		1	9	3	13	4	11,6	3,4
	<i>C. krusei</i>		1	7	2	10	3	6,9	2,6
	<b>Andere:</b>		<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>	<b>9</b>	<b>3</b>	<b>2,0</b>	<b>1,4</b>



## **Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift**

Die Arbeit wurde am Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene des Universitätsklinikums Tübingen unter Betreuung von Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter durchgeführt.

Die Konzeption der Studie und die Erstellung des Studienprotokolls erfolgte in Zusammenarbeit mit Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter und Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger.

Die zur Datenerhebung notwendigen Arbeiten der Routinediagnostik und die Bedienung der Schnelltestsyste me wurden durch das Fachpersonal des Blutkulturlabors der Medizinischen Mikrobiologie nach dem erstellten Studienprotokoll durchgeführt. Einzelne Laborarbeiten, welche nicht den Routinearbeitsablauf betrafen, wie zum Beispiel nachträgliche Testungen und Charakterisierung archivierter Studienkeime, wurden überwiegend durch mich mit Unterstützung von Baris Bader, Nadine Hofmann und Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger durchgeführt. Die Erhebung der Daten aus der SWISSLAB Datenbank und von den einzelnen Schnelltestsyste men erfolgte eigenständig durch mich, nach Einarbeitung durch Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter und die Außendienstler der betreffenden Firmen Biomerieux und GenMark Diagnostics. Ebenso erfolgte die gesamte Datenanalyse und Auswertung durch mich, nach Anleitung von Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter und Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger. Die Extraktion der Daten der Routinediagnostik aus dem Laborinformationssystem zur statistischen Analyse der Keime aus Blutkulturen in den Jahren 2015 bis 2017 erfolgte durch mich, nach entsprechender Einarbeitung durch Dr. med. Matthias Marschal. Die Auswertung und Darstellung der erhobenen Daten erfolgte durch mich mit unterstützender Anleitung von Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter.

Die Literaturrecherche und der Abgleich mit den eigens erhobenen Daten erfolgten eigenständig durch mich.

Sämtliche Abbildungen und Tabellen, welche das Manuskript enthält, wurden selbstständig durch mich erstellt, sofern nicht explizit anders erwähnt.

## Erklärung zum Eigenanteil

Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter hat das Manuskript freundlicherweise korrigiert.

Teile der erhobenen Daten wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht, die von Dr. rer. nat. Philipp Oberhettinger in Zusammenarbeit mit Apl. Prof. Dr. med. Silke Peter, Prof. Dr. med. Ingo Autenrieth, Dr. med. Matthias Marschal und mir verfasst wurde:

Oberhettinger, P., Zieger, J., Autenrieth, I., Marschal, M. und Peter, S. (2020) *Evaluation of two rapid molecular test systems to establish an algorithm for fast identification of bacterial pathogens from positive blood cultures*. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 39: 1147-57.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 04.06.2021

[Jan Zieger]