



universität
wien

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

„Bewertung eines neuen im Vergleich zu einem etablierten molekularen Test und MALDI-TOF MS zur schnellen Identifizierung von Krankheitserregern in positiven Blutkulturen“

verfasst von / submitted by

Natalie Ankowitsch, BSc

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag.pharm.)

Wien, 2022 / Vienna 2022

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Ao. Univ. Prof. DI. Dr.
Athanasios Makristathis

Danksagung

Mein großer Dank gilt meinem Betreuer, Ao. Univ. Prof. DI. Dr. Athanasios Makristathis, der mir die Chance auf eine interessante Masterarbeit mit relevanter Thematik bot, jederzeit ein offenes Ohr für mich hatte und mich in der Umsetzung der Arbeit bestmöglich unterstützt hat.

Des Weiteren gilt mein Dank Brigitte Selitsch, BA, die mir sowohl in den praktischen Labortätigkeiten als auch mit ihrer fachlichen Kompetenz und großen Hilfsbereitschaft immer zur Seite gestanden ist.

Ebenso möchte ich mich bei Dr. Peter Starzengruber bedanken, der sich immer Zeit für mich genommen hat und mir eine große Hilfe war.

Generell möchte ich mich bei der gesamten Abteilung der Klinischen Mikrobiologie am AKH Wien für die schöne Zeit dort bedanken.

Mein Dank gilt ebenso Dr. Bernhard Ronacher und Mag. Christoph Reschreiter. Durch die Zusammenarbeit war das Erstellen dieser Arbeit erst möglich.

Schlussendlich gilt mein besonderer Dank meiner Familie und meinem Freund, die mir durch die gesamte Studienzeit den Rücken stärkten und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Abkürzungsverzeichnis

BK	Blutkultur
CHCA	α -Cyano-4-hydroxymizsäure
DAMPs	damage-associated molecular patterns
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
FDA	Food and Drug Administration
FRET	Försterresonanzenergietransfer
GCS	Glasgow Coma Score
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
KNS	Koagulase negative Staphykokken
LAMP	Loop-mediated Isothermal Amplification
MRSA	Methicillin resistenter Staphylococcus aureus
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCR	Polymerase Chain Reaction
PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment
TFA	Trifluoressigsäure
TLR	Toll-like-Rezeptoren
VCAM1	Vascular Cell Adhesion Molecule–1

Begriffserklärungen

Panel	umfasst hier alle Spezies und Resistenzgene, die mittels jeweiligem PCR Test nachgewiesen werden können.
Sepsityper	MBT Sepsityper® IVD Kit – ermöglicht eine Erregeridentifizierung direkt aus positiven Blutkulturen in Kombination mit MALDI TOF Massenspektrometrie (IVD-CE MALDI Biotyper®).
Cube Dx	in Kombination mit LINA Extraktionspuffer ist eine Erregeridentifizierung und Bestimmung von Resistenzgenen direkt aus positiven Blutkulturen mittels Singleplex PCR und anschließender Hybridisierung möglich.
Biofire	BIOFIRE® BCID2 ermöglicht eine Erregeridentifizierung und Bestimmung von Resistenzgenen direkt aus positiven Blutkulturen mittels Multiplex PCR.

Gender Erklärung

In dieser Masterarbeit wird aufgrund der besseren Lesbarkeit bewusst auf eine geschlechtsneutrale Formulierung verzichtet. Sämtliche männliche Schreibweisen beziehen sich dabei gleichermaßen auf alle Geschlechter.

Zusammenfassung

Einleitung: Blutbahninfektionen können zu einer Sepsis führen, die mit hoher Mortalität assoziiert ist und ein großes gesundheitliches Problem darstellt. Für ein adäquates Therapiemanagement ist eine rasche Diagnostik des zugrundeliegenden Erregers und dessen Resistenzprofil von großer Bedeutung. Die konventionelle Blutkultur gilt nach wie vor als Goldstandard, kann jedoch aufgrund langer Bebrütungszeiten zu einer verzögerten Diagnose führen. Mit dem Einsatz molekularer Testverfahren kann diese Zeit verkürzt werden.

Methoden: Die vorliegende Masterarbeit vergleicht 3 verschiedene molekulare Testverfahren und bewertet ihre Leistung in Bezug auf die konventionelle Blutkultur. Es wurden 410 positive Blutkulturproben inkludiert und mittels Massenspektrometrie (Sepsityper) und einer Singleplex PCR und anschließender Hybridisierung (Cube Dx) getestet. Bei 66 dieser Proben wurde zusätzlich eine Nested-Multiplex PCR (Biofire) durchgeführt.

Ergebnisse: Bei 365 Monoinfektionen konnte eine gute Übereinstimmung von 76,16% der beiden Tests, Sepsityper und Cube Dx, mit der Blutkultur festgestellt werden. Wenn nur on-Panel Erreger betrachtet werden, zeigte Cube Dx eine Identifikationsrate von 94,91% und Sepsityper von 87,43%. Biofire konnte 100% von 49 on-Panel Monoinfektionen korrekt identifizieren. Die Mischinfektionen betreffend, schnitten die beiden PCR Tests besser ab als Sepsityper. Der Nachweis von Resistenzgenen war nur mittels PCR Methoden möglich, bedarf aber weiterer Studien aufgrund einer niedrigen Anzahl und Varietät nachgewiesener Resistenzgene.

Alle 3 Tests zeigten eine gute Übereinstimmung mit dem Goldstandard, der Blutkultur, und können als sinnvolle Ergänzung zur Diagnostik von Blutbahninfektionen und Sepsis angesehen werden.

Abstract

Introduction: Bloodstream infections can lead to sepsis, which is a major health problem associated with high mortality. For an adequate therapy management, early diagnosis of the causing pathogen and its resistance profile is from high importance. Blood culture is known as the gold standard but can lead to delayed diagnosis due to long incubation time. Therefore, molecular diagnosis tests are available and can help to reduce this time.

Methods: This master thesis compared 3 different tests and evaluated their performance compared to conventional blood culture methods. Therefore 410 positive blood culture samples were tested using a mass spectrometry (Sepsityper) and a singleplex PCR (Cube Dx) with hybridization. 66 of 410 samples were furthermore tested using a nested multiplex PCR (Biofire).

Results: In 365 monoinfections, the two tests, Sepsityper and Cube Dx, showed 76,16% concordance compared with gold standard, blood culture. When only included on-panel microbes, Cube Dx showed 94,91% and Sepsityper showed 87,43% concordance. Biofire was able to detect 100% of 49 samples containing monoinfections correctly. Concerning polymicrobial infections, both PCR tests showed better results than Sepsityper. Detection of resistance genes was only possible with PCR in this study, but further evaluations are necessary due to a small size and variety of detected resistance genes.

In conclusion, all three tests showed good concordance compared to gold standard and can therefore be assumed as add-on instruments in diagnostic of bloodstream infections and sepsis.

Inhalt

Inhalt.....	8
1 Einleitung	10
1.1 Pathogene Erreger im Blut - Komplikationen und Pathophysiologie der Sepsis	10
1.2 Prävalenz und Letalität weltweit	14
1.3 Spektrum häufiger Erreger	14
1.3.1 Grampositive Kokken	14
1.3.2 Enterobakterien	15
1.3.3 Candida Spezies.....	16
1.4 Resistenzen	17
1.5 Antimikrobielle Therapie	18
1.6 Polymerasekettenreaktion	20
1.7 MALDI TOF Massenspektrometrie	21
2 Problemstellung und Forschungsziele	23
3 Material und Methoden.....	24
3.1 Studiendesign	24
3.2 Probenvorbereitung	24
3.3 Routineprozedere bei positiven Blutkulturen	25
3.3.1 Gramfärbung	25
3.3.2 Sepsityper	25
3.3.3 Subkultivierung und MALDI TOF MS	27
3.3.4 Weitere Schnelltests aus der Subkultur	28
3.3.5 Resistenztestungen	28
3.4 Cube Dx.....	29
3.5 Biofire.....	33
4 Ergebnisse	35

4.1	Ergebnisse Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx.....	35
4.1.1	Monoinfektionen.....	35
4.1.2	Mischinfektionen.....	43
4.1.3	Zusätzlich nachgewiesene Erreger	45
4.1.4	Resistenzgene.....	46
4.2	Ergebnisse – Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx – Biofire	48
4.2.1	Monoinfektionen.....	48
4.2.2	Mischinfektionen.....	52
4.2.3	Resistenzen.....	53
5	Diskussion	55
5.1	Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx	55
5.2	Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx – Biofire	59
6	Conclusio.....	62
7	Literaturverzeichnis	63

1 Einleitung

1.1 Pathogene Erreger im Blut - Komplikationen und Pathophysiologie der Sepsis

Die Blutbahninfektion ist definiert als das Vorliegen eines Erregers in der Blutbahn. Sofern dieser Erreger ein Bakterium ist, handelt es sich um eine Bakteriämie und um eine Fungämie im Falle von Pilzen.^{1,2} Im Neugeborenen Alter wird eine hohe Inzidenz verzeichnet, aber vor allem auch ältere Patienten sind aufgrund diverser Grunderkrankungen und Bewegungseinschränkung prädisponiert, eine Blutbahninfektion zu erleiden.^{2,3} Meist kann das Immunsystem den pathogenen Erreger in der Blutbahn ausreichend bekämpfen. Ist dies jedoch nicht der Fall, besteht die Gefahr einer Sepsis.¹

Der Begriff der Sepsis wurde stetig überarbeitet und dem aktuellen Stand der Wissenschaft angepasst. In der seit 2016 gültigen Dritten Internationalen Konsensus Definition der Sepsis wird diese als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion als Folge einer fehlregulierten Wirtsantwort auf eine Infektion beschrieben.⁴ Als schwerste Form einer Infektionskrankheit kann die Sepsis von Bakterien, Pilzen, Viren und Parasiten verursacht werden. Diese werden vom angeborenen Immunsystem, bestehend aus zellulären und humoralen Mechanismen, als fremd erkannt. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei den Leukozyten zu, denen die Makrophagen, Monozyten, Neutrophilen, Basophilen, Eosinophilen und Natürliche Killerzellen zuzuordnen sind. Intrazelluläre und lösliche PRRs (Pattern Recognition Receptors) erkennen die mikrobiell molekularen Strukturen der Erreger, binden diese und sind für die Aktivierung der Leukozyten verantwortlich. Als am meisten untersuchte PRRs gelten die TLRs (Toll-like Receptors). PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) und DAMPs (damage-associated molecular patterns) binden als Liganden an den PRRs. DAMPs stammen von nekrotischen Zellen. Es folgt dann eine Mediator-induzierte Aktivierung und Phosphorylierung diverser Tyrosinkinasen. Die Hochregulierung inflammatorischer Zytokine wird von Transkriptionsfaktoren induziert. Zu den Zytokinen zählen unter anderem die Interleukine, die in proinflammatorisch und antiinflammatorisch unterteilt werden. Beide Gruppen spielen eine bedeutende Rolle im Infektionsgeschehen. Durch die Stimulation proinflammatorischer Zytokine exprimieren Endothelzellen Adhäsionsmoleküle wie ICAM1 (Intercellular adhesion

molecule-1) und VCAM1 (Vascular cell adhesion protein-1), die in entzündetes Gewebe einwandern und Immunzellen anlocken. Dies führt zur Steigerung der vaskulären Permeabilität und der Freisetzung von Stickstoffmonoxid, einem Vasodilatator.⁵

Als systemisches Syndrom nimmt die Sepsis Einfluss auf alle Organe des Körpers. Gelbsucht und Cholestase sind Anzeichen einer Leberfunktionsstörung, die durch eine Minderdurchblutung der Zellen oder eine überschießende Zytokinproduktion ausgelöst werden können. Diese führen des Weiteren zum akuten Nierenversagen. Die Niere ist für die Aufrechterhaltung des Elektrolyt- und Wasserhaushalts zuständig und kann so im Falle einer Sepsis die Lunge vor einem Ödem schützen. Bei einer Fehlfunktion ist dies nicht mehr möglich.⁶ Tachypnoe gilt als Leitsymptom der Sepsis und kann von Hypoxämie und einem erhöhten Kohlenstoffdioxidgehalt begleitet werden. Dies erfordert möglicherweise eine Intubation des Patienten. Die schwere Sepsis ist durch Hypotension gekennzeichnet und Folge einer myokardialen Depression. Auf neurologischer Ebene äußert sich das Syndrom in Lethargie und Verwirrtheit der Patienten. Am Herzen kommt es zu myokardialer Depression, die sich als Hypotension oder Schock äußert. Nierendysfunktion ist eine häufige Ursache Sepsis-induzierter Morbidität.⁷

Um eine Diagnose der Sepsis zu ermöglichen, wurde in der dritten Konsensus Konferenz der SOFA Score (Sepsis-related organ failure assessment score) als fortan gültiges Schema gewählt (siehe *Abbildung 1*). Die Entwicklung des Organversagens kann anhand einer Veränderung des Scores mit einem Anstieg um 2 Punkte eingeschätzt werden. Somit wird eine Risikoabschätzung der Mortalität intensivmedizinisch betreuter Patienten ermöglicht.⁴ Die Anwendung des SOFA Scores hat sich abseits der Intensivstation als problematisch erwiesen. Die oftmals nicht mögliche Beschaffung aller nötigen Laborparameter zeigte die Notwendigkeit einer Erweiterung um einen quick SOFA Score auf. Zur Risikoabschätzung von Patienten außerhalb der Intensivstation, sind folgende drei Parameter festzustellen: Bewusstseinsveränderungen GCS <15, Atemfrequenz ≥ 22 /min und ein systolischer Blutdruck < 100mmHg. Diese schnelle Variante hat sich außerhalb der Intensivstation etabliert.^{8,4}

Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score						
Organsystem	Parameter	0	1	2	3	4
Atmung	PaO ₂ /FiO ₂ mmHg (kPa)	≥ 400 (53,3)	< 400 (53,3)	< 300 (40)	< 200 (26,7) und künstliche Beatmung	< 100 (13,3) und künstliche Beatmung
Gerinnung	Thrombozyten x10 ³ /μl	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Leber	Bilirubin, mg/dl (μmol/L)	< 1,2 (20)	1,2–1,9 (20–32)	2,0–5,9 (33–101)	6,0–11,9 (102–204)	> 12,0 (204)
Herz-Kreislauf- System		MAP ≥ 70 mmHg	MAP < 70 mmHg	Dopamin < 5 oder Dobutamin* (beliebige Dosis)	Dopamin 5,1–15 Adrenalin ≤ 0,1 oder Noradrenalin ≤ 0,1*	Dopamin > 15 oder Adrenalin > 0,1 oder Noradrenalin > 0,1*
Nervensystem	Glasgow Coma Scale (GCS)	15	13–14	10–12	6–9	< 6
Niere	Kreatinin mg/dl (μmol/L)	< 1,2 (110)	1,2–1,9 (110–170)	2,0–3,4 (171–299)	3,5–4,9 (300–440)	> 5,0 (440)
	Urin- ausscheidung ml/d				< 500	< 200
*Katecholamindosen in μg/kg/min für mind. 1 h						

Abbildung 1: aus The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) ⁹

Der septische Schock wurde als schwerste Form der Sepsis ebenso in der dritten Konsensus Definition der Sepsis überdacht und gilt als eine Unterform der Sepsis, die mit einem erhöhtem Mortalitätsrisiko einhergeht. Ursächlich hierfür sind gravierende metabolische und zelluläre Veränderungen sowie Kreislaufreaktionen. Als Indikator dient eine Hypotonie, die die Gabe eines Vasopressors verlangt, um einen Blutdruck von 65mm/Hg zu erreichen. Des Weiteren kann ein Anstieg der Lactatkonzentration von 2mmol/L trotz ausreichender Flüssigkeitszufuhr verzeichnet werden. Diese Kriterien beziehen sich jedoch nur auf eine Sepsis bei erwachsenen Patienten.¹⁰

Laut einer deutschen statistischen Analyse weisen ältere Personen und Neugeborene die höchste Inzidenz einer Sepsis auf. Des Weiteren tritt bei Männern dieses Syndrom 1,8-fach häufiger auf als bei Frauen.¹¹

Da auch Virusinfektionen, wie beispielsweise eine Influenzainfektion prädisponierend für eine bakterielle oder fungale Blutbahninfektion sein können, ist es naheliegend, dass ebenso das SARS-COV-2 Virus diesbezüglich eine Gefahr birgt. Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt Risikofaktoren, Epidemiologie und klinische Outcomes bei Patienten mit einer schweren Covid-19 Infektion und schweren Blutbahninfektionen beziehungsweise Sepsis und septischem Schock. Während Patienten mit verändertem mentalem Zustand häufiger an einer schweren Blutbahninfektion litten, konnte Husten und Fieber als Leitsymptom seltener als in der Kontrollgruppe verzeichnet werden. Patienten mit schwerer Blutbahninfektion und schwerer Covid-19 Erkrankung erlitten häufiger ein akutes Nierenversagen, benötigten einen längeren Spitalsaufenthalt und wiesen eine erhöhte Mortalität während des Spitalsaufenthalts verglichen zur Kontrollgruppe auf.¹²

Eine Sepsis ist nicht nur akut lebensbedrohlich, sondern birgt ein großes Risiko, gesundheitliche Langzeitfolgen zu verursachen. So zeigten sich bei einem Sechstel der Sepsis-Überlebenden erhebliche Erkrankungen wie Belastungsstörungen und schwere funktionelle Einschränkungen.¹³ Das Auftreten neurologischer oder kognitiver Beeinträchtigungen ist laut einer prospektiven Kohortenstudie, die an Personen über 50 Jahren durchgeführt wurde, um 10,6% erhöht.¹⁴ Eine weitere Studie zeigte, dass das Sterberisiko bei Patienten, die eine Sepsis bereits überstanden haben, um 22% erhöht ist verglichen zu der Kontrollgruppe ohne Sepsis.¹⁵

1.2 Prävalenz und Letalität weltweit

Die Schätzung der weltweiten Sepsis Inzidenz und Fallsterblichkeitsrate erweist sich aufgrund mangelnder Studien und Anpassungen in der Definition der Sepsis als schwierig. Für einkommensschwache Länder sind kaum Daten bekannt.¹⁶ In einer im Lancet erschienenen Studie wird von 48,9 Millionen weltweiten Sepsis Fällen im Jahr 2017 berichtet. Rund 50% dieser Fälle betreffen Kinder und Jugendliche bis 19 Jahre. 19,7% aller globalen jährlichen Todesfälle sind mit einer Sepsis assoziiert.¹⁷ Laut einer im Jahr 2020 veröffentlichten Metaanalyse erwarben 23,6% der im Spital behandelten Sepsis Patienten diese während ihres Krankenhausaufenthalts. Auf der Intensivstation wurden 24,4% der Sepsis Fälle mit Organdysfunktion als auf der Intensivstation erworben verzeichnet.¹⁸ Durchfallerkrankungen sind im Zeitraum 1990 bis 2017 die häufigste Ursache einer Sepsis. Bei Kindern unter 5 Jahren waren im Jahr 2017 Durchfallerkrankungen ebenso der Hauptauslöser gefolgt von Neugeborenen Erkrankungen und Erkrankungen unterer Atemwege.¹⁷ Mangels valider Daten kann über die Inzidenz und Mortalität der Sepsis in Österreich keine Aussage getroffen werden. Auf Basis einer Hochrechnung deutscher Daten aus dem Jahr 2013 kann mit 28.000 Sepsis-Erkrankten und 6700 damit assoziierten Todesfällen gerechnet werden.^{11,19}

1.3 Spektrum häufiger Erreger

1.3.1 Grampositive Kokken

1.3.1.1 Staphylokokken

Staphylokokken zählen zu den grampositiven fakultativ anaeroben Kokken. Sie sind unbeweglich und ordnen sich in Haufen oder Trauben an. Die Einteilung erfolgt in koagulasepositiv, wozu *Staphylococcus aureus* als klinisch relevanter Vertreter zählt, und koagulasenegativ.²⁰ Als Besiedler der menschlichen Haut sind sie weit verbreitet und eine häufige Ursache nosokomialer Blutbahninfektionen. *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, und *Staphylococcus lugdunensis* sind als wichtige Erreger der KNS (Koagulase negativen Staphylokokken) zu nennen. Diese Gruppe stellt vor allem für immunsupprimierte Patienten eine Gefahr dar.²¹ *Staphylococcus epidermidis* ist der häufigste Erreger Venenkatheter-assoziiierter Infektionen, die in einer Sepsis resultieren können.

Die Bildung von Biofilm als primärer Virulenzfaktor ermöglicht ihm die Anheftung an implantierten Materialien.²² *Staphylococcus lugdunensis* weist eine Virulenz auf, die der des *Staphylococcus aureus* ähnlicher ist als der anderer KNS und kann zu akuter Endokarditis mit höherer Mortalität verglichen zu anderen KNS führen.^{23,21}

Staphylococcus aureus ist für eine Vielzahl von Erkrankungen verantwortlich. Der Erreger kann der Auslöser harmloser bis mittelschwerer Hautinfektionen wie Abszessen, Wundinfektionen und Furunkel sein. Er steht auch in Zusammenhang mit der Entstehung atopischer Dermatitis. Des Weiteren können schwere Pneumonien, kardiovaskuläre Infektionen und Sepsis auf eine *Staphylococcus aureus* Infektion zurückzuführen sein. Eine große Problematik stellen multiresistente Keime dieser Spezies dar, mit dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* als klinisch Relevantesten.²⁴

1.3.1.2 Enterokokken und Streptokokken

Enterokokken zählen ebenso zu den grampositiven Kokken und ordnen sich in Paaren oder kurzen Ketten an. Obwohl sie als Besiedler der Dickdarmflora physiologisch vorkommen, können sie bei abwehrgeschwächten Patienten zu schweren Infektionen führen. Der Enterokokken-assoziierten Sepsis liegt meist eine Infektion des Darms oder Urogenitaltraktes zugrunde. Klinisch relevante Erreger dieser Gruppe sind *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium*. Ebenso wie die Enterokokken sind auch die Streptokokken in Paaren oder Ketten angeordnet. Wichtige Vertreter sind beispielsweise *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus dysgalactiae* und *Streptococcus pneumoniae*. Die mit den Streptokokken verbundenen Krankheiten sind vielfältig. Eiterungen, Scharlach, Meningitis bei Neugeborenen und Sepsis können als Folge solcher Infektionen auftreten.²⁵

1.3.2 Enterobakterien

Enterobakterien sind gramnegative, fakultative anaerobe Stäbchen. Diese Gruppe umfasst zahlreiche Krankheitserreger, wobei einige als Bewohner der Darmflora gelten und erst pathogen werden, wenn sie sich in anderen Körperregionen ansiedeln oder exogen dort hingelangen. Zu dieser Erregergruppe zählen zum Beispiel *Escherichia coli* und *Klebsiellen*.

Escherichia coli ist begeißelt und somit beweglich. Er besiedelt die Darmflora und weist sowohl apathogene als auch fakultativ oder obligat pathogene Gruppen auf, die in 5 Pathotypen

unterteilt werden. Die verursachenden Erkrankungen reichen von Harnwegsinfekten, über Durchfallerkrankungen bis zu Sepsis und Meningitis bei Neugeborenen.

Klebsiellen sind unbegeißelte Erreger, die im Darm und Respirationstrakt angesiedelt sein können. Als klinisch relevanter Vertreter ist hier *Klebsiella pneumoniae* zu nennen, ebenso wie *Klebsiella oxytoca*, die aber zu einem weitaus geringeren Prozentsatz isoliert wird. Harnwegsinfekte, Weichteilinfektionen, Pneumonien und Sepsis zählen zu den Erkrankungen, die eine Infektion mit diesem Erreger auslöst.²⁵

1.3.2.1 Nonfermenter

Die Nonfermenter umfassen eine Erregergruppe derer der fermentative Abbau von Glucose nicht möglich ist. Hierzu zählen *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter* und *Burkholderia*. *Pseudomonas aeruginosa* ist ein polar monotrich begeißeltes Stäbchenbakterium, das blaugüne Pigmente bildet. Als Hauptrisikofaktor einer schweren *Pseudomonas aeruginosa* Infektion gilt die Neutropenie. Wunden und Infektionen der Atemwege und des Urogenitaltraktes können zu einer Sepsis mit hohem Sterblichkeitsrisiko führen. Vor allem Infektionen von Verbrennungswunden bergen die Gefahr einer Sepsis mit nekrotischen Hautläsionen. *Stenotrophomonas maltophilia* und *Acinetobacter* können vor allem bei immunsupprimierten Patienten zu Komplikationen wie Harnwegsinfekten, Pneumonie und Bakteriämie führen.²⁵

1.3.3 Candida Spezies

Candida Spezies zeigen morphologisch zwei verschiedene Wachstumsformen. So können sie entweder Hyphen-bildend in Fadenform oder als rundlich ovale Pilzzellen erscheinen. Obwohl diese Pilze Besiedler der Schleimhaut sind, können Infektionen bei immunsupprimierten Patienten systemische Infektionen hervorrufen. Geschätzte 50% aller Candida Infektionen entfallen auf *Candida albicans*, wobei auch andere Candida Spezies wie *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* oder *Candida dubliniensis* zunehmend an Bedeutung gewinnen.²⁶ Als verursachende Erreger von Blutbahninfektionen stehen Candida Spezies in Europa an siebter Stelle. Die mit diesen Pilzen einhergehende Mortalität kann hohe Werte von 35% bis zu 71% erreichen.²⁷

1.4 Resistenzen

Bakterielle antimikrobielle Resistenzen gelten als eine ernstzunehmende gesundheitliche Problematik im 21. Jahrhundert. Eine in 204 Ländern durchgeführte und im Jahr 2022 veröffentlichte systemische Analyse schätzt die mit antibiotischer Resistenz assoziierten Todesfälle im Jahr 2019 auf 4,95 Millionen. Infektionen der unteren Atemwege stellten hierbei die größte Gefahr dar. Hauptverantwortlich für mit antimikrobieller Resistenz assoziierten Todesfälle sind 6 Erreger in folgender Reihenfolge: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* und *Pseudomonas aeruginosa*. Um dieser Resistenzproblematik entgegenzuwirken, sind verschiedene Interventionsstrategien vorhanden. Zu nennen sind beispielsweise die Infektionsprävention und Kontrolle und der Einsatz von Impfungen. Eine weitere Empfehlung ist, Antibiotika nur dann zu verschreiben, wenn diese auch wirklich indiziert sind, sowie eine Reduktion des Antibiotika Einsatzes in der Landwirtschaft.²⁸

Zu den weltweit am häufigsten verschriebenen Antibiotika zählen die β -Lactamantibiotika. Penicilline und Cephalosporine sind als Vertreter dieser Wirkstoffklasse zu nennen. β -Lactam Antibiotika binden und inhibieren an für die bakterielle Zellwandsynthese wichtige Proteine, den sogenannten „Penicillin binding proteins“. Mittels verschiedener Mechanismen finden Bakterien Wege, Resistenzen gegen diese Wirkstoffklasse zu entwickeln. Hier können Mutationen im aktiven Zentrum der Penicillin-bindenden Proteine, die mit einer Abnahme der Wirkstoffaffinität einhergehen, ursächlich sein. Eine weitere Möglichkeit ist die Produktion von Enzymen, wie β -Lactamasen, die an die Wirkstoffe binden, sie hydrolysieren und so inaktivieren. Ist dieser Wirkstoff den Carbapenemen zuzuordnen, so ist von Carbapenemasen die Rede. OXA-48 like Carbapenemasen zählen zu häufig vertretenen Carbapenemasen in Enterobakterien. Vor allem in *Klebsiella pneumoniae* sind diese Enzyme zu finden.²⁹ Ebenso problematisch erweisen sich CTX-M Enzyme. Diese zählen zu Klasse A der ESBL (extended spectrum β Lactamase), die in der Lage sind, ein erweitertes Spektrum β -Lactam haltiger Antibiotika zu hydrolysieren. Erstmals beschrieben wurden diese Enzyme in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Salmonella spp.* Bis 2011 wurden 123 CTX-M Varianten weltweit gezählt.³⁰ β -Lactam Antibiotika werden auch bei einer Staphylokokken Infektion zur Therapie eingesetzt. Diese Erregergruppe kann bei Vorliegen eines *mecA* Gens für einen weiteren Typ Penicillin bindender Proteine kodieren (PBP2A), die eine geringe Affinität gegenüber dieser

Antibiotika Gruppe aufweist. Hier spielen vor allem *Methicillin-resistente Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämme eine tragende Rolle. MRSA Infektionen können im Krankenhaus oder ambulant erworben werden und stellen ein massives gesundheitliches Problem dar.^{31,32}

1.5 Antimikrobielle Therapie

Die rasche Einleitung einer antimikrobiellen Therapie ist essenziell im Management der Sepsis und des septischen Schocks. Empfohlen wird ein Start der antimikrobiellen Gabe ehestmöglich, jedoch spätestens drei bis fünf Stunden nach Verdacht einer Sepsis. Patienten mit der Diagnose eines septischen Schocks erfordern einen sofortigen Therapiestart.^{33,34} Des Weiteren fließt in die Therapieentscheidung mit ein, ob der Infektionsherd bekannt oder unbekannt ist und selbstverständlich auch, welcher Erreger ursächlich ist. Zu berücksichtigen ist ebenso, ob der Patient bereits mit Antibiotika vortheraapiert wurde und ob beim Patienten eine Besiedelung mit einem multiresistenten Erreger bekannt ist. Zu den Risikofaktoren für eine solche Besiedelung zählen beispielsweise eine kürzlich zurückliegende Reise ins tropische Ausland, vorhandene Katheter oder eine mehr als viertägige vorangegangene Hospitalisierung. Ist der vorliegende Erreger bereits bekannt, soll die Antibiotikawahl auf einen adäquaten Wirkstoff mit guter Gewebepenetration fallen.³⁵ Die Gabe eines oder mehrerer antimikrobieller Wirkstoffe, die ein breites Spektrum an Bakterien und möglicherweise Pilzen und Viren abdecken, wird als Initialtherapie empfohlen. Da die Therapieentscheidung von vielen Faktoren abhängt, wie beispielsweise dem Infektionsort, ist die Empfehlung einer bestimmten Wirkstoffklasse nicht möglich, jedoch können Vorschläge zur Verfügung gestellt werden. Breitspektrumcarbapeneme finden am häufigsten Einsatz, genauso wie Penicilline mit erweitertem Spektrum in Kombination mit einem β -Lactamase-Inhibitor. Als Kombinationstherapie finden vor allem Cephalosporine der dritten oder höheren Generation Anwendung. Es sind Guidelines, wie beispielsweise der *Infectious Diseases Society of America* verfügbar, die Wirkstoffe nach dem Infektionsort oder der Immundefizienz des Patienten empfehlen.³⁶ Ein Umstellen von einem Breitbandantibiotikum auf einen spezifischen Wirkstoff ist vorzunehmen, sobald die Erregeridentifizierung eines bislang unbekannten Erregers vorliegt. Dies liefert den Vorteil, eine Reduktion der Behandlungskosten zu erreichen. Des Weiteren wird der Entstehung von Antibiotikaresistenzen und möglicher Arzneimitteltoxizität entgegengewirkt.³⁷ Diese beiden Punkte können mit dem Einsatz eines therapeutischen Drug Monitorings erreicht,

beziehungsweise dadurch unterstützt werden. Bei der Verwendung von Aminoglykosiden oder Glykopeptiden wird ein Therapeutisches Drug Monitoring bereits praktiziert und möglicherweise wird dieses in Zukunft auch verstärkt beim Einsatz von β -Lactamantibiotika durchgeführt. Eine Unterdosierung könnte zu einer Resistenzentwicklung führen oder erneutes Wachstum der Bakterien zur Folge haben.³⁸ Liegt bei dem Patienten eine Besiedlung mit einem multiresistenten Erreger vor, wird je nach Erreger die Wahl des Wirkstoffes getroffen. Bei einer MRSA Infektion wird der Einsatz von Vancomycin, Ceftarolin, Linezolid oder Daptomycin empfohlen. Letztere beide Wirkstoffen sind ebenso bei Vancomycin-resistenten Enterokokken eine Option. Bei Carbapenem resistenten Enterobakterien könnten Colistin oder Polymyxine verwendet werden. Eine weitere Möglichkeit wäre der Einsatz von Ceftazidim-Avibactam.³⁹

Es sind auch neue Therapieansätze zur Behandlung der Sepsis im Bereich der Nanotechnologie verfügbar. In präklinischen Modellen haben verschiedene Nanopartikuläre Systeme sehr gute therapeutische Aktivität gezeigt. Sie könnten zum Beispiel als antibakterielle Wirkstoffe fungieren. Positiv geladene Silberionen formuliert als Nanopartikel sind in der Lage, durch irreversible Adduktbildung mit zellulären bakteriellen Bestandteilen wie DNA oder Enzymen ein breites Spektrum an Bakterien zu inaktivieren. Ebenso könnten metallische Silbernanopartikel über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies zu Toxizität führen oder durch Akkumulation Schaden in der bakteriellen Zellmembran verursachen.⁴⁰

Eine rasche Identifizierung des zugrundeliegenden Erregers einer Blutbahninfektion, beziehungsweise einer Sepsis, spielt eine bedeutende Rolle bei der Krankheitsbekämpfung. Mit dem Einsatz einer PCR (Polymerasekettenreaktion) in der Diagnostik kann eine signifikante Zeitersparnis gegenüber der herkömmlichen Blutkultur erreicht werden. Obwohl sie diese nicht ersetzen kann, ist ein Einsatz als zusätzliche Analysemethode sinnvoll.⁴¹

1.6 Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist eine von Herrn Kary B. Mullis im Jahr 1985 entwickelte und mit dem Chemie Nobelpreis ausgezeichnete Methode zur Vervielfältigung eines spezifischen DNA-Segments.⁴² Der Ablauf setzt sich aus der Denaturierung, dem Primer Annealing und der Polymerisation zusammen. Zu Beginn wird der DNA-Doppelstrang durch ein Erhitzen auf 95°C in seine zwei Einzelstränge getrennt. An diese lagern sich nach Abkühlen auf zirka 55°C die im molaren Überschuss zugesetzten Primer an und grenzen die zu amplifizierende DNA-Sequenz ein. Eine hitzestabile Taq Polymerase verlängert den Einzelstrang. Dieser Vorgang wird zirka 20 bis 50 Zyklen lang wiederholt.⁴³

Die Real Time PCR ist eine Weiterentwicklung, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht. Wie dem Namen zu entnehmen ist, wird mit dieser Methode eine Verfolgung der Polymerasekettenreaktion in Echtzeit ermöglicht. Die Funktionsweise beruht auf der Messung eines Fluoreszenzsignals nach jedem PCR Zyklus. Dieses Signal steigt proportional mit der Anzahl der PCR Produkte an.^{44,45}

Hier können spezifische Sonden oder unspezifische Fluoreszenzfarbstoffe wie beispielsweise SYBR-Green zum Einsatz kommen. Solche interkalierenden Farbstoffe können nur in Anwesenheit einer doppelsträngigen DNA ein Fluoreszenzsignal abgeben. Nach Beendigung der PCR wird die Temperatur auf bis zu 95°C erhöht, was ein Auftrennen der doppelsträngigen DNA in seine Einzelstränge zur Folge hat. Beim Vorgang der sogenannten Schmelzkurvenanalyse sinkt das Fluoreszenzsignal, da der Farbstoff nun nicht mehr in der Lage ist ein solches abzugeben.⁴⁶ Ein weiteres Beispiel für einen interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff ist Ethidiumbromid, ein Phenanthridinfarbstoff.⁴⁷

Der Einsatz fluoreszenzmarkierter Sonden führte zu einer maßgeblichen Verbesserung der Methode der Real-time-PCR. Das zugrundeliegende Funktionsprinzip ist der Försterresonanzenergietransfer, kurz FRET. Dieser beschreibt, dass über Dipol-Dipol Wechselwirkungen Energie von einem zuvor angeregten Fluoreszenzfarbstoff-Donor auf einen Akzeptor übertragen wird.⁴⁸ Es sind verschiedene Arten von Sonden am Markt erhältlich. Die Taqman Sonde besteht aus einem Reporter und einem Quencher, der das Fluoreszenzsignal unter Voraussetzung räumlicher Nähe unterdrückt. Die Polymerase verfügt über eine Exonuklease Aktivität, die als Korrekturlesefunktion dient und falsch eingebaute

Nukleotide entfernt. Dieser Vorgang findet ebenso an der Taqman Sonde statt. Wird nun der Fluoreszenzfarbstoff von seinem Quencher entfernt, steigt das sequenzspezifische Fluoreszenzsignal an und wird messbar.⁴⁹

Molecular Beacons sind eine weitere Art von Sonden, die ebenso aus einem Quencher und Reporter bestehen. Aufgrund ihrer komplementären Nukleotide am 5' und 3' Ende weisen sie eine Haarnadelstruktur auf. Binden diese beiden Enden nun an die DNA Sequenz, wird ihr Abstand vergrößert und das Fluoreszenzsignal nicht mehr unterdrückt.^{49,50}

Die Lightcyclersonde beruht ebenso auf dem FRET Prinzip, jedoch ist diese eine Hybridisierungssonde. Zwei dieser Sonden binden an den DNA-Strang und erzeugen nach Anregung ein Fluoreszenzsignal durch ihre räumliche Nähe.^{49,51}

Zur Erregerdiagnostik aus einer mikrobiologischen Probe, wie Blut oder Stuhl, kann eine Real-Time PCR in Form einer Multiplex PCR angewandt werden. Hierbei kommen mehrere Primer Paare und Sonden zum Einsatz. Das Zusammenführen zahlreicher Einzelreaktionen zu einem gemeinsamen Reaktionsansatz erfordert das genaue Abstimmen der PCR Bedingungen für die unterschiedlich eingesetzten Primer. Auf diese Art wird die Identifikation von mehr als einem Genomabschnitt ermöglicht.^{52,53}

Eine weitere Möglichkeit der Erregerdiagnostik ist der Einsatz von Massenspektrometrie.

1.7 MALDI TOF Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist eine analytische Methode, die das Masse/Ladungsverhältnis von zuvor ionisierten Molekülen bestimmt.⁵⁴ Der Begriff der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation Massenspektrometrie wurde von seinen Entdeckern Karas und Hillenkamp in den 1980er Jahren geprägt.⁵⁵ Bei dieser Methode wird eine zuvor präparierte Probe mit einer Matrix überschichtet, die die Moleküle vor Fragmentierung schützt. Für mikrobiologische Zwecke haben sich als Matrix die organischen Säuren CHCA (α -Cyano-4-hydroxymethylsäure, DHB (2,5-Dihydroxybenzoesäure) und Sinapinsäure, gelöst in Wasser, organischen Lösungsmitteln und TFA (Trifluoressigsäure) am meisten bewährt. Nachdem die Matrix mit dem Erreger ko-kristallisiert, überführt in weiterer Folge ein Laserstrahl die Erregerproteine in ihre Gasphase und ionisiert sie. Die Ionisation ermöglicht eine

Beschleunigung der Teilchen im elektrischen Feld. Ein „time of flight“ Analysator detektiert die Proteine anhand ihrer Flugzeit nach ihrem Ionisierungsgrad und ihrer Masse. Nach Abgleich der charakteristischen Peptidmassenfingerprints mit Referenzdatenbanken kann eine Aussage über den Erreger getroffen werden.^{56, 54, 57}

In den letzten Jahren ist der klinische Einsatz von MALDI-TOF MS deutlich gestiegen und hat sich als effektive Zeit- und Kostensparende Ergänzung zur herkömmlichen Blutkultur erwiesen.⁵⁸ Eine in Europa durchgeführte und 2019 veröffentlichte Studie hat gezeigt, dass 37,3% der teilnehmenden Spitäler MALDI TOF zur Erregeridentifizierung aus der Subkultur und 22,5% diese analytische Methode zur direkten Identifikation nutzen.⁵⁹

Die zwei Arten der Probenpräparation werden im Methodenteil näher erläutert.

2 Problemstellung und Forschungsziele

Als lebensbedrohlicher Zustand erfordert die Sepsis eine besonders rasche Therapie, da die Überlebenswahrscheinlichkeit einer betroffenen Person maßgeblich vom Faktor Zeit abhängig ist. Pro vergangene Stunde steigt das Sterberisiko der Patienten an.⁶⁰ Infolgedessen ist es von großer Bedeutung, eine schnelle Identifikation der pathogenen Erreger zu gewährleisten, um die richtige Therapie einleiten zu können. Die konventionelle Blutkultur gilt nach wie vor als der Goldstandard in der Routinediagnostik. Der zunehmende Einsatz neuer Testsysteme ermöglicht die Erstellung eines raschen, vorläufigen Befundes, der für die Behandlung des Patienten oftmals richtungsweisend ist.⁶¹

Die vorliegende Arbeit soll eine neue, sowie eine bereits etablierte PCR Methode und MALDI TOF Massenspektrometrie direkt aus positiven Blutkulturen miteinander vergleichen und ihre diagnostische Verlässlichkeit evaluieren. Ferner sollen mögliche Vorteile und Nachteile der einzelnen Tests aufgezeigt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Studiendesign

Die vorliegende Studie wurde im Zeitraum Juli 2021 bis November 2021 am AKH Wien an der Abteilung für Klinische Mikrobiologie durchgeführt. Zur Untersuchung gelangten Proben aus positiven Blutkulturflaschen, die ausschließlich Blut als Material enthielten. Sonstige Materialien wie Liquor oder Aszites wurden nicht in die Studie eingeschlossen. Pro Patienten wurde je Episode eine positive Blutkulturflasche verwendet, sofern der nachgewiesene Erreger innerhalb dieser Episode der Gleiche war. Die konventionelle Blutkulturdiagnostik wurde als Goldstandard herangezogen. Desweiteren wurde an den Proben eine Identifikation mittels Massenspektrometrie (Sepsityper) und PCR (Cube Dx und Biofire) vorgenommen. Während alle 410 Proben mittels Sepsityper und Cube Dx Methode getestet wurden, wurden nach vorangegangener Selektion 66 aus 410 Proben zusätzlich mittels Biofire untersucht. Der Nachweis mittels Biofire erforderte ein bestimmtes Ergebnis der Gramfärbung: Als Einschlusskriterium galten Blutproben, die gramnegative Stäbchen oder gramnegative Diplokokken oder Hefen enthielten. Des Weiteren wurden grampositive Kokken und grampositive Stäbchen (kurz und zu zweit) inkludiert, sofern die Blutabnahme vom Patienten peripher erfolgte.

3.2 Probenvorbereitung

Pro Patienten gelangte mindestens je eine anaerobe und aerobe, beziehungsweise eine pädiatrische Blutkulturflasche ein, die in das Blutkultursystem BACT/ALERT® 3D der Firma Biomerieux eingeführt und bei 37° Celsius bebrütet wurde. Mittels kolorimetrischer Messung wird ein Wachstum frühzeitig erkannt. Die durch Erregerwachstum verursachte Zunahme des CO₂ Gehaltes in der Flasche führt zu einer Änderung des pH-Wertes und damit zu einer Farbänderung des Flaschenbodens von grau nach gelb. Dieser Farbumschlag wird von einem Sensor detektiert.⁶² Sobald eine Flasche als positiv erkannt wurde, wurde ein aliquot von 2-3ml Blut entnommen. Hiervon wurden 1-2 Tropfen Blut auf einen Objektträger für die Gramfärbung aufgetragen. Ein weiteres Aliquot wurde für die Identifikation mittels Sepsityper beziehungsweise Cube Dx und Biofire verwendet.

Die konventionelle Blutkultur gilt nach wie vor als Goldstandard der Erregerdiagnostik. Im Folgenden wird die Vorgehensweise der Routinediagnostik in der Blutkultur am AKH Wien in der Abteilung Klinische Mikrobiologie näher beschrieben.

3.3 Routineprozedere bei positiven Blutkulturen

3.3.1 Gramfärbung

Diese ist eine wichtige Methode in der mikrobiologischen Diagnostik, die die morphologische Darstellung und eine grundlegende taxonomische Zuordnung im Lichtmikroskop ermöglicht. Nach einer unspezifischen Färbung mit einem Anilinfarbstoff, z.B. Gentianaviolett, wird Lugol-Jodlösung aufgetragen, die zur Bildung von Farbstoffkomplexen führt. Diese lagern sich in der Mureinschicht der Bakterien ab und werden im nachfolgenden Schritt durch Ethanolzugabe im Falle von gramnegativen Bakterien wieder entfärbt. Grampositive Bakterien unterscheiden sich im Aufbau ihrer Zelle von gramnegativen Bakterien, sodass der Farbstoffkomplex nicht vom Alkohol gelöst werden kann. Grampositive Bakterien erscheinen demnach blau, während gramnegative Bakterien nach Gegenfärbung mit verdünntem Karbolfuchsin eine rote Färbung aufweisen.⁶³

Nach Durchführung der Gramfärbung wurde in weiterer Folge eine Erregeridentifizierung direkt aus dem Blut mittels MALDI TOF MS Sepsityper durchgeführt. Diese Methode ist Bestandteil der herkömmlichen Blutkulturdiagnostik in der Abteilung Klinische Mikrobiologie des AKH Wien.

3.3.2 Sepsityper

Der MALDI Biotyper® ist ein Massenspektrometer, der in der Abteilung Klinische Mikrobiologie des AKH Wien routinemäßig im Einsatz ist. Mit diesem Gerät ist sowohl eine Erregeridentifizierung direkt aus dem Blut (Sepsityper) als auch aus der Subkultur möglich. Für die vorliegende Studie wurde die Identifizierung direkt aus dem Blut (Sepsityper) als Referenzmethode herangezogen. Dieses Gerät des Herstellers Bruker identifiziert Mikroorganismen aufgrund ihres individuellen Peptidmassenfingerprint.⁶⁴ Das Funktionsprinzip wurde bereits in der Einleitung näher erläutert. Nach dem Ergebnis der

Gramfärbung wurde direkt aus der positiven Blutkultur eine Erregeridentifizierung mittels Sepsityper vorgenommen. Dies erfolgte nach dem von der Firma Bruker zur Verfügung gestelltem Protokoll und dem zugehörigen MBT Sepsityper IVD Kit (<https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/mbt-sepsityper-ivd-kit.html>). Zur Probenvorbereitung wurde 1ml der positiven Blutkultur in ein Mikroreaktionsgefäß übergeführt. Nach Zugabe von 200µl Lysis Puffer wurde dieser durch vortexen mit der Probe vermischt und anschließend für 2 Minuten bei 13.000rpm zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde nach Entfernen des Überstandes das verbleibende Pellet in 1ml Waschpuffer durch Auf-und Abpipettieren gründlich resuspendiert. Nach vorangegangener Zentrifugation für 1 Minute und 13.000rpm wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 300µl deionisiertem Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 900µl Ethanol wurde das Mikroreaktionsgefäß mehrmals gekippt, bei 2 Minuten und 13.000 rpm zentrifugiert und der verbleibende Überstand abgekippt. Um das Ethanol vollständig zu entfernen, fand ein erneuter kurzer Zentrifugationsschritt (ca. 6 sec) statt, anschließend wurde abpipettiert und das Gefäß für einige Minuten geöffnet stehen gelassen. Im letzten Schritt erfolgte eine Zugabe von 70%iger Ameisensäure mit einem variablen Volumen der Pelletgröße entsprechend (2 bis 30µl). Nach sorgfältiger Durchmischung wurde dasselbe Volumen Acetonitril zugesetzt. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt von 2 Minuten bei 13.000 rpm wurde ein Mikroliter des Überstands auf das Stahltarget pipettiert. Das Target umfasste insgesamt 96 Positionen. Nachdem die Oberfläche getrocknet war, wurde mit einer Matrixlösung von je 1µl pro Position überschichtet. Das Target wurde in das Massenspektrometer eingebracht, sobald die Matrixlösung ebenfalls bei Raumtemperatur getrocknet war. Der Zeitaufwand betrug in Summe ungefähr 30 Minuten, abhängig von der Anzahl der durchgeführten Proben.^{65,64}

Lösung	Inhaltsstoffe	Hersteller
Lysispuffer	Keine Angaben	Bruker
Waschpuffer	Keine Angaben	Bruker
HPLC-Wasser	/	LiChrosolv
Ethanol	/	VWR Chemicals
Acetonitril	/	Honeywell

70%ige Ameisensäure	300 µl HPLC Wasser + 700 µl 100% Ameisensäure	/
OS	95µl HPLC Wasser+5µl 100% TFA+100µl Acetonitril	/
Matrix HCCA portioned	250µl OS	Bruker
Bacterial Test Standard	E.coli extract	Bruker

3.3.3 Subkultivierung und MALDI TOF MS

Zusätzlich zur Erregeridentifizierung direkt aus dem Blut wurden Kulturmedien zur Subkultivierung für jede positive Blutkulturflasche angelegt. Die Auswahl der Agarplatten erfolgte nach dem Ergebnis der Gramfärbung, beziehungsweise des Sepsitypers, sofern dieser ein Ergebnis lieferte. Das Universalmedium Columbia Agar mit 5% Schafblut wurde sowohl bei grampositiven Mikroorganismen als auch Gramnegativen gewählt. Um das Wachstum grampositiver Erreger zusätzlich zu gramnegativen Erregern auszuschließen, wurden zwei Plättchen des Antibiotikums Colistin auf den Primärstrich der Columbia 5% Schafblut Platte platziert. Grampositive Erreger weisen eine Resistenz gegen diesen Wirkstoff auf und könnten aufgrund dessen im Hemmhof anwachsen. Um eventuell das Vorhandensein von Pilzen überprüfen zu können, wurde unabhängig vom Ergebnis der Gramfärbung die Probe auf ein CHROMagar Medium ausgestrichen. CPSe und MacConkey Platten wurden ausschließlich bei gramnegativen geraden Stäbchen verwendet. Diese Platten ermöglichen eine farbliche Unterscheidung der gramnegativen Erreger.²⁵ Lieferte die Bestimmung direkt aus dem Blut mittels Sepsityper kein Ergebnis, beziehungsweise um das Sepsityper Ergebnis zu verifizieren, wurde am darauffolgenden Tag die auf den Platten angewachsene Subkultur entnommen und auf die Spots des MALDI Stahltargets aufgebracht. Nach der Zugabe von Ameisensäure auf die Spots grampositiver Erreger wurden alle Spots mit einer Matrix überschichtet. Anschließend wurde das Target wieder in das Massenspektrometer zur Identifizierung eingebracht.

3.3.4 Weitere Schnelltests aus der Subkultur

Um Erreger innerhalb sehr kurzer Zeit aus der Kultur zu identifizieren beziehungsweise einzuordnen, stehen eine Reihe von Schnelltests zur Verfügung.

Mittels Koagulasetest wird eine Unterscheidung zwischen Koagulase-negativen und Koagulase-positiven Staphylokokken ermöglicht. Nach Zufügen fibrinogenbeschichteter Latexpartikel in Form eines Reagenzes auf die Bakterienkolonie entstehen nach Verreiben Agglutinate, sofern die Reaktion positiv ist. Diese Agglutinate zeigen das Vorhandensein des Clumping Factors und sind ein Indikator für das Vorliegen des Koagulase-positiven *Staphylococcus aureus*.⁶⁶

Eine weitere Möglichkeit bietet der Oxidasetest, der dem Nachweis von Cytochromoxidase dient. Ziel ist die Unterscheidung von Oxidase-positiven Nonfermentern und Oxidase-negativen Enterobakterien. Die Kolonien werden mit ausreichend Feuchtigkeit auf die Reaktionszone des Teststreifens aufgerieben. Alternativ kann die Reaktionszone auch auf die Kolonie aufgelegt werden. Ein Farbumschlag nach blau innerhalb einer Zeit von 15 Sekunden bedeutet, dass der Test positiv ausgefallen ist.⁶⁶

Ein Katalasetest wird üblicherweise zur Unterscheidung von katalasepositiven Staphylokokken und katalasenegativen Streptokokken herangezogen. Auf ein positives Ergebnis deutet eine Bläschenbildung hin, die aus der von dem Enzym Katalase induzierten Reaktion entsteht. Die Ursache der Schaumbildung ist die Umwandlung von H_2O_2 zu Sauerstoff und Wasser.⁶⁶

3.3.5 Resistenztestungen

3.3.5.1 Agardiffusionstest

Zur Bestimmung eines Antibiotogramms wurde der Agardiffusionstest durchgeführt. Nach Ausstreichen der Probe auf ein Nährmedium werden Antibiotika-Testblättchen aufgelegt. Eine anschließende Bebrütung für 24h Stunden bei 37 Grad Celsius führt zu einem makroskopisch sichtbaren Bewuchs. Im Bereich der Antibiotika-Testblättchen ist ein klarer Hemmof, dessen Durchmesser gemessen werden kann, sichtbar. Es besteht eine Korrelation zwischen diesem Durchmesser und der Minimalen Hemmkonzentration des Antibiotikums.⁶⁷

3.3.5.2 Eazyplex

Die Firma AmplexDiagnostics GmbH liefert mit Eazyplex® eine Möglichkeit zur Ermittlung von Resistenzen direkt aus dem Blut. Das Testprinzip beruht auf einer „Schleifen-vermittelten isothermen Amplifikation“ (bekannt unter der Engl. Abkürzung LAMP) und einer real-time Detektion auf Fluoreszenz Basis.⁶⁸ Bei den Keimen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Enterococcus faecium* wurde eine solche Testung vorgenommen.

Als Probenmaterial wurden 5µl der positiven Blutkulturflaschen BacT/ALERT verwendet und in 500µl RALF (Resuspension und Lysis Fluid) pipettiert. Anschließend wurde die RALF Suspension für 2 Minuten bei 99°C inkubiert und für 30 Sekunden bei 1000xg zentrifugiert. Je 25µl dieser Suspension wurden ohne zu vortexen/ auf und abzupipettieren oder das Pellet zu berühren luftblasenfrei in die einzelnen Gefäße des Teststreifens pipettiert und in das Gerät eingebracht.⁶⁸ *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* wurden auf SuperBug CRE, *Staphylococcus aureus* auf MRSA und *Enterococcus faecium* auf VRE getestet.

3.4 Cube Dx

Die Firma Cube Dx GmbH ermöglicht unter Einsatz eines multiplexen DNA Tests den Nachweis von 56 Bakterienspezies und 11 Bakteriengenera (siehe *Abbildung 2*), 19 Pilzspezies und 5 Pilzgenera (siehe *Abbildung 4*) und 9 Resistenzgenen (siehe *Abbildung 3*), sowie von Mischinfektionen aus positiven Blutkulturproben. Der Test ist nicht als alleinige Diagnostikmethode, sondern als Ergänzung zur herkömmlichen Kultivierung angedacht.⁶⁹

	Genus	Spezies	Genus	Spezies
Bakterien	Abiotrophia	<i>Abiotrophia defectiva</i>	Klebsiella	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>
	Acinetobacter	<i>Acinetobacter baumannii</i> <i>Acinetobacter calcoaceticus complex</i>	Legionella	<i>Legionella pneumophila</i>
	Actinobacillus	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Listeria	
	Anaerococcus		Moraxella	<i>Moraxella catarrhalis</i>
	Bacterioides	<i>Bacterioides fragilis</i>	Morganella	<i>Morganella morganii</i>
	Bordetella	<i>Bordetella pertussis</i>	Neisseria	<i>Neisseria meningitidis</i>
	Borrelia	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Pasteurella	<i>Pasteurella multocida</i>
	Brucella		Prevotella	<i>Prevotella buccae</i> <i>Prevotella intermedia</i>
	Burkholderia	<i>Burkholderia cepacia complex</i> <i>Burkholderia pseudomallei</i>	Propionibacterium	<i>Propionibacterium acnes</i>
	Campylobacter		Proteus	<i>Proteus mirabilis</i>
	Citrobacter	<i>Citrobacter koseri</i> <i>Citrobacter freundii complex</i>	Providencia	<i>Providencia stuartii</i>
	Corynebacterium	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Corynebacterium jeikeium</i> <i>Corynebacterium ulcerans</i>	Pseudomonas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas non-aeruginosa</i>
	Enterobacter	<i>Enterobacter aerogenes</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Enterobacter cloacae complex</i>	Salmonella	<i>Salmonella enterica</i>
	Enterococcus	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Enterococcus faecium</i>	Serratia	<i>Serratia marcescens</i>
	Escherichia	<i>Escherichia coli</i>	Staphylococcus	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Staphylococcus epidermidis and other CNS</i>
	Finnegoldia	<i>Finnegoldia magna</i>	Stenotrophomonas	<i>Stenotrophomonas maltophilia group</i>
	Fusobacterium	<i>Fusobacterium nucleatum</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i>	Streptococcus	<i>Streptococcus anginosus group</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Streptococcus gordonii</i> <i>Streptococcus mitis group</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Streptococcus salivarius group</i>
	Granulicatella	<i>Granulicatella adiacens</i>	Yersinia	<i>Yersinia enterocolitica</i> <i>Yersinia pseudotuberculosis complex</i>
	Haemophilus	<i>Haemophilus haemolyticus</i> <i>Haemophilus influenzae</i>		
	Helicobacter	<i>Helicobacter pylori</i>		

Abbildung 2: Panel von Cube Dx – Bakterien ⁶⁹ Quelle: www.cubedx.com/deutsch/support/ressourcen/

	gram+ Resistenz	Resistenzgen	gram- Resistenz	Resistenzgen
Resistenz	Vancomycin resistances	<i>vanA</i> <i>vanB</i>	Beta-lactamase/ Carbapenemase	<i>CTX m1/m3</i> <i>IMP</i> <i>KPC</i> <i>NDM</i> <i>OXA48</i>
	Methicillin resistances	<i>mecA</i> <i>mecC</i>		

Abbildung 3: Panel von Cube Dx – Resistenz ⁶⁹ Quelle: www.cubedx.com/deutsch/support/ressourcen/

Genus	Spezies
Aspergillus	<i>Aspergillus clavatus</i> <i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus terreus</i>
Candida	<i>Candida albicans</i> <i>Candida dubliniensis</i> <i>Candida parapsilosis</i> <i>Candida tropicalis</i> <i>Candida glabrata</i>
Nakaseomyces	<i>Candida auris</i>
Clavispora	
Cladosporium	
Filobasidiella	<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Cryptococcus gattii</i>
Fusarium	<i>Fusarium oxysporum species complex</i> <i>Fusarium solani species complex</i>
Pichia	<i>Pichia kudriavzevii</i>
Pneumocystis	<i>Pneumocystis jirovecii</i> <i>Pneumocystis murina</i>
Saccharomyces	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Scedosporium	

Abbildung 4: Panel von Cube Dx – Fungi⁶⁹ Quelle: www.cubedx.com/deutsch/support/ressourcen/

Zu Beginn ist eine Aufbereitung der Probe erforderlich, die nach dem von der Firma Cube Dx zur Verfügung gestelltem Protokoll erfolgte. Die Verwendung des LINA Puffers ermöglicht eine direkte Erregeridentifizierung aus positiven Blutkulturen ohne vorangegangene Extraktionsschritte. Vor der Durchführung wurden die tiefgefrorenen und bei -15 bis -25 Grad Celsius gelagerten PCR Boxen aufgetaut. Im ersten Schritt wurden 2µl der positiven Blutprobe in 8ml des LINA Transfer-und Modulations-Puffers pipettiert. Nach mehrmaligem Invertieren der Pufferröhrchen wurden je 20µl aus dem Puffergemisch entnommen und jeweils in die drei PCR-Mastermixes: Bacteria (16S), Fungi (28S) und Resistance pipettiert. Im Anschluss an die Probenaufbereitung fand die Amplifikation der DNA statt. Dies geschieht unter Einsatz einer Singleplex PCR und der Markierung der entstandenen Einzelstränge mit einem Fluoreszenzmarker. Die PCR kann entweder an einem qPCR Gerät oder an einem Thermocycler erfolgen. Für die Umsetzung der vorliegenden Studie wurde ein Thermocycler der Firma Analytic Jena verwendet. Die PCR umfasste 41 Zyklen, bestehend aus 5 Sekunden bei 94°C, 10 Sekunden bei 56°C und 25 Sekunden bei 72°C. Abschließend wird eine Minute lang auf 72°C temperiert. Nach erfolgter Amplifikation wurden die Proben bei -25°C zur Lagerung tiefgefroren und an die Firma Cube Dx zur weiteren Analyse gesendet. Für den Identifikationsschritt, der vor Ort bei der genannten Firma vorgenommen wurde, kam die

hybcell-Technologie zur Anwendung. Dies ist das weltweit erste zylindrische Microarray. Die Hybcell wurde nach dem Entpacken in das dafür vorgesehene Rack geschoben. Im letzten Schritt wurden jeweils 30µl der PCR-Box Bacteria, Fungi und IPC in die Hybcell pipettiert. Nach dem Beladen des Geräts konnte die Identifikation gestartet werden. Das zugrundeliegende Analysenprinzip ist das *compact sequencing*. Die bei der Singleplex PCR entstandenen Amplifikate binden an immobilisierte Primer. Eine DNA-Polymerase verlängert nun im Falle einer perfekten Übereinstimmung diese Primer. Genaue Waschschriffe ermöglichen ein spezifisches Fluoreszenzsignal durch Entfernen unspezifischer Produkte. Dieses Signalmuster wird vom hyborg unter Verwendung einer Software gescannt und analysiert. Die gesamte Prozessdauer betrug insgesamt ungefähr zwei Stunden.⁶⁹

Material	Hersteller
LINA Puffer	Cube dx
PCR Box Bacteria	Cube dx
PCR Box Fungi	Cube dx
PCR Box Resistance	Cube dx
<i>hybcell Bacteria DNA</i> <i>xB Kit</i>	Cube dx
<i>hybcell Fungi DNA xB</i> <i>Kit</i>	Cube dx
<i>hybcell Pathogens</i> <i>DNA xB Kit</i>	Cube dx
System Liquid	Cube dx
PE-Buffer	Cube dx
hyborg	Cube dx
Thermocycler	Analytic Jena TPersonal Thermocycler (Biometra)

3.5 Biofire

In Verbindung mit den Ergebnissen der Gramfärbung dient der BioFire® Blood Culture Identification 2 zum Nachweis von 33 Erregern und 10 Antibiotika-Resistenzgenen (siehe *Abbildung 5*).⁷⁰

Grampositive Bakterien				
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus</i> spp.		<i>Streptococcus</i> spp.	
<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gruppe B)	
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
	<i>Staphylococcus lugdunensis</i>		<i>Streptococcus pyogenes</i> (Gruppe A)	
Gramnegative Bakterien				
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> -Komplex			<i>Enterobacterales</i>	
<i>Bacteroides fragilis</i>			<i>Enterobacter cloacae</i> -Komplex	
<i>Haemophilus influenzae</i>			<i>Escherichia coli</i>	
<i>Neisseria meningitidis</i> (verkapselt)			<i>Klebsiella aerogenes</i>	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>			<i>Klebsiella pneumoniae</i> -Gruppe	
			<i>Proteus</i> spp.	
			<i>Salmonella</i> spp.	
			<i>Serratia marcescens</i>	
Hefe				
<i>Candida albicans</i>		<i>Candida krusei</i>	<i>Cryptococcus neoformans/gattii</i>	
<i>Candida auris</i>		<i>Candida parapsilosis</i>		
<i>Candida glabrata</i>		<i>Candida tropicalis</i>		
Gene für Antibiotikaresistenzen				
CTX-M	KPC	<i>mecA/C</i>	NDM	<i>vanA/B</i>
IMP	<i>mcr-1</i> ^a	<i>mecA/C</i> und MREJ (MRSA)	OXA-48-ähnlich	VIM

Abbildung 5: Panel von Biofire ⁷⁰ Quelle: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/biofire-bcid-panel>

Im Zuge der vorliegenden Studie wurden 66 Proben mit dieser Methode getestet. Die Einschlusskriterien umfassten gramnegative Stäbchen, Hefen, gramnegative Diplokokken und grampositive Kokken oder grampositive Stäbchen (kurz und zu zweit). Letztere beiden nur aus peripher abgenommenem Blut. Die zugrunde liegende Nachweismethode ist eine Nested-Multiplex-PCR. Diese wird in einem geschlossenem 4-Schritte-Einwegsystem verrichtet. Zuvor ist eine rasch durchführbare Probenvorbereitung erforderlich.

Diese Umsetzung erfolgte laut Protokoll und umfasste eine Dauer von zirka 5 Minuten. Im ersten Schritt wurde der Riegel vorbereitet, indem dieser in die Ladestation für den Riegel eingeführt wurde. Anschließend wurden das Injektionsröhrchen für die Probe und das Injektionsröhrchen für die Hydrierung in die jeweils dafür vorhergesehenen, farblich markierten Vertiefungen gesetzt. Im Folgenden wurde das Injektionsröhrchen für die Hydrierung aus dem Verschluss gedreht und in die passende Hydrierungsöffnung im Riegel

gesetzt. Nachdem die Hydrierungslösung in den Riegel gesaugt wurde, wurde der Probenpuffer möglichst ohne Blasenbildung in das Injektionsröhrchen für die Probe gegossen. In dasselbe Röhrchen wurden 0,2ml der positiven Blutprobe pipettiert. Nach Verschließen des Röhrchens wurde dieses dreimal vorsichtig zum Durchmischen gekippt. Das Einsetzen in die Ladestation für Riegel erfolgte analog zu dem Durchführungsschritt des Injektionsröhrchens für Hydrierung. Nachdem die Flüssigkeit der Proben/Puffermischung eingesaugt wurde, konnte der Biofire beladen und die Erregeridentifizierung gestartet werden.

Zu Beginn wird die Probe mechanisch und chemisch mittels „Bead Beating“ und Probenpuffer lysiert. Das Reinigen und Extrahieren der Nukleinsäuren erfolgt durch Magnetkügelchentechnik. Folgend findet die Nested Multiplex PCR bestehend aus einer einzelnen Multiplex PCR und anschließend mehreren Singleplex PCRs, statt.⁷⁰ Da es zum Entstehen von unerwünschten Nebenprodukten kommen kann, wird eine Singleplex PCR angeschlossen, deren Primer nur mit der gewünschten Ziel DNA hybridisieren können. Diese Primer liegen innerhalb der ersten Primer und somit wird das Risiko für das weitere Entstehen von Nebenprodukten stark reduziert.⁵² Für die Ergebnisgenerierung werden Endpunkt-Schmelzkurvendaten herangezogen.⁷⁰

Material	Hersteller
Probenpuffer	bioMérieux
Hydrierungslösung	bioMérieux
Riegel	bioMérieux

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden insgesamt 410 positive Blutkulturproben untersucht. An allen diesen Proben wurde eine Identifizierung mittels Sepsityper und Cube Dx vorgenommen. Die Ergebnisse dieser beiden Tests wurden mit dem endgültigen Ergebnis der Routine-Blutkulturdiagnostik als Goldstandard (wird in der Folge Blutkultur genannt), verglichen. Ein Anteil von 66 Proben wurde des Weiteren mittels Biofire untersucht. Die Ergebnisse dieser kleineren Studie werden in Kapitel 4.2 erläutert. Zuerst werden die Ergebnisse der 410 Proben ohne die Ergebnisse des Biofire Tests erläutert.

Bei 366 der 410 Proben lag eine Monoinfektion vor und bei den verbleibenden 44 Proben eine Mischinfektion mit 2, 3 oder 4 Erregern je Probe. Hier wird unter Monoinfektion beziehungsweise Mischinfektion eine monomikrobielle beziehungsweise polymikrobielle Kultur verstanden, da nicht mit Sicherheit von einer Infektion ausgegangen werden kann. Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, wurden die Monoinfektionen und Mischinfektionen getrennt voneinander ausgewertet. Im Folgenden werden zuerst die Ergebnisse der Monoinfektionen und anschließend die der Mischinfektionen beschrieben.

4.1.1 Monoinfektionen

Bei 366 Proben wurde eine Monoinfektion nachgewiesen, wobei bei einer Probe der Keim mittels Blutkultur nicht nachgewiesen werden konnte, da dieser nicht subkultivierbar war. Diese Probe wurde folglich bei der Übereinstimmung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Bei den Monoinfektionen konnte eine Übereinstimmung der Blutkultur, des Sepsitypers und Cube Dx in 76,16% aller 365 Proben festgestellt werden. Während die Ergebnisse des Sepsitypers und der Blutkultur in 84,93% der Fälle übereinstimmten, erreichte Cube Dx eine knapp höhere Übereinstimmung von 86,85% (siehe *Abbildung 6*).

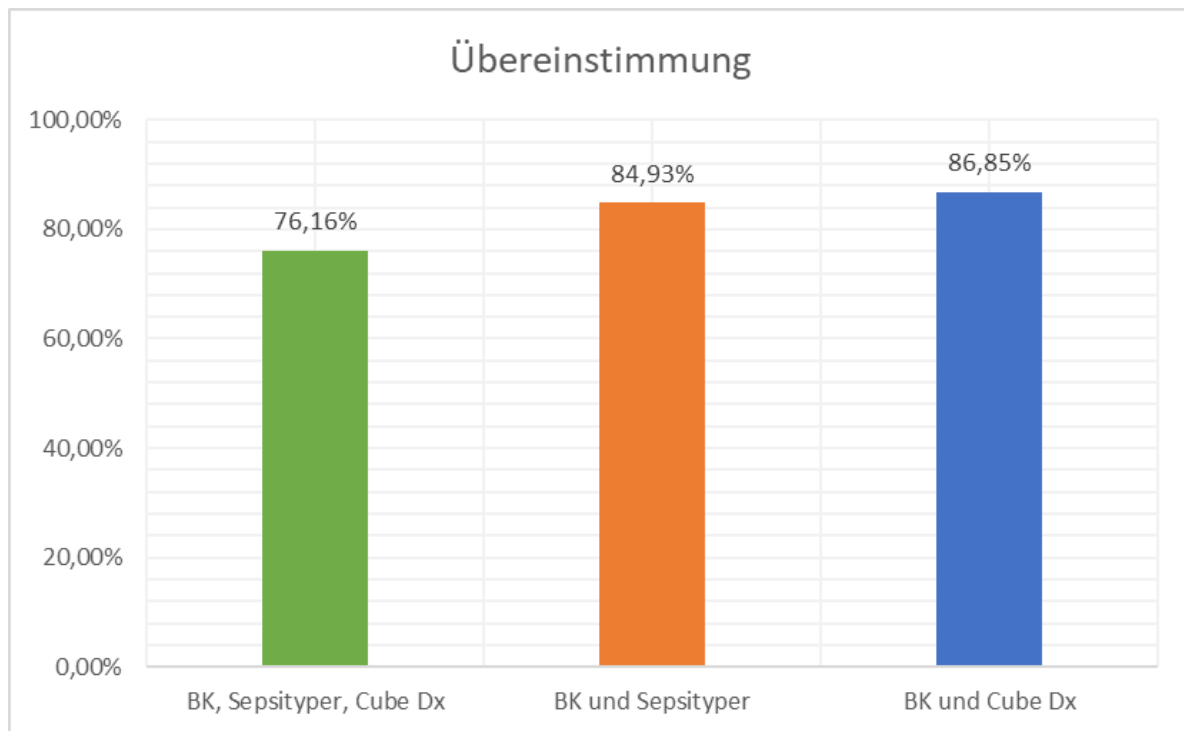


Abbildung 6: Übereinstimmung der Ergebnisse von 365 Monoinfektionen – Blutkultur (BK), Sepsityper und Cube Dx

4.1.1.1 Monoinfektionen – Erreger im Panel von Cube Dx

Nun werden ausschließlich jene Proben betrachtet, die Erreger aus dem Cube Dx Panel enthielten. Folglich kann dann eine Steigerung der jeweiligen Identifikationsraten verzeichnet werden. Bei Cube Dx konnte demnach eine Übereinstimmung mit der Blutkultur von 94,91% erreicht werden. Dies entspricht einer Erhöhung um 8,06%.

Die Ergebnisse des Sepsitypers zeigten eine um 2,5% höhere Übereinstimmung mit der Blutkultur. Der Wert dieses Tests liegt dann bei 87,43%.

Somit liegt die Differenz zwischen Cube Dx und Sepsityper bei 7,48%.

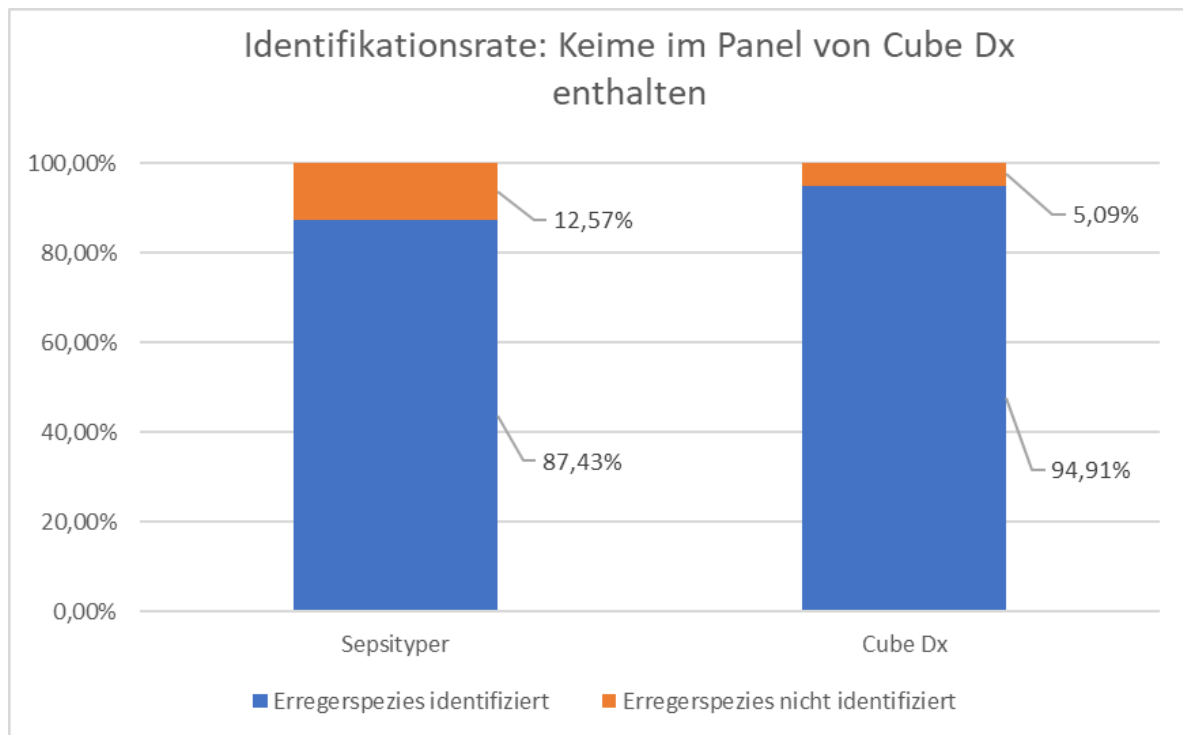


Abbildung 7: Identifikationsrate der Tests Sepsityper und Cube Dx, wenn nur Proben (n=334) mit on-Panel Erregern inkludiert werden

Von den gesamt 365 Proben enthielten 334 davon Erreger, die im Panel von Cube Dx enthalten sind. Somit kann eine Abdeckung von 91,51% der untersuchten Proben verzeichnet werden. Den größten Anteil der enthaltenen Erreger bildeten Bakterien. Hierbei waren grampositive Kokken mit einer Anzahl von 182 (54,49%) vorrangig. Während grampositive Stäbchen nur in 16 (4,79%) Proben vorkamen, wurden gramnegative Stäbchenbakterien 122 (36,53%) mal nachgewiesen. Des Weiteren wurden auch in einem kleinen Anteil von 14 (4,19%) Proben Pilze detektiert, wobei dies ausschließlich Candida Spezies waren. *Tabelle 1A* zeigt eine Auflistung aller nachgewiesenen Erreger, die im Panel von Cube Dx enthalten sind. Hierbei ist zu erwähnen, dass eine Unterscheidung innerhalb der Spezies der Koagulase negativen Staphylokokken bei Cube Dx nicht möglich ist.

Staphylokokken nahmen den größten Anteil unter den grampositiven Kokken ein. Koagulase negative Staphylokokken wurden hierbei in 112 Proben von der Blutkultur nachgewiesen. Die Identifikationsrate von Cube Dx lag bei 99% in dieser Gruppe. Der Sepsityper zeigte hier schlechtere Ergebnisse. Zum Beispiel konnte *Staphylococcus epidermidis* nur in 64 von 76 Fällen vom Sepsityper nachgewiesen werden. *Staphylococcus aureus* wurde von der Blutkultur 26-mal nachgewiesen und konnte von beiden Tests auch so oft erkannt werden.

Grampositive Stäbchen inkludierten nur zwei Spezies, wobei in einem Fall *Corynebacterium jeikeium* und in 15 Fällen *Cutibacterium acnes* vorkam. Diese Stäbchen wurden von Cube Dx zu 100% richtig identifiziert. Hier sind die Ergebnisse des Sepsitypers deutlich schlechter mit nur 5 nachgewiesenen Cutibakterien und keinem nachgewiesenen Corynebakterium. Unter den gramnegativen geraden Stäbchen wurde *Escherichia coli* gefolgt von *Klebsiella pneumoniae/variicola* am häufigsten identifiziert. Beide Tests erzielten hier eine Identifikationsrate von über 95%. Detaillierte Ergebnisse sind in *Tabelle 1A* aufgelistet.

In *Abbildung 8* sind jene 14 Erregerspezies dargestellt, die innerhalb der 334 Proben am häufigsten nachgewiesen wurden. 6 dieser 14 Erregerspezies entfallen auf grampositive Kokken, 6 auf gramnegative gerade Stäbchen, 1 Erreger ist ein Pilz und 1 Erreger ein grampositives Stäbchen. Angeführt wird diese Liste von *Staphylococcus epidermidis* mit 76 nachgewiesenen Isolaten. Hier erzielte Cube Dx eine um rund 14,5% höhere Nachweisrate als der Sepsityper. Als einziges in dieser Grafik vertretenes grampositives Stäbchen ist bei *Cutibacterium acnes* ein deutlicher Unterschied von rund 70% zugunsten Cube Dx zwischen den beiden Tests ersichtlich. Unter den 14 von der Blutkultur nachgewiesenen Candida Spezies, wurde *Candida albicans* am häufigsten verzeichnet. Bei diesem Erreger gelang eine Identifizierung mit Sepsityper und Cube Dx in 50% beziehungsweise 70% der Fälle.

Um eine bessere Übersicht zu gewährleisten, sind die Ergebnisse von *Abbildung 8* in *Abbildung 9* prozentuell dargestellt.

Tabelle 1A: Erregerliste					
Erregername	Blutkultur	Sepsityper		Cube Dx	
	n	n	%	n	%
Hefen					
Candida albicans	10	5	0,50	7	0,70
Candida dubliniensis	1	1	1,00	1	1,00
Candida glabrata	2	1	0,50	0	0,00
Candida tropicalis	1	1	1,00	1	1,00
Sonstige grampositive Kokken					
Enterococcus faecalis	11	10	0,91	11	1,00
Enterococcus faecium	13	12	0,92	13	1,00
Granulicatella adiacens	1	1	1,00	1	1,00
Staphylokokken					
Staphylococcus aureus	26	26	1,00	26	1,00
Staphylococcus capitis/	3	3	1,00	111	0,99
Staphylococcus epidermidis/	76	64	0,84		
Staphylococcus haemolyticus/	13	10	0,77		
Staphylococcus hominis/	18	15	0,83		
Staphylococcus lugdunensis	2	2	1,00		
Streptokokken					
β-haemolysierende Streptokokken Gruppe B	2	2	1,00	1	0,50
β-haemolysierende Streptokokken Gruppe C	1	1	1,00	1	1,00
β-haemolysierende Streptokokken Gruppe G	2	2	1,00	2	1,00
Streptococcus anginosus Gruppe	3	2	0,67	3	1,00
Streptococcus gordonii	1	1	1,00	0	0,00
Streptococcus mitis/oralis	5	3	0,60	5	1,00
Streptococcus pyogenes	1	1	1,00	1	1,00
Streptococcus salivarius Gruppe	1	1	1,00	1	1,00
Streptococcus sanguinis Gruppe	3	2	0,67	3	1,00
Grampositive Stäbchen					
Corynebacterium jeikeium	1	0	0,00	1	1,00
Cutibacterium acnes	15	5	0,33	15	1,00
Gramnegative Bakterien					
Acinetobacter baumannii Komplex	2	2	1,00	2	1,00
Campylobacter spezie (C. jejuni)	1	1	1,00	1	0,00
Campylobacter spezie (C. showae)	1	1	1,00	1	0,00
Citrobacter freundii	1	1	1,00	0	0,00
Enterobacter cloacae Komplex	7	7	1,00	5	0,71
Escherichia coli	47	46	0,98	47	1,00
Klebsiella aerogenes	2	2	1,00	2	1,00
Klebsiella oxytoca	6	6	1,00	5	0,83
Klebsiella pneumoniae/variicola	24	24	1,00	23	0,96
Morganella morganii	2	2	1,00	1	0,50
Proteus mirabilis	4	4	1,00	4	1,00
Pseudomonas aeruginosa	13	13	1,00	13	1,00
Pseudomonas putida Gruppe	2	2	1,00	0	0,00
Serratia marcescens	7	7	1,00	6	0,86
Stenotrophomonas maltophilia	3	3	1,00	3	1,00
Summe	334	292		317	

Tabelle 1A zeigt die Ergebnisse aller on-Panel Erreger von Cube Dx, die mittels BK nachgewiesen wurden, sowie die Ergebnisse der beiden Tests Sepsityper und Cube Dx

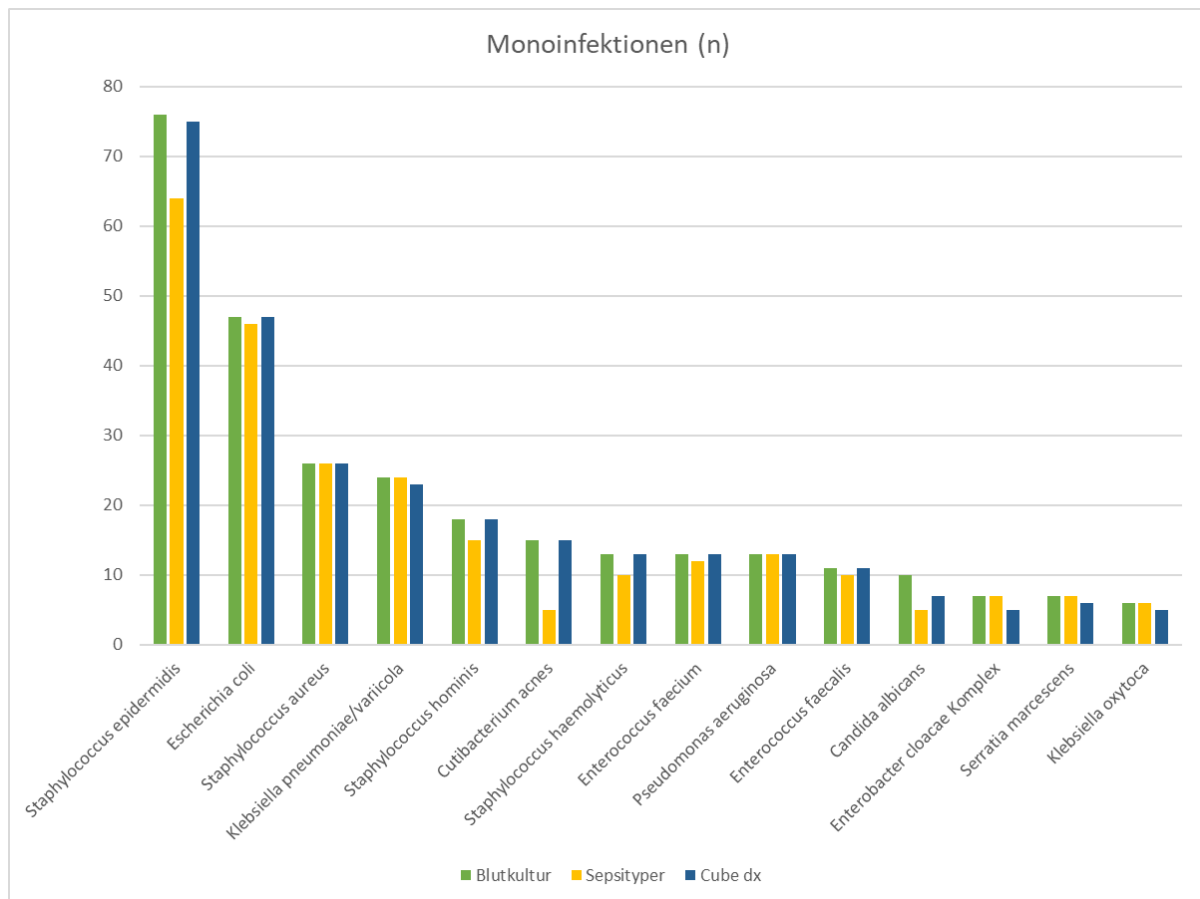


Abbildung 8: Erreger, die bei 334 Monoinfektionen am Häufigsten nachgewiesen wurden

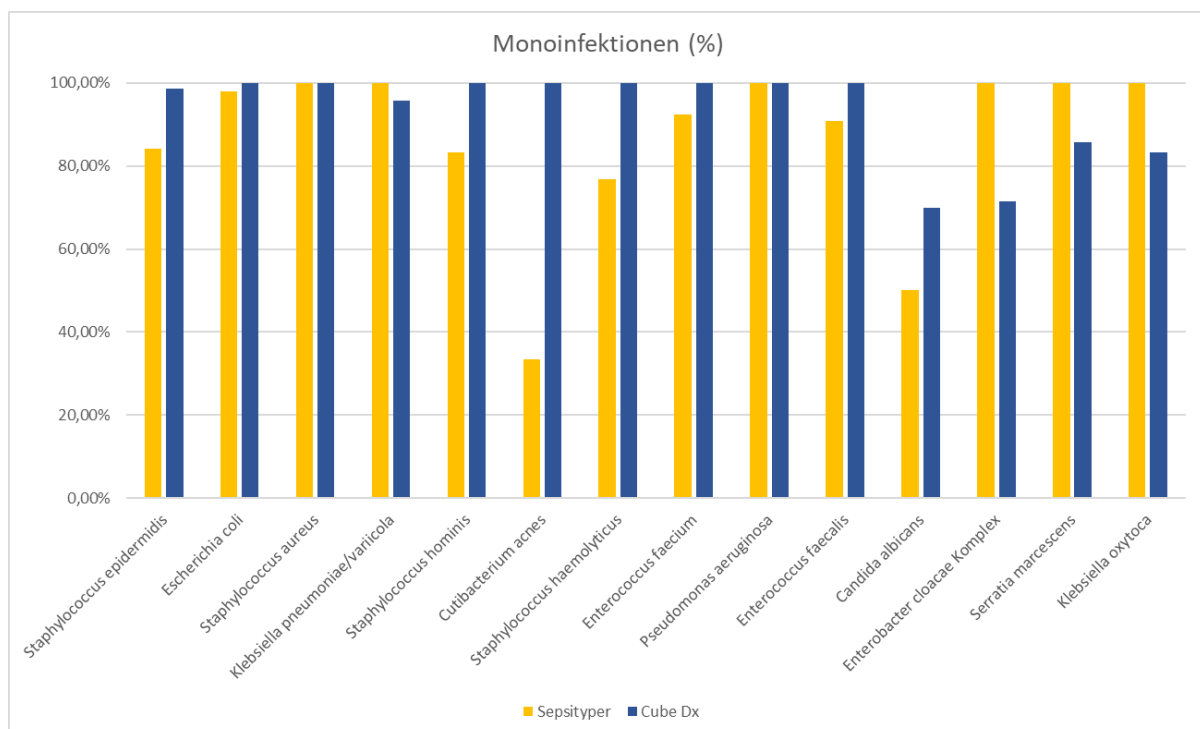


Abbildung 9: Erreger, die bei 334 Monoinfektionen am Häufigsten nachgewiesen wurden, prozentuell dargestellt

4.1.1.2 Diskonkordante Ergebnisse von Cube Dx

Bei den Proben, die mittels Cube Dx nicht korrekt identifiziert werden konnten, lieferte dieser Test entweder gar kein Ergebnis oder einen oder mehrere falsche Erreger. Letzteres war bei 12 Proben der Fall, die in *Tabelle 2* dargestellt sind. Hier ist ersichtlich, dass Cube Dx in 3 Proben ein falsches Ergebnis mit verschiedenen Erregern der Streptokokkengruppe anzeigte. *Staphylokokken sp.* und *Corynebacterium sp.* wurden ebenso 3 beziehungsweise 2mal falsch von Cube Dx nachgewiesen. Die Blutkultur hat diese Erreger in den jeweiligen Proben nicht detektiert. In einer Probe mit *Klebsiella variicola/pneumoniae* lieferte Cube Dx stattdessen *Staphylococcus aureus*. *Enterococcus gallinarum* wurde als *Enterococcus faecium* misidentifiziert.

Tabelle 2: Cube Dx Ergebnisse diskonkordant	
Blutkulturergebnis	Cube Dx Ergebnis
Acinetobacter bereziniae	Acinetobacter calcoaceticus complex
Acinetobacter radioresistens	
Candida glabrata	Staphylococcus sp.
Candida lusitanae	Streptococcus mitis group
Eggerthella lenta	Staphylococcus sp.
Eikenella corrodens	Bacteroides fragilis
Enterococcus gallinarum	Enterococcus faecium; Staphylococcus sp.
Klebsiella variicola/pneumoniae	Staphylococcus aureus
Micrococcus luteus	Corynebacterium sp.
Micrococcus luteus	Corynebacterium sp.;
Prevotella nigrescens	Streptococcus salivarius group; Acinetobacter calcoaceticus complex
Prevotella nigrescens	Streptococcus sp.
Trichosporon mycotoxinivorans	Acinetobacter baumannii

Tabelle 2 zeigt die Blutkulturergebnisse aus den Monoinfektionen, wo Cube Dx ein diskonkordantes Ergebnis geliefert hat

4.1.1.3 Erreger, nicht im Panel von Cube Dx

In *Tabelle 1B* sind jene Erreger aufgelistet, die mittels Blutkultur nachgewiesen wurden, sich jedoch nicht im Panel von Cube Dx befinden. Mittels Sepsityper konnten 18 dieser 31 Erreger korrekt identifiziert werden. Dies entspricht einer Identifikationsrate von 58,06%.

<i>Tabelle 1B</i>		
Erregername	Blutkultur	Sepsityper
<i>Acinetobacter bereziniae</i>	1	1
<i>Acinetobacter radioresistens</i>	1	1
<i>Apiotrichum (Trichosporon) mycotoxinivorans</i>	1	1
<i>Bacillus cereus</i>	2	2
<i>Bacteroides intestinalis</i>	1	0
<i>Candida lusitanae</i>	1	1
<i>Corynebacterium afermentans</i>	1	0
<i>Corynebacterium glucuronolyticum</i>	1	0
<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	1	0
<i>Eggerthella lenta</i>	1	0
<i>Eikenella corrodens</i>	1	0
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	1
<i>fraglich Oribacterium sp.</i>	1	0
<i>Lactobacillus gasseri</i>	1	1
<i>Micrococcus luteus</i>	6	5
<i>Moraxella osloensis</i>	1	0
<i>Moraxella species</i>	1	0
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	1	1
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	0
<i>Prevotella nigrescens</i>	1	0
<i>Prevotella oralis</i>	1	1
<i>Providencia rettgeri</i>	2	2
<i>Roseomonas mucosa</i>	1	0
<i>Streptococcus bovis Gruppe</i>	1	1
Summe	31	18

Tabelle 1B zeigt jene Erreger, die mittels BK nachgewiesen wurden, die jedoch nicht im Panel von Cube Dx enthalten sind

4.1.2 Mischinfektionen

In 44 der gesamt 410 Proben wurden Mischinfektionen nachgewiesen. Diese Proben enthielten folglich mehr als einen Erreger. Es wurden je Probe entweder 2, 3 oder 4 Erreger nachgewiesen. Bei der Auswertung wurden zuerst die gesamten 44 Proben betrachtet und die Ergebnisse der Blutkultur, des Sepsityper und Cube Dx gegenübergestellt (siehe *Tabelle 3A*). Anschließend wurden jene Proben selektiert, die ausschließlich Erreger enthielten, die im Panel von Cube Dx vertreten sind (siehe *Tabelle 3B*). Dies war bei 37 Proben der Fall.

Werden zuerst jene Ergebnisse aus *Tabelle 3A* betrachtet, wird sichtbar, dass am häufigsten 2 Erreger je Probe nachgewiesen wurden. Mindestens 1 von 2 Erregern je Probe konnte sowohl mittels Sepsityper als auch Cube Dx in über 80% der Fälle nachgewiesen werden. Beim Nachweis von 2 von 2 Erregern schnitt Cube Dx deutlich besser ab als Sepsityper mit 47,22% gegenüber 8,33%. 3 Erreger lagen in 7 Proben vor und hier konnten 3 von 3 Erreger in 2 Proben von Cube Dx richtig nachgewiesen werden. Mehr als einen Erreger konnte Sepsityper in diesen 7 Proben nicht identifizieren. Jedoch gelang der Nachweis von 1 von 3 Erregern in 6 Proben.

<i>Tabelle 3A: gesamt</i>					
Häufigkeit	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
36	0 von 2	3	8,33%	3	8,33%
	1 von 2	30	83,33%	16	44,44%
	2 von 2	3	8,33%	17	47,22%
	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
7	0 von 3	1	14,29%	0	0,00%
	1 von 3	6	85,71%	4	57,14%
	2 von 3	0	0,00%	1	14,29%
	3 von 3	0	0,00%	2	28,57%
	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
1	0 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	1 von 4	1	100,00%	0	0,00%
	2 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	3 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	4 von 4	0	0,00%	1	100,00%
44					

Tabelle 3A zeigt die Ergebnisse der gesamten Proben (n=44) mit Mischinfektionen

Werden nun jene Ergebnisse von *Tabelle 3B* begutachtet, die ausschließlich Proben mit Erregern, die sich im Panel von Cube Dx befinden, enthalten, ist eine Steigerung der Identifikationsrate bei Cube Dx ersichtlich. 2 von 2 Erreger können nun in 56,67% gegenüber 47,22% korrekt nachgewiesen werden.

<i>Tabelle 3B: Spezies im Panel</i>					
Häufigkeit	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
30	0 von 2	2	6,67%	2	6,67%
	1 von 2	26	86,67%	11	36,67%
	2 von 2	2	6,67%	17	56,67%
Häufigkeit	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
6	0 von 3	0	0,00%	0	0,00%
	1 von 3	6	100,00%	3	50,00%
	2 von 3	0	0,00%	1	16,67%
	3 von 3	0	0,00%	2	33,33%
Häufigkeit	Erregeranzahl	Sepsityper (n)	Sepsityper (%)	Cube Dx (n)	Cube Dx (%)
1	0 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	1 von 4	1	100,00%	0	0,00%
	2 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	3 von 4	0	0,00%	0	0,00%
	4 von 4	0	0,00%	1	100,00%
37					

Tabelle 3B zeigt die Ergebnisse der Proben (n=37), die on-Panel Erreger enthielten

4.1.3 Zusätzlich nachgewiesene Erreger

Cube Dx hat in 25 der gesamt 410 Proben mindestens einen Erreger detektiert, der mittels Blutkultur nicht nachgewiesen wurde. In 4 Proben wurden mindestens 2 weitere und in 1 Probe wurden 3 weitere Erreger von Cube Dx identifiziert. *Abbildung 10* liefert eine Auflistung eben jener Erreger. Hier nehmen *Coryne* sp. mit einer Anzahl von 7 den größten Anteil ein. 6 Erreger entfallen auf Streptokokken. *Fusobacterium nucleatum*, *Haemophilus influenza* und *Anaerococcus* sp. waren generell in der gesamten Studie in Bezug auf den Goldstandard der Blutkultur nicht vertreten.

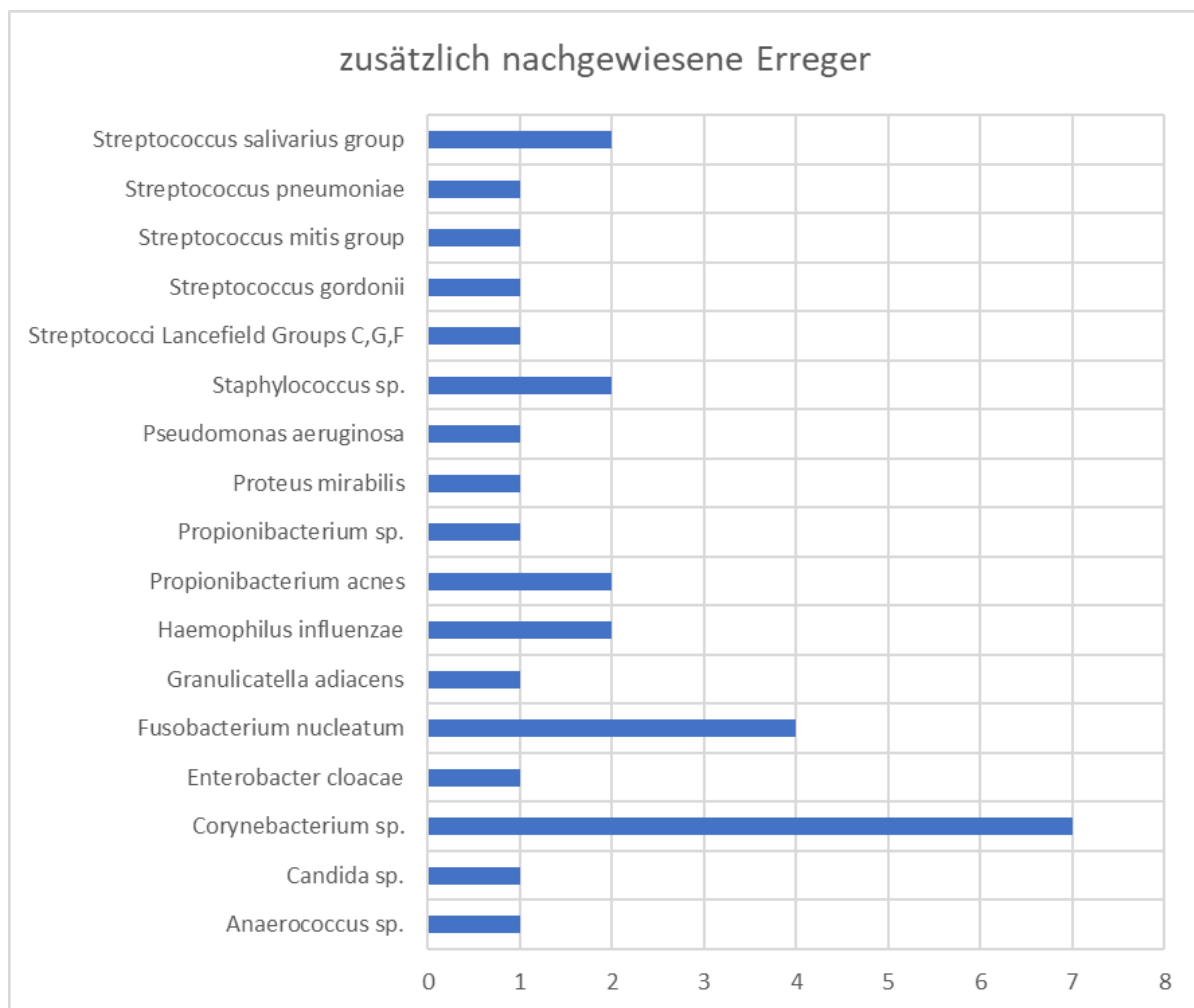


Abbildung 10: Erreger, die von Cube Dx in 25 Proben zusätzlich detektiert wurden, von BK aber nicht nachgewiesen wurden

4.1.4 Resistenzgene

Cube Dx ermöglicht neben der Identifizierung von Erregern auch den Nachweis von 9 Resistenzgenen. Hierbei ist erwähnenswert, dass die Resistenzgene auch dann angezeigt werden, wenn der Erreger selbst nicht erkannt wurde. So kann das Ergebnis für Bakterien negativ ausfallen, jedoch das Ergebnis der Resistenz zum Beispiel *mecA* lauten.

In der vorliegenden Studie wurde für das Resistenzgen *mecA* für *Koagulase negative Staphylokokken* das Ergebnis eines Antibiotogramms als Referenz herangezogen. Lautete dieses resistent bei den Wirkstoffen Oxacillin beziehungsweise Cefoxitin, wurde die Probe als *mecA* positiv betrachtet. Bei den Erregern *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* und *Enterococcus faecium* wurde nach dem Positivwerden der Blutkultur eine LAMP vorgenommen, um rasch Therapie-relevante Resistenzgene detektieren zu können. Sowohl das Erstellen des Antibiotogramms als auch die Durchführung der isothermen Amplifikation wurden im Zuge der Routinediagnostik durchgeführt.

100 Proben enthielten Methicillin-resistente *Koagulase Negative Staphylokokken*. Mittels Cube Dx konnte in 82 Proben dieses Resistenzgen nachgewiesen werden. Bei 3 Proben hat Cube Dx das Resistenzgen *mecA* falsch positiv angezeigt, da dieses hier von der Blutkultur nicht nachgewiesen wurde.

Es lagen zwei Methicillin-resistente *Staphylococci aureus* vor, die auch von Cube Dx korrekt als solche identifiziert wurden. Ebenso konnte bei *Klebsiella pneumoniae* mit dem Resistenzgen *OXA-48* sowohl der Erreger als auch das Resistenzgen selbst korrekt identifiziert werden. Ein negatives Ergebnis lieferte Cube Dx jedoch in den 3 nachgewiesenen Fällen eines positiven *CTX-M-1* Ergebnisses bei *Escherichia coli* (2) und *Klebsiella pneumoniae* (1). In diesen Fällen gelang zwar der Nachweis von *Klebsiella pneumoniae* (1 von 1) und *Escherichia coli* (1 von 2) jedoch nicht der des Resistenzgens (siehe *Abbildung 11*).

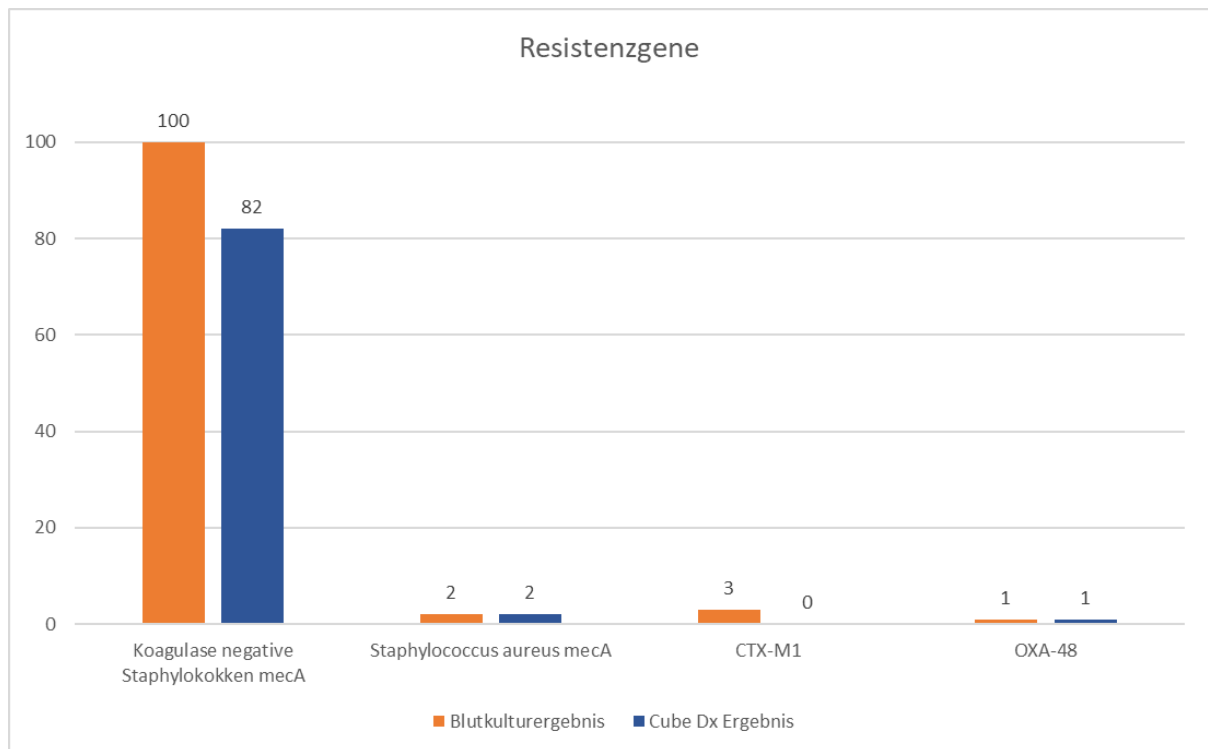


Abbildung 11: resistente Erreger Vgl. BK und Cube Dx

4.2 Ergebnisse – Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx – Biofire

An 66 Proben wurde zusätzlich eine Identifikation mittels Biofire durchgeführt. Bei 60 dieser Proben lag eine Monoinfektion vor und bei den verbleibenden 6 Proben wurden Mischinfektionen festgestellt. Die Ergebnisse werden im Folgenden erläutert.

4.2.1 Monoinfektionen

Bei 70% der 60 Proben konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse von Blutkultur, Sepsityper, Cube Dx und Biofire festgestellt werden. Die höchste Identifikationsrate wurde von Sepsityper mit 93,33% erzielt, gefolgt von Cube Dx mit 88,33% und die geringste Identifikationsrate wies Biofire mit 81,67% auf (siehe *Abbildung 12*). Hierbei sind jedoch auch 11 Proben mit Erregern inkludiert, die sich nicht im Panel von Biofire befinden.

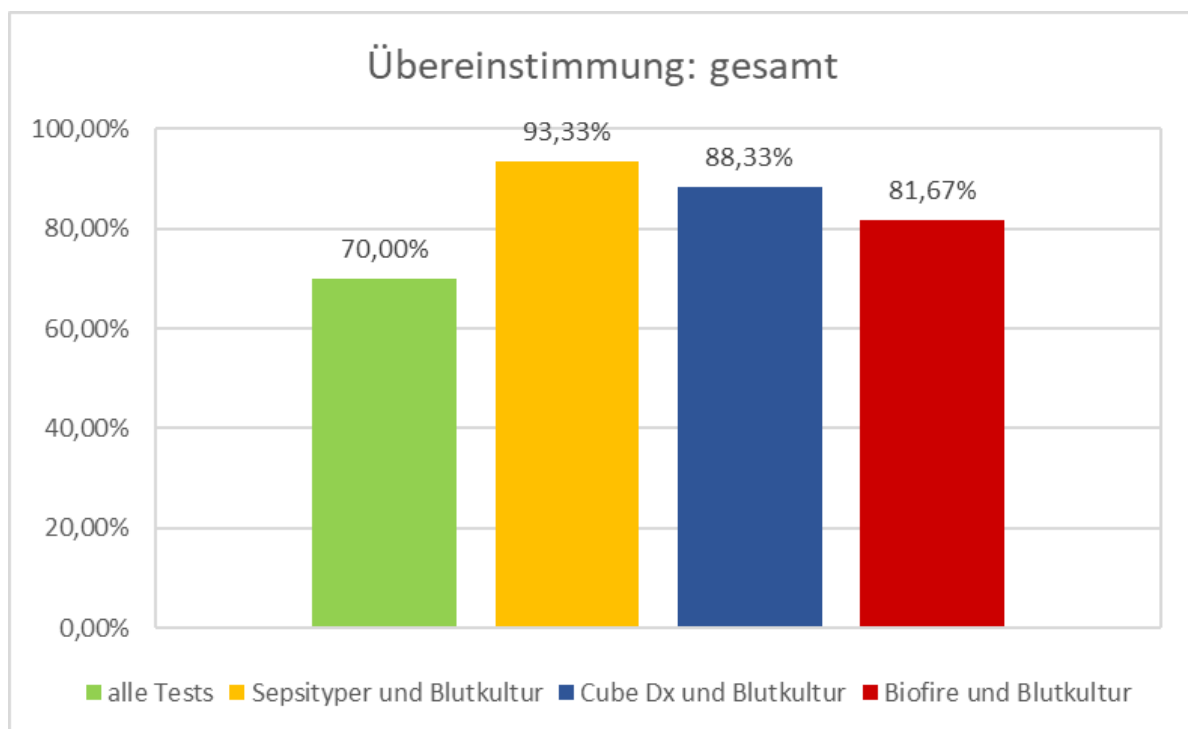


Abbildung 12: Übereinstimmung aller Tests mit BK bei gesamten Probenanzahl (n=60) der Monoinfektionen

Werden diese 11 Proben mit off-Panel Erregern ausgeschlossen, ändern sich die Ergebnisse deutlich. Nun erreicht Biofire eine Identifikationsrate von 100%. An zweiter Stelle befindet sich Sepsityper mit 95,92% und danach Cube Dx mit 89,80%. Die Übereinstimmung aller 3 Tests mit der Blutkultur steigt um 15,71% und liegt nun bei 85,71% (siehe *Abbildung 13*).

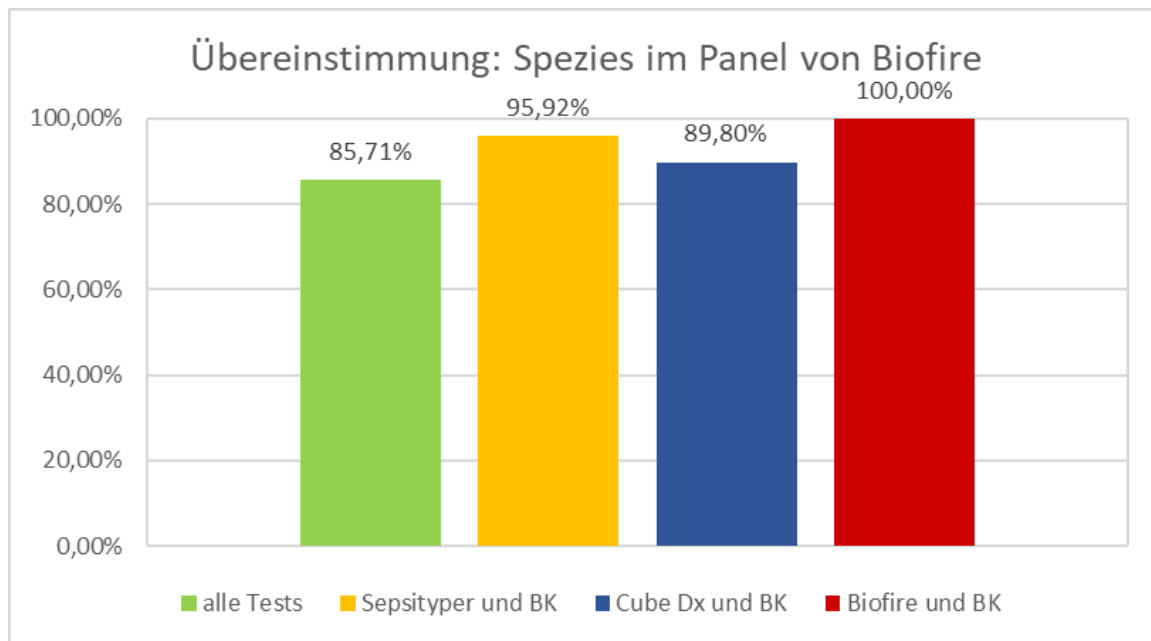


Abbildung 13: Übereinstimmung aller Tests mit BK bei Proben der Monoinfektionen, die nur on-Panel Erreger (Biofire) enthielten

Tabelle 4 liefert einen Überblick über die 60 nachgewiesenen Erreger. *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis*, *Micrococcus luteus*, *Campylobacter jejuni*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus anginosus* und *sanguinis* Gruppe und *Morganella morganii* befinden sich nicht im Panel von Biofire. Bei *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus hominis* sowie bei den Streptokokken und *Morganella morganii* war jedoch ein Nachweis der jeweiligen Genera möglich. *Micrococcus luteus* ist auch nicht im Panel von Cube Dx enthalten. Das Genus *Campylobacter* konnte von Cube Dx als korrekt identifiziert werden, jedoch ist der Nachweis als Spezies, im konkreten Fall, als *Campylobacter jejuni*, nicht möglich, da dieser nicht im Panel inkludiert ist.

Es wird deutlich, dass Cube Dx mit 2 im Vergleich zu Biofire mit 8 Erregerspezies, die nicht im jeweiligen Panel enthalten sind, eine höhere Abdeckung des Erregerspektrums der durchgeführten Proben lieferte.

Tabelle 4: Monoinfektionen							
Erreger Spezies	Blutkultur	Sepsityper		Cube Dx		Biofire	
	(n)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Grampositive Kokken							
Enterococcus faecalis	1	1	1,00	1	1,00	1	1,00
Enterococcus faecium	4	4	1,00	4	1,00	4	1,00
Staphylokokken							
Staphylococcus aureus	5	5	1,00	5	1,00	5	1,00
Staphylococcus epidermidis/	7	6	0,86			7	1,00
Staphylococcus haemolyticus/	2	2	1,00	11	1,00	2 *	1,00
Staphylococcus hominis	2	2	1,00			2 *	1,00
Micrococcus luteus	1	0	0,00	0 **	0,00	0 **	0,00
Streptokokken							
β-haemolisierende Streptokokken Gruppe C	1	1	1,00	1	1,00	1 *	1,00
Streptococcus anginosus Gruppe	1	0	0,00	1	1,00	1 *	1,00
Streptococcus pyogenes	1	1	1,00	1	1,00	1	1,00
Streptococcus sanguinis Gruppe	1	1	1,00	1	1,00	1 *	1,00
Gramnegative Bakterien							
Acinetobacter baumannii Komplex	1	1	1,00	1	1,00	1	1,00
Campylobacter spezies (<i>C. jejuni</i>)	1	1	1,00	1 *	1,00	0 **	0,00
Enterobacter cloacae Komplex	3	3	1,00	1	0,33	3	1,00
Escherichia coli	10	10	1,00	10	1,00	10	1,00
Klebsiella aerogenes	1	1	1,00	1	1,00	1	1,00
Klebsiella pneumoniae/variicola	4	4	1,00	3	0,75	4	1,00
Morganella morganii	2	2	1,00	1	0,50	2 *	1,00
Pseudomonas aeruginosa	4	4	1,00	4	1,00	4	1,00
Serratia marcescens	1	1	1,00	0	0,00	1	1,00
Stenotrophomonas maltophilia	2	2	1,00	2	1,00	2	1,00
Hefen							
Candida albicans	4	3	0,75	3	0,75	4	1,00
Candida tropicalis	1	1	1,00	1	1,00	1	1,00
Summe	60	56	0,93	53	0,88	58	0,97
* Genus erkannt (Spezies nicht im Panel)							
** weder Genus noch Spezies im Panel							

Tabelle 4 zeigt die Ergebnisse von Proben (n=60) mit Monoinfektionen

Die untenstehende Grafik (Abbildung 14) zeigt jene 15 Erreger, die am häufigsten nachgewiesen wurden und auch gleichzeitig im Panel von Biofire und Cube Dx enthalten sind. In der Gruppe der gramnegativen geraden Stäbchen wurde *Escherichia coli* (n=10) am häufigsten von der Blutkultur nachgewiesen. Dieser Erreger konnte von allen 3 Tests mit einer Identifikationsrate von 100% detektiert werden. Sepsityper zeigt bei *Staphylococcus epidermidis* ein schlechteres Ergebnis als die anderen beiden Tests. Während dieser Test hingegen bei *Klebsiella pneumoniae/variicola*, *Enterobacter cloacae* und *Serratia marcescens* einen Nachweis von 100% erreichte, schnitt hier Cube Dx schlechter ab. *Candida albicans* konnte von den beiden Tests jeweils nur in 3 von 4 Fällen nachgewiesen werden. Mittels Biofire konnten alle der 15 häufigsten Erregerspezies zu 100% korrekt identifiziert werden.

Abbildung 15 stellt jene Ergebnisse aus Abbildung 14 prozentuell dar.

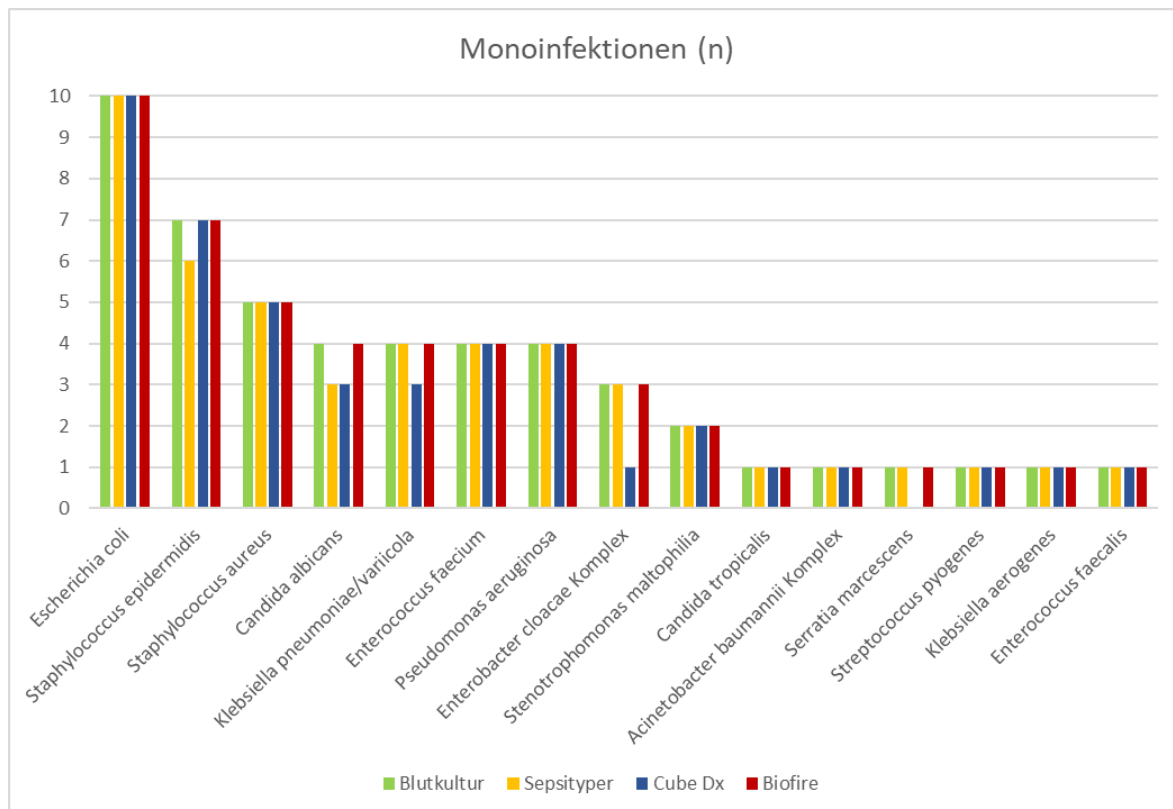


Abbildung 14: die häufigsten Erreger der Monoinfektionen (n=49)

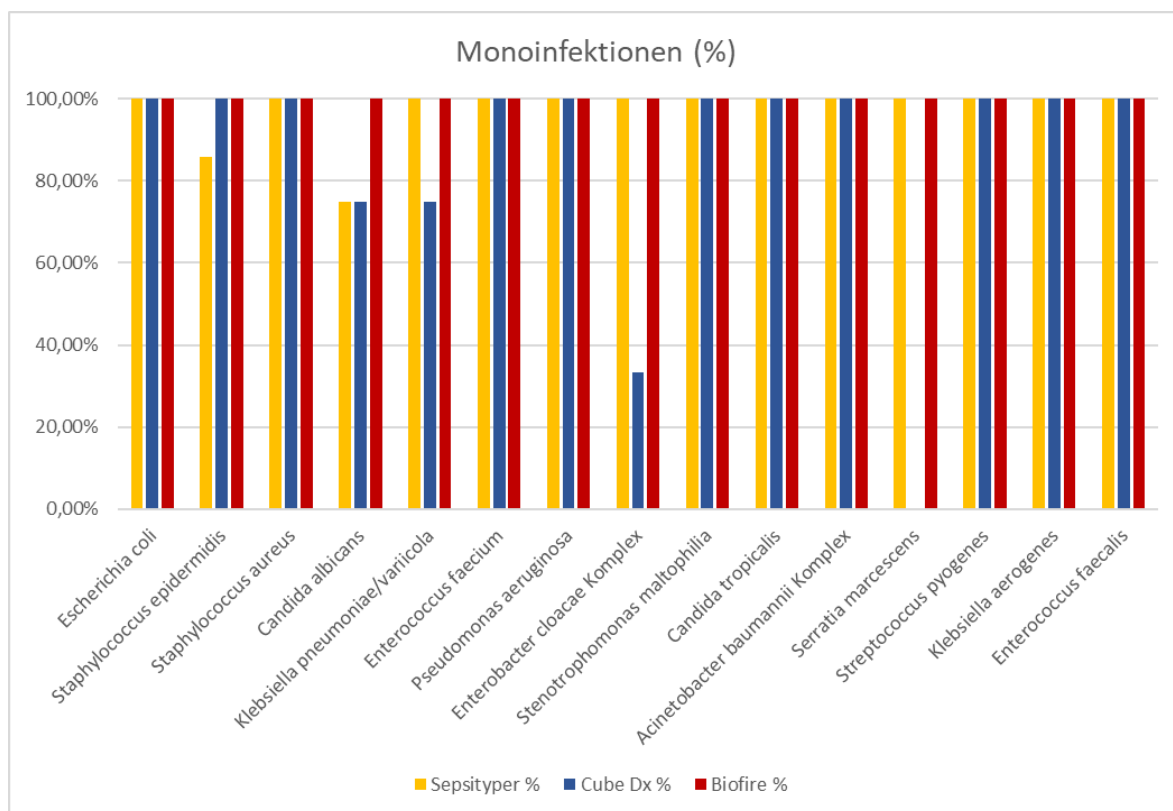


Abbildung 15: die häufigsten Erreger der Monoinfektionen aus Abb. 14 prozentuell dargestellt

4.2.2 Mischinfektionen

In 6 der 66 Proben konnte jeweils mehr als 1 Erreger von der Blutkultur nachgewiesen werden. *Tabelle 5* zeigt die Ergebnisse dieser Mischinfektionen. In der Hälfte dieser Proben ist jeweils mindestens eine Erregerspezies enthalten, die sich nicht im Panel von Biofire befindet. Bei den Erregern *Citrobacter koseri*, *Streptococcus salivarius* Gruppe, *Streptococcus mitis/oralis* war jedoch ein Nachweis des Genus möglich. *Granulicatella adiacens* und *Pseudomonas putida* Gruppe zeigten kein Ergebnis des Genus, was jedoch auf das Fehlen der jeweiligen Genera im Panel zurückzuführen ist.

Tabelle 5: Mischinfektionen			
Blutkulturergebnis	Sepsityper Ergebnis	Cube Dx Ergebnis	Biofire Ergebnis
Klebsiella oxytoca; Staphylococcus epidermidis; <i>Pseudomonas putida</i> Gruppe *	Klebsiella oxytoca	Klebsiella oxytoca; Pseudomonas aeruginosa	Staphylococcus epidermidis, Klebsiella oxytoca
<i>Citrobacter koseri</i> *; <i>Streptococcus salivarius</i> Gruppe *	unklar	Streptococcus salivarius group; <i>Citrobacter koseri</i>	Streptococcus spp., Enterobacterales
<i>Granulicatella adiacens</i> *; <i>Streptococcus mitis/oralis</i> *	Granulicatella adiacens	Granulicatella adiacens	Streptococcus spp.
Klebsiella oxytoca; Klebsiella aerogenes	Klebsiella oxytoca	Klebsiella oxytoca; Klebsiella aerogenes	Klebsiella aerogenes, Klebsiella oxytoca
Klebsiella pneumoniae; Pseudomonas aeruginosa	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae; Pseudomonas aeruginosa	Klebsiella pneumoniae group, Pseudomonas aeruginosa
Klebsiella pneumoniae; Klebsiella aerogenes	Klebsiella aerogenes; pneumoniae	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella aerogenes; Klebsiella pneumoniae group
Anm.: kursiv* Spezies nicht im Panel von Biofire			

Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Mischinfektionen

Aufgrund der geringeren Panelabdeckung zeigt Biofire bei den Mischinfektionen eine geringere Identifikationsrate. Cube Dx konnte beim Vorliegen von 2 Erregern in der Probe in 3 von 5 Fällen beide dieser Erreger korrekt identifizieren. Dies war mit Sepsityper nur in 1 von 5 Fällen möglich. In einer der 6 Proben lagen 3 Erreger vor. Sepsityper und Cube Dx identifizierten jeweils einen dieser 3 Erreger korrekt, Biofire konnte 2 dieser 3 Erreger nachweisen.

Mischinfektionen Speziesidentifikation					
Häufigkeit	Erregeranzahl	Sepsityper	Cube dx	Biofire	Biofire*
5	0 von 2	1	0	2	0
	1 von 2	3	2	0	1
	2 von 2	1	3	3	4
1	0 von 3	0	0	0	0
	1 von 3	1	1	0	0
	2 von 3	0	0	1	1
	3 von 3	0	0	0	0
* Genus					

Tabelle 6: Ergebnisse der Mischinfektionen

4.2.3 Resistenzen

Mit Biofire ist der Nachweis von 10 Resistenzgenen möglich. Innerhalb der 66 Proben, die mittels Biofire untersucht wurden, lag in 9 Proben das Resistenzgen *mecA* vor. Hier wurde ebenso ein resistentes Ergebnis des Antibiotogramms von dem Wirkstoff Oxacillin beziehungsweise Cefoxitin als positiv für das Resistenzgen *mecA* verwendet.

Biofire konnte 6 dieser 9 Fälle korrekt nachweisen, wohingegen dies bei Cube Dx nur in 4 Fällen gelang (siehe *Abbildung 16*). Hierbei ist wichtig zu erwähnen, dass Biofire das Resistenzgen nur dann anzeigt, wenn die Erregerspezies identifiziert werden konnte. Cube Dx zeigt das Resistenzgen unabhängig davon an. Da innerhalb der 66 Proben keine andere Resistenz auftrat, konnte hier kein Vergleich zur Blutkultur gezogen werden.

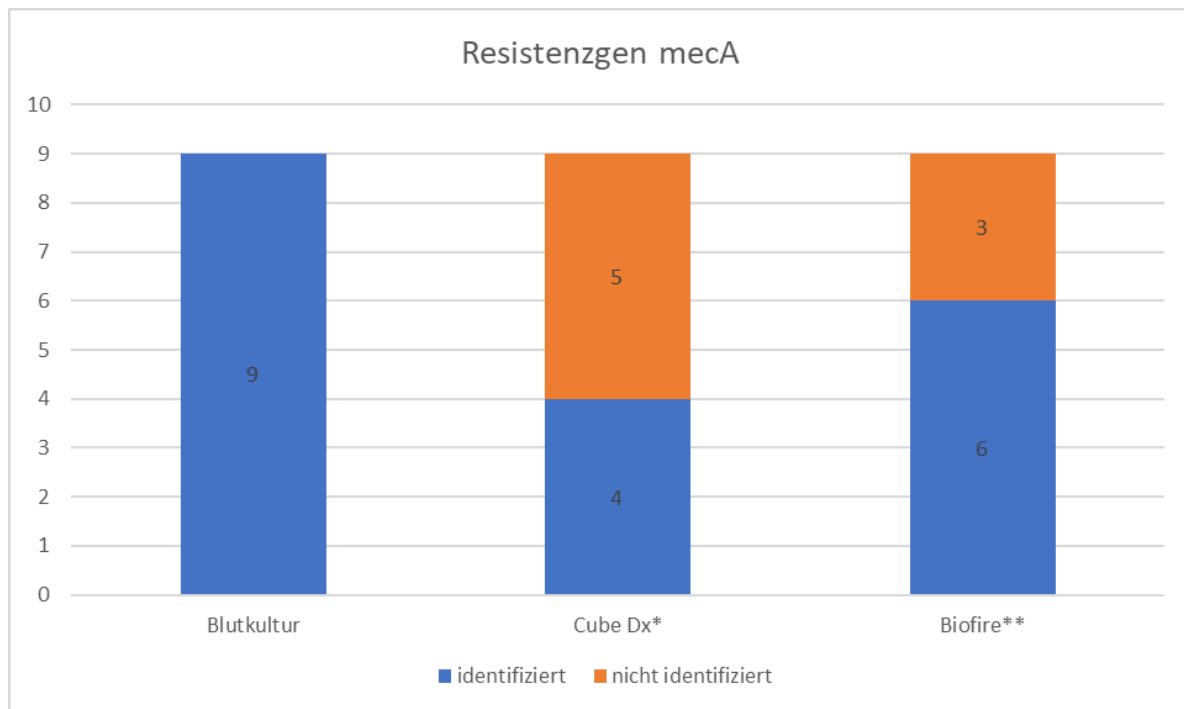


Abbildung 16: Resistenzgen *mecA*

*Cube Dx erkennt Resistenzgen unabhängig von Erreger; **Biofire erkennt Resistenzgen nur mit dem jeweiligen, im Panel enthaltenen Erreger

5 Diskussion

5.1 Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx

Die Blutkultur gilt nach wie vor als Goldstandard in der Erregerdiagnostik. Da bis zum Vorliegen der Ergebnisse oft Tage vergehen, wurden in den letzten Jahrzehnten neue Testsysteme entwickelt, um diese Zeit zu verkürzen und v.a. rasch vorläufige, jedoch meist richtungsweisende Befunde erstellen zu können. Von solchen Befunden können Patienten maßgeblich profitieren, da das Einleiten einer gezielten antimikrobiellen Therapie folglich früher erfolgen kann.^{71,60,61} Reduzierte Mortalität, bessere klinische Outcomes und eine Einsparung von Breitbandantibiotika sind positive Folgen für den Patienten.⁷²

In der vorliegenden Studie wurde ein bereits routinemäßig eingesetzter, auf Massenspektrometrie basierter Test der Firma Bruker (Sepsityper) und ein neuer PCR Test der Firma Cube Dx mit der konventionellen Blutkultur verglichen. Der PCR Test ist derzeit noch nicht routinemäßig im Einsatz. Daher ist die vorliegende Studie eine der Ersten dieser Art.

Es konnte eine Übereinstimmung der Ergebnisse der beiden Tests mit der Blutkultur in 76,16% der untersuchten Proben festgestellt werden. Cube Dx erreichte eine Identifikationsrate von 86,85% und Sepsityper von 84,93%. Wenn nur jene Proben betrachtet werden, die Erreger aus dem Cube Dx Panel enthalten, lag die Identifikationsrate von Cube Dx bei 94,91%.

Bereits durchgeführte Studien mit dem Testkit der Firma Cube Dx konnten auf herkömmlichen Datenbanken nicht gefunden werden, sondern lediglich auf der Firmenwebsite (<https://www.cubedx.com/deutsch/molekulare-mikrobiologie/testkits/>).⁷³

Eine dieser angeführten Studien, die ebenso das Extraktionskit LINA der Firma Cube Dx verwendet hat, wurde in Schweden durchgeführt. Hier haben die Autoren eine Identifikationsrate von 93% festgestellt. Diese Rate entspricht der in dieser Studie festgestellten von 94,91%, wenn nur jene Proben betrachtet werden, die Erreger aus dem Cube Dx Panel enthalten. Aus der schwedischen Arbeit geht jedoch nicht hervor, welche Erreger nachgewiesen wurden und welche letztendlich in ihre Auswertung inkludiert wurden.⁷⁴

Die in dieser Studie festgestellte Identifikationsrate des Sepsitypers lag bei 84,93% bezogen auf 365 Monoinfektionen. Werden nur die 334 Proben mit Erregern aus dem Panel von Cube Dx betrachtet, dann lag die Identifikationsrate des Sepsitypers bei 87,43%. Vorangegangene Studien berichten von Identifikationsraten von rund 74% bis zu 90%.^{75,76,77,78,79}

In der vorliegenden Studie wurde mittels Sepsityper eine bessere Identifikationsrate bei gramnegativen Bakterien (94,07%) gegenüber Grampositiver (81,22%) festgestellt. Auch in anderen Studien wird berichtet, dass gramnegative Bakterien generell sehr gut identifiziert werden können und der Nachweis grampositiver Bakterien allgemein schlechter gelingt.^{80,81,82} Laut einem von *Morgenthaler et al* verfassten Review, der Daten von 21 Reports zusammenfasst, liegt die Identifikationsrate grampositiver Bakterien durchschnittlich bei 76,1%. Wobei hier teilweise auch Identifikationsraten von bis zu 90% verzeichnet wurden. Gramnegative Bakterien zeigten Nachweisraten von über 90% jedoch auch bis zu über 95%. Die Ursache für den Unterschied bei der Identifikation grampositiver und gramnegativer Bakterien ist noch nicht geklärt. Es könnte sein, dass dieser auf die dickere Zellwand und eine dadurch reduzierte Menge extrahierter Proteine grampositiver Bakterien zurückzuführen ist.⁸³

Bei dem Nachweis grampositiver Stäbchen, wie zum Beispiel *Cutibacterium acnes* hat Cube Dx deutlich bessere Ergebnisse als der Sepsityper geliefert. Bei dieser Erregergruppe wäre der Einsatz dieser PCR Methode anstelle oder zusätzlich zum Sepsityper sinnvoll. Des Weiteren zeigte Cube Dx beim Nachweis grampositiver Kokken, vor allem der Staphylokokken, eine höhere Identifikationsrate. Hier ist jedoch zu erwähnen, dass Cube Dx nicht zwischen den einzelnen Spezies der Staphylokokken unterscheiden kann.

Mittels Cube Dx ist der Nachweis von Bakterien (56 Spezies) und Pilzen (19 Spezies) möglich.⁷³ In der vorliegenden Studie konnten mit der Blutkultur 34 dieser Spezies nachgewiesen werden. Einige der Erreger, die im Erregerspektrum von Cube Dx enthalten sind, sind in dieser Studie folglich nicht vorgekommen. Dazu zählen beispielsweise *Legionella pneumophila*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria meningitidis* oder *Aspergillus niger*. Es bleibt daher offen, ob ein Nachweis dieser Erreger, die nicht in der Studie inkludiert waren, mittels Cube Dx ebenso gelungen wäre.

11 der in dieser Studie inkludierten Erreger aus dem Cube Dx Panel, wie beispielsweise *Granulicatella adiacens* oder *Streptococcus pyogenes*, sind nur einmal vorgekommen. Hier ist somit schwierig eine Aussage zu treffen, ob diese Erreger verlässlich von den beiden Tests detektiert werden können. Die Durchführung weiterer Studien, die auch seltene Erreger in höheren Zahlen inkludieren, wäre daher sinnvoll.

Cube Dx hat bei den 410 untersuchten Proben 30 Erreger nachgewiesen, die in den jeweiligen Proben von der Blutkultur nicht detektiert werden konnten. Dazu zählt zum Beispiel *Fusobacterium nucleatum*. Eine Bakteriämie mit Erregern der Gruppe *Fusobacterium* tritt sehr selten auf, wobei die Spezies *Fusobacterium nucleatum* am häufigsten dafür verantwortlich ist.⁸⁴ Es bleibt offen, ob der Nachweis der 30 zusätzlichen Erreger auf falsch positive Ergebnisse zurückzuführen ist, da keine Nachtestungen aus diesen Proben durchgeführt wurden. Denkbar wäre, dass diese Erreger mittels Blutkultur nicht angezüchtet werden konnten, z.B aufgrund des Einflusses einer antimikrobiellen Therapie. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass nur Erreger-DNA im Blut vorhanden gewesen ist.⁶¹

In einer aus 410 Proben war der vorliegende Erreger nicht mittels Blutkultur subkultivierbar und konnte somit nicht identifiziert werden. Dieser Erreger konnte ebenso nicht mittels Sepsityper detektiert werden. Cube Dx hat hier *Cutibacterium acnes* identifiziert. Es wurde kein Identifizierungsversuch mit einer weiteren Methode bei dieser Probe vorgenommen, daher kann nicht mit Sicherheit gesagt werden, dass das Ergebnis von Cube Dx korrekt ist. Da die Gramfärbung dieser Probe grampositive Stäbchen zeigte, wäre es jedoch denkbar.

Einen klaren Vorteil bietet Cube Dx gegenüber dem Sepsityper beim Nachweis von Mischinfektionen. Hier konnte in deutlich mehr Proben jeweils mindestens 2 Erreger identifiziert werden. Es ist aus vorangegangenen Studien bekannt, dass Sepsityper bei Mischinfektionen eine schlechtere Nachweisrate hat. *Meex et al* konnten in ihrer Studie bei 6 polymikrobiellen Proben mittels Sepsityper nur je einen Erreger nachweisen.⁸⁵

Zu vergleichbaren Ergebnissen kommen *Tanner et al* und *Martinez et al*, jedoch mit einer höheren Anzahl als *Meex et al* von 32 beziehungsweise 13 Proben und einer über 75%-igen Identifikationsrate von einem Erreger.^{86,87} In der vorliegenden Studie konnte mittels Sepsityper in über 80% 1 Erreger und in knapp 8% 2 Erreger bei einer Probenanzahl von 44 identifiziert werden.

Ein weiterer Vorteil den Cube Dx gegenüber Sepsityper bietet, ist die Möglichkeit zum Nachweis von Resistenzgenen. Dies ist bei Sepsityper lediglich mit einem zusätzlichen Assay von Bruker möglich.⁸⁸ Um eine Methicillin Resistenz phänotypisch festzustellen, kann ein Agardiffusionstest zur Erstellung eines Antibigramms mit dem Wirkstoff Cefoxitin aus der Gruppe der Cephalosporine als verlässliche Methode verwendet werden,⁸⁹ wobei dieser Wirkstoff als sensitiver und spezifischer Marker gilt.^{90,91,92} Mittels Antibigramm wurde bei 100 Proben eine Resistenz Koagulase negativer Staphylokokken auf den Wirkstoff Oxacillin beziehungsweise Cefoxitin getestet. Dieses Ergebnis wurde als Methicillin-resistente (*mecA*) Koagulase negative Staphylokokken gewertet. Bei diesen 100 Proben wurde allerdings von Cube Dx nur in 82 Fällen das Resistenzgen *mecA* identifiziert. Die Sensitivität des Cube Dx für den Nachweis der Methicillin-Resistenz bei Koagulase negativen Staphylokokken betrug also 82%.

Weitere Resistenzgene, die von Cube Dx nachgewiesen werden können sind *mecC*, *vanA*, *vanB* und Extended Spektrum Betalaktamasen und Carbapenemasen (*CTX-M1/M3*, *IMP*, *KPC*, *NDM* und *OXA-48*).⁷³ In der vorliegenden Studie wurden lediglich *CTX-M1/3* und *OXA-48* mittels LAMP identifiziert. Somit bleibt offen, welche Nachweisrate Cube Dx bei den verbleibenden Resistenzgenen aufweisen würde. Da *CTX-M1* und *OXA-48* lediglich in 3 beziehungsweise 1 Probe auftraten, sind die Ergebnisse hier nicht sehr aussagekräftig. Ein Vorteil von Cube Dx ist, dass Resistenzgene nachgewiesen werden können, ohne dass der Erreger identifiziert werden muss. Somit kann diesbezüglich bereits eine erste Aussage bezüglich der anstehenden Therapie des Patienten getroffen werden, auch wenn eine Erregeridentifizierung nicht geglückt ist.

Wie bereits erwähnt, ist eine möglichst rasche Erregeridentifizierung für die Therapieeinleitung beim Patienten essenziell. Beide Tests, sowohl Sepsityper als auch Cube Dx zeigen hier gegenüber der konventionellen Blutkultur einen eindeutigen Zeitgewinn von mehr als 12 Stunden. Die Durchführung des Sepsitypers nahm je nach Probenanzahl bis zu 30 Minuten Zeit in Anspruch und ist damit kürzer als bei Cube Dx. Hier wird mit ungefähr 2 Stunden gerechnet. Cube Dx hat jedoch eine kürzere „Hands-on time“. Des Weiteren ist die Extraktion der Blutprobe mit dem Sepsityper Kit aufwendiger als bei Cube Dx und erfordert ein gut trainiertes und geschultes Personal. Dadurch kann es zu personenbezogenen

Schwankungen der Ergebnisse kommen. Somit hat Sepsityper gegenüber Cube Dx einen Zeitvorteil, ist jedoch etwas komplexer in der Durchführung.

5.2 Blutkultur – Sepsityper – Cube Dx – Biofire

BioFire® Blood Culture Identification 2 (BCID2) Panel ist ein von der FDA zugelassener Diagnostiktest mit dem Prinzip einer Nested – Multiplex PCR. Mit diesem Test ist der Nachweis von 33 Erregern und 10 Resistenzgenen möglich.⁷⁰

Eine Testung mittels Biofire wurde im Zuge der vorliegenden Studie an 66 Proben durchgeführt, die ebenso mit Sepsityper und Cube Dx getestet wurden. Die Ergebnisse wurden ebenso wieder mit dem Goldstandard, der Blutkultur verglichen. Insgesamt wurde eine Übereinstimmung aller 3 Tests mit der Blutkultur bei Monoinfektionen von 70% Prozent erreicht. Sepsityper erreichte 93,33% und Cube Dx 88,33%. Biofire zeigte eine Identifikationsrate von 81,67% und schnitt damit schlechter ab als die beiden anderen Tests. Diese Zahl zeigt zugleich auch die Abdeckung des Panels von Biofire. Alle nicht identifizierten Erregerspezies sind darauf zurückzuführen, dass diese nicht im Panel inkludiert waren.

Wenn nur die Proben mit Erregern aus dem Panel von Biofire betrachtet werden, erreichte dieser Test eine Nachweisrate von 100% Prozent und liegt damit höher als Cube Dx (89,80%) und Sepsityper (95,92%). *Berinson et al* stellten in ihrer Studie eine Identifikationsrate von 93,96% innerhalb monomikrobieller „on-Panel“ Proben fest. Diskrepante Ergebnisse des Biofires waren in dieser Studie auf einen falsch positiven Nachweis Koagulase negativer Staphylokokken oder einer Misidentifikation mit diesen Erregern zurückzuführen.⁹³

Da in ihrer Studie eine höhere Anzahl von Proben (n=149) verglichen zur vorliegenden Studie (n=60) inkludiert war, ist die Differenz der ermittelten Identifikationsraten möglicherweise darauf zurückzuführen. *Claeys et al*, *Graff et al* und *Sparks et al* stellten über 96% bis 100% korrekt identifizierte Erreger bei Monoinfektionen fest.^{94,95,96}

Innerhalb der 60 Proben der Monoinfektionen wurden 23 verschiedene Erregerspezies von der Blutkultur nachgewiesen. Das Panel von Biofire hat 65,22% der Erregerspezies abgedeckt und das von Cube Dx 91,30%. Hier ist zu erwähnen, dass bereits vorab eine Selektion der Proben durchgeführt wurde. Es kann somit trotz dieser Vorab-Selektion festgestellt werden,

dass das Panel von Cube Dx den Großteil der vorkommenden Erreger besser abdeckt als das von Biofire. Einige Erreger, die Biofire detektieren kann, sind in dieser Studie nicht vorgekommen. Hier bleibt, wie schon bei Cube Dx in 5.1 offen, ob Biofire auch den Nachweis dieser Erreger erbringen könnte. Das wäre beispielsweise bei *Neisseria meningitidis* oder *Listeria monocytogenes* der Fall.

Mischinfektionen lagen bei 6 Proben vor. Hier konnte mittels Biofire jeweils mehr als 1 Erreger korrekt nachgewiesen werden. Da jedoch einige der vorkommenden Erreger nicht im Panel enthalten sind, war hier nur der Nachweis der jeweiligen Genera möglich, was jedoch gelang. Ein Vergleich des Biofire und Cube Dx bei diesen 6 Proben ist schwierig, da Cube Dx ein umfangreicheres Panel zur Verfügung stellt. Des Weiteren ist ein Anteil von 6 Proben eine geringe Probenanzahl. In einer Studie aus 2021 wurde bei einer Anzahl von 15 Proben von ähnlichen Ergebnissen berichtet. Hier konnte Biofire ebenso alle „on-Panel“ Spezies korrekt identifizieren und die verbleibenden jeweils als Genus.⁹⁷

Ebenso wie auch Cube Dx ist es mit Biofire möglich, Resistenzgene nachzuweisen. Biofire hat 10 Resistenzgene im Panel und Cube Dx 9. Innerhalb der 66 in der Studie inkludierten Proben konnten lediglich Methicillin-resistente Koagulase negative Staphylokokken, jedoch keine anderen resistenten Erreger nachgewiesen werden. Als Vergleichsmethode galt hier wieder ein Antibiotogramm, dass eine Resistenz bei den Wirkstoffen Oxacillin beziehungsweise Cefoxitin zeigte. Dies war bei 9 Proben der Fall. Hier hat Biofire in 6 und Cube Dx in 4 Fällen das Resistenzgen *mecA* nachgewiesen. Bei 3 der 9 Proben hat Biofire das Resistenzgen nicht angezeigt. Dies ist darauf zurückzuführen, dass der Test hier die Erregerspezies (*Staphylococcus haemolyticus* oder *Staphylococcus hominis*) nicht erkannt hat, da diese nicht im Panel vorkam. Da Biofire das Resistenzgen nicht anzeigt, wenn nicht gleichzeitig der Erreger erkannt wird, ist diese Tatsache wahrscheinlich die Ursache, warum kein Resistenzgen gefunden wurde.

Da die weiteren Resistenzgene in den untersuchten Proben nicht vorgekommen sind, bleibt unklar, wie der Test diesbezüglich abgeschnitten hätte. Aus vorangegangenen Studien ist jedoch bekannt, dass Biofire hier ebenso sehr gute Ergebnisse erzielen kann.^{97,98}

Mittels Biofire dauert es ungefähr eine Stunde, bis das Ergebnis vorliegt. Die „Hands-on time“ ist hier sehr kurz mit einer Dauer von nur zirka 5 Minuten und sehr einfacher Durchführung.

Personenabhängige Schwankungen sind unwahrscheinlich. Somit liegt der Test von der Durchführungszeit zwischen der des Sepsityper (zirka 30 Minuten) und Cube Dx (zirka 2 Stunden).

6 Conclusio

Erreger in der Blutbahn können zahlreiche Komplikationen hervorrufen und im schlimmsten Fall in einer Sepsis resultieren. Die schnelle Identifizierung dieser pathogenen Erreger und ihrer Resistenzmechanismen ist daher von großer Bedeutung. Die konventionelle Blutkultur ist zwar sehr zeitintensiv, gilt jedoch nach wie vor als der Goldstandard in der Erregerdiagnostik. Mit der Entwicklung molekularer Testsysteme wurde es möglich, in Bezug auf die Identifizierung des Erregers und den Nachweis wichtiger Resistenzmarker, eine Zeitersparnis zu erreichen, die den Krankheitsverlauf des Patienten positiv beeinflusst. Der Therapiebeginn kann damit gezielt und rasch erfolgen.^{60,61}

In dieser Arbeit wurde die Massenspektrometrie (Sepsityper) und zwei PCR Methoden (Cube Dx und Biofire) zum Erregernachweis direkt aus positiven Blutkulturproben miteinander verglichen. Alle 3 Tests zeigen bei den Monoinfektionen hohe Identifikationsrate von über 80% verglichen zur Blutkultur. Abhängig von der Erregergruppe und dem jeweiligen Test haben diese Raten differiert. Bei den Mischinfektionen haben die beiden PCR Methoden, Cube Dx und Biofire, bessere Ergebnisse als der Sepsityper beim Nachweis von mehr als einem Erreger je Probe erzielt. Einen weiteren Vorteil bieten die beiden PCR Methoden auch im Nachweis von Resistenzgenen. Diesbezüglich sind noch weitere Untersuchungen aufgrund einer geringen Anzahl und Varietät resistenter Erreger in dieser Studie notwendig. Der Sepsityper ermöglicht von den 3 Tests mit einer Durchführungsdauer von rund 30 Minuten am schnellsten einen Erregernachweis.

Aufgrund ihrer verschiedenen Vorteile kann in den individuellen Fällen mit einem gezielten Einsatz der jeweiligen Tests ein klarer Nutzen für den Patienten erreicht werden. Die 3 Diagnostikmethoden sind somit als hilfreiche Ergänzung zur konventionellen Blutkultur anzusehen.

7 Literaturverzeichnis

1. Huerta, L. E. & Rice, T. W. Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections. *J. Appl. Lab. Med.* **3**, 654–663 (2019).
2. Hagel, S., Pletz, M. W., Brunkhorst, F. M., Seifert, H. & Kern, W. V. Bakteriämie und Sepsis. *Internist* **54**, 399–407 (2013).
3. Laupland, K. B., Pasquill, K., Steele, L. & Parfitt, E. C. Burden of bloodstream infection in older persons: a population-based study. *BMC Geriatr.* **21**, 31 (2021).
4. Singer, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **315**, 801–810 (2016).
5. Chousterman, B. G., Swirski, F. K. & Weber, G. F. Cytokine storm and sepsis disease pathogenesis. *Semin. Immunopathol.* **39**, 517–528 (2017).
6. Fujishima, S. Organ dysfunction as a new standard for defining sepsis. *Inflamm. Regen.* **36**, 24 (2016).
7. Hotchkiss, R. S. *et al.* Sepsis and septic shock. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2**, 16045–16045 (2016).
8. Seymour, C. W. *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 762–774 (2016).
9. Singer, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* **315**, 801–810 (2016).
10. Shankar-Hari, M. *et al.* 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) Original Investigation | CARING FOR THE CRITICALLY ILL PATIENT. *JAMA* **315**, 775–787 (2016).
11. Fleischmann, C. *et al.* Fallzahlen und Sterblichkeitsraten von Sepsis-patienten im Krankenhaus. *Dtsch. Arztebl. Int.* **113**, 159–166 (2016).

12. Bhatt, P. J. *et al.* Risk Factors and Outcomes of Hospitalized Patients with Severe Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) and Secondary Bloodstream Infections: A Multicenter Case-Control Study. *Clin. Infect. Dis.* **72**, E995–E1003 (2021).
13. Wintermann, G. B. *et al.* Stress Disorders Following Prolonged Critical Illness in Survivors of Severe Sepsis. *Crit. Care Med.* **43**, 1213–1222 (2015).
14. Iwashyna, T. J., Ely, E. W., Smith, D. M. & Langa, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **304**, 1787–1794 (2010).
15. Prescott, H. C., Osterholzer, J. J., Langa, K. M., Angus, D. C. & Iwashyna, T. J. Late mortality after sepsis: Propensity matched cohort study. *BMJ* **353**, i2375 (2016).
16. Fleischmann, C. *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **193**, 259–272 (2016).
17. Rudd, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet* **395**, 200–211 (2020).
18. Markwart, R. *et al.* Epidemiology and burden of sepsis acquired in hospitals and intensive care units: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Med.* **46**, 1536–1551 (2020).
19. Wenn Infektionen eskalieren: Unterschätzter Notfall Sepsis | ÖGARI - Österreichische Gesellschaft für Anästhesiologie, Reanimation und Intensivmedizin, 10.09.2020. https://www.ots.at/presseaussendung/OTS_20200910_OTS0156/wenn-infektionen-eskalieren-unterschaetzter-notfall-sepsis.
20. Kayser, F. H., Böttger, E. C., Deplazes, P. & Haller, O. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. (Georg Thieme Verlag KG, 2013). doi:10.1055/b-002-98020.
21. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014).
22. Le, K. Y., Park, M. D. & Otto, M. Immune evasion mechanisms of Staphylococcus epidermidis biofilm infection. *Front. Microbiol.* **9**, 359 (2018).

23. Argemi, X. *et al.* Comparative genomic analysis of *Staphylococcus lugdunensis* shows a closed pan-genome and multiple barriers to horizontal gene transfer. *BMC Genomics* **19**, 621 (2018).
24. Cheung, G. Y. C., Bae, J. S. & Otto, M. Pathogenicity and virulence of *Staphylococcus aureus*. *Virulence* **12**, 547–569 (2021).
25. Suerbaum, S., Burchard, G. D., Kaufmann, S. H. E. & Schulz, T. F. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. (Springer Berlin, Heidelberg, 2016). doi:10.1007/978-3-662-48678-8.
26. Kadosh, D. & Mundodi, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. *J. Fungi* **6**, 16–18 (2020).
27. Kotey, F. C., Dayie, N. T., Tetteh-Uarcoo, P. B. & Donkor, E. S. *Candida* Bloodstream Infections: Changes in Epidemiology and Increase in Drug Resistance. *Infect. Dis. Res. Treat.* **14**, 1–5 (2021).
28. Murray, C. J. *et al.* Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
29. Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M. & Strydom, K. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, e00102-19 (2019).
30. Cantón, R., González-Alba, J. M. & Galán, J. C. CTX-M enzymes: Origin and diffusion. *Front. Microbiol.* **3**, 110 (2012).
31. Algammal, A. M. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): One health perspective approach to the bacterium epidemiology, virulence factors, antibiotic-resistance, and zoonotic impact. *Infect. Drug Resist.* **13**, 3255–3265 (2020).
32. Miragaia, M. Factors contributing to the evolution of *mecA*-mediated β -lactam resistance in staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS). *Front. Microbiol.* **9**, 2723 (2018).
33. Niederman, M. S. *et al.* Initial antimicrobial management of sepsis. *Crit. Care* **25**, 307 (2021).

34. Weinberger, J., Rhee, C. & Klompas, M. A critical analysis of the literature on time-to-antibiotics in suspected sepsis. *J. Infect. Dis.* **222**, S110–S118 (2020).
35. Fuchs, A., Pletz, M. W. & Kaasch, A. J. Diagnosis of sepsis and empirical treatment in the emergency department. *Notfall und Rettungsmedizin* **22**, 198–204 (2019).
36. Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med.* **43**, 304–377 (2017).
37. Gauer, R., Forbes, D. & Boyer, N. Sepsis: Diagnosis and Management. *Am. Fam. Physician* **101**, 409–418 (2020).
38. Perner, A. *et al.* Sepsis: frontiers in diagnosis, resuscitation and antibiotic therapy. *Intensive Care Med.* **42**, 1958–1969 (2016).
39. Strich, J. R., Heil, E. L. & Masur, H. Considerations for empiric antimicrobial therapy in sepsis and septic shock in an era of antimicrobial resistance. *J. Infect. Dis.* **222**, S119–S131 (2020).
40. Yuk, S. A., Sanchez-Rodriguez, D. A., Tsifansky, M. D. & Yeo, Y. Recent advances in nanomedicine for sepsis treatment. *Ther. Deliv.* **9**, 435–450 (2018).
41. Bloos, F. & Reinhart, K. Rapid diagnosis of sepsis. *Virulence* **5**, 154–160 (2014).
42. The Nobel Prize in Chemistry 1993 - NobelPrize. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/1993/summary/>.
43. Werner Müller-Esterl. *Biochemie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2018). doi:10.1007/978-3-662-54851-6.
44. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Biotechnology* **11**, 1026–1030 (1993).
45. Kralik, P. & Ricchi, M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front. Microbiol.* **8**, 108 (2017).
46. Zhang, H., Gaňova, M., Yan, Z. Q., Chang, H. & Neuzil, P. PCR multiplexing based on a single fluorescent channel using dynamic melting curve analysis. *ACS Omega* **5**, 30267–30273 (2020).

47. Galindo-murillo, R. & Cheatham, T. E. Ethidium bromide interactions with DNA : an exploration of a classic DNA – ligand complex with unbiased molecular dynamics simulations. *Nucleic Acids Res.* **49**, 3735–3747 (2021).
48. Fluorescence-resonance-energy-transfer.
https://www.chemie.de/lexikon/Fluorescence_resonance_energy_transfer.html.
49. Holzapfel, B. & Wickert, L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit* **37**, 120–126 (2007).
50. Tyagi, S. & Kramer, F. R. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nat. Publ. Gr.* **14**, 303–308 (1996).
51. Kreuzer, K. A., Lass, U., Bohn, A., Landt, O. & Schmidt, C. A. Lightcycler technology for the quantitation of bcr/abl fusion transcripts. *Cancer Res.* **59**, 3171–3174 (1999).
52. Schmidt, O. *Genetik und Molekularbiologie*. (Springer Berlin Heidelberg, 2017). doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-662-50274-7>.
53. Gressner, A. M. & Arndt, T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. (Springer Berlin, Heidelberg, 2019). doi:<https://doi.org/10.1007/978-3-662-48986-4>.
54. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: An emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **6**, 791 (2015).
55. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser Desorption Ionization of Proteins with Molecular Masses Exceeding 10 000 Daltons. *Anal. Chem.* **60**, 2299–2301 (1988).
56. Yates, J. R. Mass spectrometry and the age of the proteome. *J. Mass Spectrom.* **33**, 1–19 (1998).
57. Patel, R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. *Clin. Chem.* **61**, 100–111 (2015).
58. Seng, P. *et al.* Ongoing revolution in bacteriology: Routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin. Infect. Dis.* **49**, 543–551 (2009).

59. Idelevich, E. A. *et al.* Microbiological diagnostics of bloodstream infections in Europe—an ESGBIES survey. *Clin. Microbiol. Infect.* **25**, 1399–1407 (2019).
60. Kumar, A. Early antimicrobial therapy in severe sepsis and septic shock. *Curr. Infect. Dis. Rep.* **12**, 336–344 (2010).
61. Afshari, A., Schrenzel, J., Ieven, M. & Harbarth, S. Bench-to-bedside review: Rapid molecular diagnostics for bloodstream infection-a new frontier? *Crit. Care* **16**, 222 (2012).
62. BACT/ALERT 3D Microbial Detection Systems Overview - clinical diagnostics products | bioMérieux Clinical Diagnostics. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/bact-alert-3d-microbial-detection-systems-overview>.
63. Neumeister, B., Geiss, H. K., Braun, R. W. & Kimmig, P. *Mikrobiologische Diagnostik: Bakteriologie - Mykologie - Virologie - Parasitologie*. (Thieme Verlagsgruppe, 2009). doi:10.1055/b-002-19462.
64. Microbial Identification | Bruker. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification.html>.
65. Schubert, S. *et al.* Novel, improved sample preparation for rapid, direct identification from positive blood cultures using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *J. Mol. Diagnostics* **13**, 701–706 (2011).
66. Wanger, A. *et al.* *Microbiology and molecular diagnosis in pathology : a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice*. (Elsevier, 2017). doi:10.1016/b978-0-12-805351-5.00005-3.
67. Heatley, N. G. A method for the assay of penicillin. *Biochem. J.* **38**, 61–65 (1944).
68. AmplexDiagnostics GmbH Home - Because we care! <https://www.eazyplex.com/>.
69. Cube Dx hybCell technology. <https://www.cubedx.com/deutsch/produkte/>.
70. BIOFIRE® BCID2 | bioMérieux Deutschland. <https://www.biomerieux.de/klinische-diagnostik/biofirer-bcid2>.
71. Kumar, A. *et al.* The duration of hypotension before the initiation of antibiotic

- treatment is a critical determinant of survival in a murine model of *Escherichia coli* septic shock: Association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. *J. Infect. Dis.* **193**, 251–258 (2006).
72. Rhodes, A. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Crit. Care Med.* **45**, 486–552 (2017).
 73. Testkits - Cube Dx. <https://www.cubedx.com/deutsch/molekulare-mikrobiologie/testkits/>.
 74. Brachner, A., Marki, L., Enroth, H. & Ronacher, B. Molecular pathogen identification and resistance gene detection from positive blood cultures. <https://www.cubedx.com/deutsch/molekulare-mikrobiologie/testkits/> (2020).
 75. Di Gaudio, F. *et al.* Improvement of a rapid direct blood culture microbial identification protocol using MALDI-TOF MS and performance comparison with Sepsityper kit. *J. Microbiol. Methods* **155**, 1–7 (2018).
 76. Zhou, M. *et al.* An improved in-house MALDI-TOF MS protocol for direct cost-effective identification of pathogens from blood cultures. *Front. Microbiol.* **8**, 1824 (2017).
 77. Lagacé-Wiens, P. R. S. *et al.* Identification of blood culture isolates directly from positive blood cultures by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and a commercial extraction system: Analysis of performance, cost, and turnaround time. *J. Clin. Microbiol.* **50**, 3324–3328 (2012).
 78. Loonen, A. J. M., Jansz, A. R., Stalpers, J., Wolffs, P. F. G. & Van Den Brule, A. J. C. An evaluation of three processing methods and the effect of reduced culture times for faster direct identification of pathogens from BacT/ALERT blood cultures by MALDI-TOF MS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 1575–1583 (2012).
 79. Ponderand, L. *et al.* Evaluation of Rapid Sepsityper® protocol and specific MBT-Sepsityper module (Bruker Daltonics) for the rapid diagnosis of bacteremia and fungemia by MALDI-TOF-MS. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **19**, 60 (2020).
 80. Arroyo, M. A. & Denys, G. A. Parallel evaluation of the MALDI sepsityper and verigene BC-GN assays for rapid identification of Gram-negative bacilli from positive blood

- cultures. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 2708–2718 (2017).
81. Chen, J. H. K. *et al.* Direct bacterial identification in positive blood cultures by use of two commercial matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems. *J. Clin. Microbiol.* **51**, 1733–1739 (2013).
 82. Juiz, P. M. *et al.* A comparative study of two different methods of sample preparation for positive blood cultures for the rapid identification of bacteria using MALDI-TOF MS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**, 1353–1358 (2012).
 83. Morgenthaler, N. G. & Kostrzewa, M. Rapid identification of pathogens in positive blood culture of patients with sepsis: Review and meta-analysis of the performance of the Sepsityper kit. *Int. J. Microbiol.* **2015**, 827416 (2015).
 84. Afra, K., Laupland, K., Leal, J., Lloyd, T. & Gregson, D. Incidence, risk factors, and outcomes of *Fusobacterium* species bacteremia. *BMC Infect. Dis.* **13**, 264 (2013).
 85. Meex, C. *et al.* Direct identification of bacteria from BacT/ALERT anaerobic positive blood cultures by MALDI-TOF MS: MALDI Sepsityper kit versus an in-house saponin method for bacterial extraction. *J. Med. Microbiol.* **61**, 1511–1516 (2012).
 86. Tanner, H., Evans, J. T., Gossain, S. & Hussain, A. Evaluation of three sample preparation methods for the direct identification of bacteria in positive blood cultures by MALDI-TOF. *BMC Res. Notes* **10**, 48 (2017).
 87. Martinez, R. M., Bauerle, E. R., Fang, F. C. & Butler-Wu, S. M. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 2521–2529 (2014).
 88. MBT Sepsityper® IVD Kit. <https://www.bruker.com/en/products-and-solutions/microbiology-and-diagnostics/microbial-identification-for-clinical-laboratories-ivd-ce/mbt-sepsityper-ivd-kit.html>.
 89. Becker, K., Heilmann, C. & Peters, G. Coagulase-negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 870–926 (2014).
 90. Bonjean, M. *et al.* Disk diffusion testing for detection of methicillin-resistant staphylococci: Does moxalactam improve upon cefoxitin? *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2905–

2909 (2016).

91. Secchi, C., Souza Antunes, A. L., Rodrigues Perez, L. R., Cantarelli, V. V. & d'Azevedo, P. A. Identification and detection of methicillin resistance in non-*Epidermidis* coagulase-negative staphylococci. *Brazilian J. Infect. Dis.* **12**, 316–320 (2008).
92. Shrestha, L. B., Bhattarai, N. R., Rai, K. & Khanal, B. Antibiotic resistance and *mecA* gene characterization of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical samples in Nepal. *Infect. Drug Resist.* **13**, 3163–3169 (2020).
93. Berinson, B. *et al.* Usefulness of biofire filmarray bcid2 for blood culture processing in clinical practice. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e0054321 (2021).
94. Claeys, K. C. *et al.* Day at the Races: Comparing BioFire FilmArray Blood Culture ID Panels With Verigene Blood Culture Panel in Gram-Negative Bloodstream Infections Using DOOR-MAT Analysis. *Clin. Infect. Dis.* **73**, 1103–1106 (2021).
95. Graff, K. E. *et al.* Clinical Impact of the Expanded BioFire Blood Culture Identification 2 Panel in a U.S. Children's Hospital. *Microbiol. Spectr.* **9**, e00429-21 (2021).
96. Sparks, R., Balgahom, R., Janto, C., Polkinghorne, A. & Branley, J. Evaluation of the BioFire Blood Culture Identification 2 panel and impact on patient management and antimicrobial stewardship. *Pathology* **53**, 889–895 (2021).
97. Sze, D. T. T., Lau, C. C. Y., Chan, T. M., Ma, E. S. K. & Tang, B. S. F. Comparison of novel rapid diagnostic of blood culture identification and antimicrobial susceptibility testing by Accelerate Pheno system and BioFire FilmArray Blood Culture Identification and BioFire FilmArray Blood Culture Identification 2 panels. *BMC Microbiol.* **21**, 350 (2021).
98. Cortazzo, V. *et al.* Comparing BioFire FilmArray BCID2 and BCID panels for direct detection of bacterial pathogens and antimicrobial resistance genes from positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* **59**, e03163-20 (2021).