

Aus dem Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Jonathan Jantsch

**Evaluation von  
Antibiotikaempfindlichkeitstestungen bei  
gramnegativen Blutstrominfektionen (BSI)  
respektive Sepsis**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Alexander Krüger  
aus Leverkusen

promoviert am 29. Januar 2025

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
2025

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink  
1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. Nathalie Jazmati  
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. Nat. C. M. Ernst

#### Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Frau Privatdozentin Dr. med. Nathalie Jazmati  
Frau Dr. rer. nat. Babara Körber-Irrgang  
Frau Dr. med. Greta Flüh

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Der dieser Arbeit zugrunde liegenden Datensatz wurde im Labor Dr. Wisplinghoff in Köln von mir selbst Herrn Alexander Krüger erstellt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse wurden im Labor Dr. Wisplinghoff durch mich selbst Herrn Alexander ermittelt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau Privatdozentin Dr. med. Nathalie Jazmati und Frau Dr. med Greta Flüh von mir selbst ausgeführt worden.

#### Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.06.2024

Unterschrift:

## **Danksagung**

Ich bedanke mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. med. Nathalie Jazmati für das Vertrauen und das Überlassen des Dissertationsthemas sowie die Unterstützung bei jeglichen Fragen.

Ebenso Bedanke ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Babara Körber-Irrgang und Frau Dr. med. Gerta Flüh, die mir bei Fragen bezüglich der Umsetzung mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein Dank gilt ebenso meiner Familie und Freunden die mich stets in meinem Vorhaben motivierten und unterstützten.

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>7</b>
<b>2. EINLEITUNG</b>	<b>9</b>
2.1 Blutstrominfektion, Sepsis und septischer Schock	9
2.1.1. Klinische Relevanz und Epidemiologie der Sepsis	9
2.1.2. Ursachen und Folgen der Sepsis	10
2.2 Diagnostik von Blutstrominfektionen und Sepsis	11
2.2.1. Gramnegative Pathogene und deren Detektion	12
2.2.2. Die klassischen Labordiagnostiken bei Verdacht auf BSI (Blutkulturbebrütung, Gramfärbung, Resistenztestung und Erregeridentifikation)	13
2.2.2.1. Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI-TOF) zur Erregeridentifizierung	14
2.2.2.2. Mikrodilutionsverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)	15
2.2.2.3. Disk-Diffusionsmethode und daraus entwickelte „rapid AST“ nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)	18
2.2.2.4. Epsilometer-Test („E-Test)	20
2.2.3. Neue Methoden der Labordiagnostik bei Blutstrominfektionen (BSI)	21
2.2.3.1. 4 Stunden DxM Micro Scan WalkAway® (Beckman Coulter, Brea, CA, US ) zur bakteriellen Antibiotikaempfindlichkeitstestung	22
2.2.3.2. Reveal AST – Direkte Antibiotikaempfindlichkeitstestung aus positiven Blutkulturflaschen	22
2.2.3.3. Matrix-Assentierte-Laser-Desorptions-Ionisierung als weitere Möglichkeit der Antibiotikaresistenztestung	24
2.2.3.4. Weitere Verfahren zur schnellen Antibiotikaresistenztestung – Ein Überblick	24
2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit	25
<b>3. PUBLIKATIONEN</b>	<b>27</b>

<b>3.1</b>	<b>Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Using The MicroScan System: Performance Evaluation of a 4-Hour Bacterial Cultivation From Positive Blood Cultures im Journal of Current Microbiology</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Performance evaluation of the Specific Reveal system for rapid antibiotic susceptibility testing from positiv blood cultures containing Gram-negative pathogens</b>	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>57</b>
<b>4.1</b>	<b>Probenkollektiv</b>	<b>57</b>
<b>4.2</b>	<b>4 Stunden WalkAway versus Standarddiagnostik – Ist eine Zeitreduktion möglich und sinnvoll?</b>	<b>58</b>
<b>4.3</b>	<b>Reveal-AST aus der positiven Blutkultur versus Standarddiagnostik – ist eine Zeitreduktion möglich und sinnvoll?</b>	<b>60</b>
<b>4.4</b>	<b>Einfluss und Impact mikrobiologischer Diagnostik auf die klinische antimikrobielle Therapie</b>	<b>63</b>
<b>4.5</b>	<b>Limitationen</b>	<b>64</b>
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>65</b>
<b>5.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>66</b>
<b>6.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>73</b>
<b>6.1</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>73</b>
<b>7.</b>	<b>VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN</b>	<b>74</b>
<b>7.1</b>	<b>Testing using automated broth microdilution: performance evaluation of a four-hours bacterial cultivation from positive blood cultures presented at the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases</b>	<b>74</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A. baumannii	Acinetobacter baumannii
Abb	Abbildung
AST	Antibiotikaempfindlichkeitstestung
ATBT	Antibiotikatestung
BK	Blutkultur
BMD	Bouillion-Mikrodilution
BSI	Blutstrominfektion
CA	Categorical Agreement
C. coseri	Citerobacter coseri
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
E. cloacae	Enterobacter cloacae
E. coli	Escherichia coli
EA	Essential Agreement
EMA	Europäischen Arzneimittelagentur
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ -lactamase
ESCMID	European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
HCCA	$\alpha$ -cyano-4-Hydroxycimtsäure
K. oxytoca	Klebsiella oxytoca
K. pneumoniae	Klebsiella pneumoniae
MALDI-TOF	Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung Time of flight
MHK	Minimale Hemmkonzentration
mmHG	Millimeter Quecksilbersäule
MRSA	Methicillin resistenter Staphylokokkus aureus
MSSA	Methicillin sensibler Staphylokokkus aureus
MRE	Multiresistenter Erreger
sATBT	Schnelle Antibiotikatestung
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
TTP	Time to positivity
TTR	Time to result
VRE	Vancomycin resistenter Enterokokkus

# 1. Zusammenfassung

**Einleitung:** Blutstrominfektionen (BSI) respektive Septitiden stellen ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar und bedürfen einer schnellen sowie adäquaten Therapie. Seit Jahren konnte die Letalität der Sepsis nicht verbessert werden. Jedoch hängt die Letalität maßgeblich von einer schnellen eingeleiteten und wirksamen antiinfektiven Therapie ab. Die empirische antimikrobielle Therapie wird durch die zunehmende Prävalenz multiresistenter Erreger (MREs) eingeschränkt. Daher werden schnellere Methoden zur Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber antimikrobiellen Substanzen benötigt, um schnelle und zuverlässige Ergebnisse zu erhalten und anschließend die adäquate Verabreichung von Antibiotika zu initiieren.

Eine neue Möglichkeit der schnellen Antibiotikatestung (sATBT) stellt die Testung mittels des im Jahr 2022 entwickeltem Reveal AST Testsystem dar. Das Reveal AST Testsystem reagiert nicht auf optisch Veränderungen, wie es bei den Mikrodilutionsmethoden der Fall ist, sondern detektiert volatile Emissionen aus dem mikrobakteriellen Stoffwechsel. Durch den Vergleich mit der Positivkontrolle, welche kein Antibiotikum enthält, kann die minimale Hemmkonzentration (MHK) maschinell ermittelt werden. Eine andere Möglichkeit ist es bereits etablierte automatisierte Testsysteme zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit (z.B. DxM Microscan WalkAway) zu beschleunigen, indem verkürzte Inkubationszeiten verwendet werden. Das Testsystem des DxM Mikroscan WalkAway von bioMérieux, ist eine Mikrodilutionsmethode zur Testung von Antibiotikaempfindlichkeiten. Beides wurde im Rahmen der Arbeit untersucht.

**Fragestellung:** Ziel dieser Studie war es, zu untersuchen, ob Methoden zur sATBT im Vergleich zu aktuellen Standardmethoden in der Antibiotikatestung (ATBT) vergleichbare Leistungseigenschaften haben und demnach in der Routine reliabel eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollen dazu das neue Reveal AST System und eine reduzierte Bebrütungszeit von Subkulturen (von 20 Stunden auf 4 Stunden), die zur ATBT mit dem etablierten DxM Microscan Walkaway eingesetzt werden, untersucht werden.

**Methodik:** Über 100 Isolate von gramnegativen Bakterien aus positiven Blutkulturen (BKs) wurden mit dem Reveal AST System sowie dem DxM Microscan in Kombination mit einer verkürzten Bebrütung (4-Stunden Walky) im Vergleich zur Standard ATBT mittels DxM Microscan von 20 Stunden alten Subkulturen untersucht. Berechnet wurden jeweils das essential Agreement (EA), das categorical Agreement (CA) sowie die Fehlerraten in der Interpretation (minor error (mE), major Error (mE) und very major error (VME). Der Einfluss des BK-Flaschentyps (aerob, anaerob), der Zellzahl in der BK-Flasche, der Spezies, des getesteten Antibiotikums und der Zeit bis zur Positivmeldung der BK-Flasche (TTP) auf das Auftreten von Fehlern in der sATBT beider untersuchten Verfahren wurde berechnet.

**Ergebnisse:** Im Vergleich zur Standard ATBT zeigten sowohl das Reveal AST Testsystem und auch die 4-Stunden DxM Microscan Variante ein sehr hohes CA und EA im Vergleich zur Standard ATBT (EA/CA<sub>4-Stunden</sub> 98,6%/97,1%, EA/CA<sub>Reveal</sub> 98,5%/97,1%). Dabei traten die meisten very major errors (VME) bei der Testung von Aminoglykosiden und von  $\beta$ -lactam Antibiotika auf, welche um den EUCAST S/R Umschlagspunkt lagen. In der 4-Stunden MicroScan WalkAway Studie stellt sich heraus, dass eine längere Zeit zur Positivmeldung der BK mit einer größeren VME-Rate verbunden ist (OR 1,047 (95% CI 1,004 - 1,092, p=0,031).

**Diskussion:** Wie in den beiden Studien gezeigt wurde, haben sowohl der 4-Stunden MicroScan WalkAway als auch der Reveal im Vergleich zur Standardtestung sehr gute Leistungseigenschaften, die den Anforderungen für MHK-Testsysteme der aktuellen ISO-Norm (EN ISO 20776-2:2007) entsprechen. Somit stellen beide untersuchten Verfahren eine Möglichkeit dar, die Ergebnisse der Resistenztestung für den Kliniker in kürzerer Zeit zur Verfügung zu stellen. Inwiefern die schnellere Verfügbarkeit eines AntibioGRAMMS das Outcome hinsichtlich der Mortalität der Patienten verbessern kann, müssen weitere Studien zeigen.

## **2. Einleitung**

Die Identifikation und Resistenztestung von Pathogenen und damit eine zielgerichtete antibiotische Therapie hat einen essentiellen Stellenwert in der Therapie von Blutstrominfektionen (BSI) beziehungsweise in der Sepsistherapie. So fordert die aktuelle Sepsis-Guideline stets mindestens zwei aerobe als auch anaerobe Blutkulturen (BKs) bei einem Verdacht auf eine BSI respektive Sepsis [1]. Mit zunehmender Entwicklung von MREs, die Resistenzen gegenüber herkömmliche empirisch eingesetzten Breitbandantibiotika zeigen, kommt es immer häufiger zum Therapieversagen, sodass eine greifende Therapie oft erst nach Fertigstellung des Antibiogramms möglich ist [2]. Die Evaluation sowie die Optimierung der Diagnostik aktueller laboratorischer Methodiken zur Bestimmung von Antibiotikaempfindlichkeiten von gramnegativen Pathogenen, im Zusammenhang mit der Forderung einer immer schnelleren und präzisen Diagnostik, sind Gegenstand dieser Arbeit.

### **2.1 Blutstrominfektion, Sepsis und septischer Schock**

Als BSI bezeichnet man das Auftreten von Bakterien im Blut [3], welches keinen Krankheitswert darstellen muss und klinisch inapparent verlaufen kann und somit alleinig durch eine positive BK auffallen kann [4]. Kommt es dazu, dass die körpereigene Immunabwehr die Fremdorganismen beziehungsweise Pathogene nicht oder nur unzureichend eliminieren können, entsteht das Krankheitsbild einer Sepsis oder gar fulminanter eines septischen Schocks. Die Sepsis ist definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, bedingt durch eine dysregulierte Reaktion des Wirts auf eine Infektion [5]. Der septische Schock wird als eine Untergruppe der Sepsis angesehen, welcher mit einer besonders fulminanten respektive tiefgreifenden Kreislauf-, Zell-, und Stoffwechselanomalie einhergeht als dies der Fall bei einer Sepsis ist. Dies äußert sich durch einen Anstieg des Serumlactatpiegels auf mehr als 2 mmol/L und/oder der Einsatz von Vasopressoren trotz Volumensubstitution und Euvolämie, um einen mittleren arteriellen Druck von  $\geq 65$  mmHg zu erzielen. Einhergeht das Krankheitsbild des septischen Schocks mit einer höheren Mortalität, die bei mehr als 40% liegt, als bei der Sepsis alleine ( $> 10\%$ ) [5].

#### **2.1.1. Klinische Relevanz und Epidemiologie der Sepsis**

Das septische Krankheitsbild stellt eine medizinische und diagnostische Herausforderung dar, besonders in Anbetracht auf die zunehmende Anzahl von MREs. Bei kritisch kranken

Patienten ist die Sepsis nach wie vor einer der führenden Mortalitätsursachen. Überdies verursacht die Sepsis die meisten Todesfälle im Krankenhaus und liegt bei rund 20% aller Todesfällen weltweit [6-9]. In den Industriestaaten weist die Sepsis mit 50-100 Fällen pro 100.000 Einwohner eine über den letzten Jahren stetig steigende Inzidenz auf [10]. Das Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME) (Washington, USA) exploriert, in seiner jüngsten im Lancet veröffentlichten Studie, die Sepsis als führende Todesursache. Aus einer multifaktoriellen Todesursachenstatistik aus 4 Ländern und Krankenhausstatistiken aus 10 Ländern, unter Hinzunahme länderspezifischer Daten zu Zugang und Qualität der Gesundheitsversorgung, wurde ein Index berechnet (sog. Healthcare Access and Quality [HAQ] Index). Dabei konnte herauskristallisiert werden, dass die Zahlen der Sepsis Todesfälle respektive Sepsis assoziierten Todesfälle deutlich höher ist als zuvor vermutet und in anderen Studien gezeigt wurde. Die IHME-Studie stellt die Sepsis erstmalig als eigenständiges Syndrom da, welches als schwerste Komplikation von Infektionskrankheiten gesehen wird. Durch die Analysen wurde evident, dass etwa ein Drittel der Sepsisfälle bei Patienten mit zugrunde liegenden nichtübertragbaren Erkrankungen oder nach Unfällen auftritt [9]. Aufgrund des steigenden Alters der Bevölkerung, der unbestreitbare lebensrettende Fortschritt der Medizin mit der Möglichkeit der Ausweitung von invasiven, intensivmedizinischen und pharmakologischen Therapien, die mitunter immunsuppressiv wirken, kommt es zu einer zunehmenden Inzidenz von Sepsisfällen [11]. Dabei zeigen gramnegative Pathogene eine vermehrte Inzidenz zu grampositiven Pathogenen auf [12] und wurden schon 1993 von Bone als „Dilemma of modern medicine“ bezeichnet [13]. Seither konnte die Letalität nicht signifikant beeinflusst werden.

### **2.1.2. Ursachen und Folgen der Sepsis**

Niederschwelliger Einsatz von Antibiotika, aber vor allem von Breitbandantibiotika führt zu einem Selektionsdruck und somit zu der Entstehung von Resistenzmustern, welche empirisch kalkulierte Therapien immer häufiger versagen lässt [2, 14]. Folgend muss das Ziel in einer schnellstmöglichen Umsetzung einer spezifischen Therapie liegen, um ein Ausweiten der Resistenzspektren zu supprimieren und eine bessere respektive effektivere zielgerichtete Therapie darbieten zu können.

Die Auswahl des richtigen Antibiotikums, welches das erwartete antimikrobielle Spektrum einschließt, ist die zentrale Determinante in der Therapie der Sepsis respektive des septischen Schocks. Das Risiko von der Sepsis in einen fulminanten septischen Schock zu geraten steigt mit jeder Stunde um 8% [15]. Infolgedessen resultiert das Therapieversagen der empirischen

Erstantibiose in einem Anstieg der Mortalität mit jeder Stunde, sodass sich das Überleben des Patienten um das Fünffache verringert. Hierbei zeichnet sich bei etwa 20% der Patienten im septischen Schock eine inadäquate antibiotische Ersttherapie ab, als Ursache eines schlechteren Outcomes [16, 17]. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten die mit einer hypotensiven Blutdruckentgleisung auffallen, innerhalb eines septischen Geschehens, das beste Outcome haben. Des Weiteren sinkt die Mortalität, wenn innerhalb einer Stunde eine effektive antibiotische Therapie zugeführt wird. Gleichwohl erhält gerade einmal die Hälfte der Patienten eine effektive Therapie innerhalb von sechs Stunden ab Beginn der Hypotension [18].

Zunehmende Resistenzentwicklung erschwert die antimikrobielle Therapie [2, 14]. Eine inadäquate antiinfektive Therapie, beispielsweise durch eine zu geringe Dosierung oder eine falsche Auswahl des Pharmakons, führt zu einem Überleben einer resistenten Bakterienpopulation. Dieser so genannte Selektionsdruck begünstigt Resistenzentwicklungen [35, 36]. Die zu Beginn einer schweren Infektion, wie die Sepsis eine darstellt, eingeleitete empirische antiinfektive Therapie, zwingt den Kliniker eine ungerichtete Therapie zu verabreichen aufgrund des Zeitdruckes. Um dabei eine wohlmöglich inadäquate Therapie zu verhindern, werden an dieser Stelle oftmals Breitbandantibiotika eingesetzt. Die empirische Therapie sollte sobald möglich, nach der Resistenztestung, auf eine zielgerichtete Therapie umgestellt werden, um weitere Resistenzentstehungen und Übertherapie zu vermeiden, da sonst im Notfall bereits Reserveantibiotika nicht mehr greifen [36].

Insgesamt steigt die 30-Tage-Mortalität von der Sepsis (24,4%) zum fulminanten septischen Schock (34,7%) um 10,3 Prozentpunkte und die 90-Tage Mortalität um 6,3 Prozentpunkte (32,2% zu 38,5%), aufgrund der tiefgreifenden Kreislauf-, Zell-, und Stoffwechselanomalie im Vergleich zur Sepsis. Besonders im septischen Schock ist die adäquate Erstantibiose essentiell; sodass mit einer schnelleren spezifischen Antibiotikatherapie das Überleben verbessert werden würde. Die Überlebensprävalenz ist global different und ebenso der Quelle zu entnehmen [17].

## **2.2 Diagnostik von Blutstrominfektionen und Sepsis**

Bei entsprechendem Vorliegen einer Klinik erfolgt die Diagnosesicherung beziehungsweise die Detektion von bakteriellen Pathogenen mittels Abnahme/Gewinnung von BKs. Hierbei werden regelhaft mindestens zwei BK-Paare, bestehen aus einer aeroben und einer anaeroben BK, asserviert. Dies geschieht vor der initialen Antibiose. Durch die Steigerung der Anzahl an abgenommenen BK-Paaren, kann die Sensitivität der Erregerdiagnostik respektive

der Nachweis einer Bakteriämie und damit die Erstellung eines Antibiotogramms erhöht werden [5,19, 20].

Häufig gelingt bei Patienten die in der Klinik ein septisches Krankheitsbild zeigen der Nachweis von positiven BKs nicht. Dies kann auch auf präanalytische Fehler zurückzuführen sein, denn eine begonnenen antibiotische Therapie vor der Abnahme der BKs, lässt die Wahrscheinlichkeit eines positiven Ergebnisses im Sinne eines Pathogennachweises sinken [19]. Ebenso sind Mikroorganismen zyklisch nachweisbar, das heißt, dass der Nachweis im Fieberanstieg am besten gelingt [21].

Die BK-Diagnostik beinhaltet dabei folgende Schritte: Präanalytisch werden hier jeweils paarweise BKs unter sterilen, aseptischen Bedingungen abgenommen, um eine mögliche Kontamination und damit ein falsch positives Ergebnis zu vermeiden. Hier sind besonders Keime der physiologischen Hautflora problematisch zu differenzieren bezüglich einer iatrogenen Verschleppung oder einer vorliegenden BSI bei beispielsweise einliegenden Fremdmaterial wie zentralen Venenkathetern [22, 23].

Die in der Klinik gewonnenen BKs werden anschließend in die Mikrobiologie transportiert. Dort registriert und inkubiert.

Automatisierte Systeme zur Inkubation und Wachstumsdetektion haben sich in der modernen klinischen Mikrobiologie durchgesetzt. Geräte wie das BacT/ALERT® von bioMérieux detektieren positive Ergebnisse über einen Farbumschlag der Flüssigemulsionssensoren durch eine vermehrte Kohlenstoffdioxidanreicherung, bedingt durch ein Bakterienwachstum [24, 25]. Werden Mikroorganismen detektiert schließt sich eine Identifizierung und Resistenztestung auf Antibiotika an.

### **2.2.1. Gramnegative Pathogene und deren Detektion**

Bakterien, genauer die Zellwand der Bakterien, können gefärbt werden mittels Gramfärbung und so mikroskopisch sowie morphologische beurteilt werden. Dabei können Bakterien in grampositive und -negative Bakterien, nach Hans Christian Gram, abhängig von ihrem Färbeverhalten als taxonomisches Merkmal differenziert werden [26, 27]. Grampositive Bakterien erscheinen unter dem Mikroskop durch die Färbung blau, gramnegative rot. Dies ist durch den unterschiedlichen Aufbau der Bakterienzellwand bedingt. Grampositive Bakterien enthalten eine dickere Mureinschicht als gramnegative Bakterienspezies, zusätzlich Lipoteichonsäure. Aufgrund der dickeren Mureinschicht kann der Farbstoff nicht mehr herausgewaschen werden und erscheint dunkler (blau) im Gegensatz zur dünneren Mureinschicht bei gramnegativen Bakterienspezies, welche durch das Herauswaschen des

Farbstoffes und einer anschließenden Gegenfärbung mit Fuchsin folglich rot erscheint [27]. Die dickere grampositive Zellwand ist ursächlich dafür, dass der Kristalviolett-Jod-Komplex nach der Behandlung mit Ethanol erhalten bleibt [28]. Dies ermöglicht auf einem einfachen und schnellen Weg bereits eine Aussage über die vorliegende BSI zu geben und möglicherweise bereits eine Anpassung der antibiotischen Therapie einzuleiten.

Zu den gramnegativen Bakterien zählen beispielsweise Enterobacterales und Pseudomonaden. Durch die besondere obige genannte Färbetechnik können diese Vertreter als gramnegativ identifiziert werden. Bei der Behandlung der Sepsis spielen diese Vertreter eine essentielle Rolle [12].

### **2.2.2. Die klassischen Labordiagnostiken bei Verdacht auf BSI (Blutkulturbebrütung, Gramfärbung, Resistenztestung und Erregeridentifikation)**

Wie zuvor beschrieben und erläutert werden BKs bei Ankunft im Labor in einem dafür vorgesehenen Blutkulturautomaten bebrütet und bei einer Detektion von Bakterienwachstum anschließend gramgefärbt, zur taxonomischen Einordnung. Daraufhin wird aus der positiven BK-Flasche Blut entnommen und dieses zur Anzucht der Bakterien auf unterschiedliche Agarplatten ausgestrichen (beispielsweise Blutagar, Kochblutagar und Schädler-Agar).

Nach 18-24-stündiger Inkubation der Agarplatten findet dann eine Erregeridentifikation und eine standardisierte Resistenztestung statt. Zusätzlich erfolgt die Ablesung der Hemmhöfe der direkten Resistenzbestimmung und die orientierende Interpretation.

Zur Identifikation der Spezies wird üblicherweise aus einer Bakterienkolonie eine Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI-TOF) durchgeführt. Dies ist in der Regel von einem nicht-selektiven Agarmedium bereits nach 4-Stunden Bebrütung möglich [79].

Eine standardisierte Resistenztestung wird in Deutschland üblicherweise automatisiert z.B. mittels Vitek 2 (bioMérieux, Frankreich) oder MicroScan Walkaway (Beckman Coulter, Brea, CA, US) durchgeführt. Hierbei wird die minimale Hemmkonzentration (MHK) des antimikrobiellen Wirkstoffs bestimmt, welche notwendig ist, um ein sichtbares Wachstum des Bakteriums zu hemmen. Die ermittelten MHKs werden zur Bewertung der antimikrobiellen Empfindlichkeit des Erregers gegen ein Antibiotikum verwendet. Die Bewertung der MHK findet im europäischen Raum beziehungsweise in Deutschland überwiegend nach den Richtlinien der EUCAST statt [52]. Das EUCAST ist ein internationales Komitee für Empfindlichkeitstests, welches von der European Society for Clinical Microbiology and

Infectious Diseases (ESCMID) überdacht ist und als beratender Ausschuss für MHK-Breakpoints der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) fungiert. [68]

Die konventionelle ATBT benötigt ab dem Zeitpunkt des Startens der Messung zwischen 16 und 24 Stunden bis ein endgültiges Ergebnis vorliegt [29], sodass insgesamt mit einem Zeitraum von der Abnahme der Patientenprobe bis zum mikrobiellen Ergebnis von drei Tagen gerechnet werden muss. Die Zeiten teilen sich wie folgt auf: Zunächst einmal müssen die abgenommenen BKs ins Labor transportiert werden. Hierfür ist mit einer durchschnittlichen Zeit von vier Stunden zu rechnen [69]. Die Bebrütung der BK ist stark variabel und abhängig von der Bakterienkonzentration, sodass hier unter Umständen weitere 12-24h benötigt werden können aufgrund einer großen Streubreite der Time to positivity (TTP) [70, 71]. Chen et al. zeigt in seiner Studie eine mediane TTP von 12,5h bei Patienten mit *E. coli* Infektionen [72]. In dieser Studie wurden Patienten mit einer einfachen Bakteriämie bis hin zu solchen mit einem komplizierten septischen Schock eingeschlossen. Es konnte gezeigt werden, dass die Zeit bis zur Positivmeldung der BK mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Demnach weist ein septischer Schock eine kürzere TTP auf, als eine einfache Bakteriämie. Dies erklärt die große Streubreite der TTP [73]. Anzumerken ist, dass gramnegative Bakterien eine kürzere TTP aufweisen als grampositive Bakterien [73]. Es werden dann nach Positiv-Meldung der BK wie oben beschrieben weitere 18 bis 24 Stunden für die Bebrütung der Agarplatten, sowie 18-24 h für die MHK-Bestimmung mit herkömmlichen Testmethoden wie dem Microscan Walkaway (Beckman Coulter, Brea, CA, US ) benötigt.

Diese Zeitverzögerung kann mitunter lebensbedrohlich beziehungsweise tödlich sein [15, 16, 30].

In den folgenden Unterpunkten werden die klassischen Labormethoden zur Erregeridentifizierung und Resistenztestung kurz eingeleitet.

#### **2.2.2.1. Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI-TOF) zur Erregeridentifizierung**

Die Matrix-Assistierte-Laser-Desorption-Ionisierung (MALDI) Time of flight (TOF) ist ein Verfahren der Massenspektrometrie mit dessen Hilfe Mikroorganismen identifiziert werden können [31, 32]. Hierbei werden chemische Verbindungen, wie beispielweise Proteine der Mikroorganismen, in geladene Moleküle ionisiert und dabei ihre Masse zur Ionisierung ( $m/z$ ) gemessen. Das Ergebnis dieser Untersuchung stellt einen genetischer Fingerabdruck dar,

welcher mit einer Datenbank abgeglichen wird und konsekutiv eine bakterielle beziehungsweise mikrobiologische Identifizierung ermöglicht.

Das MALDI-TOF Gerät besteht aus einer Ionenquelle, einem Flugrohr sowie einem Detektor. Zur Messung wird eine Reinkultur eines Mikroorganismuses benötigt, die auf ein Probenträger, das Target, aufgebracht wird. Anschließend kann die Matrix auf die Probe pipettiert werden. Die Matrix enthält  $\alpha$ -cyano-4-Hydroxymethylsäure (HCCA). Dies sorgt für eine Auskristallisieren der Probe. Das Target wird in das Massenspektrometer gegeben, dort baut sich zur Messung ein Vakuum auf und wird mit dem Laser beschossen. Folglich verdampft die in der Matrix kristallisierte Probe und wird ionisiert [31]. In Abhängigkeit der Masse sowie der Ladung der Probe wird diese unterschiedlich beschleunigt, sodass eine jene Probe eine differente Zeit (time off light (TOF)) spezifisch hat bis zum Erreichen des Detektors. Hieraus lässt sich der individuelle Fingerabdruck ermitteln als Massenspektrum. Die Identifikation ermöglicht bereits ein schnelles Reagieren auf eine antimikrobielle Therapie, bei möglicherweise inadäquater Therapie, obwohl kein Antibiotogramm vorliegt, beispielweise aufgrund von intrinsischen Resistenzen.

#### **2.2.2.2. Mikrodilutionsverfahren zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK)**

Die MHK, ist die Konzentration eines Antibiotikums, unter welcher unter in vitro Bedingungen kein Erreger- beziehungsweise Bakterienwachstum mehr stattfindet [33]. Das heißt, dass die MHK den Grad der Empfindlichkeit respektive Resistenz eines antimikrobiellen Pharmakons in Bezug auf einen Erreger abbildet und somit ein Maß der Effizienz der antiinfektiven Therapie darstellt [34]. Überdies zählen neben der MHK, die zur Wirksamkeit Aufschlüsse gibt die Pharmakokinetik und -dynamik, der Infektionsherd sowie Patientenfaktoren, wie etwa das Gewicht, eine entscheidende Rolle.

Die MHK an sich stellt einen Schwellwert dar, wird dieser überschritten gilt der Mikroorganismus als resistent (R), befindet sich die MHK unterhalb dieses Bereiches kann der Mikroorganismus sensibel (S) oder intermediär (I) sein. In Europa werden die Kriterien hierzu von der EUCAST festgelegt.

Neben der EUCAST gibt es zudem die Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), welches ebenfalls Richtlinien und Standards für die Durchführung und Interpretation von mikrobiologischen Testungen vorgibt. Prinzipiell gibt es keine feste Bindung, nach welchem Standard Breakpoints interpretiert werden, dennoch ist die Interpretation nach dem EUCAST

in Europa üblich und empfohlen, da die Empfehlungen transparenter (und kostenfrei) sind und jährlich aktualisiert werden.

Zur MHK-Ermittlung wird das bakterielle Wachstum in verschiedenen Konzentrationen eines Antibiotikums getestet, sodass eine aufsteigende Verdünnungsreihe entsteht. In der Konzentration, in welcher kein Bakterienwachstum mehr detektiert werden kann, wird als minimale Hemmkonzentration bezeichnet [33]. Dazu kann eine Mikrotiterplatte verwendet werden (siehe Abbildung 1), in welcher bereits vorgefertigte Konzentrationen von Antibiotika in einer entsprechenden Vertiefung vorgegeben sind. Diese werden mit einer vorgegebenen Menge an Bakterien beimpft. Im Anschluss werden die Bakterien bei 37°C inkubiert. Bakterienwachstum zeichnet sich durch eine Trübung der Flüssigkeit aus und kann dann entsprechen makroskopisch detektiert werden. Bei der automatisierten Resistenztestung erfolgt die Inkubation und Detektion der Trübung im Gerät. Eine solche Methodik verwendet der DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea, CA, US ) [37]. Nach der Übernacht-Inkubation (18-24h) wird dann automatisiert das Wachstum in den einzelnen Näpfen abgelesen. Dabei wird das „Test-Näpfchen“ mit dem „Kontroll-Näpfchen“, welches keine Antibiose enthält in Beziehung gesetzt. Mit Hilfe von Algorithmen kann maschinell die Wachstumskurve ausgewertet werden und jede einzelne MHK, des entsprechend auf der Mikrotiterplatte platzierten Antibiotikums, angegeben werden.

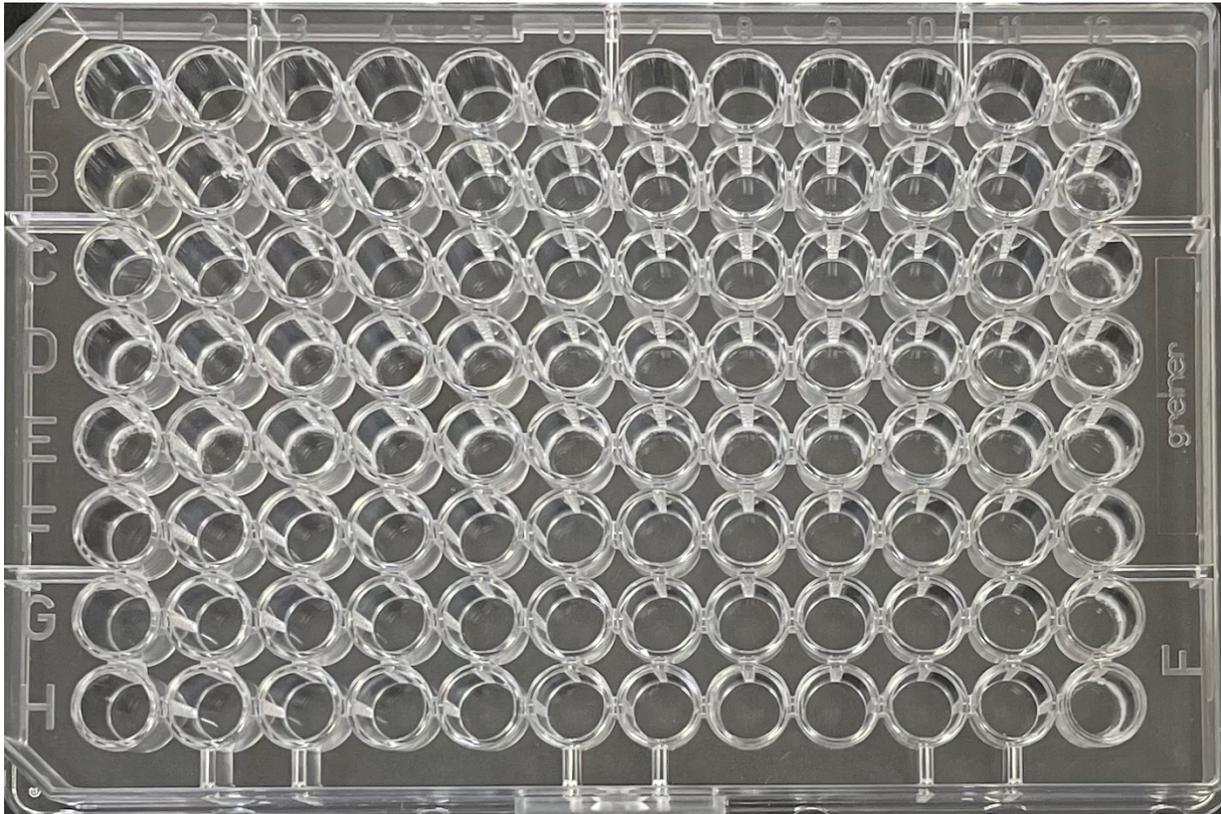


Abb. 1.: Darstellung einer 96-Well Platte zur Herstellung einer Verdünnungsreihe und MHK-Ermittlung.

Zur Resistenztestung kann die 96-Well Platte vom Hersteller mit unterschiedlichen Antibiotika belegt werden. Für die vorliegenden Studien wurde eine gramnegative MDR MIC1 Platte verwendet. Die Antibiotikaverteilung ist in Abb. 2 illustriert.

## Neg MDR MIC 1 (MDR1) 96-Well Platte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C	G	8/2 Aug	16/2 Aug	32/2 Aug	4 Am	8 Am	8 Cfx	16 Cfx	4 Crm	8 Crm	1 Cfe
B	1 Cft	2 Cft	4 Cft	8 Cft	16 Cft	32 Cft	0.5 Cpe	1 Cpe	2 Cpe	4 Cpe	8 Cpe	16 Cfz
C	0.5/4 Cft/CA	1/4 Cft/CA	2/4 Cft/CA	4/4 Cft/CA	0.12 Etp	0.5 Etp	1 Etp	LOC	8 Pi	16 Pi	8/4 P/T	16/4 P/T
D	1 Caz	2 Caz	4 Caz	8 Caz	16 Caz	32 Caz	8 Ti	16 Ti	1 Tgc	2 Tgc	2 Cl	4 Cl
E	0.25/4 Caz/CA	0.5/4 Caz/CA	1/4 Caz/CA	2/4 Caz/CA	4/4 Caz/CA	1/4 C/T	2/4 C/T	4/4 C/T	2/4 CZA	4/4 CZA	8/4 CZA	8 Mec
F	8 Ak	16 Ak	2 Gm	4 Gm	2 To	4 To	0.06 Cp	0.25 Cp	0.5 Cp	1 Cp	0.5 Lvz	1 Lvz
G	0.12 Mer	1 Mer	2 Mer	4 Mer	8 Mer	16 Mer	32 Mer	64 Fd	0.5 Nxn	1 Nxn	2 T	4 T
H	1 Imp	2 Imp	4 Imp	8 Imp	1 Azt	2 Azt	4 Azt	16 Fos	32 Fos	64 Fos	2/38 T/S	4/76 T/S

Abb. 2.: Darstellung der gramnegativen MDR 96-Well Platte und der enthaltenen Antibiotikakonzentrationen.

Aug, Amoxicillin/Clavulansäure; Am, Ampicillin; Cfx, Cefoxitin; Crm, Cefuroxim; Cfe, Cefixim; Cft, Cefotaxim; Cpe, Cefepim; Cfz, Cafazolin; Cft/CA, Cefotaxim-Clavulansäure; Etp, Ertapenem; LOC,; Pi, Piperacillin; P/T, Piperacillin-Tazobactam; Caz, Ceftazidim; Ti, Ticarcillin; Tgc, Tigecyclin; Cl, Colistin; Caz/CA, Ceftazidim-Clavulansäure; C/T, Ceftolozan-Tazobactam; CZA, Ceftazidim-Avibactam; Mec, Mecillinam; Ak, Amikacin; Gm, Gentamicin; To, Tobramycin; Cp, Ciprofloxacin; Lvz, Levofloxacin; Mer, Meropenem; Fd, Nitrofurantoin; Nxn, Norfloxacin; T, Trimethoprim; Imp, Imipenem; Azt, Aztreonam; Fos, Fosfomycin; T/S, Trimethoprim/Sulfametjoxazol

### 2.2.2.3. Disk-Diffusionsmethode und daraus entwickelte „rapid AST“ nach EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Die Disk-Diffusionsmethode („Kirby-Bauer Test“) ist das älteste Verfahren zur Bestimmung von isolierten bakteriellen Resistenzen [38]. Hierfür wird zur Testung der meisten gramnegativen Erreger ein Müller-Hinton-Agar beimpft. Aus einer angezüchteten Bakterien-Kolonie wird ein Inokulum hergestellt. Dieses Inokulum wird aus einem McFarland 0,5 hergestellt, um eine einheitliche, standardisierte Bakteriensuspension zu erhalten [53]. Daraufhin werden runde Papierplättchen, welche in einer definierten Konzentration eines Antibiotikums getränkt sind, in ausreichend großem Abstand zueinander, angeordnet. Dann erfolgt die Inkubation in einem Inkubator über 18 Stunden. Durch Diffusion, des auf dem Papierplättchen getränkten Antibiotikums, entsteht bei Antibiotikasensibilität ein sogenannter Hemmhof um das

Papierplättchen herum. Dieser Hemmhof, also eine freie Zone ohne Bakterienwachstum, kann nach entsprechend vergangener Zeit abgemessen werden. Der Hemmhof steht grob in einem linearen Zusammenhang mit der MHK. Allerdings ist hier die Genauigkeit der Vorhersagekraft der MHK eingeschränkt, da die Menge des hineindiffundierten Antibiotikums in den Agar nicht quantifiziert werden kann [39], sodass für die Interpretation der Hemmhöfe eigene Kriterien entwickelt worden sind [52]. Um diese Interpretationskriterien anwenden zu können muss die Testung den aufgestellten Teststandards bezüglich des verwendeten Agars und der Inkubationszeit von 16-20 Stunden (nach dem European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) entsprechen.

Zu den Vorteilen der Disk-Diffusionsmethode zählen eine leichte Handhabung und eine kostengünstige Durchführbarkeit.

### **Die "Rapid-AST" (Rapid-Antimicrobial Susceptibility Testing)**

Um die Zeit bis zum Ergebnis bei der BK-Diagnostik zu verkürzen, hat das EUCAST eine Methode entwickelt, um direkt aus der positiven BK-Flasche die Disk-Diffusionstestung durchzuführen und diese bereits nach wenigen Stunden zu interpretieren: Die "Rapid-AST" (Rapid-Antimicrobial Susceptibility Testing). Hierbei wird statt einer Bakterienkolonie das Blut aus der positiven BK zur Beimpfung der Agar-Platte verwendet und die Hemmhöfe werden bereits nach vier, sechs sowie acht Stunden abgelesen. Nach EUCAST können die Hemmhöfe standardisiert interpretiert werden und das jeweilige Antibiotikum sowohl in sensibel als auch resistent oder intermediär eingestuft werden [52]. Interpretationsmöglichkeiten sind hier allerdings nur für einige Spezies-Antibiotika-Kombinationen gegeben. Diese werden aber stetig erweitert.

Mit der Inkubationszeit verändern sich die Größe der Hemmhöfe, sodass festgehalten werden kann: Je kürzer die Inkubationszeit ist, desto kleiner ist der Hemmhof. Dies hat zur Folge, dass zwischen einer erworbenen Resistenz und einer phänotypischen Resistenz schlecht differenziert werden kann [42]. Das heißt, dass aufgrund der kürzeren Inkubation eine technische Unsicherheit entsteht, wodurch die Auswertung erschwert beziehungsweise keine Aussage getroffen werden kann [43].

Aber auch mittels dieser Methode wird kein vollständiges Antibiogramm mit genauen MHK-Werten generiert, sodass die Rapid-AST eine gute Orientierungshilfe darstellt, aber kein Ersatz des finalen, vollständigen Antibiogramms ist [40]. Allerdings ist dies auch weniger die Intention der Methodik. Vielmehr zielt die „RAST“ darauf hin ab, phänotypische Resistenzmuster abzubilden und so ineffektive Therapien und Selektionsdruck aufgrund von

inadäquater Therapie zu vermeiden, und weniger der Deeskalation einer initialen Therapie [43-46].

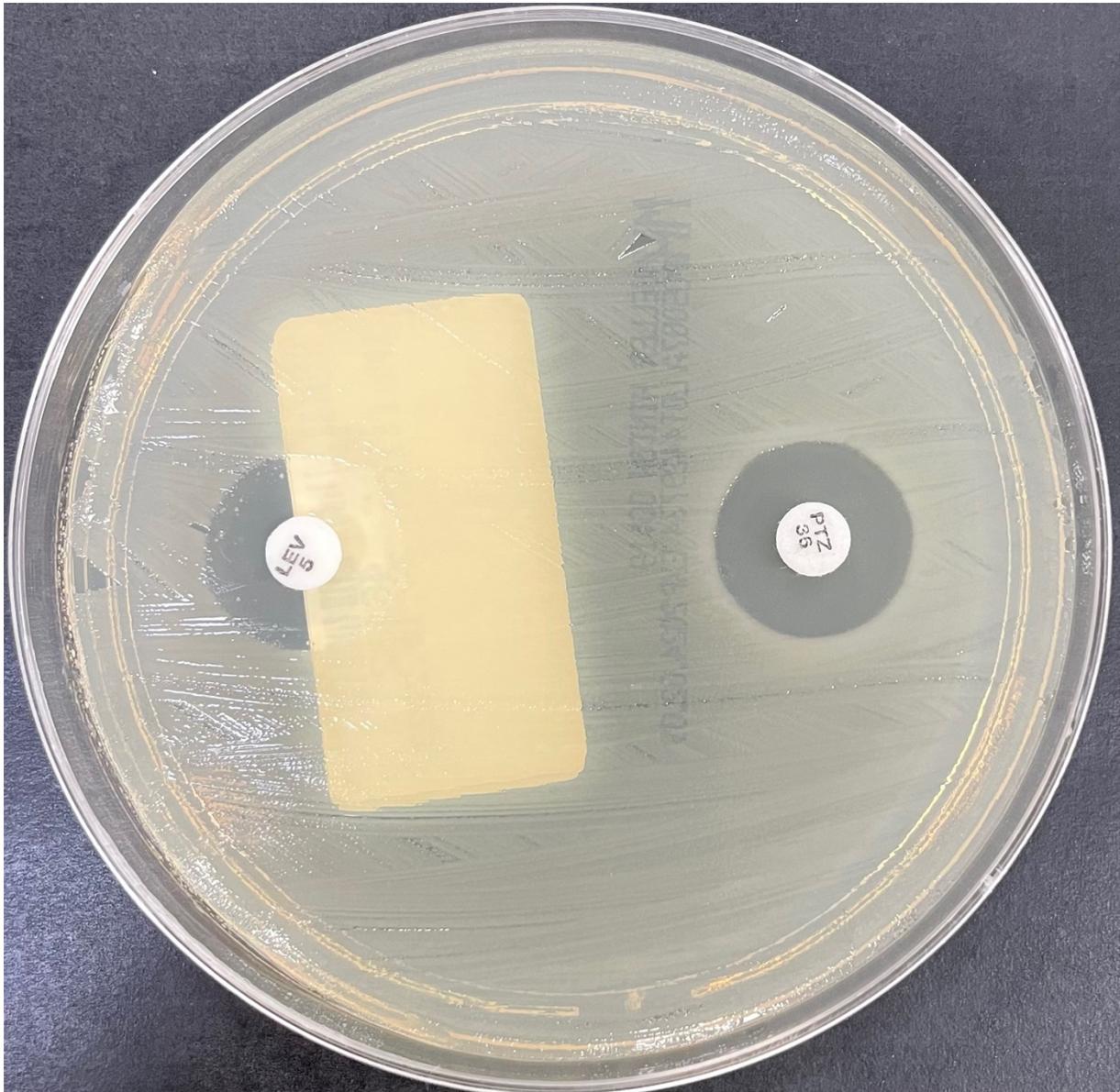


Abb. 3: Zeigt eine Disk-Diffusionstestung/Agardiffusionstest. Die aufgetragenen Plättchen enthalten jeweils ein Antibiotikum, sodass ein Hemmhof entsteht.

#### **2.2.2.4. Epsilometer-Test („E-Test)**

Der Epsilometer-Test kurz E-Test, ist ein händisch durchgeführter Test zur Ermittlung des MHK-Wertes beruhend auf dem Wachstum auf einer Agarplatte. Hierfür wird eine Agarplatte mit einem Bakterium beimpft. Auf die beimpfte Agarplatte wird anschließend ein Papierstreifen, welcher das zu testende Antibiotikum in aufsteigender Konzentration enthält aufgelegt und für

18-24 Stunden inkubiert. Der Papierstreifen enthält eine Skala, an der man die MHK ablesen kann. Bei stattgehabter Wachstumshemmung kann nach der Inkubation ein elliptischer Hemmhof abgelesen werden, ebenso auf der Skalierung ein MHK-Wert für das entsprechende Antibiotikum (siehe Abb. 4.). Entlang des E-Testes-Streifens entsteht ein Konzentrationsgradient mit einer höheren Auflösung als dies der Fall bei dem Disk-Diffusionstest ist, welcher zuvor erläutert wurde.

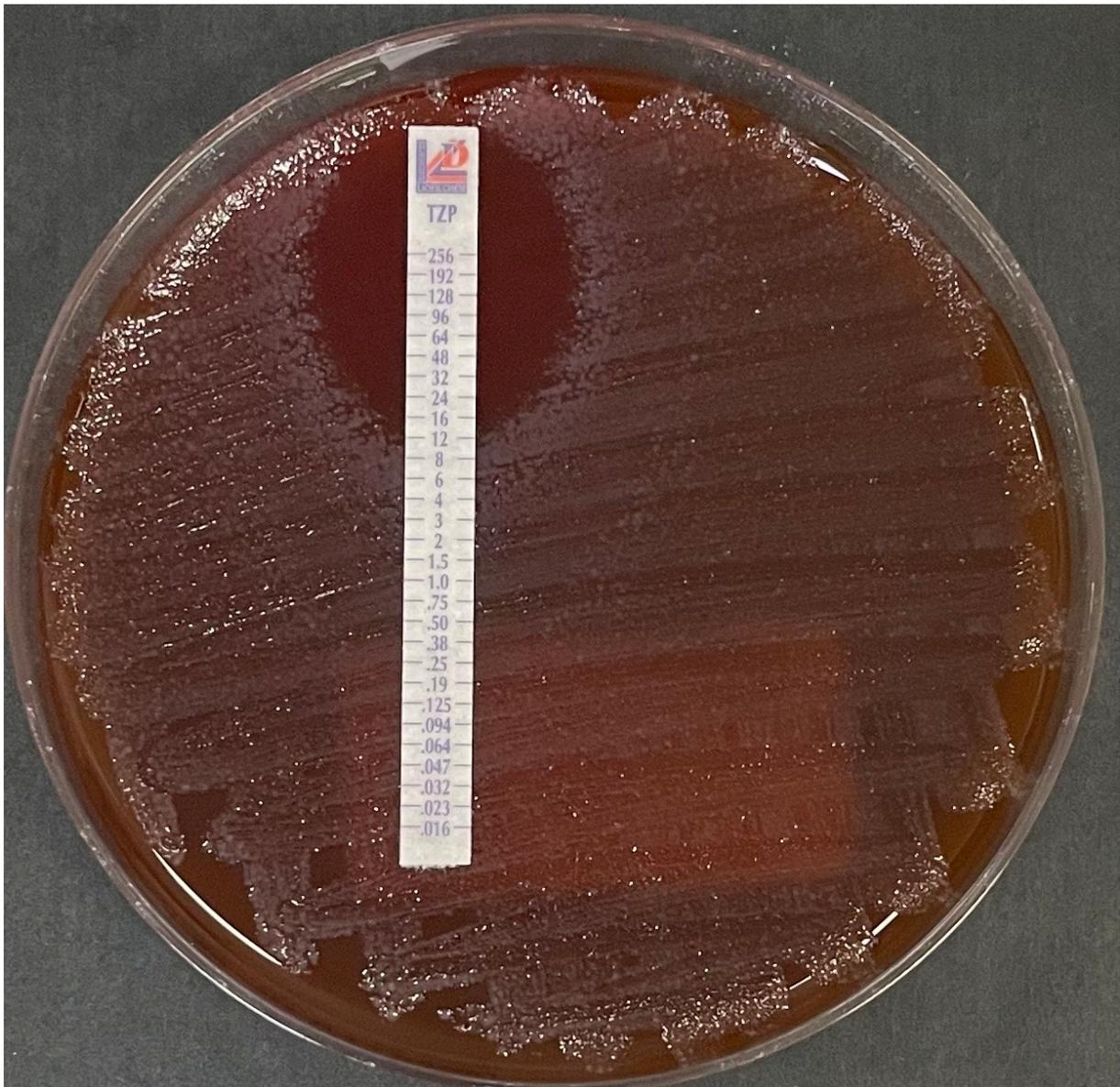


Abb. 4: Ein E-Test Streifen wurde auf eine Agarplatte gelegt, welche zuvor mit dem zu testenden Erreger beimpft wurde und anschließend inkubiert. Bedingt durch das Antibiotikum in dem E-Test Streifen ist ein elliptischer Hemmhof entstanden. An der Spitze des Hemmhofes ist der MHK-Wert abzulesen. In diesem Fall liegt der MHK-Wert bei 12 mg/L.

### 2.2.3. Neure Methoden der Labordiagnostik bei Blutstrominfektionen (BSI)

Aufgrund eines zunehmenden Zeitdrucks in der Diagnostik und einer ausbreitenden Resistenzlage werden neue Labormethoden zur Diagnostik von BISs von Nöten. Hier spielt vor allem die Zeitverkürzung bis zu einem vollständigen Antibiogramms eine entscheidende Rolle, um schneller gezielter und effektiver Antibiotika einsetzen zu können.

Dabei wird bei den meisten neueren Testverfahren versucht, eine Testung direkt aus der positiven BK-Flasche vorzunehmen und nicht mehr zunächst eine Subkultur (klassisch 16-20 Stunden) anzusetzen. Im Rahmen der Studie werden zwei Verfahren zur schnelleren Resistenztestung aus BK-Flaschen untersucht:

#### **2.2.3.1. 4 Stunden DxM Micro Scan WalkAway® (Beckman Coulter, Brea, CA, US ) zur bakteriellen Antibiotikaempfindlichkeitstestung**

Der DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea, CA, US) benötigt zur Resistenztestung nach Herstellerangaben eine Bakterienkolonie, die für 18-24 Stunden auf einem Nährboden gewachsen ist. Mit dieser Bakterienkolonie wird dann ein Inokulum hergestellt, welches zur Testung verwendet werden kann.

Daraufhin findet die Inkubation im DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea, CA, US) zur maschinellen Resistenztestung für etwa 16-24h statt. Die Methodik des MicroScan Walkway wurde in Kapitel 2.2.2.2. beschrieben.

Bei der 4-Stunden WalkAway Testung wird Blut aus der BK-Flasche auf Agarplatten ausgestrichen und folgend für nur 4-Stunden inkubiert. Analog zur 16-20h beschriebenen WalkAway Testung in Kapitel 2.2.2.2. werden die Kolonien aus der 4-stündigen Subkultur zur Resistenztestung verwendet.

#### **2.2.3.2. Reveal AST – Direkte Antibiotikaempfindlichkeitstestung aus positiven Blutkulturflaschen**

Das Reveal AST System wurde durch die amerikanische Firma Specific Diagnostics (San Jose, CA, US) entwickelt und bietet die Möglichkeit einer wesentlich schnelleren mikrobiologischen Diagnostik. Specific Diagnostics hat sich zur Aufgabe gemacht, eine Methode zu entwickeln, welche eine taggleiche Diagnostik ermöglicht, um die Mortalitätsrate von Septitiden zu verringern.

Anders als die zuvor beschriebene Methodiken (Mikrodilutionsmethoden) detektiert das Reveal-AST System keine optischen Veränderungen, sondern der Sensorarray reagiert auf volatile Emissionen, die während des mikrobiellen Metabolismus als Produkt anfallen.

Wie bei der klassischen Bouillion-Mikrodilution (BMD) wird eine MHK bestimmt, durch einen maschinellen Vergleich mit der Positivkontrolle, welche keinen medikamentösen antimikrobiellen Zusatz enthält.

Das Reveal-AST System detektiert direkt aus der positiven BK. Dazu wurden 25 µl einer positiven BK direkt (ohne Entfernung von Blutzellen) im Verhältnis 1:1000 in Pluronic Water (Beckman Coulter, Sacramento, CA, US) verdünnt und die Verdünnung für die Inokulation einer MicroScan MDR-Platte mit einem Renok-Inokulator (Beckman Coulter, Brea, CA, US) verwendet. Dies ist dieselbe 96-Well Platte, wie sie beim Dxm MicroScan WalkAway verwendet wird und enthält ebenso dieselben definierten Antibiotikakonzentrationen.

Anschließend wurde die Platte mit dem Reveal-Sensorpanel (Specific Diagnostics, San Jose, CA, US) abgedeckt und im Reveal-Plattenversiegler (Specific Diagnostics, San Jose, CA, US) automatisch versiegelt. Das Reveal-Sensorpanel enthält eine Anordnung von 7 kolorimetrischen chemischen Sensoren in einer nanoporösen Matrix, die sich über jeder der 96 Vertiefungen der AST-Platten befinden. Dadurch können die volatilen Emissionen, die als Nebenprodukt des Bakterienstoffwechsels anfallen, detektiert werden.

Für die Vorbereitung der zu analysierenden Probe ist eine Arbeitszeit von drei Minuten beschrieben, sodass die Hands-on-time gering und damit vergleichbar mit anderen automatisierten Resistenztestungssystemen, wie zum Beispiel dem DxM MicroScan WalkAway von Beckman Coulter.

Im Durchschnitt vergehen im Gerät vier bis sechs Stunden bis durch das Reveal-AST-System ein detailliertes, endgültiges Ergebnis vorliegt, welches dem Kliniker eine spezifische Therapie ermöglicht. Darüber hinaus wird nach der Spezies-Identifikation mittels MALDI-TOF das identifizierte Bakterium eingegeben. Ab diesem Zeitpunkt, also sobald die ID bekannt ist, werden die bereits ermittelten MHKs nach den Richtlinien des EUCAST interpretiert [52], sodass bereits Teilergebnisse eingesehen werden können, die zur Therapieentscheidung beitragen können. Dies kann eine signifikant relevante Zeitverkürzung darstellen [47].

Zusätzlich zu dem Zeitgewinn durch die deutlich verkürzte Laufzeit des Tests (4-6 Stunden versus 16 Stunden beim Walky) kann dieser Assay direkt aus der positiven BK-Flasche durchgeführt und angesetzt werden, so dass die Zeit einer Subkultur (16-20 Stunden) entfällt. Demnach kann in der Theorie eine Zeitersparnis von bis zu 28 Stunden erreicht werden.

Insgesamt können in einem Modul des Reveal-AST Systems vier Panels zeitgleich analysiert werden. Im Jahr 2023 wurde die Firma Specific diagnostics (San Jose, CA, US) von der französischen Firma bioMérieux (Marcy L'Etoile, Frankreich) aufgekauft und wird nun als „Vitek Reveal™“ vertrieben.

### **2.2.3.3. Matrix-Assentierte-Laser-Desorptions-Ionisierung als weitere Möglichkeit der Antibiotikaresistenztestung**

Der MALDI-TOF kann neben der zuvor in Kapitel 2.2.2.1. beschriebenen Identifikation eines Mikroorganismus auch zur Antibiotikaresistenztestung verwendet werden, wobei hier gesagt werden muss, dass dies sich in der Praxis als schwierig erweist.

Die Intention hinter der Resistenztestung mittels MALDI-TOF ist die Entschlüsselung spezifischer Proteine, die sensible von resistenten Bakterien unterscheiden und sich im Massenspektrometer darstellen lassen. Viele Studien versuchen beispielsweise differente Massenspektren von Methicillin resistenten und sensiblen *Staphylococcus aureus*-Stämmen (MRSA/MSSA) als standardisierte Labormethode in den Alltag zu etablieren [48, 49]. Ebenso wurde dies für Vancomycin- resistenten Enterokokken (VRE) versucht. Hier wurden die beiden Genotypen *vanA* sowie *vanB* für Glykopeptid-Resistenzen massenspektroskopisch diskriminiert, um Aussagen über den Resistenzmechanismus und daraus folgend mögliche Antibiotikatherapien treffen zu können. [50].

MRSA als auch VRE, als MREs, stellen heutzutage ein zunehmendes Problem dar, bei immer weiterwachsenden Resistenzen, da hier oftmals empirische Antibiotikatherapien versagen [2, 14].

Demnach postuliert der Ansatz der Resistenztestung mittels MALDI-TOF, beruhend auf dem Vergleich der Spektren verschiedener Mikroorganismen im Massenspektrum, wodurch Rückschlüsse auf Genotypen respektive Resistenzmechanismen getroffen werden können. Auch wenn eine solche Methodik der Resistenzbestimmung prinzipiell möglich erscheint und mannigfaltig in Studien bereits untersucht wurde, zeigt es sich aktuell als sehr komplex und wird in der Routinediagnostik nicht angewandt. Obschon die experimentellen Ergebnisse vielversprechend erscheinen benötigt es für die zuverlässige Beurteilung ein bekanntes Massenspektrum, sodass der Resistenzmechanismus und die resultierende Veränderung bekannt sein muss.

### **2.2.3.4 Weitere Verfahren zur schnellen Antibiotikaresistenztestung – Ein Überblick**

Die neuartigen Methoden zur Bestimmung von Antibiotikasensibilitäten zielen in erster Linie auf die Entwicklung eines schnelleren Ergebnisses hin - und zwar mit zwei primären Ansätzen:

solchen, die den Phänotyp eines Mikroorganismus bewerten, und solchen, die seinen Genotyp bewerten [74].

Anspruchsvollere Ansätze für die schnelle AST aus BKs verwenden alternative Methoden zur Bewertung des Phänotyps, indem sie Ansätze wie die mikroskopische Bewertung antimikrobiell induzierter Veränderungen der Zellmorphologie, die Bewertung der Teilungsraten oder der Genexpression anwenden [75].

Zwei schnelle AST-Methoden sollen folgend dargestellt werden, welche klinisch für die schnelle phänotypische AST aus positiven BKs bereits in der Diagnostik eingesetzt werden können: der Accelerate PhenoTest BC® (Tucson, AZ), der sowohl von der US Food and Drug Administration (FDA) als auch von Conformité-Européenne in vitro Diagnostic (CE-IVD) zugelassen ist und der Alfred 60AST (Alifax, Italien). Darüber hinaus sind weitere Geräte in der Erprobung, welche aber noch nicht in Deutschland zugelassen sind.

Der PhenoTest BC ermöglicht eine schnelle Identifizierung in ungefähr 1,5h und eine AST in ungefähr 7h aus positiven BKs durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung beziehungsweise Zeitraffer-Bildgebung von Bakterien unter Dunkelfeldmikroskopie [76, 77]. Zur Bestimmung der MHKs werden verschiedene morphologische und kinetische Veränderungen der Bakterien im Vergleich zu Kontrollen ohne Antibiotikum verwendet [76].

Konträr dazu nutzt der Alfred 60AST die Lichtstreuung zum Nachweis des Bakterienwachstums in einer flüssigen Kulturbrühe und ermittelt die Ergebnisse innerhalb von 3 bis 5 Stunden. Die Identifizierung der Organismen erfolgt bei der letztgenannten Methode nicht und muss mit alternativen Methoden bestimmt werden [78], beispielsweise mittels MALDI-TOF.

### **2.3 Fragestellungen und Ziel der Arbeit**

Ziel dieser Studie ist es, zu untersuchen, ob das neue Reveal AST System und eine verkürzte Bebrütungszeit von Subkulturen in Kombination mit dem DxM Microscan Walkaway (4-Stunden WalkAway), im Vergleich zu aktuellen Standardmethoden in der ATBT, vergleichbare Leistungseigenschaften haben und demnach in der Routine reliabel eingesetzt werden können.

Neben den Leistungsgrößen Categorical Agreement und Essential Agreement sollen dabei die Fehlerraten in der Interpretation berechnet werden und Einflussfaktoren auf die Fehlerraten (wie z.B. der Typ der BK-Flasche (aerob/anaerob), getestetes Antibiotikum, Spezies, Zeit bis die BK-Flasche positiv wird und Menge der Erreger in der positiven BK-Flasche) untersucht werden.



### **3. Publikationen**

**3.1 Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Using The MicroScan System:  
Performance Evaluation of a 4-Hour Bacterial Cultivation From Positive  
Blood Cultures im Journal of Current Microbiology**



## Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Using the MicroScan System: Performance Evaluation of a 4-Hour Bacterial Cultivation From Positive Blood Cultures

Alexander Krüger<sup>1,2</sup> · Barbara Körber-Irrgang<sup>1</sup> · Greta Flüh<sup>1</sup> · Jörg Gielen<sup>2</sup> · Claus-Jürgen Scholz<sup>1</sup> · Hilmar Wisplinghoff<sup>1,3</sup> · Nathalie Jazmati<sup>1,2</sup>

Received: 22 April 2024 / Accepted: 4 June 2024

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

### Abstract

A reliable and above all, rapid antimicrobial susceptibility test (AST) is required for the diagnostics of blood stream infections (BSI). In this study, resistance testing using DxM MicroScan WalkAway (MicroScan) from a 4-h subculture is compared with the standard overnight culture (18–24 h). Randomly selected positive blood cultures (PBC,  $n=102$ ) with gram-negative bacteria were included in the study. PBC were sub-cultured onto appropriate agar plates and AST by MicroScan was performed after 4 h of incubation and repeated after incubation for 18–24 h as standard. In a total of 1909 drug–strain pairs, the 4-h subculture approach showed a very high essential agreement (EA) (98.6%) and categorical agreement (CA) (97.1%) compared with the standard. The incidence of minor error (mE), major error (ME), very major error (VME), and adjusted very major error (aVME) was 1.1%, 0.4%, 12.9%, and 5.3%, respectively. In summary, the use of 4-h subcultures for resistance testing with the MicroScan offers a very reliable and easy to realize time saving when testing positive blood cultures with gram-negative bacteria.

### Introduction

Bloodstream infections (BSI) resulting in sepsis or septic shock cause nearly 20% of all deaths worldwide each year, which is more than one death per minute [1, 2] and nearly half of all hospital mortalities [3, 4]. Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction due to a dysregulated host response to infection [5] and presents a medical as well as diagnostic challenge. Sepsis, if not treated, can lead to shock, multi-organ failure, or even death [6]. In total sepsis with gram-negative bacteria is more common than with gram-positive bacteria [7].

Due to the rise of multidrug-resistant bacteria failure of empirical treatment with broad-spectrum antibiotics rise. To retain an effective therapy, identification and antimicrobial susceptibility testing of the sepsis causative microorganism are needed [8]. However, rapid administration of appropriate antibiotics is crucial for effective treatment of sepsis and delayed therapy is related with worse clinical outcome, respectively, a significantly increased mortality [9–13]. It is recommended to start antibiotic treatment within the first one to three hours since first symptoms of septic disease profile; otherwise, mortality rates increase by approximately 8% per hour [14, 15]. Thus, identification of bacterial pathogens and antimicrobial susceptibility testing (AST) using blood cultures is mandatory. While identification of pathogens is speed up by matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight (MALDI-TOF) and can be done directly from positive blood cultures (BCs). The current standard AST is based on the overnight cultivation of microorganisms from positive BCs and subsequent determination of the minimal inhibitory concentration of drugs.

Conventional antimicrobial susceptibility testing requires 36 to 72 h until final report [16]. Particularly in the setting of bacteremia with multi-drug-resistant organisms, this has been shown to impact patients' outcome negatively [16, 17].

✉ Alexander Krüger  
a.krueger1010@googlemail.com

<sup>1</sup> Wisplinghoff Laboratories, Horbeller Straße 18-20, 50858 Cologne, Germany

<sup>2</sup> Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Goldenfelsstr, 19-21, 50935 Cologne, Germany

<sup>3</sup> Institute for Virology and Medical Microbiology, Witten/Herdecke University, Witten, Germany

In order to deal with the time pressure in sepsis, it is essential to shorten time of diagnostic AST methods with regard to fast and reliable susceptibility results. In view of that, the aim of this study was to investigate if the conventional overnight cultivation before AST by the DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, CA US) can be shortened to a 4-h cultivation.

## Materials and Methods

### Clinical Blood Culture Samples

From February to April 2021, all blood cultures bottles (BacT/ALERT FN Plus/BacT/ALERT FA Plus, Biomérieux, Nürtingen, Germany) sent for microbiological diagnosis were screened for gram-negative bloodstream infections (BSIs). After receipt, the blood culture bottles (BCBs) were immediately incubated in the BacT/ALERT 3D Microbial Detection Systems (Biomérieux, Nürtingen, Germany) until positivity was indicated. Gram stain was performed and BCBs with gram-negative rods were included in the study subsequently with a limit of one bottle per patient. Time to positivity (TTP) and bottle type (aerobe or anaerobe BCB) were documented. Cell counts of every positive BCs, within the study, were performed with the fully automated flow cytometer Sysmex UF-5000 according to the protocol of Mancini et al. [18]. Therefore, a  $2 \times 10^3$  dilution (10  $\mu$ l of blood culture in 5 ml of 0.9% NaCl) was chosen for quantification of bacteria in BCs.

Subsequently, 10  $\mu$ l of the positive blood culture was sub-cultured onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood, chocolate agar, and Schaedler agar (all Becton Dickinson, Heidelberg, Germany BD) and inoculated plates were incubated at  $36 \pm 1$  °C under the respective conditions.

All agar plates were checked for growth after 4 h at  $36 \pm 1$  °C of incubation. Bacterial growth/colonies after 4 h were identified to species level using MALDI-TOF MS (MBT Smart, software MBT Compass 4.1, MBT Compass Library revision F version 9 database, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) and colonies were used for rapid AST (see below). Agar plates were placed back into the incubator for further overnight incubation (18–24 h). Only the following gram-negative organisms from monomicrobial samples were included for AST performance evaluation: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Pseudomonas aeruginosa*.

All clinical bacterial isolates included in the study were stored at -80 °C.

### Antimicrobial Susceptibility Testing

AST was performed within 16 h of BCBs being flagged as positive by the BacT/ALERT system using the automated microbroth dilution system DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea, CA, US). According to manufacturer's instruction, AST should be performed from overnight cultures (18–24 h). Thus, AST from overnight cultures (further referred to as overnight WalkAway) served as reference method for our study. Comparatively, the same test was performed using a 4-h subculture (in the following text mentioned as 4-h WalkAway).

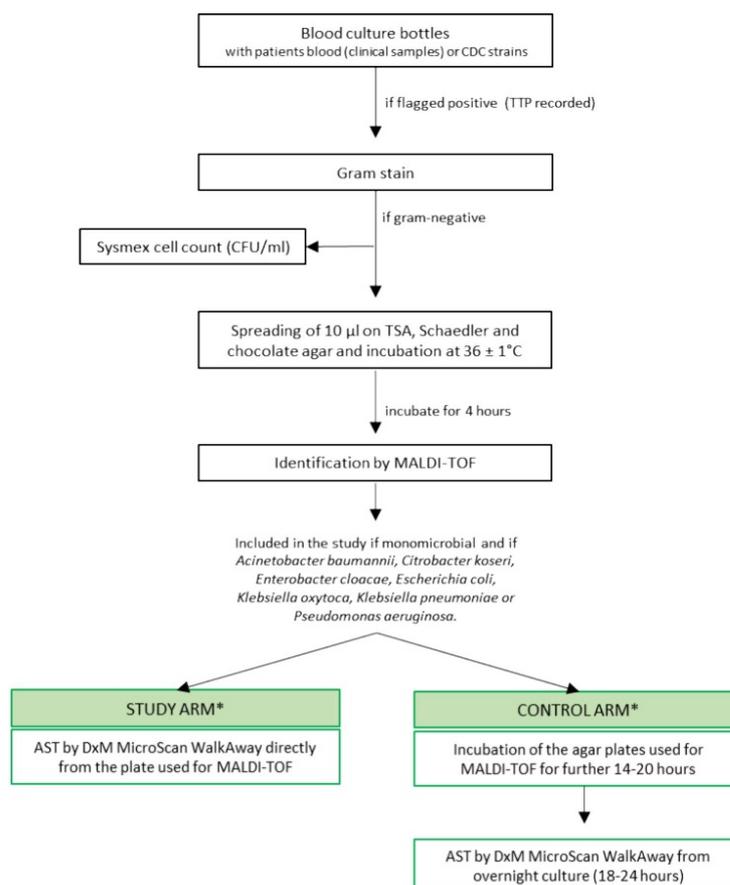
Discrepancies in the interpretive category of MICs between the 4-h WalkAway and the reference method overnight WalkAway were resolved using MTS™ gradient strips (MIC Test Strip; Liofilchem S.r.l. Italy). MTS™ tests were performed according to the manufactures' instructions. For comparative evaluation, such MIC results of the MTS™ test that were in between of two  $\log_2$  dilution steps were upscaled to the respective next higher  $\log_2$  dilution step.

The complete workflow is graphically illustrated in Fig. 1.

### Antibiotic Panels for AST

For both, the 4-h and the overnight WalkAway method, MicroScan MDR1 96-well broth microdilution panels (Beckman Coulter, Brea, CA, US) were used for susceptibility testing. The panel contain 35 antibiotics, among them up to 20 antibiotics (listed with concentration range as follows) were further evaluated in our study: amikacin (8–16 mg/L), amoxicillin–clavulanic acid (8/2–32/2 mg/L), ampicillin (4–8 mg/L), aztreonam (1–4 mg/L), cefepime (0.5–8 mg/L), cefotaxime (1–32 mg/L), ceftazidime (1–32 mg/L), ceftazidime–avibactam (2/4–8/4 mg/L), ceftolozane–tazobactam (1/4–4/4 mg/L), cefuroxime (4–8 mg/L), ciprofloxacin (0.06, 0.25–1 mg/L), ertapenem 0.12, 0.5–1 mg/L, gentamicin (2–4 mg/L), imipenem (1–8 mg/L), levofloxacin (0.5–1 mg/L), meropenem (0.12, 1–32 mg/L), piperacillin (8–16 mg/L), piperacillin–tazobactam (8/4–16/4 mg/L), tobramycin (2–4 mg/L), and trimethoprim–sulfamethoxazole (2/38–4/76 mg/L). Not listed antibiotics were excluded since (i) not all species had breakpoints for every antibiotic, (ii) for some species–drug combinations breakpoints were not included in the respective concentration range of the plate, and (iii) ESBL- and Amp C-producing bacteria were not analyzed.

**Fig. 1** Study workflow. \*Discrepancies in the interpretive category of MICs between the 4-h WalkAway and the reference method overnight WalkAway were resolved using MTS gradient strips. AST antimicrobial susceptibility testing, TTP time to positivity, MALDI-TOF matrix-assisted laser desorption ionization—time of flight, TSA Tryptic soy agar



### Preparation and AST Procedure for Spiked Blood Cultures

In addition to the clinical blood culture samples 10 highly resistant gram-negative challenge strains from the CDC & FDA Antimicrobial Resistance (AR) Isolate Bank were tested from spiked blood cultures. The CDC & FDA AR strains and respective resistance determinants are listed in Supplementary Table S1.

The strains were sub-cultured from freezer stocks onto blood agar plates. Colonies of a pure overnight culture were diluted into sterile saline to prepare a bacterial suspension according to a 0.5 McFarland standard (approximately  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL). The suspension was further diluted by  $10^6$  into sterile saline ( $10^2$  CFU/mL). A BacT/ALERT FA Plus aerobic blood culture bottle was inoculated with one mL

of the  $10^2$  CFU/mL dilution. Spiked blood culture bottles were loaded for incubation into the BacT/ALERT until they flagged positive and TTPs were noted.

AST of positive spiked blood cultures was performed with the 4-h WalkAway only. The workflow was identical to that of the clinical blood culture samples (Fig. 1). For data analysis reference, MICs provided by the CDC & FDA were used as comparator. Interpretive categories (S, I, R) were evaluated according to EUCAST guidelines 2020 [19].

### Data Analysis and Statistics

Results of the 4-h WalkAway were compared to the results obtained by the reference method (overnight WalkAway) or if required by the MTS™ for discrepancy resolution. For all methods, interpretive categories (S, I, R) were determined

according to the guidelines of the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) from 2020 [19]. Intrinsically resistant bacteria were accounted as resistant according to EUCAST guidance document “Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes version 3.2, February 2020.”

The total category agreement (CA) was defined as the percentage of isolates classified in the same interpretive category when determined with the 4-h WalkAway system and the reference method or MTS™. Category discrepancies were classified as follows: (i) very major error (VME) and adjusted VME (aVME) when the test system indicated susceptibility and the reference method or MTS™ indicated resistance (aVME; only category discrepancies based on more than  $\pm 1$  dilution step were included); (ii) major error (ME) when the test system indicated resistance and the reference method or MTS™ indicated susceptibility; (iii) minor error (mE) when the test system reported “susceptible increased dosage” (former intermediate) and the reference method or MTS™ “susceptible” or “resistant” or the test system reported “susceptible” or “resistant” and the reference method or MTS™ “susceptible increased dosage.” Essential agreement was defined as the percentage of MIC results that fell within plus or minus one  $\log_2$  dilution step when compared to the reference method or MTS™. Most antibiotics on the test plate showed limited concentration ranges that did not allow for assessment of evaluable EA (only on-scale MICs are considered). Thus, on-scale MICs (MICs within the concentration range) as well as off-scale MICs (MICs below or equal the lowest concentration or above the highest concentration) were considered for EA evaluation. Moreover, if a MIC of the MTS™ gradient strip or – for spiked samples – the CDC & FDA AR isolate bank MIC was below or above the limit of quantification (LOQ) for the test method, this was counted as in agreement.

The concentration ranges of ciprofloxacin, ertapenem, and meropenem included skipped concentrations. If a MIC of the 4-h WalkAway and/or the reference method detected a MIC above the highest skipped concentration the respective strain was excluded from EA calculation. Likewise, if a strain showed a MIC, which was falling in the area of technical uncertainty (ATU), it was excluded for CA as well as for error calculation.

### Statistical Analysis

Mean and median were used as descriptive summary statistics for continuous variables (i.e., TTP, bacterial count) depending on distributional characteristics; categorical variables (bottle type, species, antibiotic drug, error types) were shown as percentages.

Predictive variables TTP, bacterial count, bottle type, species, and antibiotic drug as well as dependent variables

“occurrence of mE, ME, VME” (outcome parameters) were included as fixed effects along with a random intercept for strain ID in generalized linear-mixed models (GLMM) of binomial family. Association of predictive variables with the outcome was tested with a multi-way Analysis of Variance (ANOVA), considering a  $p$ -value of  $< 0.05$  as statistically significant. ATU was considered as no error in this analysis. All calculations were done with R version 4.1.2 (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) along with package lme4 [20].

## Results

### Clinical Strains

In the clinical part of the study, 143 routine BC samples with gram-negative bacteria were included. Forty-one samples were excluded because of polymicrobial cultures or because identification revealed a species that was not included in the study. Overall, an amount of 102 BCs and seven different gram-negative species were included and evaluated in the study. Among the 102 strains tested, *E. coli* (71.6%, 73/102) was the most common pathogen, followed by *K. pneumoniae* (17.6%, 18/102). Overall, 1909 tested strain–drug pairs, of which 10.9% (209/1909) were tested resistant with the reference method, were included in the analysis. In the 4-h WalkAway AST three *E. coli* strains had a MIC for ciprofloxacin within the area of technical uncertainty (ATU, 0.5 mg/L) and were excluded for calculation of CA as well as for error calculation. Using the reference method two of these strains were tested as susceptible (S) and one strain as susceptible at an increased dose (I).

The overall CA between the 4-h WalkAway and the reference method using clinical strains from positive BCs was very high at 97.1% (1851/1906) with 1.1% (21/1906) mE, 0.4% (7/1587) ME, and 12.9% (27/209) VME. aVME rate was 5.3% ( $n = 11$ ).

EA calculation was not possible for 15 of 1909 strain–drug pairs due to MIC values that were one  $\log_2$  dilution step above the highest skipped concentration of ciprofloxacin, ertapenem, or meropenem. The overall EA of evaluable strains was very high at 98.6% (1867/1894).

All performance parameters for the clinical strains are shown in detail in Table 1. For EA analysis, the distribution of all  $\log_2$  dilution differences between the 4-h and the overnight WalkAway/MTS™ per species is listed in detail in Supplementary Table S2 and also per antimicrobial drug in Supplementary Table S3.

According to the European standard for the evaluation of MIC test systems (EN ISO 20776-2:2022) [21], the systematic deviation was calculated to be -2.06% in our study (details shown in supplementary Table S2).

**Table 1** Overall performance of the 4-h WalkAway when compared to the overnight WalkAway (clinical blood cultures)

Study details or performance parameter	No. or percentage
<i>Study details</i>	
No. of species collected	7
No. of antibiotics tested <sup>a</sup>	19
No. of strains tested	102
No. of total strain–drug pairs	1909
No. of S strain–drug pairs <sup>b</sup>	1589
No. of I strain–drug pairs <sup>b</sup>	111
No. of R strain–drug pairs <sup>b</sup>	209
<i>Performance parameter</i>	
EA <sup>c,d,e</sup>	98.6 (1867/1894)
CA <sup>f</sup>	97.1 (1851/1906)
mE <sup>f</sup>	1.1 (21/1906)
ME <sup>f</sup>	0.4 (7/1587)
VME <sup>f</sup>	12.9 (27/209)

Abbreviations: S susceptible, I susceptible increased dosage, R resistant, EA essential agreement, CA category agreement, mE minor error, ME major error, VME very major error

<sup>a</sup>The number of antibiotics varies depending on the respective species

<sup>b</sup>The number of respective strain–drug pairs is the number evaluated by the reference method and MTS<sup>TM</sup> test (the latter was performed in case of discrepancies between 4-h WalkAway and the reference method)

<sup>c</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation

<sup>d</sup>Percentage (no.) of strains for which the difference in MICs regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1 \log_2$  dilution when compared to the reference method or MTS<sup>TM</sup>

<sup>e</sup>The concentration ranges of ciprofloxacin, ertapenem, and meropenem included skipped concentrations. If a MIC of the 4-h WalkAway and/or the reference method showed a MIC above the highest skipped concentration the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 15 strains

<sup>f</sup>In 4-h WalkAway testing 3 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. Two of the three strains were tested susceptible and one strain susceptible increased dosage with the reference method or MTS<sup>TM</sup>

Using the 4-h WalkAway, we found 27 VMEs among 209 resistant strain–drug pairs. Of these, 24 VMEs (88.9%) were found in *E. coli* (see Table 5). aVME rate was 5.3% (not depicted in Table)

With regard to the distribution of VMEs, a heterogeneous pattern is evident among the antimicrobial agents tested in this study. The majority of the 27 overall VMEs occurred with amoxicillin–clavulanic acid (EUCAST concentration) (29.6%, 8/27) followed by the aminoglycosides, gentamicin, and tobramycin (each 18.5%, 5/27) as well as piperacillin–tazobactam (11.1%, 3/27). Table 2 summarized

the distribution of all errors in relation to the antimicrobial drugs.

Distribution of EA/CA by drugs only concerning *E. coli*, which is the most common pathogen in our study, is presented in Supplementary Table S4. Overall, we record an EA of 99.1% and a CA of 97.5% for *E. coli*.

### Multi-Drug-Resistant (MDR) Strains

Because there were not so many resistant strains in the clinical part of the present study 10 multi-drug-resistant (MDR) strains from the CDC & FDA AR Isolate Bank were included in the challenge part of the study. We performed two test runs on each of the 10 strains. These results in a total of 292 strain–drug pairs with a resistance rate of 87.0% (254/292). The EA as well as the CA was high with a rate of 100.0% and 97.9%, respectively (see Table 3).

In the challenge part of the study no VME, 1 ME, and 2 mE in each of the two test runs could be detected. Table 4 summarizes all results for the challenge strains by each drug.

### Influence Factor Analysis of the Error Occurrence

The experimental setup and read-out allowed multiple variables to be specific the BCB-type (aerobe vs anaerobe), the bacterial count in the blood from the positive blood culture bottle, the TTP (time until a blood culture was flagged positive), the species, and the tested antibiotic drug to have a potential impact on the occurrence of mE, ME, and VME. Analysis of this multivariate setting using GLMMs revealed an association of TTP with the occurrence of VME ( $p = 0.0307$ , see Supplementary Table S5).

Drug–strain combinations with a VME had a higher TTP compared to drug strain combinations without VME (18 h  $\pm$  15 h vs. 13 h  $\pm$  9 h). The statistically estimated effect size for TTP was an odds ratio of 1.047 (95% CI 1.004 – 1.092,  $p = 0.031$ ) meaning that with every hour until bottle flagged positive the risk for a VME increases by approximately 4.7%.

Furthermore, ME occurred more often in *Pseudomonas aeruginosa* (30% ME, see Table 5) compared to other species (0.4% ME over all species). Accordingly, in our GLMM the species had a significant influence on the occurrence of ME ( $p = 0.0327$ , Supplementary Table S5). However, total number of *Pseudomonas aeruginosa* in our study was very low with only two isolates and all ME occurred in one of these isolates. All other variables did not show an influence on the occurrence of errors in our model.

**Table 2** AST results of the 4-h Walk-Away compared to the overnight Walk-Away by drugs

Drug	No. of strains with AST results of the reference method					% Agreement (no.)			% (no.) of errors			
	Total	Total used for EA calc	Total used for CA and error calc	S	I	R	EA <sup>ab</sup>	CA	mE	ME	VME	ATU <sup>c</sup>
Amikacin	102	102	102	97		5	100.0 (102)	98.0 (100)	n.a	0 (0)	40.0 (2)	
Amoxicillin-clavulanic acid (EUCAST)	99	99	99	72		27	96.0 (95)	91.9 (91)	n.a	0 (0)	29.6 (8)	
Ampicillin	99	99	99	44		55	99.0 (98)	99.0 (98)	n.a	0 (0)	1.8 (1)	
Cefepime	101	101	101	92	4	5	99.0 (100)	99.0 (100)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)	
Cefotaxime	99	99	99	92		7	99.0 (98)	99.0 (98)	0 (0)	1.1 (1)	0 (0)	
Ceftazidime	101	101	101	92	2	7	97.0 (98)	97.0 (98)	3.0 (3)	0 (0)	0 (0)	
Ceftazidime-avibactam	101	101	101	101			99.0 (100)	99.0 (100)	n.a	1.0 (1)	0 (0)	
Ceftiozane-tazobactam	101	101	101	99		2	99.0 (100)	99.0 (100)	n.a	1.0 (1)	0 (0)	
Cefuroxime IV	95	95	95	87		8	100.0 (95)	97.9 (93)	2.1 (2)	0 (0)	0 (0)	
Ciprofloxacin	102	90 <sup>d</sup>	99 <sup>e</sup>	84	3	12	98.9 (89)	99.0 (98)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)	3.0 (3)
Ertapenem	99	98 <sup>e</sup>	99	98		1	97.9 (96)	98.0 (97)	n.a	2.0 (2)	0 (0)	
Gentamicin	100	100	100	93		7	100.0 (100)	95.0 (95)	n.a	0 (0)	71.4 (5)	
Imipenem	102	102	102	99	2	1	99.0 (101)	99.0 (101)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)	
Levofloxacin	102	102	102	88	2	12	99.0 (101)	97.1 (99)	2.0 (2)	0 (0)	8.3 (1)	
Meropenem	102	100 <sup>f</sup>	102	101		1	99.0 (99)	99.0 (101)	0 (0)	1.0 (1)	0 (0)	
Piperacillin	101	101	101	61	7	33	98.0 (99)	90.1 (91)	89.1 (9)	1.6 (1)	0 (0)	
Piperacillin-tazobactam	101	101	101	92	3	6	96.0 (97)	95.0 (96)	2.0 (2)	0 (0)	50.0 (3)	
Tobramycin	102	102	102	94		8	99.0 (101)	95.1 (97)	n.a	0 (0)	62.5 (5)	
Trimethoprim-sulfamethoxazole	100	100	100	88		12	98.0 (98)	98.0 (98)	0 (0)	0 (0)	16.7 (2)	

In general, S, I, and R categorization was based on MIC results which were evaluated by the reference method or MTS™ (the latter was performed in case of discrepancies between the 4-h Walk-Away and the overnight Walk-Away)

Abbreviations: calc., calculation, S susceptible, I susceptible increased dosage, R resistant, EA essential agreement, CA category agreement, mE minor error, ME major error, VME very major error, n.a. not applicable

<sup>a</sup> Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation

<sup>b</sup> Percentage (no.) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than ± 1 log<sub>2</sub> dilution

<sup>c</sup> In 4-h Walk-Away testing 3 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. Two strains were tested susceptible and one strain susceptible increased dosage with the reference method

<sup>d</sup> The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was ≤ 0.06 mg/L and 0.25–1 mg/L (the MIC of 0.125 mg/L was skipped). If a MIC of the 4-h Walk-Away and/or reference method was 0.25 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *A. baumannii* strain, 5 *E. coli* strains, 5 *K. pneumoniae* strains, and 1 *P. aeruginosa* strain

<sup>e</sup> The concentration range of ertapenem on the AST plate was ≤ 0.125 mg/L and 0.5–1 mg/L (the MIC 0.25 mg/L was skipped). If a MIC of the 4-h Walk-Away and/or reference method was 0.5 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain

<sup>f</sup> The concentration range of meropenem on the AST plate was ≤ 0.125 mg/L and 1–32 mg/L (the MIC values 0.25 mg/L and 0.5 mg/L were skipped). If a MIC of the 4-h Walk-Away and/or reference method was 1 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain and 1 *P. aeruginosa* strain

**Table 3** Overall performance of the 4-h WalkAway with blood cultures spiked with CDC & FDA AR bank isolates compared to CDC & FDA AR reference data

Study details or performance parameter	No. or percentage		
	1st test	2nd test	1st and 2nd test
<b>Study details</b>			
No. of species tested	6	6	6
No. of antibiotics tested <sup>a</sup>	17	17	17
No. of strains tested	10	10	20
No. of total strain–drug pairs	146	146	292
No. of S strain–drug pairs <sup>b</sup>	17	17	34
No. of I/ATU strain–drug pairs <sup>b,c</sup>	2	2	4
No. of R strain–drug pairs <sup>b</sup>	127	127	254
<b>Performance parameter</b>			
EA <sup>d,e,f,g</sup>	100.0 (135/135)	100.0 (135/135)	100.0 (270/270)
CA <sup>c</sup>	97.9 (142/145)	97.9 (142/145)	97.9 (284/290)
mE <sup>c</sup>	1.4 (2/145)	1.4 (2/145)	1.4 (4/290)
ME <sup>c</sup>	5.9 (1/17)	5.9 (1/17)	5.9 (2/34)
VME <sup>c</sup>	0 (0/127)	0 (0/127)	0 (0/254)

Abbreviations: S susceptible, I susceptible increased dosage, R resistant, EA essential agreement, CA category agreement, mE minor error, ME major error, VME very major error

<sup>a</sup>The number of antibiotics varies depending on the respective species

<sup>b</sup>The number of respective strain–drug pairs is the number based on CDC & FDA AR reference data. EUCAST clinical breakpoints were used for categorization

<sup>c</sup>CDC & FDA AR reference MIC of one *K. aerogenes* strain for ciprofloxacin was falling in the area of technical uncertainty (ATU) and was excluded for CA as well as for error calculation

<sup>d</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation

<sup>e</sup>Percentage (no.) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1 \log_2$  dilution

<sup>f</sup>The concentration ranges of ciprofloxacin, ertapenem, and meropenem included skipped concentrations. If a MIC of the 4-h WalkAway and/or CDC & FDA AR data showed a MIC above the highest skipped concentration, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 3 strains each in test one and two

<sup>g</sup>For meropenem and CDC & FDA AR MIC data 8 strains in each test had MIC values of  $> 8$  mg/L or  $> 16$  mg/L. On AST plates, highest concentration is 32 mg/L for meropenem, resulting in MIC values of  $> 32$  mg/L if a strain grows at 32 mg/L. Thus, the 8 strains were excluded from EA calculation

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study that compared AST determined by the DxM MicoScan WalkAway from an agar plate incubated for only 4 h to that from a standard overnight culture using EUCAST for interpretation of MIC results.

We detected a very high overall EA and CA between the 4-h WalkAway and the reference method when testing the clinical strains (98.6% and 97.1%, respectively) as well as in the test of the multi-drug-resistant challenge strains (100% and 97.9%, respectively).

In a recent study the DxM MicroScan WalkAway was used for AST directly from positive BCs. However, this approach only leads to a CA of 92.3% compared to the standard protocol [22]. Using other automated AST systems such as the Accelerate Pheno system and VITEK 2 directly from positive BCs resulted in CA of 93.4% and 97.4%, respectively [23]. In these studies, EA was not assessed.

However, in our approach, we found a high amount of VMEs in the clinical part of our study (12.9%,  $n = 27$ ). In contrast, there was no VME observed in the challenge part of our study, where predominantly resistant strains were tested. In our study, the highest number of VMEs occurred in testing amoxicillin–clavulanic acid. This may be attributed to a high number of strains with a MIC around the EUCAST breakpoint (susceptible  $\leq 8$  mg/mL, resistant  $> 8$  mg/mL). It should be considered that EUCAST has no intermediate category for amoxicillin–clavulanic acid. Thus, measurement inaccuracies of only one MIC-step lead to a VME.

Accordingly, the overall aVME rate in our study was only 5.3%.

In a study of Soares et al. with *E. coli* strains, amoxicillin–clavulanic acid MICs around the EUCAST breakpoints resulted in VME percentages ranging from 10.5% for the Phoenix System (Becton Dickinson) to 27.3% for the ETEST® [24]. In contrast, the clinical standards institute

**Table 4** AST results of the 4-h Walk-Away with blood cultures spiked with CDC & FDA AR strains compared to CDC & FDA AR reference data

Drug	No. of strains with CDC & FDA AR reference AST data		Total used for CA and S error calc		Total used for EA calc		Total used for CA and S error calc		% Agreement (no.)		% (no.) of errors			
	Total	Total used for EA calc	Total used for error calc	S	I	R	EA <sup>a,b</sup>	CA	mE	ME	VME	ATU <sup>c</sup>		
<i>1st test</i>														
Amikacin	10	10	10	3		7	100.0 (10)	90.0 (9)	n.a	33.3 (1)	0 (0)			
Ampicillin	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Aztreonam	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Cefepime	8	8	8			8	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftaxime	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftazidime	8	8	8			8	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftazidime-avibactam	8	8	8	5		3	100.0 (8)	100.0 (8)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Ceflozoxane-tazobactam	8	8	8	1		7	100.0 (8)	100.0 (8)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Ciprofloxacin	10	9 <sup>d</sup>	9 <sup>c</sup>			9	100.0 (9)	100.0 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10.0 (1)		
Ertapenem	7	6 <sup>e</sup>	7	1		6	100.0 (6)	100.0 (7)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Gentamicin	9	9	9	1		8	100.0 (9)	100.0 (9)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Imipenem	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Levofloxacin	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Meropenem	10	1 <sup>f,g</sup>	10	1	1	8	100.0 (1)	80.0 (8)	20.0 (2)	0 (0)	0 (0)			
Piperacillin-tazobactam	8	8	8	1		7	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Tobramycin	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Trimethoprim-sulfamethoxazole	9	9	9			9	100.0 (9)	100.0 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
<i>2nd test</i>														
Amikacin	10	10	10	3		7	100.0 (10)	90.0 (9)	n.a	33.3 (1)	0 (0)			
Ampicillin	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Aztreonam	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Cefepime	8	8	8			8	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftaxime	7	7	7			7	100.0 (7)	100.0 (7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftazidime	8	8	8			8	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Ceftazidime-avibactam	8	8	8	5		3	100.0 (8)	100.0 (8)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Ceflozoxane-tazobactam	8	8	8	1		7	100.0 (8)	100.0 (8)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Ciprofloxacin	10	9 <sup>d</sup>	9 <sup>c</sup>			9	100.0 (9)	100.0 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	10.0 (1)		
Ertapenem	7	6 <sup>e</sup>	7	1		6	100.0 (6)	100.0 (7)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Gentamicin	9	9	9	1		8	100.0 (9)	100.0 (9)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Imipenem	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Levofloxacin	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Meropenem	10	1 <sup>f,g</sup>	10	1	1	8	100.0 (1)	80.0 (8)	20.0 (2)	0 (0)	0 (0)			
Piperacillin-tazobactam	8	8	8	1		7	100.0 (8)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			
Tobramycin	10	10	10	1		9	100.0 (10)	100.0 (10)	n.a	0 (0)	0 (0)			
Trimethoprim-sulfamethoxazole	9	9	9			9	100.0 (9)	100.0 (9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)			

**Table 4** (Continued)

Abbreviations: *calc.*, calculation, *S* susceptible, *I* susceptible increased dosage, *R* resistant, *EA* essential agreement, *CA* category agreement, *mE* minor error, *ME* major error, *VME* very major error, *n.a.* not applicable

<sup>a</sup> Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation

<sup>b</sup> Percentage (no.) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1 \log_2$  dilution

<sup>c</sup> CDC & FDA AR reference MIC of one *K. aerogenes* strain for ciprofloxacin was falling in the area of technical uncertainty (ATU) and was excluded for CA as well as for error calculation

<sup>d</sup> The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was  $\leq 0.06$  mg/L, 0.25–1 mg/L (the MIC of 0.125 mg/L was skipped), if a MIC of the 4-h WalkAway and/or CDC & FDA AR MIC was 0.25 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *K. aerogenes* strain

<sup>e</sup> The concentration range of ertapenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/L, 0.5–1 mg/L (the MIC of 0.25 mg/L was skipped), if a MIC of the 4-h WalkAway and/or CDC & FDA AR MIC was 0.5 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain

<sup>f</sup> The concentration range of meropenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/L and 1–32 mg/L (the MIC values 0.25 mg/L and 0.5 mg/L were skipped), if a MIC of the 4-h WalkAway and/or CDC & FDA AR MIC was 1 mg/L, the respective strain was excluded for EA. This was the case for 1 *K. aerogenes* strain

<sup>g</sup> For meropenem and CDC & FDA AR MIC data 8 strains in each test had MIC values of  $> 8$  mg/L or  $> 16$  mg/L. On AST plates used in the study the highest concentration was 32 mg/L for meropenem, resulting in MIC values of  $> 32$  mg/L if a strain grows at 32 mg/L. Thus, the 8 strains were excluded from EA calculation

(CLSI) interpose an intermediate category for beta-lactamase/beta-lactamase inhibitors like amoxicillin–clavulanic acid (susceptible  $\leq 8/4$  mg/mL; intermediate = 16/8 mg/mL; resistant  $\geq 32/16$  mg/mL), which results in minor and not in very major errors [25].

This is in line with the finding that Jacobs et al. report the largest number of mE in ampicillin–sulbactam ( $n = 10$ ) (amoxicillin–clavulanic acid was not tested) and only report 0.4% ( $n = 5$ ) VME when using CLSI standard for interpretation of MIC results [22].

In general, beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations appear to be error prone if MICs are around the breakpoint in ampicillin–sulbactam [22, 24, 26]. In our opinion, this arises the demand for the insertion of an ATU for amoxicillin–clavulanic acid MICs—like EUAST has already implemented for disk diffusion of this antibiotic drug [19].

The second most common VMEs in our study were found in testing aminoglycosides – probably for the same reasons as discussed above for amoxicillin–clavulanic acid.

The European standard for the evaluation of MIC test systems EN ISO 20776-2:2007 already has addressed this problem and defines test systems with a high EA of  $> 97\%$  as having acceptable accuracy even if the VME rate is  $> 3\%$  [27]. The 4-h WalkAway is meeting these criteria and is therefore considered to have an adequate accuracy for the use in routine AST.

We found significantly higher TTPs in drug–species combinations with VMEs compared to those without VMEs. TTP is in part related to the number of organisms initially inoculated into the bottle. However, other factors affect time to positivity including organism identity, volume of blood collected, and presence of antibiotics in the blood. A possible explanation for our finding might be that the presence of antibiotics in the blood culture bottle or, respectively, in the patient selects and propagates clones with a MIC near a breakpoint, causing test systems to have a higher probability of failure for these isolates.

Compared to EUCAST RAST [28], more strain–drug combinations can be tested/reported using the 4-h WalkAway. Furthermore, reading plates manually after short incubation (as it is done using EUCAST RAST) is complicated by thin (although confluent) and sometimes hazy growth with poorly demarcated zone edges and requires. Furthermore, zone diameters change during incubation and with short incubation the margin between susceptible and resistant populations is less pronounced—therefore very well-trained staff is indispensable.

Limitations of our study include that it was performed in a single microbiological laboratory in Germany and that essential agreement assessment was limited by the range of antimicrobial concentrations present in the trays used. Furthermore, we did not analyze gram-positive bacteria

**Table 5** AST results of the 4-h Walk-Away compared to the overnight Walk-Away for 102 clinical gram-negative strains and all drugs

Species	No. of strains	No. of tested antibiotics per species	No. of AST results of the reference method		% agreement (no.)		% (no.) of errors			Comments			
			Total	Total used for EA calc	Total used for CA and error calc	EA <sup>ab</sup>	CA	mE	ME		VME		
<i>E. coli</i>	73	19	1387	1380 <sup>cd,e</sup>	1384 <sup>f</sup>	1164 <sup>f</sup>	150	99.1 (1367)	97.5 (1349)	0.7 (10)	0.1 (1)	16.0 (24)	mE: PIP (2), CTZ (2), CUR (2), LEV (2) CIP (1), PIT (1); ME: ERT (1); VME: AMC (7), GEN (5), TOB (5), AMI (2), PIT (2), TRS (2), AMP (1)
<i>K. pneumoniae</i>	18	19	342	337 <sup>c</sup>	342	285	20	98.5 (332)	97.7 (334)	0.9 (3)	0.7 (2)	8.1 (3)	mE: PIP (3); ME: ERT (1), PIP (1); VME: PIT (1), AMC (1), LEV (1)
<i>K. oxytoca</i>	4	19	76	76	76	66	4	98.7 (75)	97.4 (74)	2.6 (2)	1.5 (1)	0 (0)	mE: PIP (2); ME: CTA (1)
<i>E. cloacae</i>	3	18	54	54	54	41	0	100.0 (54)	100.0 (54)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	no errors
<i>P. aeruginosa</i>	2	12	24	22 <sup>cd,e</sup>	24	10	12	63.6 (14)	66.7 (16)	20.8 (5)	30.0 (3)	0 (0)	mE: CEP (1), CTZ (1), IMI (1), PIP (1), PIT (1); ME: CTV (1), CTT (1), MER (1)
<i>C. koseri</i>	1	18	18	18	18	16	1	100.0 (18)	94.4 (17)	5.6 (1)	0 (0)	0 (0)	mE: PIP (1)
<i>A. baumannii</i>	1	8	8	7 <sup>c</sup>	8	5	2	100.0 (7)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	no errors
Overall	102	n.e	1909	1894	1906	1587	110	98.6 (1867)	97.1 (1851)	1.1 (21)	0.4 (7)	12.9 (27)	mE: PIP (9), CTZ (3), PIT (2), CUR (2), LEV (2), CEP (1), CIP (1), IMI (1); ME: ERT (2), CTV (1), CTV (1), MER (1), CTA (1), PIP (1); VME: AMC (8), GEN (5), TOB (5), PIT (3), AMI (2), TRS (2), AMP (1), LEV (1)

**Table 5** (continued)

Abbreviations: *calc.* calculation, *S* susceptible, *I* susceptible increased dosage, *R* resistant, *EA* essential agreement, *CA* category agreement, *mE* minor error, *ME* major error, *VME* very major error, *n.e.* not evaluable, *AM* amikacin, *AMC* amoxicillin–clavulanic acid, *AMP* ampicillin, *CEP* cefepime, *CTA* ceftazidime, *CTZ* ceftazidime–avibactam, *CTT* ceftiozane–tazobactam, *CUR* cefuroxime, *CIP* ciprofloxacin, *ERT* ertapenem, *GEN* gentamicin, *IMI* imipenem, *LEV* levofloxacin, *MEP* meropenem, *PIP* piperacillin–tazobactam, *TOB* tobramycin, *TRK* trimethoprim–sulfamethoxazole

In general, *S*, *I*, and *R* categorization was based on MIC results which were evaluated by the reference method or MTS™ (the latter was performed in case of discrepancies between the 4-h and the overnight WalkAway)

<sup>a</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate, MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation

<sup>b</sup>Percentage (no.) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than ± 1 log<sub>2</sub> dilution

<sup>c</sup>The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was ≤ 0.06 mg/L and 0.25–1 mg/L (the MIC of 0.125 mg/L was skipped). If a MIC of the 4-h WalkAway and/or reference method was 0.25 mg/L and the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *A. baumannii* strain, 5 *E. coli* strains, 5 *K. pneumoniae* strains, and 1 *P. aeruginosa* strain

<sup>d</sup>The concentration range of ertapenem on the AST plate was ≤ 0.125 mg/L and 0.5–1 mg/L (the MIC 0.25 mg/L was skipped). If a MIC of the 4-h WalkAway and/or reference method was 0.5 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain

<sup>e</sup>The concentration range of meropenem on the AST plate was ≤ 0.125 mg/L and 1–32 mg/L (the MIC values 0.25 mg/L and 0.5 mg/L were skipped). If a MIC of the 4-h WalkAway and/or reference method was 1 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain and 1 *P. aeruginosa* strain

<sup>f</sup>In the 4-h WalkAway testing, 3 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. Two strains were tested susceptible and one strain susceptible increased dosage with the reference method

but only the most common gram-negative bacteria. Due to randomization, we had mostly *E. coli* so that the general statement about all other species is limited (especially for non-fermenters), nevertheless the study represents the reality of species distribution and we also used CDC & FDA AR strains of highly resistant species to show the performance of particularly challenging strains. We only included 20 of the 35 antibiotics from the used AST panel.

In addition, AST was performed within 16 h of BCB being flagged positive. The exact time difference was not determined for each BCB and could have an influence on the AST that we cannot quantify.

The European standard for the evaluation of MIC test systems (EN ISO 20776-2:20022) defines test systems as having acceptable accuracy if the MIC test system has an EA of > 90% and a systemic deviation of less than ± 30% compared to the reference method [21]. In our study, systemic deviation was as low as -2.06%. Furthermore, except for *P. aeruginosa*, the 4-h-Walkaway showed EAs of > 98% in total and for all analyzed species.

In conclusion, we believe that 4-h subculture from positive blood cultures of the studied *Enterobacterales* with the DxM MicroScan WalkAway is a reliable and accurate AST approach.

Time saving of about 14 to 20 h is achieved without implementing new methodologies or extensive training for laboratory staff. In addition, in our laboratory an identification of the species by MALDI-TOF is regularly performed after 4 h of cultivation and AST can be performed from the same culture without additional arising expenses.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00284-024-03768-9>.

**Acknowledgements** Parts of the data were submitted to the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2024, Barcelona, Spain. We thank the laboratory staff of Wisplinghoff Laboratories for general assistance.

**Author Contribution** N.J. received payments for lectures for the Ärztekammer Nordrhein and is part of the directory board of jUNITE (unpaid) e.V.; H.W. received payments for lectures from Thermo Fisher Scientific and BioMérieux and CCS received support for attending meetings from Thermo Fisher Scientific and BioMérieux, participated on data safety monitoring board or advisory board for BioMérieux and Specific technologies, and received equipment and material by BioMérieux and Specific technologies. All other authors have none to declare.

**Funding** The study was conducted without financial or correspondent support.

**Declarations**

**Ethical statement** The study has been performed in accordance with ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. The involvement of an ethics committee was not required for the chosen study design.

## References

- Fleischmann C, Scherag A, Adhikari NK et al (2016) Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current estimates and limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 193(3):259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>
- Cribbs SK, Martin GS (2009) Going global with sepsis: the need for national registries. *Crit Care Med* 37(1):338–340. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181934fab>
- Liu V, Escobar GJ, Greene JD et al (2014) Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA* 312(1):90–92. <https://doi.org/10.1001/jama.2014.5804>
- Rhee C, Jones TM, Hamad Y et al (2019) Prevalence, underlying causes, and preventability of sepsis-associated mortality in US acute care hospitals. *JAMA Netw Open*. 2(2):e187571. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2018.7571>
- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW et al (2016) The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA* 315(8):801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Bloos F, Thomas-Rüddel D, Rüddel H et al (2014) Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multicenter study. *Crit Care*. 18(2):R42. <https://doi.org/10.1186/cc13755>
- Alexandraki I, Palacio C (2010) Gram-negative versus Gram-positive bacteremia: what is more alarming? *Crit Care* 14(3):161. <https://doi.org/10.1186/cc9013>
- Niedermaier MS, Baron RM, Bouadma L et al (2021) Initial antimicrobial management of sepsis. *Crit Care*. 25(1):307. <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03736-w>
- Banerjee R, Humphries R (2021) Rapid antimicrobial susceptibility testing methods for blood cultures and their clinical impact. *Front Med (Lausanne)*. 8:635831. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.635831>
- Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G et al (2014) Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med* 42(8):1749–1755. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000330>
- Naucler P, Huttner A, van Werkhoven CH et al (2021) Impact of time to antibiotic therapy on clinical outcome in patients with bacterial infections in the emergency department: implications for antimicrobial stewardship. *Clin Microbiol Infect* 27(2):175–181. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.032>
- Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD et al (2012) Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 56(1):472–478. <https://doi.org/10.1128/AAC.00462-11>
- Seymour CW, Gesten F, Prescott HC et al (2017) Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med* 376(23):2235–2244. <https://doi.org/10.1056/NEJMoal703058>
- Sterling SA, Miller WR, Pryor J et al (2015) The impact of timing of antibiotics on outcomes in severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med* 43(9):1907–1915. <https://doi.org/10.1097/CCM.00000000000011>
- Kumar A, Ellis P, Arabi Y et al (2009) Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest* 136(5):1237–1248. <https://doi.org/10.1378/chest.09-0087>
- Opota O, Croxatto A, Prod'hom G et al (2015) Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect* 21(4):313–322. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.01.003>
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W et al (2017) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 43(3):304–377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
- Mancini S, Bodendoerfer E, Kolensnik-Goldmann N et al (2020) Evaluation of standardized automated rapid antimicrobial susceptibility testing of Enterobacterales-containing blood cultures: a proof-of-principle study. *J Antimicrob Chemother* 75(11):3218–3229. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa336>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software* 67(1):1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices (ISO 20776-2:2022).
- Jacobs MR, Good CE, Abdelhamed AM et al (2022) Accuracy of direct antimicrobial susceptibility testing of gram-negative bacteria from positive blood cultures using microscan system and value of using expert rules for  $\beta$ -Lactam agents. *Antimicrob Agents Chemother* 66(3):e0214821. <https://doi.org/10.1128/aac.02148-21>
- Schneider JG, Wood JB, Smith NW, Emery CL, Davis TE, Manaloor JJ, Bocian B, Schmitt BH (2019) Direct antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures: a comparison of the Accelerate Pheno and VITEK 2 systems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 95:114841. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.05.013>
- Soares A, Pestel-Caron M, Leysour de Rohello F et al (2020) Area of technical uncertainty for susceptibility testing of amoxicillin/clavulanate against *Escherichia coli*: analysis of automated system, Etest and disk diffusion methods compared to the broth microdilution reference. *Clin Microbiol Infect*. 26(12):1685.e1-1685.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.038>
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2020) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th informational supplement. CLSI document M100-S30. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM et al (2012) Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect* 18(11):E452–E458. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03980.x>
- International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2007. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices (ISO 20776-2:2007).
- Åkerlund A, Jonasson E, Matuschek E et al (2020) EUCAST rapid antimicrobial susceptibility testing (RAST) in blood cultures: validation in 55 European laboratories. *J Antimicrob Chemother*. 75(11):3230–3238

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Springer Nature or its licensor (e.g. a society or other partner) holds exclusive rights to this article under a publishing agreement with the author(s) or other rightsholder(s); author self-archiving of the accepted manuscript version of this article is solely governed by the terms of such publishing agreement and applicable law.



## 3.2 Performance evaluation of the Specific Reveal system for rapid antibiotic susceptibility testing from positive blood cultures containing Gram-negative pathogens



### Performance evaluation of the Specific Reveal system for rapid antibiotic susceptibility testing from positive blood cultures containing Gram-negative pathogens

Greta Ostermann,<sup>1</sup> Barbara Körber-Irrgang,<sup>1</sup> Alexander Krüger,<sup>1,2</sup> Pragma Singh,<sup>3</sup> Kenny Vo,<sup>4</sup> Jörg Gielen,<sup>2</sup> Ute Aurbach,<sup>1</sup> Hilmar Wisplinghoff,<sup>1,5</sup> Nathalie Jazmati<sup>1,2</sup>

**AUTHOR AFFILIATIONS** See affiliation list on p. 14.

**ABSTRACT** Rapid antimicrobial drug administration is crucial for the efficient treatment of sepsis or septic shock, but empirical therapy is limited by the increasing prevalence of multidrug-resistant bacteria. Thus, rapid and reliable antimicrobial susceptibility testing (AST) is needed to start appropriate antimicrobial drug administration as quickly as possible. In the present study, we evaluated the performance of the Reveal rapid AST system. From February to April 2021, 102 positive blood culture bottles (BCBs) from hospitalized patients with bacteremia caused by Gram-negative bacteria were included in the study. All isolates were tested by the Reveal system directly from the positive BCBs in comparison to the DxM MicroScan WalkAway. Essential agreement (EA) and category agreement (CA) were high with 98.5% and 97.1%, respectively. We also determined the susceptibility of 10 highly resistant CDC & FDA AR strains in duplicate. Here, EA was 99.6% and CA 97.9%. The average time to result by Reveal was 5.4 h  $\pm$  1.2 h compared to an average of 16 h by DxM MicroScan WalkAway for clinical strains and 3.8 h  $\pm$  1.2 h for more resistant CDC & FDA AR strains. Susceptibility determination with the Reveal rapid AST system directly from positive BCBs is for the frequently represented bug-drug combinations a reliable and accurate approach, meeting the European ISO guideline for the performance of AST systems. Moreover, AST directly from blood cultures performed with the Reveal system saves time when compared to the conventional AST, as no subculturing is needed and time to result is very short.

**KEYWORDS** Specific Reveal, VITEK Reveal, rapid AST, sepsis, blood culture

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction that is caused by a dysregulated host response due to an infection and can lead to shock, multiple organ failure, and death (1, 2). In Germany, e.g., 146,985 explicitly coded sepsis cases and 58,689 (39.9%) associated deaths were reported in 2016 (3). Recently, sepsis has been described as the most common cause of death worldwide, with 48.9 million sepsis cases each year and approximately 11 million deaths associated with sepsis (4). Rapid administration of appropriate antibiotics is crucial for effective treatment of sepsis, and delayed therapy is associated with worse clinical outcome (5–8). The “surviving sepsis campaign” recommends antibiotic treatment within the first hour of recognition of septic shock as well as severe sepsis (9). In septic shock, the initiation of antibiotic therapy within the first hour of documented hypotension increases survival by 79.9%, whereas survival decreases by about 8% every hour of delay over the ensuing 6 h (10). In the case of suspected sepsis, therapy is most often started empirically with broad-spectrum antibiotics even though patients who are infected with multidrug-resistant pathogens are more likely to initially receive an ineffective therapy (11). To provide an adequate antibiotic therapy, identification of bacterial pathogens and antimicrobial susceptibility testing (AST) are

**Editor** Erin McElvania, NorthShore University HealthSystem Department of Pathology and Laboratory Medicine, Evanston, Illinois, USA

Address correspondence to Nathalie Jazmati, n.jazmati@wisplinghoff.de.

Greta Ostermann and Barbara Körber-Irrgang contributed equally to this article. Author order was determined alphabetically.

N.J. received payments for lectures for the Ärztekammer Nordrhein and is part of the directory board of JUNITE (unpaid) e.V.; H.W. received payments for lectures for Thermo Fisher Scientific, BioMérieux, and CCS, received support for attending meetings by Thermo Fisher Scientific and BioMérieux, participated on data safety monitoring board or advisory board for BioMérieux and Specific technologies, and received equipment and material by BioMérieux and Specific technologies and has stock options in LBT innovations and Specific technologies. P.S. is under employment at Specific Diagnostics (Biomerieux). K.V. was under employment at Specific Diagnostics during the time of data analysis. All other authors declare no conflicts of interest.

**Received** 22 May 2024

**Accepted** 7 October 2024

**Published** 15 November 2024

Copyright © 2024 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

required. For rapid identification, the matrix-assisted laser desorption time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) provides accurate identification results with centrifugated pellets from blood cultures for Gram-positive bacteria (88%) and Gram-negative bacteria (96%) (12). However, current standard susceptibility tests are based on the culturing of bacteria. The turnaround time of these diagnostic tools is over 24 h making them inadequate for providing a fast and correct treatment within the first 1–3 h. To overcome this hurdle, new methods and devices for rapid AST direct from positive blood cultures have been developed or are under development. Rapid phenotypical systems for AST directly from blood cultures include the Pheno Test BC (Accelerate diagnostics, Tuscon, AZ, USA), Alfred 60AST (Alifax, Italy), dRAST (QuantaMatrix, Seoul, Republic of Korea), the FASTinov Kit (FASTinov, Portugal), Reveal rapid AST system (Biomerieux, Marcy-l'Étoile, France, formerly Specific diagnostics, San Jose, CA, USA), and rapid disk diffusion according to EUCAST and CLSI guidelines (13, 14).

The aim of the present study was to assess the performance of the Specific Reveal rapid AST System compared to the DxM MicroScan WalkAway used routinely in our laboratory. Specific Reveal rapid AST was recently renamed to VITEK Reveal (Biomerieux, Marcy L'Etoile, France).

## MATERIALS AND METHODS

### Clinical blood culture samples

The study was performed at Wisplinghoff laboratories (Cologne, Germany) that processed 232,529 blood cultures in 2021 with a positivity rate of 15% (34,801/232,529), of which 38% were Gram-negative bacteria (13,224/34,801).

For the present study, routine positive blood culture bottles (Bact/ALERT FN Plus/Bact/ALERT FA Plus, bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) were selected by convenience sampling and screened for Gram-negative bloodstream infections in the time period from 1 February to 31 April 2021. The blood culture bottles (BCBs) were incubated in the BACT/ALERT 3D Microbial Detection Systems (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) until they flagged positive. Time to positivity (TTP) in the blood culture instrument as well as the bottle type (aerobe or anaerobe blood culture bottle) was noted, the bottles were taken out of the BACT/ALERT, and blood samples were Gram-stained throughout the day, 7 days per week. Positive blood cultures were collected to a maximum of 8 strains per day for the study setup. As recommended by the manufacturer (at this time, Specific diagnostics), only blood culture samples that could be processed within 16 h post bottle positivity were included in the study. Blood cultures containing Gram-positive bacteria or fungi were not included in the study. According to the study protocol, the following Gram-negative organisms could be included for performance evaluation of the Reveal rapid AST system: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. If a positive blood culture showed Gram-negative bacteremia, cell counting, Reveal testing, and subculturing on agar plates were performed. Cell counts of positive blood cultures were achieved in order to investigate the influence of bacteria growing at different rates as well as the influence of the time from positive notification of BCB to AST (0–16 h). Cell count was measured using the fully automated flow cytometer Sysmex UF-5000 according to the protocol of Mancini et al. and results were noted (15). As described in the protocol of Mancini et al., a  $2 \times 10^3$  dilution (10  $\mu$ L of blood culture in 5 mL of 0.9% NaCl) was chosen for quantification of bacteria in blood cultures (15). Antibiotic susceptibility of the bacteria was determined in parallel with the Reveal rapid AST system directly from blood cultures and the DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Sacramento, CA, US), as comparative method/standard of care (further referred to as reference method), from an 18–24 h subculture, the following day. Identification of bacteria to species level was performed using MALDI-TOF MS (MBT Smart, software MBT Compass 4.1, MBT Compass Library revision F version 9 database, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) from a 4-h incubated

agar culture. If the identification at 4 h resulted in a species that was not noted in the study protocol or the incubated agar showed a polymicrobial growth the samples were excluded from the study. All bacterial isolates included in the study were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in case of later need for retesting.

### Bacterial challenge set

In addition to the clinical blood culture samples, 10 Gram-negative challenge strains from the CDC & FDA Antimicrobial Resistance (AR) Isolate Bank with known susceptibilities, including multidrug-resistant strains, were tested from spiked blood cultures with the Reveal rapid AST system. The strains were provided by Specific Diagnostics and are listed in Table S1.

### Quality control strains

Three ATCC strains (*E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 700603 [SHV-18 ESBL-producer]) were used as quality control strains and run once a week for quality control testing.

### Antibiotic panels for AST

Commercially available MicroScan Neg MDR MIC 1 panels (Beckman Coulter, Brea, CA, US) were used for susceptibility testing with the Reveal rapid AST system as well as with the reference system (DxM MicroScan WalkAway). The MDR panel contains 35 antibiotics. The following 20 antibiotics (concentration range) were included in the study: amikacin (8–16 mg/L), amoxicillin-clavulanic acid (8/2–32/2 mg/L), ampicillin (4–8 mg/L), aztreonam (1–4 mg/L), cefepime (0.5–8 mg/L), cefotaxime (1–32 mg/L), ceftazidime (1–32 mg/L), ceftazidime-avibactam (2/4-8/4 mg/L), ceftolozane-tazobactam (1/4-4/4 mg/L), cefuroxime (4–8 mg/L), ciprofloxacin (0.06, 0.25–1 mg/L), ertapenem (0.125, 0.5–1 mg/L), gentamicin (2–4 mg/L), imipenem (1–8 mg/L), levofloxacin (0.5–1 mg/L), meropenem (0.125, 1–32 mg/L), piperacillin (8–16 mg/L), piperacillin-tazobactam (8/4–16/4 mg/L), tobramycin (2–4 mg/L), and trimethoprim-sulfamethoxazole (2/38–4/76 mg/L). The antibiotics not listed here were excluded since (i) the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) did not publish breakpoints for all species-drug combinations tested in the study, (ii) for some species-drug combinations EUCAST breakpoints were not included in the respective concentration range of the study panel, (iii) at the time of this study some antibiotics were not included in the Reveal rapid AST menu, (iv) ESBL- and AmpC detection was not analyzed. Note, ceftazidime-avibactam, ceftolozane-tazobactam, and amoxicillin-clavulanic acid were not included in the Reveal rapid AST software when the study part with the challenge strains started but were included for the clinical blood culture samples.

### Preparation of spiked blood cultures with challenge strains

Spiked blood cultures were used for the study part with the bacterial challenge strains. Frozen isolates were sub-cultured onto blood agar plates. Colonies of a pure overnight culture were diluted into sterile saline to prepare a bacterial suspension according to a McFarland standard 0.5 (approximately  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL). The suspension was further diluted by  $10^6$  into sterile saline ( $10^2$  CFU/mL). One milliliter of the  $10^2$  CFU/mL dilution (100 CFUs) was used to inoculate a BacT/ALERT FA Plus aerobic blood culture bottle. As it was only proof of concept no human blood was added. Spiked BCs were loaded into the BACT/ALERT. Once the bottles turned positive, TTPs were noted, and the bottles were pulled. For testing of the challenge set, AST was performed with the Reveal rapid AST system. All challenge strains were tested twice. For data analysis, reference minimal inhibitory concentrations (MICs) provided by the CDC & FDA were used as comparators. Interpretive categories (S, I, R) were evaluated according to the EUCAST guidelines 2020 (16).

### Reveal rapid AST workflow

For Reveal sample preparation, 25  $\mu\text{L}$  of a PBC was directly (without removal of blood cells) diluted 1:1,000 in pluronic water (Beckman Coulter, Sacramento, CA, USA) according to manufacturer's instructions, and the dilution was used for inoculation of a MicroScan MDR plate using a Renok inoculator (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). Subsequently, the plate was covered with the Reveal sensor panel (Specific Diagnostics, San Jose, CA, USA) and sealed automatically in the Reveal plate sealer (Specific Diagnostics, San Jose, CA, USA). The Reveal sensor panel contains an array of seven colorimetric chemical sensors in a nanoporous matrix that are located over each of the 96 wells of the AST plates and respond to metabolic byproducts produced during bacterial growth. Sealed plates were barcode-scanned and loaded in the Reveal rapid AST instrument (Specific Diagnostics, San Jose, CA, USA), where they were incubated at 37°C, constantly agitated to promote the growth of test bacteria and imaged every 10 min by the Reveal system to monitor a change in color of the seven sensors. One well on each AST plate served as growth control (contains growth medium but no antibiotic = growth must occur) and another one as negative control (without media to support bacterial growth = no growth should occur). Results of species identification by MALDI-TOF were entered in the Reveal system if available, anytime during the test. The Reveal software allocated the determined MICs to interpretive categories (S, I, R) according to EUCAST guidelines once the ID of the test bacterium was provided (16). Time to result (TTR) for each antibiotic was noted after each run.

### Reference method for AST of clinical blood culture samples

MICs of clinical blood culture isolates of the overnight culture determined by the automated broth microdilution SOC system DxM MicroScan WalkAway served as reference. After Gram-staining, 10  $\mu\text{L}$  each of PBC was spread onto appropriate agar plates (tryptic soy blood agar, MacConkey agar). Plates were incubated 18–24 h at  $36 \pm 1^\circ\text{C}$  in ambient air. Subsequently, single colonies were diluted in sterile saline (MicroScan prompt inoculation system; Beckman Coulter, Brea, CA, USA), and the further procedure was performed according to the manufacturer's instructions.

Discrepancies in the interpretive category between the Reveal rapid AST system and the reference system were resolved using MTS gradient strips (MIC Test Strip; Liofilchem S.r.l, Italy) which was performed according to the manufacturer's instructions. For comparative evaluation, MIC results of the MTS test that were in between of two  $\log_2$  dilution steps were upscaled to the respective next higher  $\log_2$  dilution step.

### Data analysis

The AST results of the Reveal rapid AST system were compared to the results obtained by the reference method (DxM MicroScan WalkAway) and, if required, by MTS for discrepancy resolution ( $n = 58/2008$ ). Only the final result (as the result of the MTS strip in the case of a discrepancy) was used throughout the work and for all analyses. Interpretive categories (S, I, R) were determined for all methods according to the EUCAST guidelines (16). Intrinsically resistant bacteria were accounted as resistant according to EUCAST guidance document "Intrinsic Resistance and Unusual Phenotypes" version 3.2 (17).

The total category agreement (CA) was defined as the percentage of isolates classified in the same interpretive category when determined with Reveal rapid AST system and the reference method or MTS. Category discrepancies were classified as follows: (i) very major error (VME) and adjusted VME (aVME) when the test system indicated susceptibility and the reference method or MTS indicated resistance (aVME; only category discrepancies based on more than  $\pm 1 \log_2$  dilution steps), (ii) major error (ME) when the test system indicated resistance and the reference method or MTS indicated susceptibility, (iii) minor error (mE) when the test system reported "susceptible increased dosage" (former intermediate) and the reference method or MTS "susceptible" or "resistant"; or the test system reported "susceptible" or "resistant" and the reference method or MTS

“susceptible increased dosage”. The essential agreement was defined as the percentage of MIC results that fell within plus or minus one  $\log_2$  dilution step when compared to the reference method or MTS. Most antibiotics on the test plate showed limited concentration ranges that did not allow for the assessment of evaluable EA (when the MIC result is on-scale for both, the test and the reference method). Thus, on-scale MICs (MICs within the concentration range) as well as off-scale MICs (MICs below or equal to the lowest concentration or above the highest concentration) were considered for EA evaluation. Moreover, if a MIC obtained with the MTS gradient strip or – for spiked samples – a MIC of a respective CDC & FDA AR challenge isolate was below or above the limit of quantification of the MIC test panel (= lowest and highest concentration, respectively, of each drug in the MicroScan Neg MDR MIC 1 panel) and the Reveal MIC was correspondent  $\leq$  or  $>$  this was counted as in agreement.

### Statistical analysis

Mean and median were used as descriptive summary statistics for continuous variables (i.e., TTP, bacterial count) depending on distributional characteristics; categorical variables (bottle type, species, antibiotic drug, error types) were shown as percentages.

Predictive variables such as TTP, bacterial count, bottle type, species, and antibiotic drug as well as dependent variables “occurrence of mE, ME, VME” (outcome parameters) were included as fixed effects along with a random intercept for strain ID in generalized linear mixed models (GLMM) of binomial family. Association of predictive variables with the outcome was tested with a multi-way Analysis of Variance (ANOVA), considering a *P*-value of  $<0.05$  as statistically significant. The area of technical uncertainty (ATU) was considered no error in this analysis. All calculations were done with R version 4.1.2 (Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) along with package lme4 (18).

## RESULTS

### Overall

We found a high overall EA and CA of 98.5% and 97.1%, respectively, between the Reveal and the reference method in the clinical part of the study, as well as for the more resistant CDC & FDA AR bank isolates in the spiked blood cultures (EA 99.6%; CA 97.9%). All quality control strains were within range.

### Evaluation of clinical blood culture samples

In detail, 143 routine blood culture samples were randomly collected. Forty-one samples were excluded because (i) 4 were polymicrobial cultures, (ii) 28 of the identified species were not included in the study protocol, (iii) 6 showed no growth on agar plates during the identification time frame, (iv) 1 was not identified by MALDI-TOF, (v) 2 had Reveal System control errors. Thus, a total of 102 blood cultures with 7 different Gram-negative species were included in the study and 2,008 (drugs tested per species see Table S2) strain-drug pairs were tested, of which 10.5% (211/2,008) were tested as resistant by the reference method. EA calculation was not possible for 17 of 2,008 strain-drug pairs because the concentration ranges for ciprofloxacin (0.06, 0.25–1 mg/L), ertapenem (0.125, 0.5–1 mg/L), and meropenem (0.125, 1–32 mg/L) in the MDR panel included skipped concentrations (ciprofloxacin: 0.125 mg/L; ertapenem: 0.25 mg/L; meropenem: 0.25 mg/L, and 0.5 mg/L). The 17 strains showed MIC values that were one dilution step above the highest skipped concentration of ciprofloxacin, ertapenem, or meropenem and were excluded from EA calculation: in the case of ciprofloxacin, 10 strains (1 *A. baumannii* strain, 3 *E. coli* strains, 5 *K. pneumoniae* strains, and 1 *P. aeruginosa* strain), of ertapenem 2 strains (1 *E. coli* strain and 1 *K. oxytoca* strain) and of meropenem 5 strains (3 *E. coli* strains and 2 *P. aeruginosa* strains) were excluded. The overall essential agreement for the remaining strains was 98.5% (1,962/1,991) for the Reveal system when compared to the reference method (DxM MicroScan WalkAway) or MTS (in case of discrepancy resolution). In Reveal testing, 6 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MICs

in the ATU and were excluded for CA as well as for error calculation. All six strains were tested as susceptible with the reference method. The overall CA was 97.1% (1,944/2,002) with 0.8% (16/2,002) mE, 0.5% (8/1,678) ME, and 16.1% (34/211) VME. Table 1 summarizes all performance parameters in detail.

We also calculated the aVME rate. Thirteen of the 34 VMEs resulted from category discrepancies based on more than a 1 log<sub>2</sub> dilution step difference between the Reveal MIC and the MIC determined by the reference method. Thus, the overall aVME rate amounted to 6.2% (13/211).

For the EA, the distribution of all log<sub>2</sub> dilution differences between MICs of Reveal rapid AST system and DxM MicroScan WalkAway or Liofilchem MTS test per species is shown in detail in Table S3 and per antimicrobial drug in Table S4.

*E. coli* (71.6%, 73/102) was the most common pathogen included in our study followed by *K. pneumoniae* (17.6%, 18/102), *K. oxytoca* (3.9%, 4/102), *E. cloacae* (2.9%, 3/102), *P. aeruginosa* (1.9%, 2/102), *C. koseri* (0.98%, 1/102), and *A. baumannii* (0.98%, 1/102). No *C. freundii* or *K. aerogenes*—that could be also included according to the study protocol—were observed during the study time period. The average time to result was 5.4 h ± 1.2 h for Reveal and varied slightly between the different species ranging from 4.2 h ± 0.7 h for *A. baumannii* to 6.0 h ± 1.0 h for *P. aeruginosa* (see Table 2) compared to DxM MicroScan WalkAway with 16 h time to result after first subculturing.

Of the overall observed 34 VMEs, 32 VMEs (94.1%) were found in *E. coli* (see Table 2). VMEs were not equally distributed among the antimicrobial agents tested in this study. Most of the VMEs (41.2%, 14/34) occurred when testing amoxicillin-clavulanic acid (EUCAST concentration) followed by testing the aminoglycosides gentamicin (17.6%, 6/34), tobramycin (14.7%, 5/34), and amikacin (11.8%, 4/34). We investigated whether the number of errors was significantly higher for a particular bug-drug combination than for others, but found no significance (amoxicillin-clavulanic acid\_VME\_*E.coli* *P* = 0.28, gentamicin\_VME\_*E.coli* *P* = 1.0, amikacin\_VME\_*E.coli* *P* = 0.60, tobramycin\_VME\_*E.coli* *P* =

TABLE 1 Overall performance of the Reveal rapid AST system when compared to the DxM MicroScan WalkAway (clinical blood cultures)<sup>a</sup>

Study details or performance parameter	Number and percentage
Study details	
No. of species collected	No.
No. of antibiotics tested <sup>d</sup>	7
No. of strains tested	20
No. of total strain-drug pairs	102
No. of S strain-drug pairs <sup>b</sup>	2,008
No. of I strain-drug pairs <sup>b</sup>	1,684
No. of R strain-drug pairs <sup>b</sup>	113
Performance parameter	
EA <sup>c,d,e</sup>	% (no.)
CA <sup>f</sup>	98.5 (1,962/1,991)
mE <sup>f</sup>	97.1 (1,944/2,002)
ME <sup>f</sup>	0.8 (16/2,002)
VME <sup>f</sup>	0.5 (8/1,678)
	16.1 (34/211)

<sup>a</sup>The number of antibiotics varies depending on the respective species.

<sup>b</sup>The number of respective strain-drug pairs is the number evaluated by the reference method or MTS (the latter was performed in case of discrepancies between Reveal and the reference method).

<sup>c</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate, MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation.

<sup>d</sup>Percentage (number) of strains for which the difference in MICs regarding all drugs tested was no more than ±1 log<sub>2</sub> dilution when compared to the reference method or MTS.

<sup>e</sup>The concentration ranges of ciprofloxacin, ertapenem, and meropenem included skipped concentrations. If the Reveal system and/or the reference method showed a MIC above the highest skipped concentration, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 17 strains.

<sup>f</sup>In Reveal testing 6 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. All six strains were tested susceptible with the reference method or MTS.

<sup>g</sup>S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; mE, minor error; ME, major error; VME, very major error.

TABLE 2 AST results of the Reveal rapid AST system compared to the DxMI MicroScan WalkAway test for 102 clinical Gram-negative strains and all drugs tested<sup>a,b</sup>

Species	Reveal average TTR (h)	No. of strains	No. of antibiotics per species	Total	No. of AST results of the reference method			% (no.) agreement			% (no.) of errors			Comments	
					Total used for EA calc. and error calc.	S	I	R	EA <sup>a,b</sup>	CA	mE	ME	VME		
<i>Enterobacteriales</i>															
<i>E. coli</i>	5.4	73	20	1,460	1,453 <sup>c,d,e</sup>	1,454 <sup>f</sup>	1,229 <sup>f</sup>	71	154	98.5 (1,431)	97.1 (1,412)	0.3 (5)	0.4 (5)	20.8 (32)	mE: CIP (1), PIT (1), CTZ (1), CUR (1), TRS (1); ME: TOB (1), CIP (1), TRS (1), GEN (1), CTV (1); VME: AMC (13), GEN (6), TOB (5), AMI (4), PIT (2), AMP (1), CTZ (1)
<i>K. pneumoniae</i>	5.3	18	20	360	355 <sup>c</sup>	360	306	21	33	99.2 (352)	97.8 (352)	1.7 (6)	0 (0)	6.1 (2)	mE: PIP (3), CUR (2), LEV (1); VME: AMC (1), PIT (1)
<i>K. oxytoca</i>	5.3	4	20	80	79 <sup>d</sup>	80	70	6	4	98.7 (78)	96.3 (77)	2.5 (2)	1.4 (1)	0 (0)	mE: PIP (2); ME: CTT (1)
<i>E. cloacae</i>	5.1	3	19	57	57	57	42	1	14	96.5 (55)	96.5 (55)	1.8 (1)	2.4 (1)	0 (0)	mE: CEP (1); ME: CTA (1)
<i>C. koseri</i>	4.9	1	19	19	19	19	16	1	2	94.7 (18)	89.5 (17)	5.3 (1)	6.3 (1)	0 (0)	mE: PIP (1); ME: CTT (1)
Non-fermentative															
GNB															
<i>P. aeruginosa</i>	6.0	2	12	24	21 <sup>c,e</sup>	24	10	12	2	100.0 (21)	95.8 (23)	4.2 (1)	0 (0)	0 (0)	mE: CEP (1)
<i>A. baumannii</i>	4.2	1	8	8	7 <sup>c</sup>	8	5	1	2	100.0 (7)	100.0 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	No errors
Overall	5.4	102	n.e.	2,008	1,991	2,002	1,678	113	211	98.5 (1,962)	97.1 (1,944)	0.8 (16)	0.5 (8)	16.1 (34)	mE: PIP (6), CUR (3), CEP (2), CIP (1), PIT (1), CTZ (1), TRS (1), LEV (1); ME: CTT (2), TOB (1), CIP (1), TRS (1), GEN (1), CTV (1), CTA (1); VME: AMC (14), GEN (6), TOB (5), AMI (4), PIT (3), AMP (1), CTZ (1)

<sup>a</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate, MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation.  
<sup>b</sup>Percentage (number) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1$  log<sub>2</sub> dilution.  
<sup>c</sup>The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was  $\leq 0.06$  mg/L, 0.25–1 mg/L (the MIC of 0.125 mg/L was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 0.25 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *A. baumannii* strain, 3 *E. coli* strains, 5 *K. pneumoniae* strains, and 1 *P. aeruginosa* strain.  
<sup>d</sup>The concentration range of eropenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/L, 0.5–1 mg/L (the MIC 0.25 mg/L was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 0.5 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain and 1 *K. oxytoca* strain.  
<sup>e</sup>The concentration range of meropenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/L, 1–32 mg/L (the MIC values 0.25 mg/L and 0.5 mg/L were skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 1 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 3 *E. coli* strains and 2 *P. aeruginosa* strains.  
<sup>f</sup>In Reveal testing 6 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. All six strains were tested susceptible with the reference method or MTS.  
 TTR, time to result; calc., calculation; S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; ME, minor error; mE, major error; VME, very major error; GNB, Gram-negative bacterium; n.e., not evaluable; AMI, amikacin; AMC, amoxicillin-clavulanic acid; AMP, ampicillin; CEP, ceftepime; CIP, ceftriaxime; CTZ, ceftazidime; CTV, ceftazidime-avibactam; CUR, cefuroxime; CIP, ciprofloxacin; GEN, gentamicin; LEV, levofloxacin; PIP, piperacillin; PIT, piperacillin-tazobactam; TOB, tobramycin; TRS, trimethoprim-sulfamethoxazole.  
<sup>g</sup>In general, S, I, R categorization based on MIC results that were evaluated by the reference method or MTS (the latter was performed in case of discrepancies between Reveal and the reference method).

0.33). The distribution of all errors by test drugs is shown in Table 3. The average time to result for the Reveal varied among tested drugs and ranged from  $3.6 \text{ h} \pm 0.9 \text{ h}$  for ampicillin to  $7.3 \text{ h} \pm 1.7 \text{ h}$  for piperacillin-tazobactam (see Table 3). The distribution of EA/CA and errors only concerning *E. coli* are shown in Table S5.

Figure 1 shows the correlation of the mean TTR and the resistance rate for each antibiotic. For every percent more resistance, TTR decreases by  $-0.018 \text{ h}$ . This is significant with  $P < 0.0001$ .

### Evaluation of challenge strains

To analyze the performance of the Reveal rapid AST system with more resistant strains which were not well represented in the clinical part of our study, we performed test-runs on 10 highly resistant strains (including multidrug-resistant strains) from the CDC & FDA AR Isolate Bank in duplicate. Here in total, 244 strain-drug pairs were analyzed, of which 88.5% (216/244) were resistant. EA/CA was as high as 99.6%/97.9% and no VME, 1 ME, (gentamicin), and 4 ME (meropenem and piperacillin-tazobactam) occurred (see Tables 4 and 5).

The time to result in the highly resistant CDC & FDA AR strains was lower than in the more susceptible clinical strains ( $5.4 \text{ h} \pm 1.2 \text{ h}$ ) with  $3.9 \text{ h} \pm 1.2 \text{ h}$  ( $P < 0.0001$ ).

### Analysis of the factors that may have an influence on the occurrence of errors

The experimental setup and read-out allowed multiple variables, namely culture bottle type (aerobe vs anaerobe), the bacterial count in the blood from the positive blood culture bottle, the time to positivity (TTP, time until a blood culture was flagged positive), the species, and the tested antibiotic drug to have a potential impact on the occurrence of mE, ME, and VME.

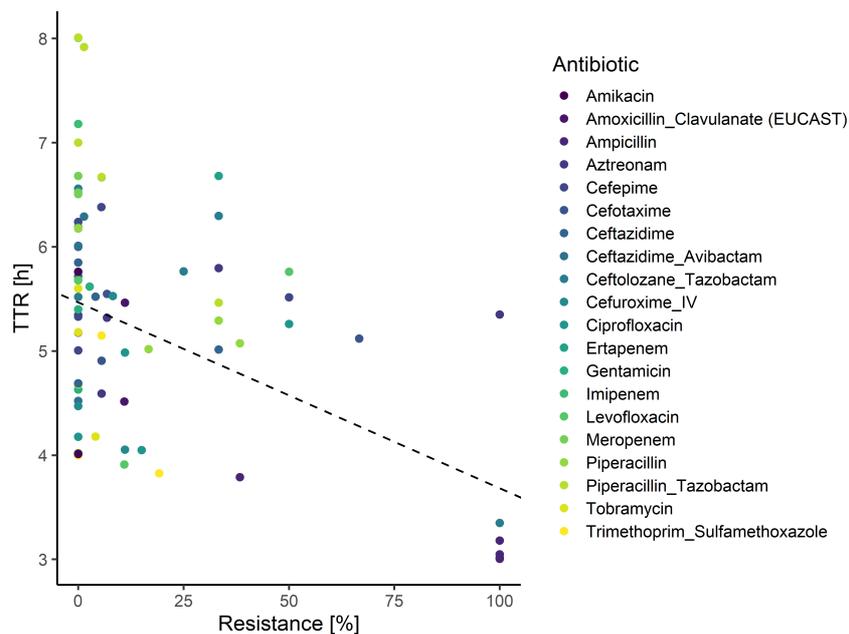


FIG 1 TTR for Reveal in hours and percentage of resistance (%) stratified by antibiotic. Dots represent the resistance rate/TTR for individual bug-drug combinations.

TABLE 3 AST results of the Reveal rapid AST system compared to the DxHM MicroScan WalkAway by drugs<sup>a,b</sup>

Drug	Reveal average TTR (h)	No. of strains with AST Total used for EA calc.	No. of strains with AST results of the reference method					% (no.) agreement			% (no.) of errors		
			Total	S	I	R	EA <sup>a,b</sup>	CA	mE	ME	VME	ATU <sup>c</sup>	
Amikacin	3.9	102	102	98	4	0	99.0 (101)	96.1 (98)	n.a.	0 (0)	100.0 (4)		
Amoxicillin-clavulanic acid (EUCAST)	4.0	99	99	72	27	0	91.9 (91)	85.9 (85)	n.a.	0 (0)	51.9 (14)		
Ampicillin	3.6	99	99	44	55	0	99.0 (98)	99.0 (98)	n.a.	0 (0)	1.8 (1)		
Aztreonam	5.1	99	99	90	1	8	100.0 (99)	100.0 (99)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Cefepime	5.9	101	101	93	3	5	99.0 (100)	98.0 (99)	2.0 (2)	0 (0)	0 (0)		
Cefotaxime	5.4	99	99	92	7	0	99.0 (98)	99.0 (98)	0 (0)	1.1 (1)	0 (0)		
Ceftazidime	5.3	101	101	93	2	6	97.0 (98)	98.0 (99)	1.0 (1)	0 (0)	16.7 (1)		
Ceftazidime-avibactam	6.1	101	101	101	0	0	99.0 (100)	99.0 (100)	n.a.	1.0 (1)	0 (0)		
Ceftiozone-tazobactam	6.4	101	101	99	2	0	98.0 (99)	98.0 (99)	n.a.	2.0 (2)	0 (0)		
Cefuroxime IV	5.1	95	95	95	0	0	98.9 (94)	96.8 (92)	3.2 (3)	0 (0)	0 (0)		
Ciprofloxacin	4.1	102	92 <sup>d</sup>	96 <sup>e</sup>	81 <sup>c</sup>	3	96.7 (89)	97.9 (94)	1.0 (1)	1.2 (1)	0 (0)		
Ertapenem	6.5	99	97 <sup>f</sup>	99	98	1	100.0 (97)	100.0 (99)	n.a.	0 (0)	0 (0)		
Gentamicin	5.1	100	100	100	0	0	98.0 (98)	93.0 (93)	n.a.	1.1 (1)	85.7 (6)		
Imipenem	6.5	102	102	102	0	0	100.0 (102)	100.0 (102)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Levofloxacin	4.3	102	102	102	89	3	100.0 (102)	99.0 (101)	1.0 (1)	0 (0)	0 (0)		
Meropenem	6.6	102	97 <sup>g</sup>	102	101	1	100.0 (97)	100.0 (102)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Piperacillin	5.0	101	101	101	62	7	100.0 (101)	94.1 (95)	5.9 (6)	0 (0)	0 (0)		
Piperacillin-tazobactam	7.3	101	101	101	92	3	97.0 (98)	96.0 (97)	1.0 (1)	0 (0)	50.0 (3)		
Tobramycin	4.1	102	102	102	95	7	99.0 (101)	94.1 (96)	n.a.	1.1 (1)	71.4 (5)		
Trimethoprim-sulfamethoxazole	4.0	100	100	100	86	1	99.0 (99)	98.0 (98)	1.0 (1)	1.2 (1)	0 (0)		

<sup>a</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug, were included in the calculation.  
<sup>b</sup>Percentage (number) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1 \log_2$  dilution.  
<sup>c</sup>In Reveal testing 6 *E. coli* strains showed ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. All 6 strains were tested susceptible with the reference method or MTS.  
<sup>d</sup>The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was  $\leq 0.06$  mg/l, 0.25-1 mg/l (the MIC of 0.125 mg/l was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 0.25 mg/l the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *A. baumannii* strain, 3 *E. coli* strains, 5 *K. pneumoniae* strains and 1 *P. aeruginosa* strain.  
<sup>e</sup>The concentration range of ertapenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/l, 0.5-1 mg/l (the MIC 0.25 mg/l was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 0.5 mg/l the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain and 1 *K. oxytoca* strain.  
<sup>f</sup>The concentration range of meropenem on the AST plate was  $\leq 0.125$  mg/l, 1-32 mg/l (the MIC values 0.25 mg/l and 0.5 mg/l were skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method was 1 mg/l, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 3 *E. coli* strains and 2 *P. aeruginosa* strains.  
<sup>g</sup>TTR, time to result; calc., calculation; S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; mE, minor error; ME, major error; VME, very major error; n.a., not applicable.  
<sup>h</sup>In general, S, I, R categorization based on MIC results that were evaluated by the reference method or MTS (the latter was performed in case of discrepancies between Reveal and the reference method).

**TABLE 4** Overall performance of the Reveal rapid AST system with blood cultures spiked with CDC & FDA AR bank isolates compared to CDC & FDA AR reference data<sup>a</sup>

Study details or performance parameter	Number and percentage		
	No. in 1st test	No. in 2nd test	No. in 1st and 2nd test
No. of species tested	6	6	6
No. of antibiotics tested <sup>d</sup>	14	14	14
No. of strains tested	10	10	20
No. of total strain-drug pairs <sup>b</sup>	122	122	244
No. of S strain-drug pairs <sup>c</sup>	11	11	22
No. of I/ATU strain-drug pairs <sup>c,d</sup>	3	3	6
No. of R strain-drug pairs <sup>c</sup>	108	108	216
<b>Performance parameter</b>	<b>% (no.)</b>	<b>% (no.)</b>	<b>% (no.)</b>
EA <sup>e,f,g,h</sup>	99.1 (112/113)	100.0 (113/113)	99.6 (225/226)
CA <sup>d</sup>	97.5 (118/121)	98.3 (119/121)	97.9 (237/242)
mE <sup>d</sup>	1.7 (2/121)	1.7 (2/121)	1.7 (4/242)
ME <sup>d</sup>	9.1 (1/11)	0 (0/11)	4.5 (1/22)
VME <sup>d</sup>	0 (0/108)	0 (0/108)	0 (0/216)

<sup>a</sup>The number of antibiotics varies depending on the respective species.

<sup>b</sup>Of 123 strain-drug pairs, one MIC result for piperacillin-tazobactam and *K. aerogenes* was missing by the Reveal system, resulting in 122 evaluable strains-drug pairs.

<sup>c</sup>The number of respective strain-drug pairs is the number based on CDC & FDA AR reference data. EUCAST clinical breakpoints were used for categorization.

<sup>d</sup>CDC & FDA AR reference MIC of one *K. aerogenes* strain for ciprofloxacin was falling in the area of technical uncertainty (ATU) and was excluded for CA as well as for error calculation.

<sup>e</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate, MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation.

<sup>f</sup>Percentage (number) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1 \log_2$  dilution.

<sup>g</sup>The concentration ranges of ciprofloxacin, ertapenem, and meropenem included skipped concentrations. If the Reveal system and/or CDC & FDA AR data showed a MIC above the highest skipped concentration, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for one strain each in test one and two.

<sup>h</sup>For meropenem and CDC & FDA AR MIC data, eight strains in each test had MIC values of  $>8 \text{ mg/L}$  or  $>16 \text{ mg/L}$ . On AST plates used in the study, the highest concentration is  $32 \text{ mg/L}$  for meropenem, resulting in MIC values of  $>32 \text{ mg/L}$  if a strain grows at  $32 \text{ mg/L}$ . Thus, the eight strains were excluded from EA calculation.

<sup>i</sup>S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; mE, minor error; ME, major error; VME, very major error.

In total of the 102 blood cultures included in the study, 53 were aerobic and 49 anaerobe bottles resulting in 1,030 drug-strain combinations in aerobic and 978 strain-drug combinations in anaerobe BCB. The type of blood culture bottle had no influence on the occurrence of category errors. No error occurred in 96.8% (997/1,030) of drug-strain combination from aerobic bottles and in 97.4% (953/978) from anaerobe bottles ( $P = 0.386$ ). VME/ME/mE occurred in 1.75% (18/1,030)/0.48% (5/1,030)/0.97% (10/1,030) aerobic bottles and in 1.64% (16/978)/0.31% (3/978)/0.61% (6/978) anaerobe bottles ( $P = 0.846/0.525/0.368$ ). We also performed this analysis on bug-drug level but again, and we found no significant influence of the bottle type on any of the errors (data not shown).

Bacterial count (CFU/mL) in the BCB at the time of testing (Sysmex) had no influence on the overall failure rate (BCBs with no failure  $2,038 \pm 1,593 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 1,950$ ) vs BCBs with errors had bacterial counts of  $2,233 \pm 1,651 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 58$ ) ( $P = 0.357$ ).

BCBs with VME/ME/mE had a bacterial count of  $2,342 \pm 1,784 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 34$ )/ $2,027 \pm 931 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 8$ )/ $2,104 \pm 1,701 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 16$ ), while BCBs with no errors had bacterial counts of  $2,038 \pm 1,591 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 1,974$ )/ $2,043 \pm 1,597 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 2,000$ )/ $2,043 \pm 1,594 \text{ CFU/mL}$  ( $n = 1,992$ ) ( $P = 0.270/0.978/0.879$ ).

The time to positivity of the BCB (time in the BACT/ALERT before flagging positive) had no influence on the overall error occurrence rate (BCB with no error  $13.0 \text{ h} \pm 9.0 \text{ h}$  ( $n = 1,950$ ) vs BCBs with errors  $15.0 \text{ h} \pm 12 \text{ h}$  ( $P = 0.073$ ). BCBs with VME/ME/mE had a TTP of  $15.0 \text{ h} \pm 11.0 \text{ h}$  ( $n = 34$ )/ $11.0 \text{ h} \pm 3.0 \text{ h}$  ( $n = 8$ )/ $18.0 \text{ h} \pm 16.0 \text{ h}$  ( $n = 16$ ) while BCBs with no errors had TTPs of  $13.0 \text{ h} \pm 9.0 \text{ h}$  ( $n = 1,974$ )/ $13.0 \text{ h} \pm 9.0 \text{ h}$  ( $n = 2,000$ )/ $13.16 \text{ h} \pm 8.9 \text{ h}$  ( $n = 1,992$ ) ( $P = 0.194/0.465/0.045$ ).

These results show longer TTP for samples with minor errors compared to the samples with no minor errors, indicating that TTP could have an impact on the occurrence of minor errors.

Analysis of the variables in a multivariate setting using GLMMs revealed no influence of TTP, BCB type, bacterial count, antibiotic drug, or species on the occurrence of categorical errors (Tables S6 and S7).

TABLE 5 AST results of the Reveal rapid AST system with blood cultures spiked with CDC & FDA AR bank isolates compared to CDC & FDA AR reference data<sup>a</sup>

Drug	Reveal average TTR (h)	No. of strains with CDC & FDA AR reference AST data		% Agreement (No.)		% (No.) of errors		
		Total	Total used for EA calc.	EA <sup>b</sup>	CA	mE	VME	ATU <sup>c</sup>
1st test	3.8							
Amikacin	3.4	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Aztreonam	4.9	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Cefepime	3.8	8	8	100.0 (8)	100.0 (8)	0.0	0.0	0.0
Cefotaxime	3.4	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Ceftazidime	3.6	8	8	100.0 (8)	100.0 (8)	0.0	0.0	0.0
Ciprofloxacin	3.2	10	9 <sup>d</sup>	100.0 (9)	100.0 (9)	0.0	0.0	10.0 (1)
Ertapenem	3.6	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Gentamicin	3.3	9	9	88.9 (8)	88.9 (8)	0.0	100.0 (1)	0.0
Imipenem	4.3	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Levofloxacin	3.6	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Meropenem	5.4	10	2 <sup>e</sup>	100.0 (2)	90.0 (9)	10.0 (1)	0.0	0.0
Piperacillin-tazobactam	5.3	7	7	100.0 (7)	85.7 (6)	14.3 (1)	0.0	0.0
Tobramycin	3.2	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	3.2	9	9	100.0 (9)	100.0 (9)	0.0	0.0	0.0
2nd test	3.9							
Amikacin	3.5	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Aztreonam	4.9	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Cefepime	3.9	8	8	100.0 (8)	100.0 (8)	0.0	0.0	0.0
Cefotaxime	3.4	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Ceftazidime	3.6	8	8	100.0 (8)	100.0 (8)	0.0	0.0	0.0
Ciprofloxacin	3.3	10	9 <sup>d</sup>	100.0 (9)	100.0 (9)	0.0	0.0	10.0 (1)
Ertapenem	3.6	7	7	100.0 (7)	100.0 (7)	0.0	0.0	0.0
Gentamicin	3.3	9	9	100.0 (9)	100.0 (9)	0.0	0.0	0.0
Imipenem	4.6	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Levofloxacin	3.6	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Meropenem	5.6	10	2 <sup>e</sup>	100.0 (2)	90.0 (9)	10.0 (1)	0.0	0.0
Piperacillin-tazobactam	5.3	7 <sup>f</sup>	7	100.0 (7)	85.7 (6)	14.3 (1)	0.0	0.0
Tobramycin	3.1	10	10	100.0 (10)	100.0 (10)	0.0	0.0	0.0
Trimethoprim-sulfamethoxazole	3.2	9	9	100.0 (9)	100.0 (9)	0.0	0.0	0.0

<sup>a</sup>Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate, MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation.

<sup>b</sup>Percentage (number) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than  $\pm 1$  log<sub>2</sub> dilution.

<sup>c</sup>CDC & FDA AR reference MIC of one *K. aerogenes* strain for ciprofloxacin was falling in the area of technical uncertainty (ATU) and was excluded for CA as well as for error calculation.

<sup>d</sup>The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was  $\leq 0.06$  mg/L, 0.25–1 mg/L (the MIC of 0.125 mg/L was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or CDC & FDA AR bank MIC was 0.25 mg/L, the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *K. aerogenes* strain.

<sup>e</sup>For meropenem and CDC & FDA AR MIC data, eight strains had MIC values of  $> 8$  mg/L or  $> 16$  mg/L. On AST plates used in the study, the highest concentration was 32 mg/L for meropenem, resulting in MIC values of  $> 32$  mg/L if a strain grows at 32 mg/L. Thus, the eight strains were excluded from EA calculation.

<sup>f</sup>Of eight strain-drug pairs, one MIC result for piperacillin-tazobactam and *K. aerogenes* was missing by the Reveal system, resulting in seven evaluable results.

<sup>g</sup>TTR, time to result; calc., calculation; S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; mE, minor error; ME, major error; VME, very major error.

## DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study with the Reveal rapid AST (VITEK Reveal) system analyzing resistance testing of Gram-negative strains including *Enterobacteriales*, directly from positive routine blood cultures by using a test panel that includes EUCAST breakpoints for respective drugs and interpretation according to EUCAST guidelines.

We found a very high overall EA and CA of 98.5% and 97.1%, respectively, between the Reveal rapid AST system and the reference method in the clinical part of the study as well as 99.6% and 97.9%, respectively, in the study part with bacterial challenge strains. Tibbetts et al. published similar performance characteristics for the Reveal system when using panels and breakpoints according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (19). However, compared to the study of Tibbetts et al., we found a higher percentage of VME with 16.1% ( $n = 34/211$ , MicroScan AST plates) versus 1.3% ( $n = 3/232$ , Vitek2 AST cards) and 1.2% ( $n = 4/313$ , Sensititre AST plates), respectively, in Tibbetts study (19). In general, in both studies (our study and Tibbetts et al.), the number of resistant clinical isolates was low (<14%) (19). Low number of resistant strains may lead to a higher occurrence of VMEs if guidelines for MIC evaluation without an intermediate category are used, e.g., EUCAST, as it was in the present study.

In our study, the highest number of VMEs per drug occurred with amoxicillin-clavulanic acid ( $n = 14$ ). It should be considered that EUCAST has no intermediate category for amoxicillin-clavulanic acid, and there were a large number of strains in the study that had MICs around the EUCAST breakpoint (susceptible  $\leq 8$  mg/L, resistant  $>8$  mg/L) (16). Thus, measurement inaccuracies of only 1  $\log_2$  dilution step can lead to a VME. If only VMEs were considered which resulted from category discrepancies based on more than a 1  $\log_2$  dilution step difference between the Reveal MIC and the MIC determined by the reference method, the rate drops from 51.9% (14 VMEs/27 MICs determined as resistant to amoxicillin/clavulanic acid by the reference method) to 18.5% (= aVME: 5 VMEs/27 MICs determined as resistant to amoxicillin/clavulanic acid by the reference method). The aVME rate seems to be more realistic if drugs with S/R instead of S/I/R breakpoints are analyzed. However, the problem in susceptibility testing with amoxicillin-clavulanic acid, under consideration of EUCAST breakpoints, was also highlighted by Soares et al. in a study with 286 *E. coli* strains (including 159 amoxicillin-clavulanic acid resistant strains). Here, amoxicillin-clavulanic acid MICs around the EUCAST breakpoints also resulted in high VME percentages ranging from 10.5% for the Phoenix System (Becton Dickinson) to 27.3% for the epsilon test ("Etest method", strips from AES) (20).

Amoxicillin-clavulanic acid was not tested by Tibbetts et al. as the CLSI panel includes ampicillin-sulbactam instead (19). In contrast to EUCAST, the CLSI interpose an intermediate category for beta-lactam/beta-lactamase inhibitors like amoxicillin-clavulanic acid (susceptible  $\leq 8/4$  mg/L; intermediate = 16/8 mg/L; resistant  $\geq 32/16$  mg/L), which results in minor and not in very major errors (21). Accordingly, Tibbetts et al. found no VME but a high number of mE of ampicillin-sulbactam when testing the Reveal rapid AST system ( $n = 29/33.7\%$  in comparison to Sensititre;  $n = 16/18.4\%$  to Vitek 2), which may reflect the general problem with testing aminopenicillin combination substances such as beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations in strains with a MIC around the breakpoints discussed in several other studies (19, 20, 22, 23).

In both studies, low CA while high EA for amoxicillin-clavulanic acid (this study 85.9% CA vs. 91.9% EA) and ampicillin-sulbactam (Tibbetts et al. Sensititre 66.3% CA vs 98.8% EA; Vitek 2 81.6% CA vs 90.8% EA) was observed (19). In our case, all 14 strains showing a VME for amoxicillin-clavulanic acid had Reveal MICs of  $\leq 8$  mg/L categorized by EUCAST as susceptible and MicroScan WalkAway MICs of 16 ( $n = 9$ ), 32 ( $n = 4$ ), and 64 ( $n = 1$ ) categorized as resistant.

In our opinion, this arises the demand for the implementation of an ATU for amoxicillin-clavulanic acid MICs—like EUAST has already implemented for disc diffusion of this antibiotic drug (16). The European standard for the evaluation of MIC test systems EN ISO 20776-2:2007 already has addressed this problem and defines test systems with a high EA of  $>97\%$  as having acceptable accuracy even if the VME rate is  $>3\%$  (24).

The second most common VME rate in our study was found for aminoglycosides [gentamicin ( $n = 6/34$ ), tobramycin ( $n = 5/34$ ), and amikacin ( $n = 4/34$ )]. Other studies like Cayci et al. have shown with various testing systems, including standard automated testing systems like the Vitek 2, the unreliability of aminoglycoside testing in Gram-negative bacteria and occurrence of VME (22, 23, 25, 26). However, in our study, the high VME rates may have occurred for the same reasons as discussed above for amoxicillin-clavulanic acid (low rate of resistant strains for these antibiotics and strains with MICs around the respective EUCAST S/R breakpoint). If only VMEs were considered which resulted from category discrepancies based on more than a 1  $\log_2$  dilution step difference between the Reveal MIC and the MIC determined by the reference method discussed above for amoxicillin/clavulanic acid, the VME rate drops for amikacin from 100% to 25%, for gentamicin from 85.7% to 14.3%, and for tobramycin from 71.4% to 14.3%.

A study from Couchot et al. using Reveal rapid AST system with EUCAST 2021 breakpoints to the evaluation susceptibility testing for *Pseudomonas aeruginosa* from blood cultures found VME and ME mostly in piperacillin/tazobactam, ceftazidime, ceftolozane/tazobactam, fluoroquinolones, and amikacin. Since we only included two *P. aeruginosa* strains in our study, we have no significant result for this species, but looking at the entirety of our strains, the problematic in testing beta-lactam/beta-lactamase inhibitor combinations and aminoglycosides seems to be similar to our study. Also, a high count of the ME strains in piperacillin/tazobactam were with MIC around the breakpoints similar to the amoxicillin/clavulanate errors in our study (27).

In the present study, we observed that there is a correlation between resistance rate and TTR. If strains were highly resistant to an antibiotic drug, they had a shorter TTR when tested with the Reveal rapid AST system, e.g., ampicillin (3.6 h), compared to strains that were susceptible to a drug such as meropenem (6.6 h). In line with this, the average time to result for all antibiotics in the clinical data set was significantly higher compared to that of the study part with highly resistant CDC & FDA AR strains. In our opinion, using the Reveal system for AST has a particular advantage at this point, as patients with resistant strains benefit especially from rapid diagnostics since empirical therapy is often ineffective here (13).

Nevertheless, it is also important to consider that the reveal procedure may not definitively rule out the possibility of polymicrobial infections. Therefore, we respectfully suggest an 18–24-h subculture, potentially on different agar plates, as a final control measure.

There were some limitations to this study. First, only a few Gram-negative species were included in the study because strains were collected by a routine manner. VMEs with clinical study strains occurred only while testing *E. coli* and *K. pneumoniae* which is probably the result of a bias caused by the lower number of other species. Thus, significant conclusions may be allowed only for those two species. Phenotypic AmpC and ESBL tests were not measured in this study because the Reveal system did not support the analysis at the time of the study. Since most clinical isolates in our study were highly susceptible to most antibiotics without significant numbers of ESBL, AmpC, or carbapenemase production, we used the challenge strains with highly resistant strains. Challenge strains were incubated in spiked blood culture bottles without human blood and thus the results are theoretically not comparable, ergo only used for proof of concept. The discrepancy analysis was not carried out according to the ISO 20776-2 (2021-12) standards but was performed using a completely different method (MTS gradient strip). Important antibiotics for multidrug-resistant strains like ceftolozane-tazobactam and ceftazidime-avibactam were included in the study but still from the 35 gram-negative antimicrobials in the test panel only 20 could be analyzed at this time. Due to panel concentrations, some antibiotics like aztreonam for *Pseudomonas* could not be included in the study. Also, one of the most used antibiotics in German hospitals ampicillin-sulbactam was not part of the test panel (<https://avs.rki.de/Content/ReferenceData/AIReport.aspx>). Because most antibiotics on the test plate showed limited concentration ranges, we considered on-scale MICs (MICs within the concentration

range) as well as off-scale MICs (MICs below or equal the lowest concentration or above the highest concentration) for EA evaluation which may lead to overestimation of EA. To close these gaps further studies—also with Gram-positive isolates that were not part of our study—are necessary.

In conclusion, the Reveal rapid AST system is a reliable and accurate approach for the frequently represented bug-drug combinations, meeting the European ISO guideline for the performance of AST systems. The Reveal system provides MICs that could be interpreted by EUCAST or CLSI guidelines. Moreover, AST directly from blood cultures performed with the Reveal system saves time when compared to the conventional AST (MicroScan WalkAway) used in the present study, especially in resistant bacterial strains.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the laboratory staff of Wisplinghoff Laboratories for general assistance. Consumables and testing system were provided by Reveal.

#### AUTHOR AFFILIATIONS

<sup>1</sup>Wisplinghoff Laboratories, Cologne, Germany

<sup>2</sup>Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University of Cologne, Cologne, Germany

<sup>3</sup>Specific Diagnostics, San Jose, California, USA

<sup>4</sup>Cellular Longevity, Inc, San Francisco, California, USA

<sup>5</sup>Institute for Virology and Medical Microbiology, Witten/Herdecke University, Witten, Germany

#### AUTHOR ORCID*s*

Greta Ostermann  <http://orcid.org/0000-0001-6188-2439>

Barbara Körber-Irrgang  <http://orcid.org/0009-0002-9588-965X>

Nathalie Jazmati  <http://orcid.org/0000-0003-4746-7970>

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

Greta Ostermann, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Investigation, Project administration, Supervision, Validation, Writing – original draft | Barbara Körber-Irrgang, Data curation, Formal analysis, Investigation, Methodology, Project administration, Validation, Writing – original draft | Alexander Krüger, Data curation, Formal analysis, Investigation, Writing – review and editing | Pragya Singh, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Methodology, Project administration, Writing – review and editing | Kenny Vo, Conceptualization, Data curation, Formal analysis, Writing – review and editing | Jörg Gielen, Formal analysis, Investigation, Supervision, Writing – review and editing | Ute Aurbach, Formal analysis, Methodology, Validation, visualization, Writing – review and editing | Hilmar Wisplinghoff, Conceptualization, Project administration, Supervision, Writing – review and editing | Nathalie Jazmati, Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Project administration, Supervision, Writing – original draft, Writing – review and editing

#### ETHICS APPROVAL

The study was excluded from review by the responsible ethics committee due to the chosen study design.

#### ADDITIONAL FILES

The following material is available [online](#).

## Supplemental Material

Supplemental material (JCM00692-24-s0001.pdf). Tables S1 to S7.

## REFERENCES

- Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, Shankar-Hari M, Annane D, Bauer M, Bellomo R, Bernard GR, Chiche J-D, Cooper-Smith CM, Hotchkiss RS, Levy MM, Marshall JC, Martin GS, Opal SM, Rubenfeld GD, van der Poll T, Vincent J-L, Angus DC. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA* 315:801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Bloos F, Thomas-Rüddel D, Rüddel H, Engel C, Schwarzkopf D, Marshall JC, Harbarth S, Simon P, Riessen R, Keh D, Dey K, Weiß M, Toussaint S, Schädler D, Weyland A, Ragaller M, Schwarzkopf K, Eiche J, Kuhnle G, Hoyer H, Hartog C, Kaisers U, Reinhart K, MEDUSA Study Group. 2014. Impact of compliance with infection management guidelines on outcome in patients with severe sepsis: a prospective observational multi-center study. *Crit Care* 18:R42. <https://doi.org/10.1186/cc13755>
- Fleischmann-Struzek C, Rose N, Reinhart K. 2022. Sepsisassoziierte Todesfälle in Deutschland: Charakteristika und regionale Variation. *Bundesgesundheitsbl* 65:388–395. <https://doi.org/10.1007/s00103-021-03427-5>
- Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, Shackelford KA, Tsoi D, Kievlan DR, Colombara DV, Ikuta KS, Kisssoon N, Finfer S, Fleischmann-Struzek C, Machado FR, Reinhart KK, Rowan K, Seymour CW, Watson RS, West TE, Marinho F, Hay SI, Lozano R, Lopez AD, Angus DC, Murray CJL, Naghavi M. 2020. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the global burden of disease study. *Lancet* 395:200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, Osborn TM, Townsend S, Dellinger RP, Artigas A, Schorr C, Levy MM. 2014. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med* 42:1749–1755. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000330>
- Nauciel P, Huttner A, van Werkhoven CH, Singer M, Tattevin P, Einav S, Tängdén T. 2021. Impact of time to antibiotic therapy on clinical outcome in patients with bacterial infections in the emergency department: implications for antimicrobial stewardship. *Clin Microbiol Infect* 27:175–181. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.032>
- Retamar P, Portillo MM, López-Prieto MD, Rodríguez-López F, de Cueto M, García MV, Gómez MJ, Del Arco A, Muñoz A, Sánchez-Porto A, Torres-Tortosa M, Martín-Aspas A, Arroyo A, García-Figueras C, Acosta F, Corzo JE, León-Ruiz L, Escobar-Lara T, Rodríguez-Baño J, SAEI/SAMPAC Bacteremia Group. 2012. Impact of inadequate empirical therapy on the mortality of patients with bloodstream infections: a propensity score-based analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 56:472–478. <https://doi.org/10.1128/AAC.00462-11>
- Seymour CW, Gesten F, Prescott HC, Friedrich ME, Iwashyna TJ, Phillips GS, Lemeshow S, Osborn T, Terry KM, Levy MM. 2017. Time to treatment and mortality during mandated emergency care for sepsis. *N Engl J Med* 376:2235–2244. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703058>
- Rhodes A, Evans LE, Alhazzani W, Levy MM, Antonelli M, Ferrer R, Kumar A, Sevransky JE, Sprung CL, Nunnally ME, et al. 2017. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. *Intensive Care Med* 43:304–377. <https://doi.org/10.1007/s00134-017-4683-6>
- Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, Suppes R, Feinstein D, Zanotti S, Taiberg L, Gurka D, Kumar A, Cheang M. 2006. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 34:1589–1596. <https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9>
- Banerjee R, Humphries R. 2021. Rapid antimicrobial susceptibility testing methods for blood cultures and their clinical impact. *Front Med (Lausanne)* 8:635831. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.635831>
- García Clemente P, Romero-Gómez P, García-Rodríguez J, Cendejas-Bueno E. 2022. Optimized identification of microorganisms directly from positive blood cultures by MALDI-TOF to improve antimicrobial treatment. *Rev Esp Quimioter* 35:362–369. <https://doi.org/10.37201/req/135.2021>
- Anton-Vazquez V, Planche T. 2022. Gram-negative blood stream infections: prospects and challenges of rapid antimicrobial susceptibility testing. *Expert Rev Anti Infect Ther* 20:483–485. <https://doi.org/10.1080/14787210.2022.1999805>
- Chandrasekaran S, Abbott A, Campeau S, Zimmer BL, Weinstein M, Thrupp L, Hejna J, Walker L, Ammann T, Kirn T, Patel R, Humphries RM. 2018. Direct-from-blood-culture disk diffusion to determine antimicrobial susceptibility of gram-negative bacteria: preliminary report from the clinical and laboratory standards institute methods development and standardization working group. *J Clin Microbiol* 56:e01678-17. <https://doi.org/10.1128/JCM.01678-17>
- Mancini S, Bodendoerfer E, Kolensnik-Goldmann N, Herren S, Röthlin K, Courvalin P, Böttger EC. 2020. Evaluation of standardized automated rapid antimicrobial susceptibility testing of Enterobacterales-containing blood cultures: a proof-of-principle study. *J Antimicrob Chemother* 75:3218–3229. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa336>
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. 2020. "Intrinsic resistance and unusual phenotypes" version 3.2.
- Bates D, Mächler M, Bolker B, Walker S. 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J Stat Softw* 67:1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Tibbetts R, George S, Burwell R, Rajeev L, Rhodes PA, Singh P, Samuel L. 2022. Performance of the reveal rapid antibiotic susceptibility testing system on Gram-negative blood cultures at a large urban hospital. *J Clin Microbiol* 60:e0009822. <https://doi.org/10.1128/jcm.00098-22>
- Soares A, Pestel-Caron M, Leysour de Rohello F, Bourgoin G, Boyer S, Caron F. 2020. Area of technical uncertainty for susceptibility testing of amoxicillin/clavulanate against *Escherichia coli*: analysis of automated system, Etest and disk diffusion methods compared to the broth microdilution reference. *Clin Microbiol Infect* 26:1685. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.038>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 30th ed. CLSI, Wayne, PA.
- Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, Gomes R, Rodrigues AG, Cantón R, Pina-Vaz C. 2021. Evaluation of FASTinov ultrarapid flow cytometry antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood cultures. *J Clin Microbiol* 59:e0054421. <https://doi.org/10.1128/JCM.00544-21>
- Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, García-Castillo M, Rossolini GM, Cantón R. 2012. Assessment of the Phoenix automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect* 18:E452–E458. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03980.x>
2007. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. ISO 20776-2:2007
- Cayci YT, Ulker KH, Birinci A. 2021. Evaluation of three different methods for susceptibility testing of gentamicin in carbapenem resistant Enterobacterales. *Infez Med* 29:568–573. <https://doi.org/10.53854/lim-2904-10>
- Bartoletti M, Antonelli A, Bussini L, Corcione S, Giacobbe DR, Marconi L, Pascale R, Dettori S, Shbaklo N, Ambretti S, Gaibani P, Giani T, Coppi M, Bassetti M, De Rosa FG, Marchese A, Cavallo R, Lewis R, Rossolini GM, Viale P, Giannella M. 2022. Clinical consequences of very major errors with semi-automated testing systems for antimicrobial susceptibility of

- carbapenem-resistant Enterobacterales. *Clin Microbiol Infect* 28:1290. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2022.03.013>
27. Couchot J, Fournier D, Bour M, Rajeev L, Rhodes P, Singh P, Jeannot K, Plésiat P. 2023. Evaluation of the reveal rapid AST system to assess the susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from blood cultures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 42:359–363. <https://doi.org/10.1007/s10096-023-04556-2>

## 4. Diskussion

Die gezielte antimikrobielle Diagnostik und daraus folgende antimikrobielle Therapie gilt als unverzichtbar in der Behandlung von BSIs beziehungsweise Septitiden, die weltweit eine steigende Inzidenz zeigen [2, 11, 14]. Die global steigende Resistenzraten lassen eine initiale Therapie immer häufiger versagen und führen zur Notwendigkeit eines vollständigen Antibiotogramms. Resultierend kann die „golden hour of sepsis“, also die initiale antimikrobielle Therapieeinleitung innerhalb einer Stunde nach Symptomauftritt zwar initiiert werden, jedoch ist diese immer häufiger ineffektiv aufgrund von Resistenzen. Folgend steigt die Mortalität drastisch [15]. Ebenso ist es wünschenswert, die Resistenzausbreitung einzudämmen. Dies ist nur mit einer gezielten Therapie möglich, die sowohl treffend ist als auch eine geringe Breite aufweist. Um dies umzusetzen ist ein Antibiotogramm essentiell, dabei ist eine schnelle Ergebnismitteilung wünschenswert.

Die vorliegende experimentelle Studie beleuchtet und evaluiert zwei neue mikrobiologische Diagnostikverfahren zur AST bei gramnegativer Sepsis respektive BSI aus positiven BK-Flaschen.

### 4.1 Probenkollektiv

In die Studien wurden nicht alle gramnegativen Spezies eingeschlossen, sondern sich auf die folgenden Spezies fokussiert: *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*. Bei den eingeschlossenen Proben zeigt sich eine heterogene Speziesverteilung mit 73 x *E.coli* (71,6 %), 18 x *K. pneumoniae* (17,6 %), 4 x *K. oxytoca* (3,9 %), 3 x *E. cloacae* (2,9 %), 2 x *P aeruginosa* (1,9 %), 1 x *C. koseri* 1,0 %, 1 x *A. baumannii* (1,0 %). Diese Verteilung deckt sich mit den Ergebnissen der AlertNet-Studie, einer großen deutschen Sepsis-Surveillance-Studie, wo ebenfalls *E.coli* (23,0 %) und *K. pneumoniae* (4,6 %) die häufigsten Enterobacterales unter den gramnegativen Bakterien waren [51]. Zu Bedenken ist hierbei jedoch, dass es keine Selektion hinsichtlich der Spezies in der AlertNet- Studie gab, demnach auch grampositive Erreger berücksichtigt wurden.

## 4.2 4 Stunden WalkAway versus Standarddiagnostik – Ist eine Zeitreduktion möglich und sinnvoll?

Der aktuelle Standard in der automatisierten Antibiotikaresistenztestung ist die overnight, sprich 18-24 Stunden, Subkultivierung eines Keimes aus der positiven BK und die anschließende Fertigstellung eines Inokulums zur Testung. Bedingt durch die lange Subkultivierung ist die Frage aufgekommen, inwieweit eine Zeitreduktion, ohne den Verlust der diagnostischen Reliabilität, möglich ist.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Reduktion der Zeit zur Subkultivierung auf 4-Stunden ein verlässliches Ergebnis liefert (EA von 98,6% und ein CA von 97,1%). Auch bei der Testung von multiresistenten Stämmen aus der CDC & FDA AR Isolat Bank konnten valide Ergebnisse erzielt werden (EA von 100% und CA von 97,9%) [41].

In einer kürzlich durchgeführten Studie von Jacobs et al. wurde der DxM MicroScan WalkAway (Beckman Coulter, Brea, CA, US) für AST direkt aus positiven BCs verwendet. Dieser Ansatz führte jedoch nur zu einer CA von 92,3 % im Vergleich zum Standardprotokoll [53]. Die Verwendung anderer automatisierter AST-Systeme wie das Accelerate Pheno System (Accelerate Diagnostics, Tucson, Arizona, US) und VITEK 2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich) direkt aus positiven BKs ergaben ebenfalls eine niedrige CA von 93,4% bzw. 97,4% [54]. In diesen Studien wurde das EA nicht bewertet.

In unserer durchgeführten Studie wurde im Vergleich zu den oben beschriebenen Studien eine hohe Anzahl von VMEs (12,9%, n=27) gefunden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Testung der multiresistenten Stämme aus der CDC & FDR AR Isolat Bank, innerhalb derselben Studie, keine VMEs beobachtet. Die höchste Anzahl von VMEs trat bei der Prüfung von Amoxicillin-Clavulansäure auf. Dies kann auf eine hohe Anzahl von Stämmen mit einer MHK um den EUCAST-Breakpoint (empfindlich  $\leq 8$  mg/ml, resistent  $> 8$  mg/ml) zurückgeführt werden. Dabei ist zu bedenken, dass EUCAST keine Zwischenkategorie für Amoxicillin-Clavulansäure definiert hat. Daher führen Messungenauigkeiten von nur einer MHK-Stufe zu einem VME.

Betrachtet man nur die adjustierten VMEs, also jene, die auf einer Differenz von mehr als 1  $\log_2$  Verdünnungsschritt zwischen der 4h-MHK und der mit der Referenzmethode ermittelten MHK beruhen, sinkt die Rate der VME auf 5,3%.

In einer von Soares et al. durchgeführten Studie mit *E. coli*-Stämmen, wurden zwischen 10,5% VMEs mit Amoxicillin-Clavulansäure-MHKs um den EUCAST-Breakpoint herum gefunden für das Phoenix System (Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, US) und 27,3 % für den ETEST® [55]. Im Gegensatz dazu hat das CLSI eine Zwischenkategorie für  $\beta$ -Lactame/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren wie Amoxicillin-Clavulansäure eingeführt (sensibel  $\leq 8/4$  mg/ml;

intermediär =16/8 mg/ml; resistent  $\geq$  32/16 mg/ml), sodass eine Abweichung einer MHK-Stufe bei Interpretation mittels CLSI zu einem mE und nicht zu einem VME führt [56].

Dies deckt sich mit der Feststellung, dass Jacobs et al. die größte Anzahl von mE bei Ampicillin-Sulbactam (n=10) detektierte (Amoxicillin-Clavulansäure wurde nicht getestet) und nur 0,4 % (n=5) VME fand, da in dieser Studie der CLSI-Standard für die Interpretation der MHK-Ergebnisse verwendet wurde [53].

Auffällig erscheint, dass  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitor-Kombinationen generell fehleranfälliger sind, wenn die MHKs der Bakterienisolate sich um den Breakpoint befinden, wie dies bei Ampicillin-Sulbactam nicht selten der Fall zu sein scheint [53, 55, 57]. Daraus ergibt sich unseres Erachtens die Forderung nach der Einfügung einer (Area of technical uncertainty) ATU für Amoxicillin-Clavulansäure-MHKs - wie sie EUAST bereits für die Disk-Diffusionstestung für dieses Antibiotikum eingeführt hat [43].

Die Detektion eines VME an Stelle eines mE hat erhebliche therapeutische Auswirkungen. Denn ein Antibiotikum, welches unwirksam ist, wird durch die Detektion eines VMEs fälschlicherweise als sensibel eingestuft und als Therapieoption angesehen, obwohl eine Resistenz vorliegt.

Die zweithäufigsten VMEs, in unserer Studie, wurden bei der Testung von Aminoglykosiden gefunden - wahrscheinlich aus denselben Gründen wie oben für Amoxicillin-Clavulansäure diskutiert [41].

Die europäische Norm für die Bewertung von MHK-Testsystemen EN ISO 20776-2:2007 hat sich bereits mit diesem Problem befasst und definiert Testsysteme mit einem hohen EA von >97% als mit akzeptabler Genauigkeit, selbst wenn die VME-Rate >3% beträgt [58]. In der neuen Version von 2022 wird sogar gänzlich auf die Berechnung der Fehlerraten verzichtet. Der 4-Stunden- DxM MicroScan WalkAway erfüllt diese Kriterien hinreichend und wird daher als ausreichend genau für den Einsatz in der AST-Routine angesehen.

Es exponierte sich, dass die TTP bei Arzneimittel-Spezies-Kombinationen mit VMEs signifikant höher war als bei denen ohne VMEs. Die TTP hängt zum Teil mit der Anzahl der ursprünglich in die Flasche beimpften Organismen zusammen [41]. Es gibt jedoch noch weitere Faktoren, die sich auf die Zeit bis zur Positivität auswirken, darunter die Identität des Organismus, die Menge des entnommenen Blutes und das Vorhandensein von Antibiotika im Blut.

Als eine mögliche Erklärung für das beschriebene Ergebnis kann das Vorhandensein von Antibiotika in der BK-Flasche respektive im Patienten sein. Hierdurch könnten Spezies-Klone mit einer MHK in der Nähe eines Breakpoints selektiert und vermehrt werden, sodass die Testsysteme für diese Isolate eine höhere Fehlerwahrscheinlichkeit aufweisen.

In Zusammenschau der Ergebnisse kann festgehalten werden, dass die Verwendung einer 4-stündigen Subkultur gramnegativer Bakterien aus positiven BKs für die AST mit dem DxM MicroScan WalkAway ein reliabler Ansatz ist, der die europäischen ISO-Richtlinien für die Leistung von AST-Systemen erfüllt. Eine Zeitersparnis von etwa 14 bis 20 Stunden wird erzielt. Abschließend lässt sich in Anbetracht der Ergebnisse sagen, dass eine Zeitreduktion sehr gut möglich und zugleich sinnvoll erscheint, da eine erhebliche Zeitreduktion gewonnen werden kann bei erhaltener Reliabilität der Testmethode. Ebenso zeigt sich ein günstiges Kosten-Nutzen Verhältnis, da keine neuen Gerätschaften finanziert werden müssen. Zudem fallen neue Zertifizierungen sowie Schulungen des Personals weg, denn eine bereits etablierte Methode wird modifiziert.

#### **4.3 Reveal-AST aus der positiven Blutkultur versus Standarddiagnostik – ist eine Zeitreduktion möglich und sinnvoll?**

Das Reveal-AST System, welches zuvor mit seiner Funktionsweise in Kapitel 2.2.3.2 beschrieben wurde, ermöglicht in einer durchschnittlichen Zeit von  $5,4\text{h} \pm 1,2\text{h}$  eine Erstellung eines phänotypischen Antibiogramms. Dabei variiert die Zeit zwischen den einzelnen Spezies in unserer Studie ein wenig und zeigt Zeiten von  $4,2\text{h} \pm 0,7\text{h}$  für *A. baumannii* bis  $6,0\text{h} \pm 1,0\text{h}$  für *P. aeruginosa*. Tibbetts et. al beschreibt bei der Verwendung des Reveal AST Systems eine TTR (Time To Result) abhängig von der Spezies-Antibiotika Kombination von 3 Stunden bis 6,8 Stunden [47]. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen und zeigt eine erhebliche Zeitersparnis im Vergleich zur Standarddiagnostik, da eine overnight (18-24 Stunden) Subkultivierung und auch die Testung von zusätzlichen 16-18 Stunden komplett entfällt. Somit ist es möglich die Ergebnisse der Resistenztestung mittels Reveal AST System innerhalb von 5-6 Stunden (also ggf. taggleich) nach positiv werden der BK zu ermitteln.

Die taggleiche Fertigstellung eines phänotypischen Antibiogramms hat eine hohe Bedeutung, da nachts Ergebnisse im Labor und auch in der Klinik nur unzureichend umgesetzt werden. Die schnellere Ergebnisübermittlung ermöglicht eine schnellere Reaktion in der Klinik. Inwiefern eine Reduktion der TTR sich tatsächlich auf die Behandlung auswirkt ist zum aktuellen Zeitpunkt noch Gegenstand der Forschung. Es ist anzunehmen, dass eine kürzere Zeit bis zur optimalen Antibiotikatherapie zu einer geringeren Dauer des Krankenhausaufenthalts und einer geringeren Sterblichkeit führen könnte [76].

Wir fanden ein sehr hohes EA und CA von 98,5% bzw. 97,1% zwischen dem Reveal® rapid AST System und der Referenzmethode sowie 99,6% bzw. 97,9% bei der Testung von multiresistenten Stämmen aus der CDC & FDA AR Isolat Bank. Tibbetts et al. veröffentlichten ähnliche Leistungsmerkmale für das Reveal-System bei Verwendung von Panels und Breakpoints gemäß dem CLSI [47]. Im Vergleich zur Studie von Tibbetts et al. fanden wir jedoch einen höheren Prozentsatz an VME mit 16,1 % (n=34/211, MicroScan AST-Platten) gegenüber 1,3% (n=3/232, Vitek2 AST-Karten) bzw. 1,2% (n=4/313, Sensititre AST-Platten). Im Allgemeinen war in beiden Studien die Zahl der resistenten klinischen Isolate gering (<14%) [47]. Eine geringe Anzahl resistenter Stämme kann zu einem höheren Auftreten von VMEs führen, wenn Leitlinien für die MHK-Bewertung ohne Zwischenkategorie verwendet werden, beispielsweise EUCAST, wie es in der vorliegenden Studie der Fall war.

Auch in unserer durchgeführten Reveal-Studie trat die höchste Anzahl von VMEs pro Medikament bei Amoxicillin-Clavulansäure auf (n=14). Aufgrund derselben Problematik, dass nach EUCAST keine intermediäre Kategorie für die Testung von Amoxicillin-Clavulansäure besteht. Somit können Messungenauigkeiten von nur 1 log<sub>2</sub> Verdünnungsschritt zu einer VME führen. Betrachtet man nur VMEs, die aus Kategorieabweichungen resultieren, die auf einer Differenz von mehr als 1 log<sub>2</sub> Verdünnungsschritt zwischen der Reveal-MHK und der mit der Referenzmethode ermittelten MHK beruhen (adjusted VME, aVME), sinkt die Rate von 51,9% auf 18,5% aVMEs. Die aVME-Rate scheint realistischer zu sein, wenn Arzneimittel mit S/R- statt mit S/I/R-Breakpoints analysiert werden.

Analog hierzu kann wie in Kapitel 3.2 die Studie von Soares et al. [55] vergleichend hinzugezogen werden, denn auch hier sind auffällig hohe VME-Raten bei Amoxicillin-Clavulansäure zu detektieren.

Amoxicillin-Clavulansäure wurde von Tibbetts et al. nicht getestet, da das CLSI-Panel stattdessen Ampicillin-Sulbactam enthält. Im Gegensatz zu EUCAST sieht das CLSI eine Zwischenkategorie für  $\beta$ -Lactame/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren wie Amoxicillin-Clavulansäure und Ampicillin-Sulbactam vor (sensibel  $\leq 8/4$  mg/ml; intermediär =16/8 mg/ml; resistent  $\geq 32/16$  mg/ml), sodass mEs und nicht VMEs resultieren. Dementsprechend fanden Tibbetts et al. keine VME, aber eine hohe Anzahl von mE mit Ampicillin-Sulbactam (n=29/33,7% mit Sensititre; n=16/18,4 % mit Vitek 2) [47]. Dies lässt auf eine generelle Problematik beim Testen von Aminopenicillin-Kombinationspräparaten, wie  $\beta$ -Lactam/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitor-Kombinationen in Stämmen mit MHKs um den Breakpoint, schließen [55, 57, 59]. Die Reveal-Studie unterstützt somit mit ihren Ergebnissen die Forderung nach einer intermediären Kategorie beziehungsweise ATU für  $\beta$ -Lactame/ $\beta$ -Lactamase-Inhibitoren. Gleiches konnte in der 4h DxM MicroScan WalkAway-Studie gezeigt werden (vergleiche Kapitel 3.2).

Die zweithäufigste VME-Rate wurde für die Aminoglykoside Gentamicin, Tobramycin sowie Amikacin festgestellt. Andere Studien wie die von Cayci et al. [60] haben mit verschiedenen Testsystemen, einschließlich automatisierter Standardtestsyste wie dem Vitek 2 (bioMérieux, Marcy L'Etoile, Frankreich), die Unzuverlässigkeit von Aminoglykosid-Tests bei gramnegativen Bakterien und das Auftreten von VME gezeigt [57, 59-61]. In unserer Studie sind die hohen VME-Raten jedoch wahrscheinlich aus denselben Gründen aufgetreten, die bereits für Amoxicillin-Clavulansäure diskutiert wurden (niedrige Rate resistenter Stämme für diese Antibiotika und Stämme mit MHKs um den jeweiligen EUCAST S/R Breakpoint). Wenn nur die VMEs berücksichtigt werden, die aus Kategorieabweichungen resultieren, die auf einer Differenz von mehr als 1 log<sub>2</sub> Verdünnungsschritt zwischen der Reveal-MHK und der mit der Referenzmethode ermittelten MHK beruhen, wie oben für Amoxicillin/Clavulansäure erörtert, sinkt die VME-Rate für Amikacin von 100% auf 25%, für Gentamicin von 85,7% auf 14,3% und für Tobramycin von 71,4% auf 14,3%.

Wenn Stämme hochgradig resistent gegen ein Antibiotikum waren, hatte das entsprechende Antibiotikum im Schnitt eine kürzere TTR, wenn sie mit dem Reveal® rapid AST System getestet wurden, z. B. Ampicillin (3,6 h), im Vergleich zu Antibiotika, die im Großteil der Stämme empfindlich waren (z.B. Meropenem; 6,6 h). Dementsprechend war die durchschnittliche Zeit bis zum Ergebnis für alle Antibiotika im klinischen Datensatz deutlich höher als im Studienteil mit hochresistenten CDC & FDA AR-Stämmen. Damit hat die Verwendung des Reveal-Systems für AST an dieser Stelle einen besonderen Vorteil, da Patienten mit resistenten Stämmen besonders von einer schnellen Diagnostik profitieren. Denn resistente Spezies werden häufiger empirisch inadäquat therapiert [62].

Kritisch hinzuzufügen ist, dass bei einer Testung direkt aus der BK-Flasche generell initial nicht sichergestellt werden kann, dass es sich um eine monobakterielle Kultur handelt. Polybakterielle Kulturen sind nicht zur Diagnostik mittels des Reveal-AST Systems geeignet. Hierfür sind initiale Subkultivierungen notwendig, sodass jede gewachsene Spezies einzeln auf die Antibiotikaempfindlichkeit getestet werden kann. Da allerdings die Mehrzahl der BKs monobakteriell sind (143 getestete BKs davon 4 exkludiert aufgrund von polybakteriellem Wachstum), ist eine Diagnostik mittels des Reveal AST-Systems in der Regel möglich.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Verwendung des Reveal®-Schnellanalysesystems ein zuverlässiger und genauer Ansatz ist, der die europäischen ISO-Richtlinien für die Leistungsfähigkeit von AST-Systemen erfüllt. Das Reveal-System liefert MHKs, die nach EUCAST- oder CLSI-Richtlinien interpretiert werden können. Darüber hinaus spart die mit dem Reveal-System durchgeführte AST direkt aus BKs im Vergleich zur

konventionellen AST (MicroScan WalkAway), die in der vorliegenden Studie verwendet wurde, Zeit, insbesondere bei resistenten Bakterienstämmen.

#### **4.4 Einfluss und Impact mikrobiologischer Diagnostik auf die klinische antimikrobielle Therapie**

Auch wenn eine Keimidentifizierung, beispielsweise durch die initial durchgeführte Gramfärbung oder Identifikation mittels MALDI-TOF, bereits erste Hinweise auf eine adäquate antiinfektive Therapie liefert, ist eine detaillierte Resistenztestung unerlässlich. Bereits innerhalb einer Spezies können unterschiedliche Resistenzmuster auftreten, welche hierdurch nicht adressiert werden. Dies zeigt bereits das eine optimale Labordiagnostik wichtig für eine optimale Behandlung der Sepsis beziehungsweise der BSI ist.

Im laboratorischen Alltag können zwei Arten von Befundübermittlung differenziert werden. Der Vorbefund beziehungsweise Teilbefund und der Endbefund, welcher das vollständige Antibiotogramm enthält. Der Vorbefund beinhaltet die in Kapitel 2.2.1 beschriebene Gramfärbung. Diese erlaubt die Einordnung des Keimes und lässt eine erste Differenzierung anhand von phänotypischen Merkmalen zu, welche in Zusammenhang mit der Klinik des Patienten bereits erste Aufschlüsse auf eine möglich adäquate Therapie geben kann. Eine Anpassung der antimikrobiellen Therapie kann gegeben Falls stattfinden.

Der Endbefund mit dem vollständigen Antibiotogramm erlaubt dann letztendlich die gezielte Therapie und eine Reduktion der Breite der antibiotischen Therapie. Dies ist wünschenswert für die globale Resistenzentwicklung als auch für die des Patienten (siehe 2.1.2.).

In Anbetracht der Zeit bis zum mikrobiologischen Befund erfolgt initial eine empirische Therapie. Die Studie von Banerjee et al. [63] konnte aufzeigen, dass eine antimikrobielle Therapieadaption in Schnelltestungsverfahren häufiger war als in den herkömmlichen, langwierigen Referenzverfahren. Begründet könnte dies in der Zeit sein, da bereits entweder ein Therapieerfolg verzeichnet wurde oder ein Therapieversagen bereits stattgefunden hat [64]. Untersuchungen im intensivmedizinischen Bereich stellten eine hohe Bedeutung der antimikrobiellen Therapie dar: Bei Patienten im septischen Schock ergab sich eine antibiotische Therapieumstellung aufgrund der mikrobiologischen Befunde in 80%. Der Anteil einer Therapiedeskalation betrug 64% [65]. Gleichermaßen konnte Cuthbertson et al. in seiner Studie eine Therapieumstellung nach erfolgten Antibiotogramm in 63% der Fälle detektieren [66]. Dies deutet darauf hin, dass die mikrobiologische Differenzialdiagnostik umso wichtiger ist, je kranker ein Patient ist. Patienten auf einer Intensivstation stellen ein

besonders vulnerables Klientel dar, da sie aufgrund ihrer Erkrankung ein höheres Infektionspotential besitzen, besonders mit resistenten Keimen. Häufig zeigen sich hier Keime mit extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), welche sich oftmals nur nach Antibiotogramm zielgerichtet therapieren lassen [67].

Fraglich bleibt, welchen Nutzen die vierstündige Subkultivierung und damit ein um 4-Stunden verlängertes Testverfahren im Vergleich zur Direktdiagnostik für den Patienten hat. Dies müssten weitere Studien zeigen, um abschließend im vollen Umfang ein Urteil bezüglich der Favorisierung einer Testmethode fällen zu können. In gleicher Weise ist offen wie das Outcome des Patienten durch eine schnellere Diagnostik beeinflusst wird.

Zu bemerken ist jedoch, dass Systeme wie der DxM MicroScan Walkway oder Vitek 2 bereits im Laboralltag etabliert sind, sodass hier sicherlich auch der Kosten-Nutzen Aspekt eine Rolle spielt, da die bisher gezeigten Ergebnisse nahezu identisch sind.

#### **4.5 Limitationen**

Die beiden Studien, sowohl die 4-Stunden MicroScan WalkAway als auch die Reveal Studie, wurden an einem limitierten Kollektiv durchgeführt. So wurden insgesamt 102 Proben inkludiert. Alle Proben waren monobakteriell gramnegativ. Ebenso wurden nur die in Kapitel 3.1 genannten Spezies eingeschlossen. Dies limitiert die Generalisierung der Ergebnisse, da für grampositive Spezies sowie für alle anderen gramnegativen Spezies folglich keine Aussage getroffen werden kann. Ebenso verliefen beide Studien (Reveal-Studie als auch DxM MicroScan WalkAway) monozentrisch, sodass die Ergebnisse nur im Labor Dr. Wisplinghoff generiert wurden. In dem Probenkollektiv wurden nur bei *E. coli* und *K. pneumoniae* VMEs gemessen. Dies führt zu einer Verzerrung der Ergebnisse, bedingt durch die geringe Anzahl an Spezies.

Zudem wird die Studie dadurch limitiert, dass in beiden Studien nur 20 der 35 Antibiotika, die auf der MDR-Platte verfügbaren sind, eingeschlossen wurden. Gleichmaßen war die Bewertung der Übereinstimmung der MHK-Ergebnisse durch die begrenzte Bandbreite der antimikrobiellen Konzentrationen auf der MDR-Platte eingeschränkt.

Konkret führte dies dazu, dass Antibiotika wie Aztreonam für die Behandlung von *Pseudomonas* nicht in die Studie aufgenommen wurden.

Um diese Lücken zu schließen, sind weitere Studien - auch mit grampositiven Isolaten, die nicht Teil unserer Studie waren – notwendig.

Zu guter Letzt ist anzumerken, dass die Proben randomisiert inkludiert wurden ohne Zuordnung von Patientendaten. Demnach ist eine Nachverfolgung der Patienten nicht möglich und somit kann auch keine Aussage darüber getroffen werden, ob eine Sepsis vorlag oder nicht. Der Impact einer schnelleren Diagnostik ist durch diese Studien nicht zu klären und bedarf weiterer Studien.

#### **4.6 Schlussfolgerung**

Die BSI respektive Sepsis ist ein weit verbreitetes Krankheitsbild mit einer großen weltweiten Relevanz und hoher Letalität. Hieraus resultiert für die Betroffenen eine große Bedrohung.

Die schnelle Erregerdiagnostik stellt eine Schlüsselrolle in der antiinfektiven Therapie dar.

In den vorliegenden Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl der Reveal AST als auch der 4-Stunden Walkaway Ansatz reliable und valide Ergebnisse hinsichtlich der Antibiotikaresistenztestung von gramnegativen Erregern erzielen und dabei eine deutliche Zeitersparnis mit sich bringen. Diese Ergebnisse ermöglichen es theoretisch dem Klinker früher auf eine gezielte, schmalere sowie kausale antiinfektive Therapie zu deeskalieren. Inwiefern durch die Zeitreduktion und die frühere Verfügbarkeit von Antibigrammen das Outcome des Patienten hinsichtlich der Mortalität gebessert werden kann, muss in weiteren Studien untersucht werden. Es ist zu vermuten, dass durch eine schnellere gezielte und schmalere Therapie die Resistenzentstehung supprimiert werden könnte, durch einen geringeren Selektionsdruck.

Dennoch reicht eine alleinige schnellere antimikrobielle Ergebnisübermittlung nicht aus, denn im Klinikalltag muss die Information des Antibigramms auch den entsprechend zuständigen Arzt erreichen, von diesem verarbeitet und umgesetzt werden. Dies ist ein Faktor der durch diagnostische Verbesserung allerdings nicht beeinflusst werden kann, aber ebenso ein wichtiger beeinflussender Faktor ist, den es in weiteren Studien zu untersuchen gilt.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med.* 2021;47(11):1181-1247.
2. Rottier WC, Ammerlaan HS, Bonten MJ. Effects of confounders and intermediates on the association of bacteraemia caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae and patient outcome: a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1311-1320.
3. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP. Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(3):444-465.
4. Huerta LE, Rice T, Pathologic Difference between Sepsis and Bloodstream Infections, *The Journal of Applied Laboratory Medicine* January 2019, Pages 654–663
5. Singer M, Deutschman CS, Seymour CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA.* 2016;315(8):801-810.
6. Liu V, Escobar GJ, Greene JD, et al. Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. *JAMA.* 2014;312(1):90-92.
7. Bauer M, Gerlach H, Vogelmann T, et al. Mortality in sepsis and septic shock in Europe, North America and Australia between 2009 and 2019- results from a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2020;24(1):239. Published 2020 May 19.
8. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200-211.
9. Rudd KE, Johnson SC, Agesa KM, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *Lancet.* 2020;395(10219):200-211.
10. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med.* 2003;348(16):1546-1554.
11. Fleischmann C, Thomas-Rueddel DO, Hartmann M, et al. Hospital Incidence and Mortality Rates of Sepsis. *Dtsch Arztebl Int.* 2016;113(10):159-166.
12. Niederman MS, Baron RM, Bouadma L, et al. Initial antimicrobial management of sepsis. *Crit Care.* 2021;25(1):307.
13. Bone RC. Gram-negative sepsis: a dilemma of modern medicine. *Clin Microbiol Rev.* 1993;6(1):57-68.

14. De Waele JJ, Dhaese S. Antibiotic stewardship in sepsis management: toward a balanced use of antibiotics for the severely ill patient. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2019;17(2):89-97.
15. Buckman SA, Turnbull IR, Mazuski JE. Empiric Antibiotics for Sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2018 Feb/Mar;19(2):147-154.
16. Ferrer R, Martin-Loeches I, Phillips G, et al. Empiric antibiotic treatment reduces mortality in severe sepsis and septic shock from the first hour: results from a guideline-based performance improvement program. *Crit Care Med.* 2014 Aug;42(8):1749-55.
17. Kumar A, Ellis P, Arabi Y, et al. Cooperative Antimicrobial Therapy of Septic Shock Database Research Group. Initiation of inappropriate antimicrobial therapy results in a fivefold reduction of survival in human septic shock. *Chest.* 2009 Nov;136(5):1237-1248.
18. Kumar A, Roberts D, Wood KE, et al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med.* 2006 Jun;34(6):1589-96.
19. Shafazand S, Weinacker AB. Blood cultures in the critical care unit: improving utilization and yield. *Chest.* 2002;122(5):1727-1736.
20. Fabre V, Carroll KC, Cosgrove SE. Blood Culture Utilization in the Hospital Setting: a Call for Diagnostic Stewardship. *J Clin Microbiol.* 2022;60(3):e0100521.
21. Cockerill FR 3rd, Wilson JW, Vetter EA, et al. Optimal testing parameters for blood cultures. *Clin Infect Dis.* 2004;38(12):1724-1730.
22. Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, et al. Practical Guidance for Clinical Microbiology Laboratories: A Comprehensive Update on the Problem of Blood Culture Contamination and a Discussion of Methods for Addressing the Problem. *Clin Microbiol Rev.* 2019;33(1):
23. Lalezari A, Cohen MJ, Svinik O, et al. A simplified blood culture sampling protocol for reducing contamination and costs: a randomized controlled trial. *Clin Microbiol Infect.* 2020;26(4):470-474.
24. Endimiani A, Tamborini A, Luzzaro F, et al. Epidemiology of bloodstream infections and time to detection of positive blood cultures: an evaluation of the automated BacT/Alert and BACTEC 9240 systems. *New Microbiol.* 2002;25(1):9-16.
25. Mirrett S, Reller LB, Petti CA, et al. Controlled clinical comparison of BacT/ALERT standard aerobic medium with BACTEC standard aerobic medium for culturing blood. *J Clin Microbiol.* 2003 Jun;41(6):2391-4.

26. O'Toole GA. Classic Spotlight: How the Gram Stain Works. *J Bacteriol.* 2016;198(23):3128. Published 2016 Nov 4.
27. BARTHOLOMEW JW, MITTWER T. The Gram stain. *Bacteriol Rev.* 1952;16(1):1-29.
28. Beveridge TJ, Davies JA. Cellular responses of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* to the Gram stain. *J Bacteriol.* 1983 Nov;156(2):846-58.
29. Opota O, Croxatto A, Prod'hom G, et al. Blood culture-based diagnosis of bacteraemia: state of the art. *Clin Microbiol Infect.* 2015;21(4):313-322. doi:10.1016/j.cmi.2015.01.003.
30. Marquet K, Liesenborgs A, Bergs J, et al. Incidence and outcome of inappropriate in-hospital empiric antibiotics for severe infection: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2015 Dec;19(1):795.
31. Freiwald A, Sauer S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nat Protoc.* 2009;4(5):732-742.
32. Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, et al. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol.* 2015;6:791.
33. Methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Terminology. *Clin Microbiol Infect.* 1998;4(5):291.
34. Kowalska-Krochmal B, Dudek-Wicher R. The Minimum Inhibitory Concentration of Antibiotics: Methods, Interpretation, Clinical Relevance. *Pathogens.* 2021;10(2):165.
35. Cantón R, Morosini MI. Emergence and spread of antibiotic resistance following exposure to antibiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 2011;35(5):977-991.
36. Strich JR, Heil EL, Masur H. Considerations for Empiric Antimicrobial Therapy in Sepsis and Septic Shock in an Era of Antimicrobial Resistance. *J Infect Dis.* 2020;222(Suppl 2):S119-S131.
37. Neumeister B, Geiss H K, Braun R W, et al. Automatisierung in der Mikrobiologie (Identifizierung und antimikrobielle Empfindlichkeitsprüfung) In: Mikrobiologische Diagnostik 2009: Thieme Verlag Hrsg. 2. Auflage. Stuttgart: Thieme; 2009
38. Heatley NG. A method for the assay of penicillin. *Biochem J.* 1944;38(1):61-65.
39. Nijs A, Cartuyvels R, Mewis A, et al. Comparison and evaluation of Osiris and Sirscan 2000 antimicrobial susceptibility systems in the clinical microbiology laboratory. *J Clin Microbiol.* 2003;41(8):3627-3630.
40. Gajic I, Kabic J, Kekic D, et al. Antimicrobial Susceptibility Testing: A Comprehensive Review of Currently Used Methods. *Antibiotics (Basel).* 2022;11(4):427.
41. Unser Paper

42. Jonasson E, Matuschek E, Kahlmeter G. The EUCAST rapid disc diffusion method for antimicrobial susceptibility testing directly from positive blood culture bottles. *J Antimicrob Chemother.* 2020;75(4):968-978.
43. EUCAST. Methodology—EUCAST Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing (RAST) Directly from Positive Blood Culture Bottles. 2019. [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/RAST/2022/EUCAST\\_RAST\\_calibration\\_and\\_validation\\_BP\\_v5.0\\_final.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/RAST/2022/EUCAST_RAST_calibration_and_validation_BP_v5.0_final.pdf) (Zuletzt abgerufen am 08.09.2023)
44. Fröding I, Vondracek M, Giske CG. Rapid EUCAST disc diffusion testing of MDR *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: inhibition zones for extended-spectrum cephalosporins can be reliably read after 6 h of incubation. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Apr 1;72(4):1094-1102.
45. Hombach M, Jetter M, Blochliger N, et al. Fully automated disc diffusion for rapid antibiotic susceptibility test results: a proof-of-principle study. *J Antimicrob Chemother* 2017; 72: 1659–68.
46. Van den Bijllaardt W, Buiting AG, Mouton JW, et al. Shortening the incubation time for antimicrobial susceptibility testing by disk diffusion for Enterobacteriaceae: how short can it be and are the results accurate? *Int J Antimicrob Agents.* 2017 May;49(5):631-637.
47. Tibbetts R, George S, Burwell R, et al. Performance of the Reveal Rapid Antibiotic Susceptibility Testing System on Gram-Negative Blood Cultures at a Large Urban Hospital. *J Clin Microbiol.* 2022.
48. Kostrzewa M, Sparbier K, Maier T, et al. MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *Proteomics Clin Appl.* 2013;7(11-12):767-778.
49. Yu J, Tien N, Liu YC, et al. Rapid Identification of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Using MALDI-TOF MS and Machine Learning from over 20,000 Clinical Isolates. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2).
50. Candela A, Arroyo MJ, Sánchez-Molleda Á, et al. Rapid and Reproducible MALDI-TOF-Based Method for the Detection of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Using Classifying Algorithms. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(2):328.
51. Karch A, Schmitz RP, Reißner F, et al. Bloodstream infections, antibiotic resistance and the practice of blood culture sampling in Germany: study design of a Thuringia-wide prospective population-based study (AlertsNet). *BMJ Open.* 2015;5(12).

52. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0, 2020.
53. Jacobs MR, Good CE, Abdelhamed, AM et al. Accuracy of Direct Antimicrobial Susceptibility Testing of Gram-Negative Bacteria from Positive Blood Cultures Using MicroScan System and Value of Using Expert Rules for  $\beta$ -Lactam Agents. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(3):e0214821. doi:10.1128/aac.02148-21.
54. Schneider JG, Wood JB, Smith NW, et al. Direct antimicrobial susceptibility testing of positive blood cultures: a comparison of the Accelerate Pheno™ and VITEK® 2 systems. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2019 Nov;95(3):114841. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.05.013.
55. Soares A, Pestel-Caron M, Leysour de Rohello F, et al.. Area of technical uncertainty for susceptibility testing of amoxicillin/clavulanate against *Escherichia coli*: analysis of automated system, Etest and disk diffusion methods compared to the broth microdilution reference. *Clin Microbiol Infect*. 2020;26(12):1685.e1-1685.e6. doi:10.1016/j.cmi.2020.02.038.
56. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2020. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 30th informational supplement. CLSI document M100-S30. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
57. Giani T, Morosini MI, D'Andrea MM, et al. Assessment of the Phoenix™ automated system and EUCAST breakpoints for antimicrobial susceptibility testing against isolates expressing clinically relevant resistance mechanisms. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(11):E452-E458. doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03980.x.
58. International Organization for Standardization (ISO), Geneva, Switzerland, 2007. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices (ISO 20776-2:2007).
59. Silva-Dias A, Pérez-Viso B, Martins-Oliveira I, et al. Evaluation of FASTinov Ultrarapid Flow Cytometry Antimicrobial Susceptibility Testing Directly from Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. 2021 Sep 20;59(10):e0054421. doi: 10.1128/JCM.00544-21. Epub 2021 Aug 4. PMID: 34346718; PMCID: PMC8451411.
60. Cayci YT, Ulker KH, Birinci A. Evaluation of three different methods for susceptibility testing of gentamicin in carbapenem resistant Enterobacterales. *Infez Med*. 2021 Dec 10;29(4):568-573. doi: 10.53854/liim-2904-10.

61. Bartoletti M, Antonelli A, Bussini L, et al. Clinical consequences of very major errors with semi-automated testing systems for antimicrobial susceptibility of carbapenem-resistant Enterobacterales. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Sep;28(9):1290.e1-1290.e4. doi: 10.1016/j.cmi.2022.03.013.
62. Anton-Vazquez V, Planche T. Gram-negative blood stream infections: prospects and challenges of rapid antimicrobial susceptibility testing. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2022 Apr;20(4):483-485. doi: 10.1080/14787210.2022.1999805.
63. Banerjee R, Komarow L, Virk A, et al. Randomized Trial Evaluating Clinical Impact of RAPid IDentification and Susceptibility Testing for Gram-negative Bacteremia: RAPIDS-GN. *Clin Infect Dis.* 2021;73(1):e39-e46. doi:10.1093/cid/ciaa528.
64. Meda M, Clayton J, Varghese R, et al. What are the critical steps in processing blood cultures? A prospective audit evaluating current practice of reporting blood cultures in a centralised laboratory serving secondary care hospitals. *J Clin Pathol.* 2017;70(4):361-366. doi:10.1136/jclinpath-2016-204091.
65. Leone M, Bourgoin A, Cambon S, et al. Empirical antimicrobial therapy of septic shock patients: adequacy and impact on the outcome. *Crit Care Med.* 2003;31(2):462-467. doi:10.1097/01.CCM.0000050298.59549.4A.
66. Cuthbertson BH, Thompson M, Sherry A, et al. Intensive Care Society. Antibiotic-treated infections in intensive care patients in the UK. *Anaesthesia.* 2004;59(9):885-890. doi:10.1111/j.1365-2044.2004.03742.x.
67. Brusselaers N, Vogelaers D, Blot S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. *Ann Intensive Care.* 2011;1:47. Published 2011 Nov 23. doi:10.1186/2110-5820-1-47.
68. Giske CG, Turnidge J, Cantón R, et al. EUCAST Steering Committee. Update from the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). *J Clin Microbiol.* 2022 Mar 16;60(3):e0027621. doi: 10.1128/JCM.00276-21.
69. Lamy B, Sundqvist M, Idelevich EA; ESCMID Study Group for Bloodstream Infections, Endocarditis and Sepsis (ESGBIES). Bloodstream infections - Standard and progress in pathogen diagnostics. *Clin Microbiol Infect.* 2020 Feb;26(2):142-150. doi: 10.1016/j.cmi.2019.11.017.
70. Rogers MS, Oppenheim BA. The use of continuous monitoring blood culture systems in the diagnosis of catheter related sepsis. *J Clin Pathol.* 1998 Aug;51(8):635-7. doi: 10.1136/jcp.51.8.635.

71. Peralta G, Rodríguez-Lera MJ, Garrido JC, et al. Time to positivity in blood cultures of adults with *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *BMC Infect Dis*. 2006 Apr 27;6:79. doi: 10.1186/1471-2334-6-79.
72. Chen Y, Huang X, Wu A, et al. Prognostic roles of time to positivity of blood cultures in patients with *Escherichia coli* bacteremia. *Epidemiol Infect*. 2020 May 8;148:e101. doi: 10.1017/S0950268820000941.
73. Gavronski S, Nogueira KDS. Time to positivity: a useful parameter to evaluate intensive care unit blood stream infections? *Rev Bras Ter Intensiva*. 2020 Jun;32(2):326-329. doi: 10.5935/0103-507x.20200049.
74. van Belkum A, Burnham CD, Rossen JWA, et al. Innovative and rapid antimicrobial susceptibility testing systems. *Nat Rev Microbiol*. 2020 May;18(5):299-311. doi: 10.1038/s41579-020-0327-x.
75. Humphries RM. Update on Susceptibility Testing: Genotypic and Phenotypic Methods. *Clin Lab Med*. 2020 Dec;40(4):433-446. doi: 10.1016/j.cll.2020.08.002.
76. Banerjee R, Humphries R. Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing Methods for Blood Cultures and Their Clinical Impact. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Mar 10;8:635831. doi: 10.3389/fmed.2021.635831.
77. Pancholi P, Carroll KC, Buchan BW, et al. Multicenter Evaluation of the Accelerate PhenoTest BC Kit for Rapid Identification and Phenotypic Antimicrobial Susceptibility Testing Using Morphokinetic Cellular Analysis. *J Clin Microbiol*. 2018 Mar 26;56(4):e01329-17. doi: 10.1128/JCM.01329-17.
78. Anton-Vazquez V, Adjepong S, Suarez C, et al. Evaluation of a new Rapid Antimicrobial Susceptibility system for Gram-negative and Gram-positive bloodstream infections: speed and accuracy of Alfred 60AST. *BMC Microbiol*. 2019 Nov 29;19(1):268. doi: 10.1186/s12866-019-1654-9.
79. Kohlmann R, Hoffmann A, Geis G, et al. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int J Med Microbiol*. 2015 Jun-Aug;305(4-5):469-79. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.04.004.

## 6. Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 Darstellung einer 96-Well Platte
- Abbildung 2 Darstellung der Antibiotikaverteilung in der 96-Well Platte
- Abbildung 3 Beispielhafte Darstellung eines Agardiffusionstestes mittels Plättchendiffusion
- Abbildung 4 Beispielhafte Darstellung eines Epsilon-Test

## **7. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen**

**7.1 Testing using automated broth microdilution: performance evaluation of a four-hours bacterial cultivation from positive blood cultures presented at the European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**

# Rapid antimicrobial susceptibility testing using automated broth microdilution: performance evaluation of a four-hours bacterial cultivation from positive blood cultures

Barbara Körber-Irrgang, Alexander Krüger<sup>1,2</sup>, Greta Flüh<sup>1</sup>, Jörg Gielen<sup>2</sup>, Claus Scholz<sup>1</sup>, Hilmar Wisplinghoff<sup>1,3</sup>, Nathalie Jazmati<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Wisplinghoff Laboratories - Cologne (Germany).

<sup>2</sup> Institute for Medical Microbiology, Immunology and Hygiene, University Hospital of Cologne - Cologne (Germany)

<sup>3</sup> Institute for Virology and Medical Microbiology, Witten/Herdecke University - Witten (Germany)

## Background

Sepsis or septic shock due to bacterial infection is a common disease worldwide that can rapidly lead to death. Due to the increasing number of antimicrobial-resistant bacteria there is the risk that empirical antibiotic therapy fails. Thus, rapid and reliable antimicrobial susceptibility testing (AST) is needed. In the present study, the performance of the DxM MicroScan WalkAway by using colonies after 4-hour incubation in comparison to standard overnight cultures was assessed.

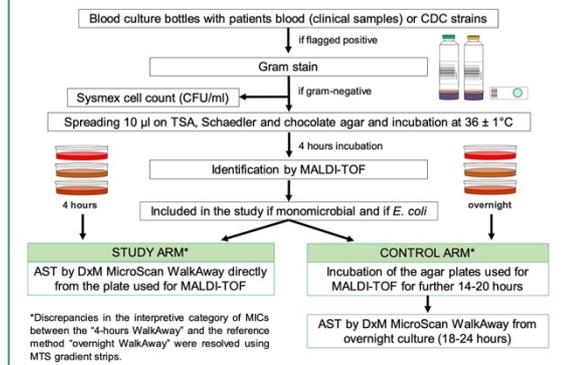
## Methods

- ❖ From February to April 2021 randomly selected positive blood-cultures (PBC) from clinical microbiology yielding *Escherichia coli* were included in the study.
- ❖ Essential agreement (EA), category agreement (CA), minor errors (mE), major errors (ME), very ME (VME) and adjusted VME (aVME; only category discrepancies based on more than +/- 1 dilution step are included) were calculated.

## Results

- ❖ 73 *E. coli* isolates, 19 antimicrobial drugs
- ❖ 1387 drug-strain pairs
- ❖ Essential Agreement 99.1%
- ❖ Categorical Agreement 97.5%
- ❖ 0.7% mE (n=10), 0.1% ME (n=1), 16% VME (n=24), 5.3% adjusted VME (n=8).

## Study Workflow



Drug	No. of strains with AST results of the reference method/gold standard						% Agreement (no.)			% (no.) of errors			
	Total	Total used for EA calc.	Total used for CA and error calc.	S	I	R	EA <sup>a,b</sup>	CA	mE	ME	VME	ATU <sup>c</sup>	
<b>All</b>	<b>1387</b>	<b>1380</b>	<b>1384</b>	<b>1164</b>	<b>70</b>	<b>150</b>	<b>99.1 (1367)</b>	<b>97.5 (1349)</b>	<b>0.7 (10)</b>	<b>0.09 (1)</b>	<b>16.0 (24)</b>	<b>3</b>	
Amikacin	73	73	73	69		4	100.0 (73)	97.3 (71)	0 (0)	0 (0)	50.0 (2)		
Amoxicillin-clavulanic acid (EUCAST)	73	73	73	52		21	95.9 (70)	90.4 (66)	0 (0)	0 (0)	33.3 (7)		
Ampicillin	73	73	73	44		29	98.6 (72)	98.6 (72)	0 (0)	0 (0)	3.4 (1)		
Cefepime	73	73	73	68	1	4	100.0 (73)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Cefotaxime	73	73	73	68		5	100.0 (73)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Ceftazidime	73	73	73	68		5	97.3 (71)	97.3 (71)	2.7 (2)	0 (0)	0 (0)		
Ceftazidime-avibactam	73	73	73	73			100.0 (73)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Ceftolozane-tazobactam	73	73	73	73			100.0 (73)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Cefuroxime IV	73	73	73		66	7	100.0 (73)	97.3 (71)	2.7 (2)	0 (0)	0 (0)		
Ciprofloxacin	73	68 <sup>d</sup>	70 <sup>e</sup>	60 <sup>f</sup>	1 <sup>g</sup>	9	98.5 (67)	98.6 (69)	1.4 (1)	0 (0)	0 (0)	4.1 (3)	
Ertapenem	73	72 <sup>h</sup>	73	73			98.6 (71)	98.6 (72)	0 (0)	1.4 (1)	0 (0)		
Gentamicin	73	73	73	66		7	100.0 (73)	93.2 (68)	0 (0)	0 (0)	71.4 (5)		
Imipenem	73	73	73	73			100.0 (73)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Levofloxacin	73	73	73	63	1	9	100.0 (73)	97.3 (71)	2.7 (2)	0 (0)	0 (0)		
Meropenem	73	72 <sup>h</sup>	73	73			100.0 (72)	100.0 (73)	0 (0)	0 (0)	0 (0)		
Piperacillin	73	73	73	45		28	100.0 (73)	97.3 (71)	2.7 (2)	0 (0)	0 (0)		
Piperacillin-tazobactam	73	73	73	69	1	3	97.3 (71)	95.9 (70)	1.4 (1)	0 (0)	66.7 (2)		
Tobramycin	73	73	73	65		8	98.6 (72)	91.8 (67)	0 (0)	0 (0)	62.5 (5)		
Trimethoprim-sulfamethoxazole	73	73	73	62		11	97.3 (71)	97.3 (71)	0 (0)	0 (0)	18.2 (2)		

Abbreviations: calc, calculation; S, susceptible; I, susceptible increased dosage; R, resistant; EA, essential agreement; CA, category agreement; mE, minor error; ME, major error; VME, very major error

<sup>a</sup> Because of the limited concentration ranges for most antibiotics on the test plate MICs less or equal to the lowest concentration or greater than the highest concentration of a drug were included in the calculation.

<sup>b</sup> % (no.) of strains for which the difference regarding all drugs tested was no more than ±1 log<sub>2</sub> dilution.

<sup>c</sup> In reveal testing 3 *E. coli* strains showed on ciprofloxacin MIC values falling in the area of technical uncertainty (ATU) and were excluded for CA as well as for error calculation. Two strains were tested susceptible and one strain susceptible increased dosage with the reference method/gold standard.

<sup>d</sup> The concentration range of ciprofloxacin on the AST plate was 0.06 mg/l, 0.25-1 mg/l (the MIC of 0.125 was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method/gold standard was 0.25 mg/l the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 3 *E. coli* strains.

<sup>e</sup> The concentration range of ertapenem on the AST plate was 0.125 mg/l, 0.5-1 mg/l (the MIC 0.25 was skipped). If a MIC of the Reveal system and/or reference method/gold standard was 0.5 mg/l the respective strain was excluded from EA calculation. This was the case for 1 *E. coli* strain.

## Conclusion

Rapid AST by the DxM MicroScan WalkAway using 4-hours sub-cultures from positive BCB harboring *E. coli* instead of overnight cultures provides comparable and accurate results meeting the European ISO guidelines for performance of AST systems. Time saving of about 14 to 20 hours is achieved without implementing new methodologies or extensive training.

Contact: n.jazmati@wisplinghoff.de