

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und
Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

Einfluss auf den Arbeitsworkflow bei der mikrobiologischen Urindiagnostik und
Sensitivität der Detektion von anspruchsvollen Uropathogenen durch
Einführung einer Laborautomatisierung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Anna Christina Frömgen

2023

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin R. MacKenzie

Zweitgutachter: PD Dr. med. Erik Schiffner

Zusammenfassung

Urinproben haben einen großen Anteil an der diagnostischen Arbeitsbelastung und die Richtlinien für die Inkubation der Proben für bis zu 48 Stunden behindern den Arbeitsfluss, speziell in Fällen automatisierter Systeme, da die Bilderstellung der Agarplatten zeitaufwändig ist. Die Detektion anspruchsvoller Uropathogene wie *Actinotignum schaalii*, *Aerococcus* spp., und *Corynebacterium urealyticum* erfordert längere Bebrütungszeiten, welche einen Rückstau in automatisierten Systemen verursachen können. Andererseits ermöglichen bildgebende Systeme den effizienten Gebrauch von standardisierten Bebrütungszeiten, daher ist es wichtig die optimale Inkubationszeit für diese Uropathogene zu ermitteln.

Alle Urinproben über einen Zeitraum von 14 Wochen wurden nach einem modifizierten diagnostischen Flowchart ausgewertet. Die Proben wurden mittels eines automatisierten Systems (WASPLab™) auf Columbia-CNA und CHROMagar Orientation Platten aufgetragen und nach 0, 18, 24 und 48 Stunden ausgewertet. Die Inkubation erfolgte bei 36°C und Umgebungsatmosphäre.

Die Ergebnisse wurden in Hinblick auf die minimale Inkubationszeit untersucht, welche für die Detektion von anspruchsvollen und seltenen Uropathogenen notwendig ist. Die Leukozytenbestimmung erfolgte mittels Leukozyten-Esterase Teststreifen und wurde semiquantitativ als negativ, +, ++, und +++ erfasst, wobei in Fällen eines technischen Fehlers, der die Auswertung verhinderte, die Leukozyten als +++ gewertet wurden.

Es wurden 4993 Proben analysiert. 52 (1%) anspruchsvolle Uropathogene wurden nachgewiesen: *Aerococcus urinae*, 39; *Aerococcus sanguinicola*, 2; *Actinotignum schaalii*, 11. *Corynebacterium urealyticum* wurde nicht nachgewiesen. Alle *A. urinae* und *A. sanguinicola* wurden spätestens nach 24h detektiert, 38 nach 18h und weitere 3 nach 24h. 2 *A. schaalii* wurden nach 18h, 3 nach 24h und 6 nach 48h entdeckt. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde ein diagnostischer Flowchart generiert, nach dessen Algorithmus nur 16% der Proben eine Inkubation von 48 Stunden erfordern. Das Resultat entspricht einer Reduktion des Inkubationsplatzes im Brutschrank um 54%, und somit einer erheblichen Einsparung der Bilderstellungszeit, sowie einer deutlich effizienteren Ausnutzung des automatisierten Systems.

Abstract

Urine samples make up a large portion of the diagnostic work-load and guidelines for the incubation of samples for up to 48 h can hinder the work-flow, especially true for automated systems as imaging plates is time-consuming. Detection of fastidious uropathogens such as *Actinotignum schaalii*, *Aerococcus* spp. and *Corynebacterium urealyticum* require extended incubation times, which can cause a backlog in an automated system. On the other hand, imaging systems may enable an efficient use of standardised incubation times and thus it is important to determine the optimal incubation time for these uropathogens.

All urine specimens received over time period of 14 weeks were analysed according to a modified diagnostic flow-chart. Specimens were plated onto Columbia-CNA, and CHROMagar Orientation plates using an automated system (WASPLab™) and then imaged at time points 0h, 18h, 24h and 48h. The plates were incubated at 36°C and normal atmosphere. The results were then analysed to detect the minimal incubation time that would allow the detection of fastidious and infrequent uropathogens. The leucocyte count was determined using leucocyte esterase strips and documented semi-quantitatively as negative, +, ++ and +++ or if a technical error prevented a correct interpretation the specimen was assumed to have +++ leucocytes.

We analysed 4993 samples. Fifty-two (1 %) fastidious uropathogens were detected: *Aerococcus urinae*, 39; *Aerococcus sanguinicola*, 2; *Actinotignum schaalii*, 11. *Corynebacterium urealyticum* was not detected.

All *A. urinae* and *A. sanguinicola* were detected by 24 h; 38 at 18 h and a further 3 at 24 h. Two *A. schaalii* were detected at 18h, three at 24 h and six at 48 h.

Based on these results we generated a diagnostic flow-chart and using this algorithm only 16 % of the samples require incubation for 48h. This represents a saving of 54 % of the incubation time of plates, a considerable saving of imaging time allowing a more efficient use of the automated system.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d	<i>day</i>
ggf.	gegebenenfalls
h	<i>hour</i>
CFU/mL	<i>Colony forming unit/mL</i>
LIS	Laborinformationssystem
MALDI-TOF	<i>Matrix assisted laser desorption/ionization time of flight</i>
min	Minute
mL	Milliliter
MIC	<i>minimal inhibitory concentration</i>
PK/PD breakpoints	<i>pharmacokinetic/pharmacodynamic breakpoints</i>
s.o.	siehe oben
sp.	<i>Species</i>
spp.	<i>Species plurales</i>
s.u.	siehe unten

TLA	<i>Total Laboratory Automation</i>
TP	<i>Timepoint</i>
z.B.	zum Beispiel
µl	Mikroliter
WASP®	<i>Walk Away Specimen Processor</i>
WASPLab®	<i>Walk Away Specimen Processor Lab</i>

Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1.1	Anspruchsvolle Uropathogene	1
1.1.2	<i>Aerococcus</i> spp.....	1
1.1.3	<i>Actinotignum schaalii</i>	3
1.1.4	<i>Corynebacterium urealyticum</i>	4
1.2	<i>Total Lab Automation</i> (TLA) mit WASP® und WASPLab®.....	6
1.3	Neuer Algorithmus	7
1.4	Ziele der Arbeit	9
2	Material und Methoden	10
2.1	Material	10
2.1.1	Nährmedien.....	10
2.1.2	Laborgeräte	10
2.1.3	Zubehör und Verbrauchsmaterial	11
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	11
2.1.5	Software	11
2.2	Methoden	12
2.2.1	Überblick	12
2.2.2	WASP® und WASPLab®.....	14
2.2.3	Speziesidentifikation.....	14
2.2.4	Datenerfassung und -verarbeitung	15
2.3	Aktenzeichen des Ethikvotums	15
3	Ergebnisse.....	16
3.1	Anspruchsvolle Uropathogene	16
3.2	Pilze	19
3.3	Algorithmus.....	23
4	Diskussion	26

4.1	Anspruchsvolle Uropathogene	26
4.2	Pilze	30
4.3	<i>Total Lab Automation</i> (TLA) mit WASP® und WASPLab®	31
4.4	Algorithmus	32
4.5	Schlussfolgerungen	32
5	Literatur- und Quellenverzeichnis	34

1 Einleitung

1.1.1 Anspruchsvolle Uropathogene

Die anspruchsvollen Uropathogene *Aerococcus urinae*, *Aerococcus sanguinicola*, *Actinotignum schaalii* und *Corynebacterium urealyticum* sind humanpathogene Erreger, welche Harnwegsinfektionen aber auch invasive Infektionen verursachen können. Sie gehören, wie die meisten typischen Erreger von Harnwegsinfektionen, in geringen Mengen zur physiologischen urogenitalen Flora [1]. Im Vergleich zu häufigen und wenig anspruchsvollen Erregern wie z.B. *Escherichia coli*, benötigen diese Bakterien aufwendigere Inkubationsverhältnisse und teilweise mehr Zeit für deren Anzucht, weshalb sie unter Routinebedingungen nicht verlässlich nachgewiesen werden oder aber, aufgrund ihrer Morphologie, als Kontamination fehlinterpretiert werden.

1.1.2 *Aerococcus* spp.

1953 wurde der Genus *Aerococcus* durch Williams *et al.* beschrieben, mit *A. viridans* als einziger Spezies. Von Aguirre und Collins wurde 1991 *Aerococcus urinae* als weitere Spezies beschrieben und 2001 folgte *Aerococcus sanguinicola* [2].

Bezeichnend für diese aeroben, grampositiven Kokken ist, dass sie Katalase negativ sind und für ein optimales Wachstum bluthaltige Medien und eine Inkubationszeit von 18-24 Stunden bei 37°C in normaler Umgebungsatmosphäre benötigen. Von Christensen *et al.* wurde beschrieben, dass eine Inkubation in erhöhter CO₂-Spannung zu einer minimalen Größenzunahme der Kolonien führt, eine anaerobe Inkubation allerdings zu einer Größenreduktion um 50% [3]. In anderen Publikationen konnte diese Optimierung des Wachstums durch eine CO₂-angereicherte Inkubationsatmosphäre nicht gezeigt werden [4–7], dennoch wird in der publizierten Fachliteratur *Aerococcus* spp. häufig als mikroaerophil beschrieben und eine Inkubation bei 5% CO₂ durchgeführt.

Makroskopisch erscheinen die Kolonien sehr klein, mit einem Durchmesser von 0,5-2,0 mm nach 18 bis 24 Stunden Inkubation, sie sind semi-transparent, weiß bis grau mit deutlicher α -Hämolyse [4, 5]. Mikroskopisch zeigen sich deutlich gefärbte Kokken in Paaren, Tetraden oder irregulären Gruppen, allerdings keine Ketten-Formationen [5, 6]. Sie ähneln optisch Enterokokken, vergrünenden

Streptokokken oder auch Laktobazillen und werden daher leicht als urogenitale Flora fehlinterpretiert [8].

Diese humanpathogen relevanten Spezies sind grundsätzlich auch Teil dieser physiologischen Flora, können aber dennoch ursächlich für Harnwegsinfektionen und auch invasive und schwere Infektionen, wie Urosepsis, infektiöse Endokarditis, Osteomyelitis oder auch Spondylodiscitis sein [9–13].

Für Harnwegsinfektionen durch *Aerococcus* spp. beträgt die Inzidenz zwischen 0,2-0,8%, dabei ist der Großteil der Patienten älter als 65 Lebensjahre und weiblich [3, 6, 10, 14, 15]. Meist liegt eine lokale oder generelle Prädisposition vor (z.B. Diabetes mellitus, maligne Erkrankung, Prostatahyperplasie, Dauerkatheterisierung).

In verschiedenen Studien konnte eine Empfindlichkeit für Amoxicillin, Vancomycin und Teicoplanin für fast alle Isolate nachgewiesen werden. Zwischen den einzelnen Spezies bestehen aber auch Unterschiede, so ist *Aerococcus urinae* meist gegen Trimethoprim-Cotrimoxazol resistent, aber empfindlich gegenüber Fosfomycin, *Aerococcus sanguinicola* hingegen typischerweise gegen Fosfomycin resistent und Trimethoprim-Sulfamethoxazol empfindlich [15, 16].

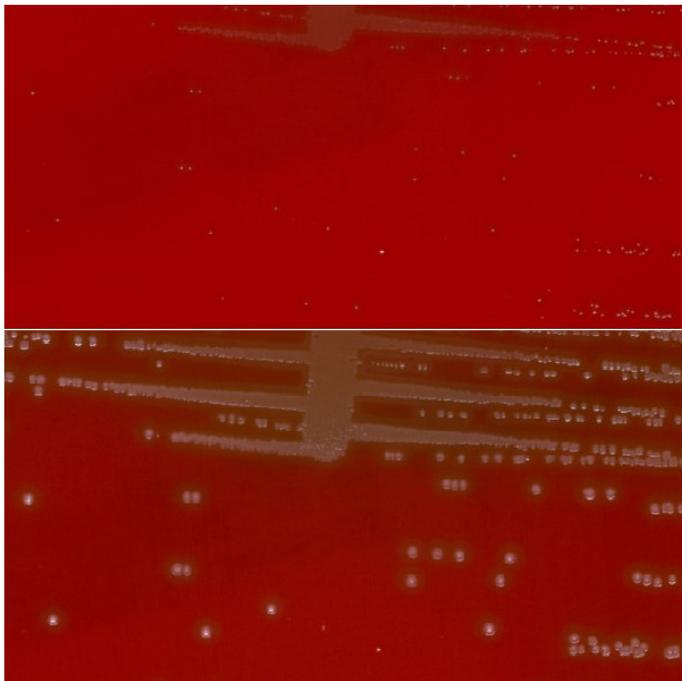


Abb. 1: Koloniemorphologie von *Aerococcus urinae*
oben: nach 18 Stunden Inkubation; unten: nach 48h Inkubation
bei Raumluftatmosphäre in 36°C

1.1.3 *Actinotignum schaalii*

Actinotignum schaalii (ehemals *Actinobaculum schaalii*) wurde erstmalig 1997 von Lawson *et al.* beschrieben und gehört phylogenetisch zu den *Actinomycetales* [17]. Es ist ein kleines, leicht gebogenes, grampositives Stäbchenbakterium, welches Katalase, Oxidase und Urease negativ ist. Von Reinhard *et al.* wurde in einem Versuch mit 9 Isolaten gezeigt, dass die Anzucht am besten auf pferde- oder schafsbluthaltigen Medien, bei einer anaeroben Atmosphäre gelingt und ca. 3 Tage Inkubation benötigt, um gut sichtbare Kolonien zu bilden. Die Koloniegröße nach 48 Stunden unter anaeroben Bedingungen lag bei <1 mm Durchmesser. Nach ca. 2-5 Tagen Inkubation zeigten die Kolonien zudem eine leichte β -Hämolyse. Bei Inkubationsbedingungen von 5% CO₂ wuchsen die Kolonien gut bis schlecht, und unter Umgebungsluftbedingungen wuchsen die Kolonien schlecht bis überhaupt nicht [18]. In einer Untersuchung von Nielsen *et al.* [19] konnte ein suffizientes Wachstum nach 48 Stunden Inkubation bei 5% CO₂ und 35°C nachgewiesen werden. Diese Anforderungen für die Kultivierung werden weitestgehend in der publizierten Fachliteratur angewendet.

Aufgrund des langsamen Wachstums und der geringen Koloniegröße, wird *Actinotignum schaalii* unter Standard-Inkubationsbedingungen schnell übersehen, da es der urogenitalen Schleimhautflora sehr ähnlichsieht, oder aber bei Vorliegen einer polymikrobiellen Infektion von schnellwachsenden Spezies überwuchert wird.

Wie in Untersuchungen gezeigt, gehört *Actinotignum schaalii* zur urogenitalen Schleimhautflora [13, 20], wobei eine zunehmende Anzahl an Harnwegsinfektionen beschrieben wird, und auch seltener schwere Infektionen wie Urosepsis, Abszesse, Osteomyelitis. und Endokarditis [18, 19, 21–23]. Vor allem ältere Menschen >60 Jahre und Kleinkinder <4 Jahre sind häufig besiedelt [21, 22], von denen am Häufigsten ältere Menschen mit Prädisposition eine Infektion erleiden [19]. Ein Unterschied in der Geschlechterverteilung zeigte sich dabei nicht [21]. Die Prävalenz liegt laut einer Untersuchung von Nielson *et al.* bei 0,6% für >60-Jährige [19].

Bislang liegen keine Therapieleitlinien vor und es gibt keine *clinical breakpoints* für die Antibiotika-Empfindlichkeitstestung. In publizierten Fallberichten und

Untersuchungen wurden die MIC (*minimal inhibitory concentration*) für verschiedene Antibiotika getestet und ggf. nach PK/PD *breakpoints* nach EUCAST bewertet. Cotrimoxazol, Ciprofloxacin und Metronidazol sind hiernach typischerweise nicht wirksam, für Mecillinam wurde in 28% sehr hohe MIC-Werte ermittelt und für β -Laktam-Antibiotika (Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefuroxim und Ceftriaxon) und Nitrofurantoin wurden bisher nur niedrige MIC gemessen [23–25]. Demnach sind viele, der in den Leitlinien zur empirischen Therapie von Harnwegsinfektionen empfohlenen Substanzen meist nicht wirksam bei Infektionen mit *Actinotignum schaalii*.



Abb. 2: Koloniemorphologie von *Actinotignum schaalii*
oben: nach 18 Stunden Inkubation; unten: nach 48h Inkubation
bei Raumluftatmosphäre in 36°C

1.1.4 *Corynebacterium urealyticum*

Corynebacterium urealyticum (ehemals *Corynebacterium* CDC-Gruppe D2) wird bereits seit 1985 als Erreger von Harnwegsinfektionen beschrieben und ist insbesondere mit der selten vorkommenden alkalischen enkrustierenden Zystitis assoziiert [26], einer chronisch lokal ulzerierenden Zystitis mit Ablagerung von Ammonium-Magnesiumphosphat (Struvit). Hierbei kommt es durch die starke Urease-Aktivität zu einer Spaltung von Harnsäure in Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, wodurch der Urin alkalisiert wird. Dies begünstigt die Entstehung der enkrustierenden Zystitis und die Bildung von Struvitkristallen [27], aber auch

Risikofaktoren, wie urologische Eingriffe mit Verletzungen der Harnblase, einliegende Blasenkatheter oder Harnleiterschienen, rezidivierende Harnwegsinfektionen, Nierentransplantation und Immunsuppression haben hierauf einen Einfluss [28].

Wie andere *Corynebacterium* spp. ist *Corynebacterium urealyticum* aber auch Bestandteil der Normalflora der Haut [29]. Die Nachweisrate von *Corynebacterium urealyticum* in Urinproben variiert zwischen 0,03% und 0,3% [30, 31]. Der Nachweis ist erschwert, da *Corynebacterium urealyticum* langsam wächst. Dadurch gelingt die Detektion bei einem Standardansatz mit Übernacht-Inkubation meist nicht, und auch die Überwucherung durch die begleitende Flora kann den Nachweis beeinträchtigen. *Corynebacterium urealyticum* ist strikt aerob und benötigt für die kulturelle Anzucht auf Blutagar eine Inkubationszeit von bis zu 72 Stunden bei Inkubationstemperaturen zwischen 25-42°C. Die Kolonien sind winzig (*pinpoint* groß), weiß, *opaque* und nicht-hämolytisch. Mikroskopisch handelt es sich um kurze grampositive Stäbchen, welche häufig in Palisaden- bzw. V-Formationen angeordnet sind [26, 32–35]. Typischerweise liegt eine Resistenz gegenüber β -Lactam-Antibiotika und Aminoglykosiden vor, demgegenüber aber eine Empfindlichkeit für Vancomycin.

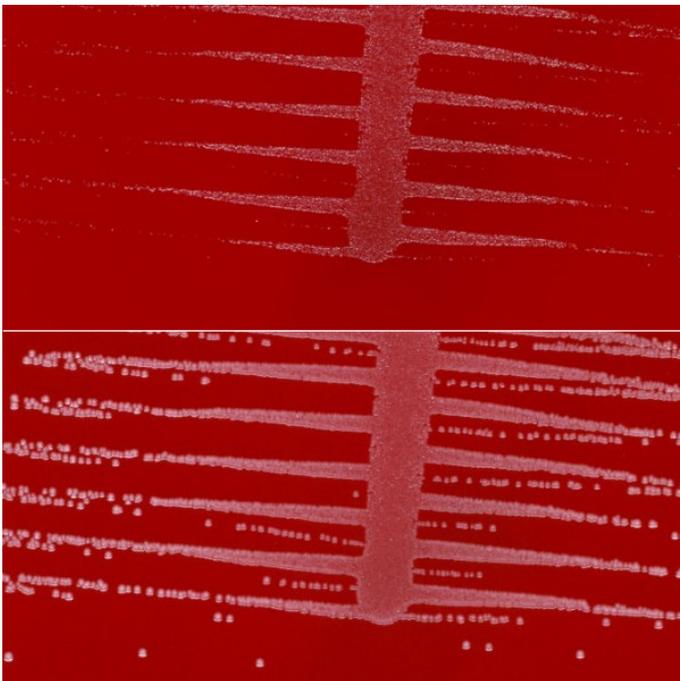


Abb. 3: Koloniemorphologie von *Corynebacterium urealyticum*
oben: nach 18 Stunden Inkubation; unten: nach 48h Inkubation
bei Raumluftatmosphäre in 36°C

1.2 **Total Lab Automation (TLA) mit WASP® und WASPLab®**

Total Lab Automation (TLA) sind Systeme zum automatisierten Bearbeiten von Proben. Bei der klassischen Bearbeitung wird ein Großteil der Arbeitszeit mit dem Beimpfen und Ausstreichen der verschiedenen Kulturmedien verbracht, sowie dem Transport der Kulturplatten in und aus dem Brutraum bzw. Inkubator, zum Ableseplatz und zu den Arbeitsplätzen, an welchem die Proben weiterverarbeitet werden und letztendlich zum Abfall. Durch TLA entfallen diese manuellen Aufgaben, wodurch die Mitarbeiter*innen Zeit für anspruchsvollere, qualifizierte Arbeiten haben. Durch die maschinelle Bearbeitung werden zudem Erfassungs- und Bearbeitungsfehler reduziert und hierdurch die Qualität gesteigert.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die *turnaround time* (TAT), also die Bearbeitungszeit zwischen dem Probeneingang und dem Vorliegen der Befunde, durch TLA reduziert werden konnten [36–38].

Das WASP® (*Walk Away Specimen Processor*) ist ein automatisiertes System zum Anlegen von Kulturmedien. Durch die Anbindung an das Laborinformationssystem (LIS) werden die erforderlichen Angaben, wie z.B. Materialart und entsprechend benötigte Kulturmedien über Barcodes abgerufen. Die Proben werden automatisiert auf die Kulturmedien beimpft und durch Roboterarme und Förderbänder zum WASPLab® transportiert. Hier erfolgt nun die digitale Fotografie der Kulturplatten und die Inkubation. Die Platten werden zu festgelegten Zeitpunkten wieder zur Bildgebungseinheit transportiert und dort fotografiert, danach verbleiben sie bis zur abschließenden Beurteilung im Inkubator. Diese erfolgt an einer PC-Arbeitsstation, an welcher die Bilder betrachtet und auch bewertet werden. Die hier eingegebenen Informationen werden direkt an das LIS gesendet. Abschließend werden die entsprechenden Kulturplatten zur weiteren Bearbeitung ausgeladen oder direkt in den Abfall entsorgt.

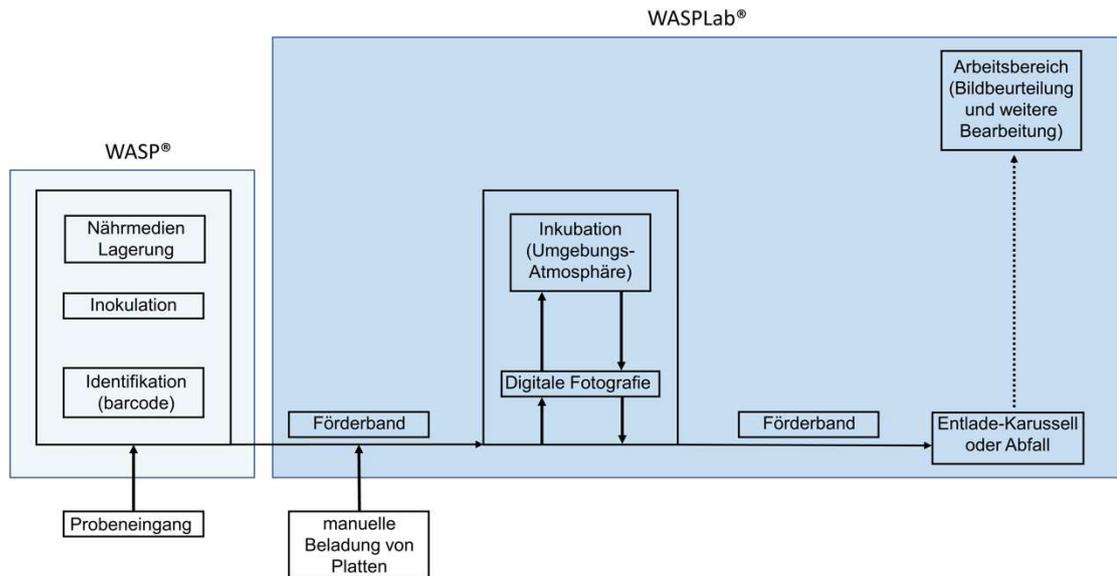


Abb. 4: Schematischer Aufbau von WASP® und WASPLab®

Dargestellt ist der Ablauf der Probenverarbeitung, Probentransport, Bildgebung, Inkubation und Entladung und Weiterverarbeitung im WASP® und WASPLab®

1.3 Neuer Algorithmus

Nach Empfehlung der Mikrobiologisch-Infektiologische Qualitätsstandards 02 (MiQ) [39] sollen nach 24 Stunden noch negative Kulturplatten für weitere 24 Stunden, bzw. bei Anforderung auf Nachweis von Sprosspilzen, für weitere 48 Stunden bebrütet werden. Begründet wird dies durch die möglicherweise notwendige längere Bebrütungszeit von Hemmstoff-haltigen Urinen, um verzögert wachsende Erreger nachzuweisen und um die langsam wachsenden, anspruchsvollen Uropathogene *Aerococcus* spp., *Actinotignum schaalii* und *Corynebacterium urealyticum* verlässlich zu detektieren. In Bezug auf den Nachweis von Sprosspilzen wird die verlängerte Bebrütungszeit durch das gelegentlich langsame Wachstum von *Candida glabrata* gerechtfertigt.

Der in der MiQ vorgeschlagene Diagnostik-Algorithmus teilt die Erreger in typische und potenzielle uropathogene Erreger, sowie Vertreter der urogenitalen Schleimhautflora ein (s. Abb. 5) und gibt, in Abhängigkeit der Anzahl der nachgewiesenen Erreger und der ermittelten Leukozytenzahl, das weitere diagnostische Vorgehen (s. Abb. 6) vor.

Typischerweise uropathogene Erreger	Potenziell uropathogene Erreger	Urogenitale Schleimhautflora
<ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterobacterales</i>, u.a.: <ul style="list-style-type: none"> – <i>E. coli</i> – <i>Klebsiella</i> sp. – <i>Proteus</i> sp. – <i>Morganella</i> sp. – <i>Providencia</i> sp. – <i>Enterobacter</i> sp. – <i>Citrobacter</i> sp. • <i>Pseudomonas aeruginosa</i> • <i>Staphylococcus saprophyticus</i> • β-hämolsierende Streptokokken der serologischen Gruppen A und B 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Staphylococcus aureus</i> • Enterokokken • Hefen (<i>Candida</i> sp.) • <i>Aerococcus urinae</i> • <i>Aerococcus sanguinicola</i> • <i>Actinotignum schaalii</i> • <i>Corynebacterium urealyticum</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Haemophilus</i> sp. • Vergrünende Streptokokken • <i>Neisseria</i> sp. • <i>Lactobacillus</i> sp. • Koagulase-negative Staphylokokken (außer <i>S. saprophyticus</i>) • <i>Corynebacterium</i> sp. (außer <i>C. urealyticum</i>) • <i>Aerococcus</i> sp. (außer <i>A. urinae</i> und <i>A. sanguinicola</i>)

Abb. 5: MiQ 02 [39] – „Ampelfarben-System“

Einteilung in typische Uropathogene, potenziell uropathogener Erreger und urogenitale Schleimhautflora

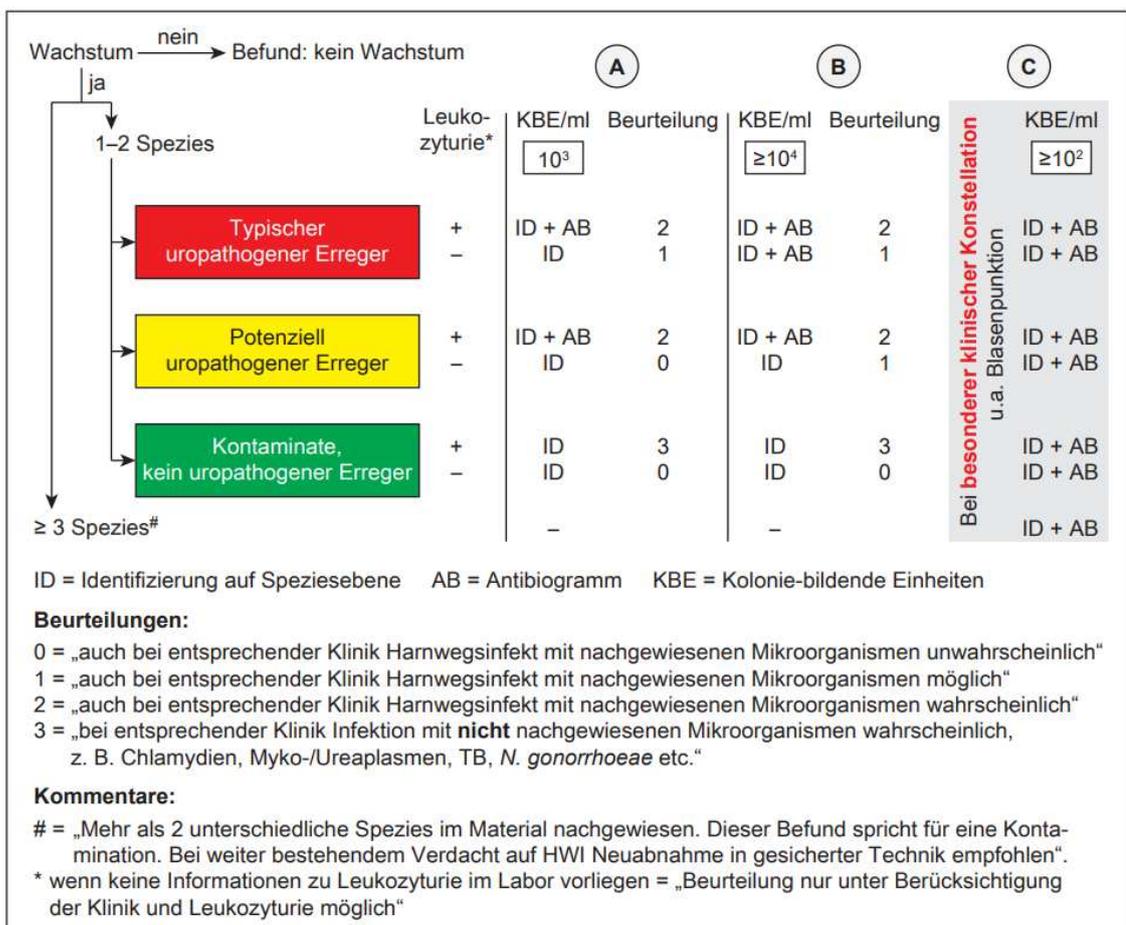


Abb. 6: MiQ 02 [39] – Diagnostik-Algorithmus

Interpretation der Primärkultur und weiterführende Untersuchungsverfahren

Das empfohlene Vorgehen bezieht sich auf eine konventionelle Bearbeitung von Urinproben und berücksichtigt nicht die Vorteile eines automatisierten Systems. Eine suboptimierte Nutzung der TLA führt über eine unnötige Inkubationsauslastung zwangsweise auch zu einer gesteigerten Auslastung der Roboterarme bei der Plattenbewegung, was zu einer Verzögerung in der Bildgebung führt, und dementsprechend auch allen darauffolgenden Prozessen. Aus ökonomischen Gesichtspunkten ist es daher zwingend notwendig, für jedes einzelne Kulturmedium die optimale Inkubationszeit zu ermitteln und vor allem auch ganz gezielt Urinproben zu identifizieren, bei denen eine Fortführung der Inkubation mit erneuter Beurteilung zu einem diagnostischen Nutzen führt. Daher wurde in Anlehnung an den empfohlenen Algorithmus ein neuer, angepasster Algorithmus erstellt, durch welchen Proben selektioniert werden, die eine hohe Wahrscheinlichkeit für den Nachweis anspruchsvoller Uropathogene haben, und dementsprechend länger inkubiert werden müssen. Im gleichen Sinne entfällt die verlängerte Inkubation für Proben mit geringer Wahrscheinlichkeit eines solchen Nachweises, was wiederum zu einer geringeren Auslastung des Systems führt, und hierdurch die Bearbeitung weiterer Proben ermöglicht.

1.4 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit soll Aufschluss darüber geben, wie eine optimale Nutzung der TLA und deren Einbindung in den Laborablauf möglich ist. Dabei galt es, für Urinproben, die optimalen Inkubationszeiten für die verschiedenen Kulturmedien zu ermitteln und insbesondere die anspruchsvollen Uropathogene verlässlich zu detektieren. Des Weiteren sollte ein Algorithmus erstellt und geprüft werden, der zwischen Urinproben diskriminiert, welche einen diagnostischen Mehrwert durch eine fortgeführte Inkubation beinhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Nährmedien

Nährmedium	Hersteller/Lieferant
Columbia CNA + 5% Schafblut	Mast Diagnostica GmbH, DE
CHROMagar Orientation	Mast Diagnostica GmbH, DE
COS (Columbia Agar + 5% Schafblut)	bioMérieux, FR
Sabouraud GC Agar / Chromagar Candida Biplate	Becton Dickinson, DE

2.1.2 Laborgeräte

Bezeichnung	Gerät	Hersteller
Vitek® MS	MALDI-TOF Massenspektrometer	bioMérieux, FR
Vitek® 2 XL	Automatisierte ID / AST Bestimmung	bioMérieux, FR
WASPLab®	Automatisiertes System zur Probenverarbeitung, -inkubation und -auswertung	Copan, IT
WASP®	System für den automatisierten Probenausstrich	Copan, IT
Aerospray® Gram 7322	Gram Färbeautomat	Wescor Inc., US
Axioskop 2 plus	Mikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, DE

2.1.3 Zubehör und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
VITEK® MS-DS Slide (Maldi Target)	bioMérieux, FR
Objektträger	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, DE

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
Multistix® 10SG (Urinstix)	Siemens Healthcare GmbH, DE
VITEK® MS-CHCA (Matrix-Lösung)	bioMérieux, FR
NaCl 0,45%-Lösung für ID/AST	Axon Lab AG, CH
Katalase (H ₂ O ₂)	Eigene Herstellung
Gramfärbung Reagenz A+B+C	Wescor Inc., US

2.1.5 Software

Bezeichnung	Version	Hersteller
VITEK® MS Software	1.1	bioMérieux, FR
VITEK® 2	9.03	bioMérieux, FR
Excel®	2019	Microsoft®, US
WASPLab® WebApp	2.240	Copan, IT
David Laborinformationssystem	3.7.22.04	Medat Computersysteme GmbH, DE

2.2 Methoden

2.2.1 Überblick

Die zur Untersuchung ins Labor eingeschickten Urinproben wurden nach der Auftragserfassung zuerst mittels Streifentest (Multistix®) auf das Vorhandensein von Leukozyten untersucht. Das semiquantitative Ergebnis (keine Leukozyten, vereinzelt Leukozyten, mäßig Leukozyten, reichlich Leukozyten) wurde in der Laborinformationssoftware (LIS) eingetragen.

Bei der konventionellen Urindiagnostik wurden die Kulturplatten sukzessiv angesetzt und dann kollektiv bei 36°C und Raumluft in einem Brutraum inkubiert. Die Beurteilung erfolgte am nächsten Morgen. Dementsprechend gab es keine einheitliche Inkubationsdauer in diesem Verfahren.

In dieser Arbeit erfolgte der Ansatz und die Inkubation der Kulturplatten mit dem automatisierten WASP® und WASPLab®. Vor dem Einladen in die Inkubatoreinheit (Zeitpunkt 0) wurden digitale Fotografien der Kulturplatten automatisiert angefertigt, eine erneute Fotografie erfolgte nach 18 Stunden Inkubation und wurde anschließend am PC beurteilt. Solange keine Kontamination der Proben durch urogenitale Flora vorlag, erfolgte die Fortführung der Inkubation für alle diejenigen Kulturmedien, deren Keimzahl $<10^3$ CFU/mL betrug (Studienprotokoll s. Abb. 7). Bei Vorliegen von Uropathogenen, und insbesondere morphologischem Verdacht auf *Aerococcus urinae*, *Aerococcus sanguincola*, *Actinotignum schaalii* und *Corynebacterium urealyticum* wurden die verdächtigen Kolonien mittels Vitek® MS (MALDI-TOF) bzw. Vitek® 2 identifiziert und ggf. eine Resistenzbestimmung durchgeführt.

Die Daten aus dem Laborinformationssystem (LIS) wurden in eine Excel-Tabelle übernommen und um die Informationen zu Keim- und Speziesanzahl zu den jeweiligen Zeitpunkten anhand der angefertigten Fotografien erweitert. Sofern durchgeführt, wurde hier auch das Ergebnis der Speziesidentifizierung erfasst.

Es erfolgte die statistische Auswertung der Daten und anschließende Prüfung des neu entwickelten Algorithmus zur Inkubationszeit und Beurteilung der Kulturplatten.

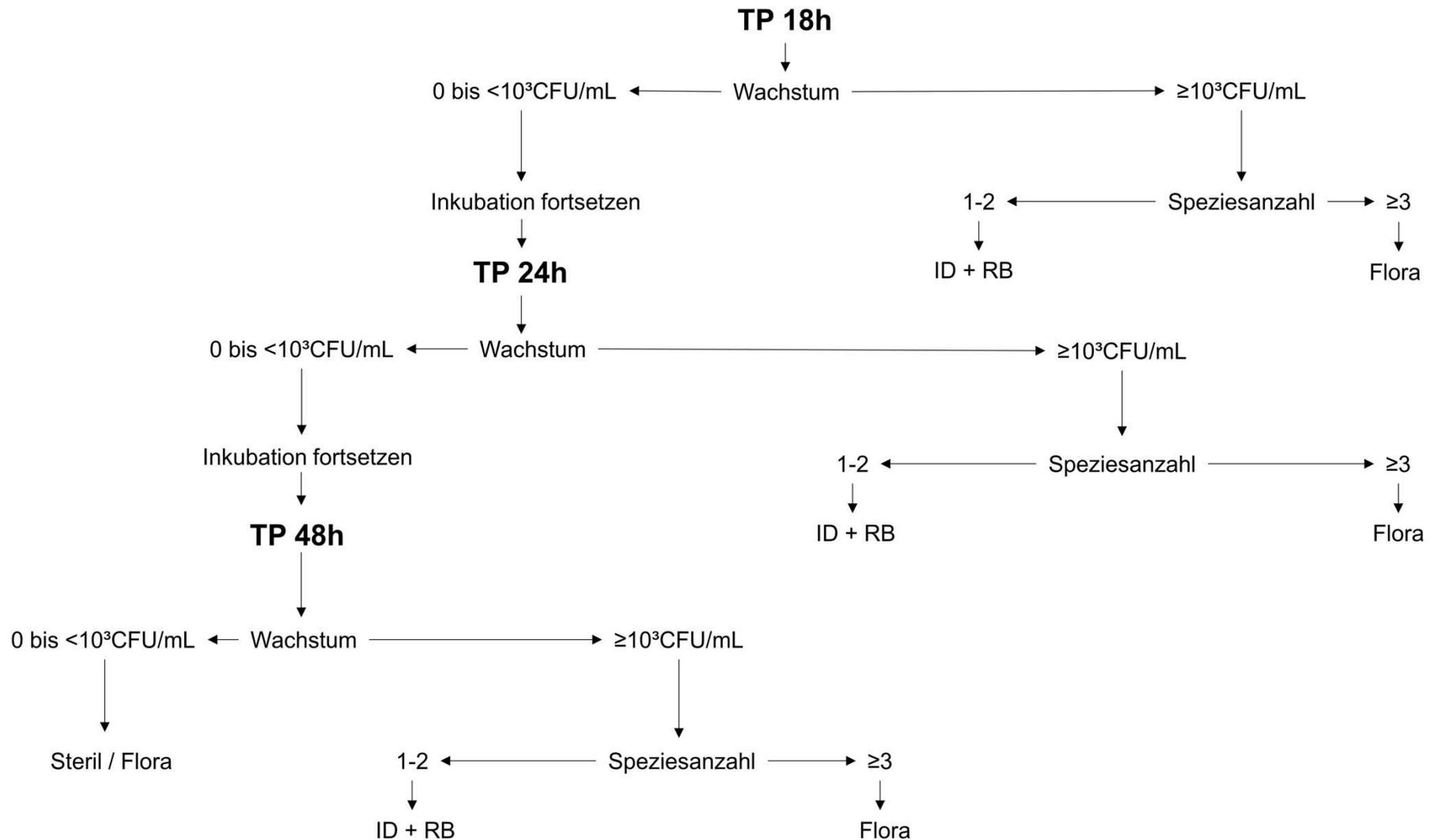


Abb. 7 : **Studienprotokoll zur Inkubation und Beurteilung der Kulturplatten**

TP: Timepoint; ID: Speziesidentifikation; RB: Resistenzbestimmung; Flora: urogenitale Standortflora bzw. Kontamination

2.2.2 WASP® und WASPLab®

Die Anlage der Kulturmedien erfolgte mittels WASP® (*Walk Away Specimen Processor*). Nach dem Einladen der Proben in das WASP® erfolgte das Scannen der Barcodes wodurch das, im Laborinformationssystem hinterlegte, Anforderungsprofil abgerufen wurde. Die Proben wurden nacheinander prozessiert und mit einer kalibrierten 10µl-Öse auf die entsprechenden Agarplatten (Columbia CNA-Agar, CHROMagar Orientation, COS-Agar, Sabouraud GC Agar / Chromagar Candida Biplate) ausgestrichen. Danach wurden die Probenröhrchen wieder ausgeladen und die beimpften Kulturplatten mit Barcodes beklebt und auf das Förderband des WASPLab® transportiert. Die Kulturplatten wurden fortlaufend in der Bildgebungseinheit des WASPLab® bearbeitet. Hier wurde durch Scannen des Plattenbarcodes die Information zu der Art der Agarplatte und damit auch der Inkubationsdauer, den Terminen für die Bildanfertigung und deren Belichtungseinstellungen abgerufen. Durch Roboterarme wurden die Platten zum Abfotografieren auf den Belichtungstisch und anschließend in die Inkubatoreinheit gebracht. Zu den definierten Zeitpunkten wurden die Platten wieder aus dem Inkubator transportiert und erneut fotografiert. Die Agarplatten verblieben solange in Inkubation, bis die Beurteilung an der PC-Arbeitsstation erfolgte. Neben den Fotografien wurden zur Beurteilung der Proben die Patientendaten (Name, Geburtsdatum, Alter, Geschlecht), die Art der Uringewinnung und das Ergebnis der Leukozytenbestimmung am Bildschirm angezeigt.

2.2.3 Speziesidentifikation

Entsprechend den Kriterien des Studienprotokolls (s. Abb. 7), wurden morphologisch auffällige Kolonien auf ihre Spezies untersucht. Für alle gesuchten anspruchsvollen Uropathogene entspricht eine auffällige Morphologie besonders kleinen (0,5-1mm Durchmesser), gelblich oder gräulichen Kolonien, mit α -Hämolyse (*Aerococcus* spp.) oder keiner (*Corynebacterium urealyticum*) bis geringer β -Hämolyse (*Actinotignum schaalii*).

Solche Kolonien wurden mittels chemischer Tests (z.B. Katalase) und mikroskopischer Untersuchung nach Gramfärbung weiter untersucht. Bei weiterreichendem Verdacht wurde von den Kolonien eine Speziesidentifikation mittels MALDI-TOF (Vitek® MS) oder biochemisch (Vitek® 2) durchgeführt.

2.2.4 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Daten aus dem LIS wurden in eine Excel-Tabelle übertragen: Probeneingangsdatum, Art der Probe (z.B. Mittelstrahl, Katheterurin, Nierenbeckenurin etc.), Auftragsnummer, Geburtsdatum und Geschlecht des Patienten, Anforderung auf Erreger- und Resistenzbestimmung mit ggf. Ansatz auf Pilze. Die Kulturergebnisse wurden anhand der Bildaufnahmen des WASPLab® zu den jeweiligen Zeitpunkten (TP 18h, TP 24h, TP 48h, ggf. TP 72h) dokumentiert. Nach Exklusion unvollständiger Datensätze erfolgte die Auswertung in Bezug auf die Anzahl und Menge der nachgewiesenen Uropathogene und deren Detektionszeitpunkt, sowie der Geschlechts- und Altersverteilung der Patienten. In einem weiteren Schritt wurde mit diesen Daten der neue Ablese-Algorithmus geprüft.

2.3 Aktenzeichen des Ethikvotums

Die Studie hat ein positives Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät, HHU - Studien-Nr.: 2022-1902

3 Ergebnisse

3.1 Anspruchsvolle Uropathogene

Von 5120 erfassten Urinproben wurden insgesamt 4993 Proben ausgewertet; 127 Proben waren aufgrund unvollständiger Daten nicht auswertbar.

Der Nachweis von Uropathogenen wurde ab einer Keimzahl von 10^3 CFU/mL als positiv gewertet. Bei Wachstum von ≥ 3 Spezies galt die Probe als kontaminiert.

Insgesamt wurden 52 Isolate der gesuchten Uropathogene identifiziert.

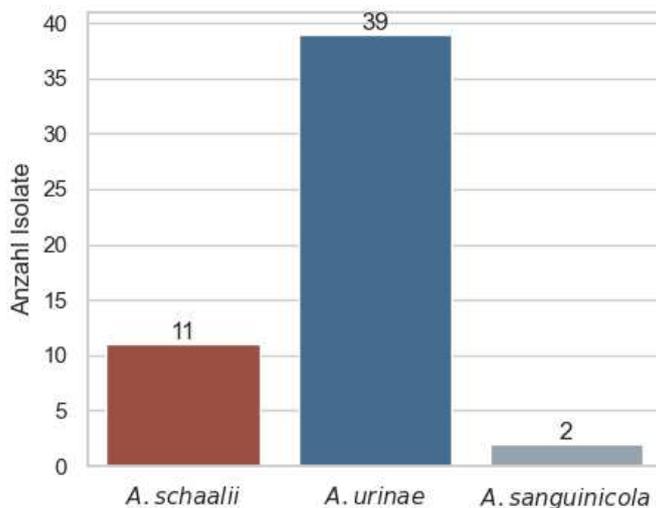


Abb. 8: Nachweis von anspruchsvollen Uropathogenen

Die Gesamtzahl der nachgewiesenen gesuchten Uropathogenen ist dargestellt. Nur relevante Keimzahlen ($\geq 10^3$ CFU/mL) werden angezeigt.

Die Nachweisrate von *Actinotignum schaalii* lag bei 0,2% und für *Aerococcus* spp. bei 0,8%. In Bezug auf den Nachweiszeitpunkt konnten 76,9% der gesuchten Uropathogene nach 18 Stunden Inkubation bereits nachgewiesen werden (s. Abb.9), insbesondere gelang dies bei *Aerococcus* spp..

Für den Nachweis von *Actinotignum schaalii* war in 9 von 11 (81,8%) Proben eine Inkubation von mehr als 18 Stunden erforderlich.

C. urealyticum konnte in keiner der untersuchten Probe nachgewiesen werden. Es wurde allerdings mit einem asservierten Stamm das Wachstum auf COS-Agar, CHROMAgar Orientation und CNA-Agar getestet. Auf beiden bluthaltigen Nährmedien zeigte sich bereits nach 18 Stunden ausreichendes Wachstum, welches bei Inkubation in 5% CO₂ deutlicher war als bei aerober Bebrütung.

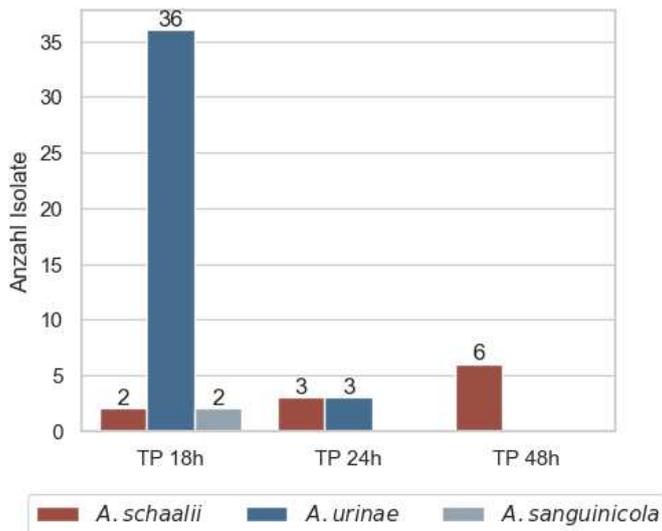


Abb. 9: Nachweis anspruchsvoller Uropathogenen nach Inkubationsdauer

Die Anzahl der nachgewiesenen anspruchsvollen Uropathogenen nach 18h, 24h und 48h Inkubationszeit ist dargestellt. Nur relevante Keimzahlen ($\geq 10^3$ CFU/mL) werden angezeigt.

In 17 Fällen wurden Reinkulturen der gesuchten Uropathogene nachgewiesen, in 35 Fällen konnte zusätzlich ein weiteres, relevantes, uropathogenes Bakterium angezüchtet werden.

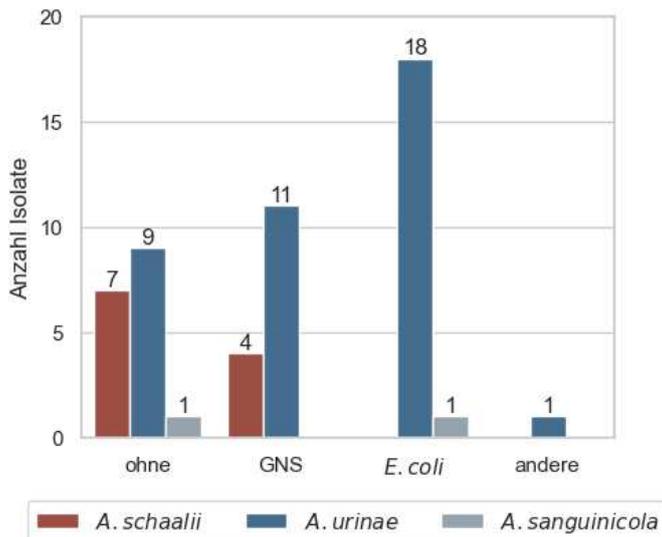


Abb. 10: Anspruchsvolle Uropathogene mit Koinfektion durch weitere Uropathogene

Die Anzahl der nachgewiesenen anspruchsvollen Uropathogenen und das Vorliegen von Koinfektionen ist dargestellt. Nur relevante Keimzahlen ($\geq 10^3$ CFU/mL) werden angezeigt. Ohne, keine Koinfektion nachgewiesen; GNS, Koinfektion mit Gram-negativen Stäbchen (andere als *E. coli*); *E. coli*, Koinfektion mit *E. coli*; andere; Koinfektion mit anderen Bakterien als *E. coli* oder GNS.

Bei *Aerococcus* spp. war *Escherichia coli* in 61,3% der Fälle das weitere Uropathogen, in 35,5% wurde ein anderes gram-negatives Stäbchen und nur in 1 Fall (3,2%) *Staphylococcus* spp. als Koinfektion nachgewiesen. *Actinotignum schaalii* wurde überwiegend als Reinkultur (63,6%) in den Proben

gefunden, eine Koinfektion mit einem weiteren Gram-negativen Uropathogen lag in 36,4% der Proben vor, wobei *Escherichia coli* hier nicht vorkam.

Alle Keime von Koinfektionen waren bereits nach 18 Stunden auf dem CHROMagar Orientation nachweisbar.

Für die CHROMagar Orientation-Platte konnte nur in einem Fall gezeigt werden, dass die verlängerte Inkubationszeit von mehr als 18 Stunden zu einem zusätzlichen Nachweis eines Uropathogens führt. Es handelt sich um eine Urinprobe ohne begleitende Leukozyturie, bei der zu allen Beurteilungszeitpunkten auf dem CNA-Agar *Enterococcus* spp. in Keimzahl 10^2 CFU/mL vorlag. Auf dem CHROMagar Orientation war jeweils nach 18 und 24 Stunden *Pseudomonas aeruginosa* mit Keimzahl 10^2 CFU/mL nachweisbar, nach 48 Stunden lag die Keimzahl bei 10^3 CFU/mL und damit als relevantes Wachstum zu bewerten. Die Anzucht der anspruchsvollen Uropathogene gelang fast ausschließlich auf CNA-Agar, nur einmal gelang der Nachweis von *Aerococcus urinae* zusätzlich auf dem CHROMagar Orientation.

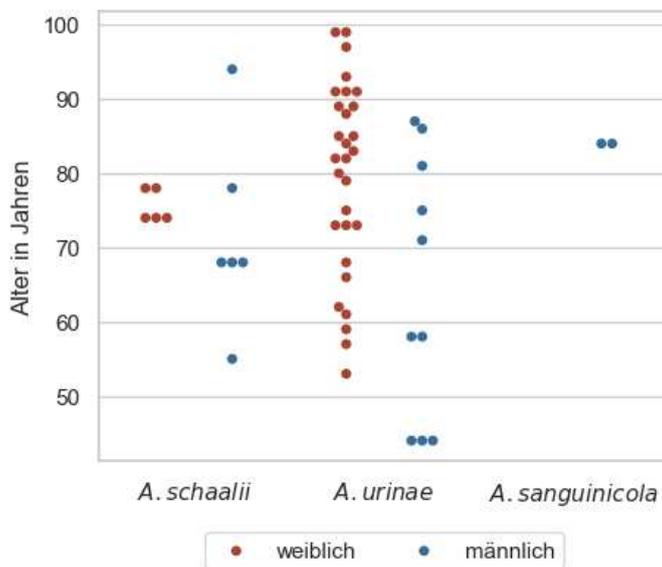


Abb. 11: Anspruchsvolle Uropathogene nach Patientenalter und -Geschlecht

Die Anzahl der nachgewiesenen anspruchsvollen Uropathogenen in Abhängigkeit von Patientenalter und -geschlecht ist dargestellt. Nur relevante Keimzahlen ($\geq 10^3$ CFU/mL) werden angezeigt

Bezüglich der Alters- und Geschlechtsverteilung waren bei *Aerococcus* spp. die Patienten überwiegend weiblich (70,7% weiblich, 29,2% männlich) und das Durchschnittsalter lag bei 75 Jahren. Für *Actinotignum schaalii* konnte keine Geschlechterdominanz nachgewiesen werden und das Durchschnittsalter lag bei 74 Jahren.

3.2 Pilze

Unabhängig vom Ansatz auf Bakterien wurde die Sabouraud Candida Biplate nach 18, 24, 48 und 72 Stunden Inkubation beurteilt. Sobald Wachstum nachweisbar war, wurde die Inkubation beendet.

Von insgesamt 556 Urinproben mit Anforderung auf Hefepilze konnte in 18% (100/556) *Candida* spp. nachgewiesen werden. 68% der *Candida*-Nachweise gelangen bereits nach 18 Stunden Inkubation, weitere 25% nach 24 Stunden und für 7% musste die Inkubationszeit 48 Stunden betragen. Eine bis 72 Stunden fortgeführte Inkubation erbrachte keinen zusätzlichen *Candida*-Nachweis.

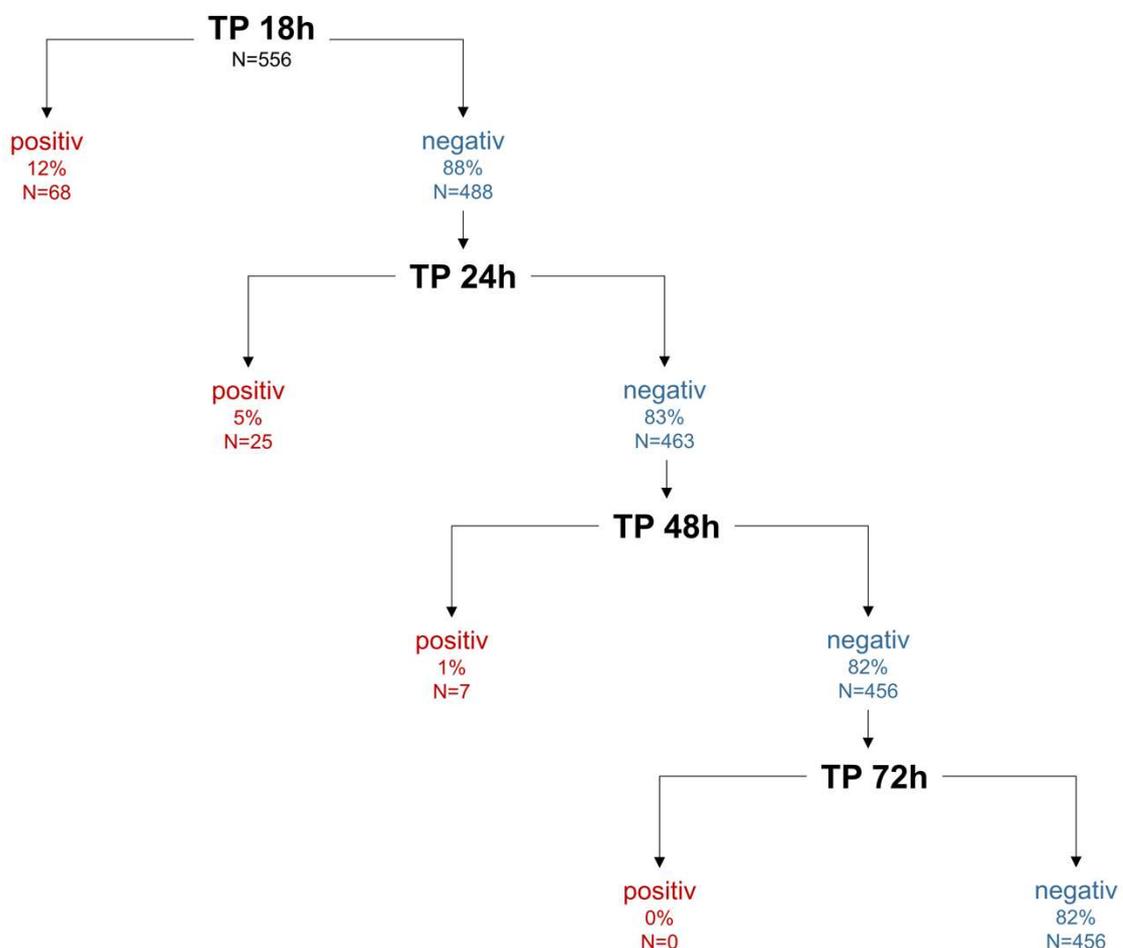


Abb. 12: Nachweis von *Candida* spp. in den Urinproben

Darstellung der positiven Nachweise von *Candida* sp. nach Detektionszeitpunkt.
TP, Timepoint;

In 20% der Fälle lag eine Reinkultur von *Candida* spp. vor, ohne weiteren Bakteriennachweis. Bei 16% der Fälle handelte es sich um eine Koinfektion mit Nachweis eines Uropathogens in relevanter Keimzahl von $\geq 10^3$ CFU/mL und zu 64% lag eine Kontamination der Probe mit Nachweis von urogenitaler Flora vor.

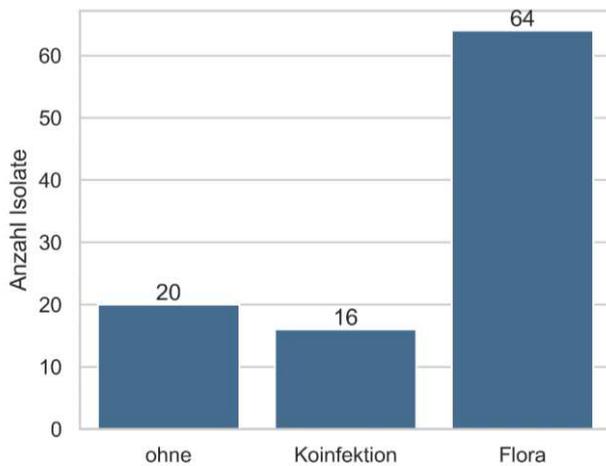


Abb. 13: Koinfektionen bei Nachweis von *Candida* spp.

Darstellung der *Candida* spp.-Reinkulturen, *Candida* spp. Nachweis mit Koinfektion, *Candida* spp. Nachweis mit Kontamination durch urogenitale Flora

Unter Berücksichtigung des Leukozytennachweises, gruppiert in keine/vereinzelt bzw. mäßig/reichlich Leukozyten oder fehlender Beurteilbarkeit der Probe, waren 57% der Proben mit Nachweis von *Candida* spp. ohne relevanten Leukozytennachweis. In 16% der Proben lag eine Koinfektion mit einem uropathogenen Erreger vor, lediglich bei 11% der Proben erfolgte der Nachweis von *Candida* spp. in Reinkultur mit gleichzeitigem Vorliegen einer Leukozyturie.

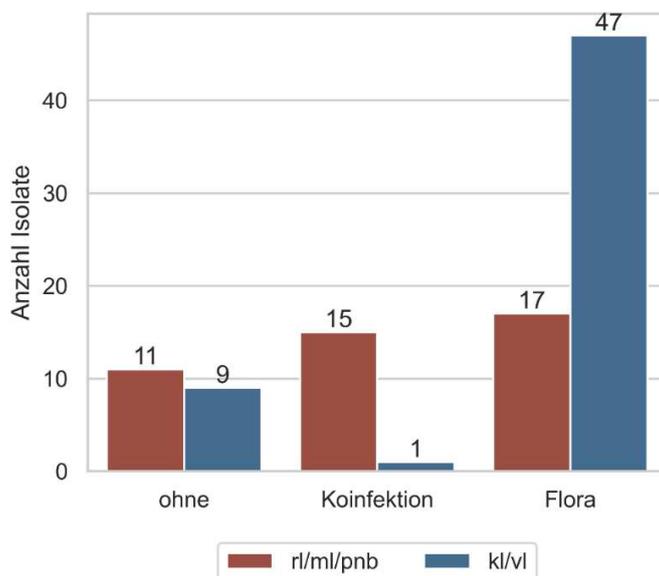


Abb. 14: *Candida* spp. in Reinkultur, mit Koinfektion und Kontamination mit urogenitaler Flora in Bezug zum Leukozytennachweis

rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten; ohne, Reinkultur; Koinfektion, Nachweis eines Uropathogens mit $\geq 10^3$ CFU/mL, Flora, Kontamination durch urogenitale Flora

Bezogen auf die jeweiligen Inkubationszeitpunkte, konnte nach 18 Stunden Inkubation in 9 Urinproben *Candida* spp. in Reinkultur, mit gleichzeitig positivem Leukozytennachweis angezüchtet werden. 12 Proben mit begleitender Leukozyturie hatten zusätzlich einen weiteren Uropathogen-Nachweis und 7 Urinproben, in denen *Candida* angezüchtet werden konnte, waren durch urogenitale Standortflora kontaminiert.

Nach 24 bzw. 48 Stunden konnte in nur einer Probe *Candida* spp. in Reinkultur mit begleitender Leukozyturie nachgewiesen werden.

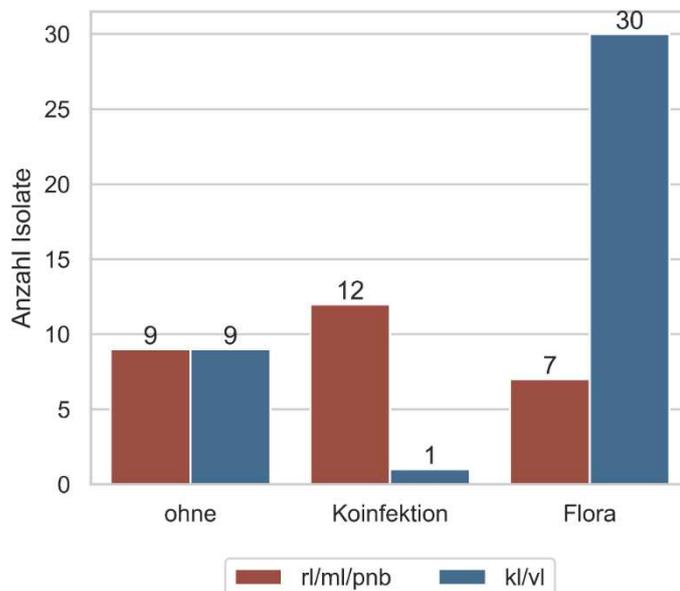


Abb. 15: (A) Nachweise von *Candida* in Reinkultur, als Koinfektion und Kontamination mit urogenitaler Flora in Bezug zum Leukozytennachweis nach 18 Stunden Inkubation
 rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten;
 ohne, Reinkultur; Koinfektion, Nachweis eines Uropathogens mit $\geq 10^3$ CFU/mL,
 Flora, Kontamination durch urogenitale Flora

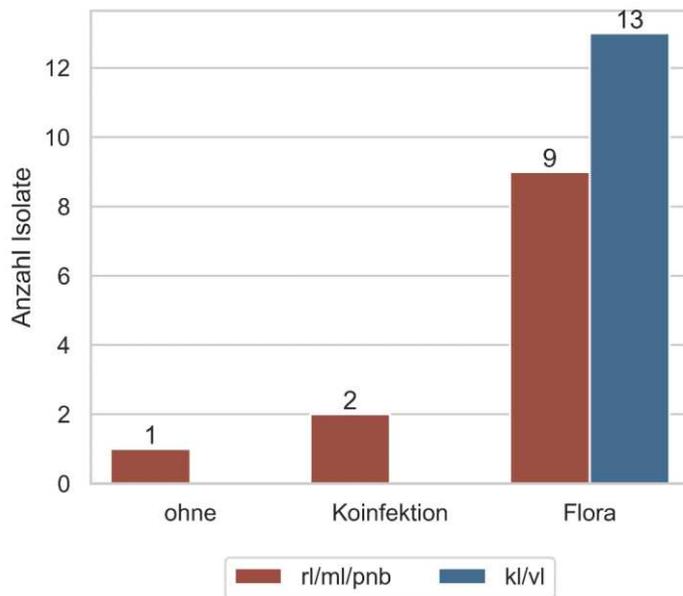


Abb. 16: (A) Nachweise von Candida in Reinkultur, als Koinfektion und Kontamination mit urogenitaler Flora in Bezug zum Leukozytennachweis nach 24 Stunden Inkubation
 rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten;
 ohne, Reinkultur; Koinfektion, Nachweis eines Uropathogens mit $\geq 10^3$ CFU/mL,
 Flora, Kontamination durch urogenitale Flora

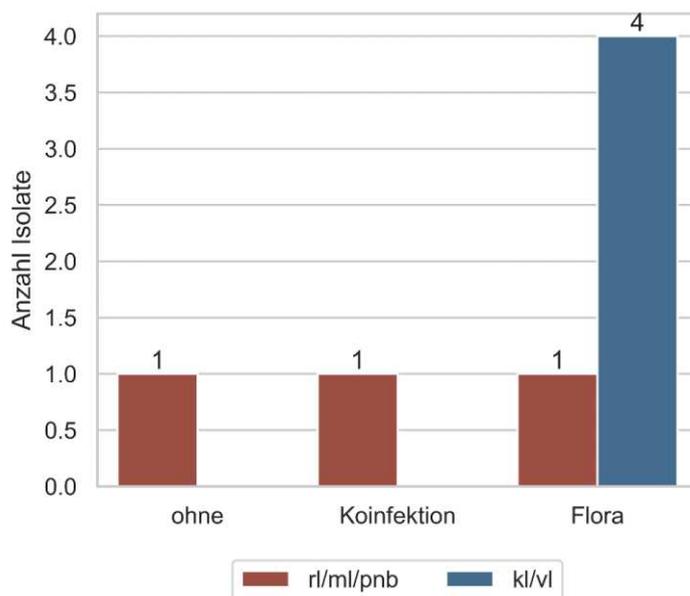


Abb. 17: Nachweise von Candida in Reinkultur, als Koinfektion und Kontamination mit urogenitaler Flora in Bezug zum Leukozytennachweis nach 48 Stunden Inkubation
 rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten;
 ohne, Reinkultur; Koinfektion, Nachweis eines Uropathogens mit $\geq 10^3$ CFU/mL,
 Flora, Kontamination durch urogenitale Flora

3.3 Algorithmus

Ein neuer Algorithmus zur Inkubation und Beurteilung von Urinkulturen (Abb. 18) wurde, unter Berücksichtigung des empfohlenen Algorithmus der MiQ 2 [39], entwickelt und anhand der vorliegenden Daten überprüft. Das Keimwachstum wurde ab einer Keimzahl von 10^3 CFU/mL als relevant gewertet, die Speziesanzahl wurde vorrangig von CHROMagar Orientation abgelesen, wobei Bakterienspezies, welche nur auf CNA-Agar wachsen (wie z.B. *Actinotignum schaalii*) von diesem Medium mitbeurteilt wurden. Der Focus des neuen Algorithmus liegt auf der frühestmöglichen Beendigung der Inkubation, bei gleichzeitig sicherer Detektion anspruchsvoller Uropathogene. Hierfür wurde der Nachweis der Leukozytenzahl im Urin als diskriminierender Parameter genutzt. Für die untersuchten Proben ergibt sich die in Abb. 19 dargestellte Verteilung.

In 23% der Proben waren nach 18 Stunden Inkubation bereits ≥ 3 Bakterienspezies nachzuweisen und wurden daher als kontaminierte Proben bewertet.

Die 77% der Proben ohne Wachstum nach 18 Stunden oder mit Wachstum von maximal 2 Spezies wurden nach dem Algorithmus in 2 Gruppen, je nach Leukozytenstatus, aufgeteilt. In der Gruppe mit positiven Leukozytenstatus wurden nach 18 Stunden bereits 35 Proben mit anspruchsvollen Uropathogene detektiert. Durch Fortführung der Inkubation wurden weitere 5 *A. schaalii* und 3 *A. urinae* nachgewiesen.

In der Gruppe ohne relevanten Leukozytennachweis wurden nach 18 Stunden 5 *A. urinae* gefunden. Da in dem neuen Algorithmus die Inkubation dieser Proben nicht fortgesetzt würde, entsteht hierdurch ein Nachweisdefizit von insgesamt 4 Fällen mit *Actinotignum schaalii*. Demnach werden 7,7% (4/52) der gefundenen Uropathogene durch den neuen Algorithmus nicht detektiert.

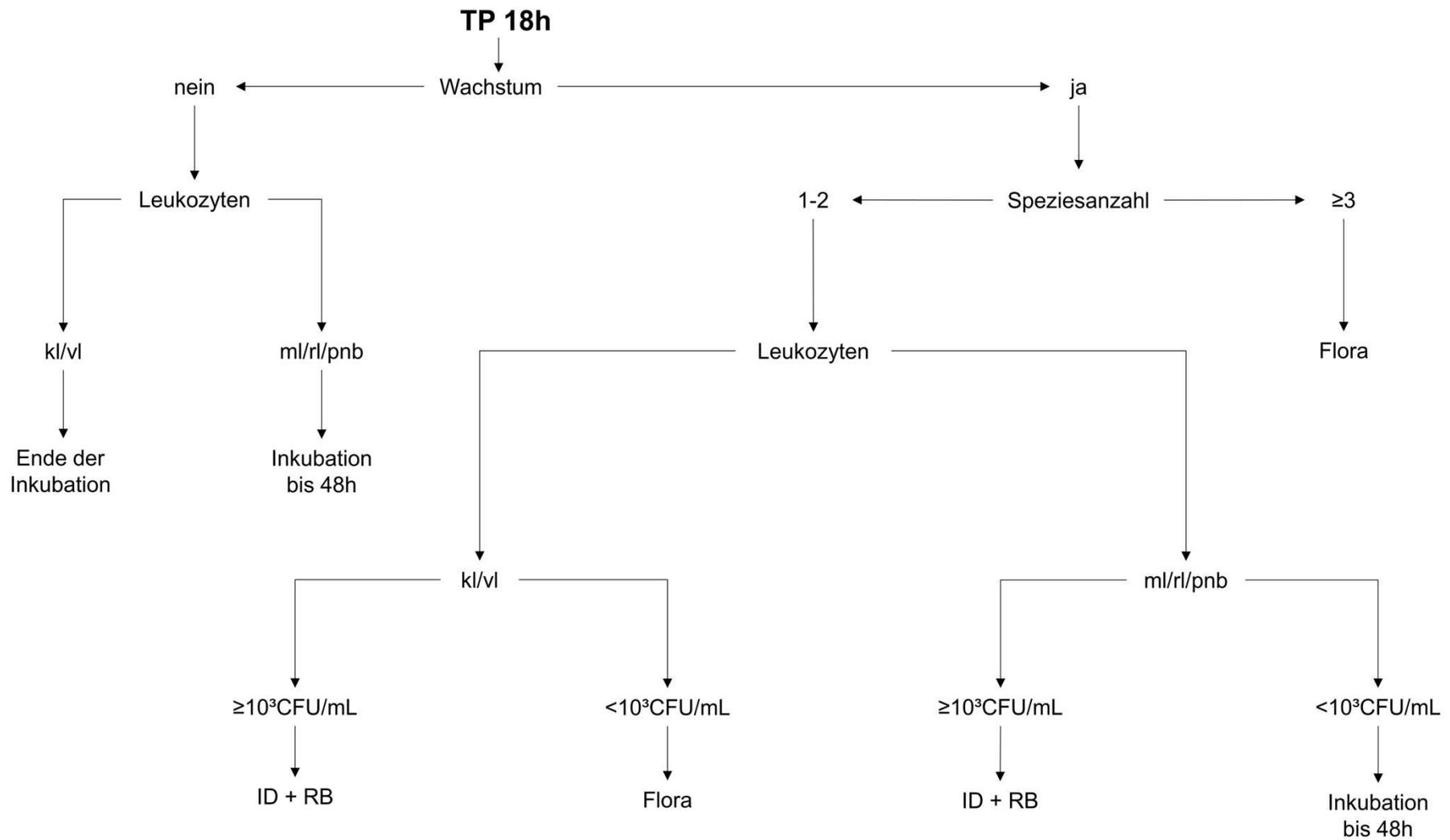


Abb. 18: Algorithmus zur Inkubation und Beurteilung von Urinkulturen

TP, Timepoint; KZ, Keimzahl; rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten; ID, Speziesidentifikation; RB, Resistenzbestimmung; Flora, urogenitale Standortflora bzw. Kontamination

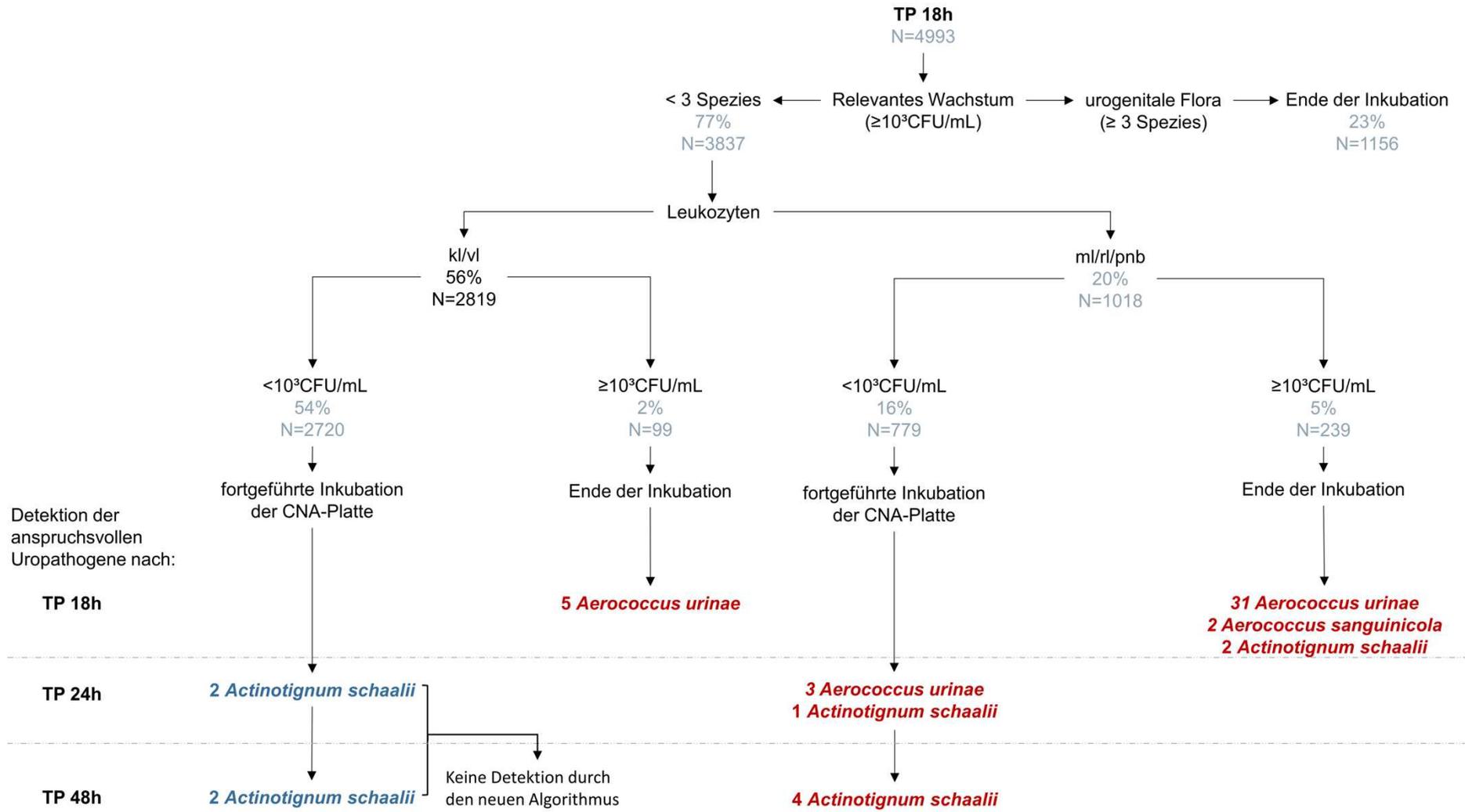


Abb. 19: Detektion anspruchsvoller Uropathogene nach dem neuen Algorithmus
 TP, Timepoint; rl/ml/pnb, reichlich/mäßig Leukozyten/Probe nicht beurteilbar; kl/vl, keine/vereinzelt Leukozyten

4 Diskussion

4.1 Anspruchsvolle Uropathogene

In dieser Studie wurden 4993 Urinproben auf das Vorkommen anspruchsvoller Harnwegsinfektionserreger untersucht. Insgesamt konnten diese in 52 Proben (1%) nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit ermittelte Nachweisrate von *Aerococcus* spp. von 0,8% ist mit den publizierten Nachweisraten von 0,2 – 0,8% vergleichbar [3, 10, 15]. Wie schon 1953 von Williams *et al.* [5], oder auch 1997 von Schuur *et al.* [9] beschrieben, konnte auch in dieser Untersuchung bereits nach 18 Stunden Inkubation ein ausreichendes Wachstum detektiert werden. Die Inkubationsbedingungen der Studien waren identisch mit den hier angewandten Bedingungen und erfolgten in normaler Atmosphäre bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$ auf 5% bluthaltigen Nährmedien.

Eine wichtige Voraussetzung für die Bearbeitung von Urinproben in dieser Studie war die Kulturbedingungen der nachzuweisenden Uropathogene zu prüfen. Es versteht sich, dass bei einer Automatisierung alle Uropathogene in den gegebenen Zeiten des Algorithmus nachweisbar sein sollten. Bezogen auf die notwendigen Inkubationsbedingungen fanden sich diskrepante Aussagen in der Literatur. Die von Aguirre *et al.* [40], sowie Lawson *et al.* [2] getroffene Aussage *Aerococcus* spp. sei „microaerophil“ ist nicht zutreffend, wobei sich hier auf die Untersuchungen von Williams *et al.* bezogen wurde. In ihren Untersuchungen konnten Williams *et al.* [5] (12 untersuchte Isolate) und Christensen *et al.* [3] (29 Isolate) zeigen, dass *Aerococcus* spp. aerob kultivierbar war, dies aber auch unter anaeroben Bedingungen gelang und dementsprechend als fakultativ anaerob bezeichnet werden kann. Eine Inkubation in CO₂-angereicherter Atmosphäre führte nur bei Christensen *et al.* zu einer leichten Größenzunahme der Kolonien (was durch ein schnelleres Wachstum erklärbar wäre). Auch wurden von Miller *et al.* [4] 1996 und Zhang *et al.* [8] 2000 in ihren Studien die Wachstumsbedingungen von *Aerococcus* spp. untersucht, und darin eindeutig gezeigt, dass keine besonderen Inkubationsbedingungen zur Anzucht notwendig sind, sondern diese unter aeroben, mikroaerophilen und anaeroben Bedingungen gelang; wenngleich die Inkubationszeit im anaeroben Milieu gegebenenfalls verlängert werden musste.

Die Inkubationszeit von 18 bis 24 Stunden wird in vielen publizierten Studien als ausreichend angesehen, um ein Wachstum von *Aerococcus* spp. nachzuweisen [4, 5, 16].

In den Empfehlungen der MiQ wird allerdings eine Inkubationszeit von 48 Stunden vorgegeben, da „langsam wachsende potenziell uropathogene Erreger (*Aerococcus urinae*, *Actinotignum schaalii*) nur nach 48h sicher nachgewiesen werden können“ [39, S. 39].

Als alleinige Referenz wird hierzu auf eine Publikation von Rasmussen *et al.* [11] verwiesen, in der allerdings keine Aussage über die Inkubationszeit getroffen wird, und welche sich ausschließlich auf *Aerococcus* spp. bezieht.

Eine Besonderheit von *Aerococcus* spp. fiel in dieser Studie auf, welche bislang nicht in der Literatur für diese Spezies beschrieben wurde. Nach 18 bis 24 Stunden Inkubation wirkten manche Isolate, als seien unterschiedliche Spezies nachweisbar, da sie sich vorrangig in der Koloniegroße und -farbe unterschieden, nämlich kleine farblose bis graue Kolonien mit deutlicher α -Hämolyse und größere Kolonien von weiß-grauer Farbe und ohne bis geringer α -Hämolyse. Die Speziesidentifikation mittels Maldi-TOF ergab aber jeweils den Nachweis von *Aerococcus urinae*.

Dieser Pleomorphismus könnte zu einer Fehlinterpretation der Probenbeurteilung als Kontamination führen und damit den Nachweis, selbst von klinisch relevanter Anzahl von *Aerococcus* spp. in der Probe verhindern. Es gibt viele Beispiele in der Literatur von Erregern, die von der Koloniemorphologie unterschiedlich wachsen (z. B. glatte und raue Formen von *Mycobacterium abscessus*), die durchaus Bedeutung haben bezüglich Virulenz und Pathogenität. Für *Aerococcus* ist bisher nichts darüber bekannt. Da es nicht Ziel dieser Studie war, wird hier nicht weiter darüber berichtet. Weitere Analysen der verschiedenen Wachstumsformen werden in weiteren Forschungsprojekten durchgeführt.

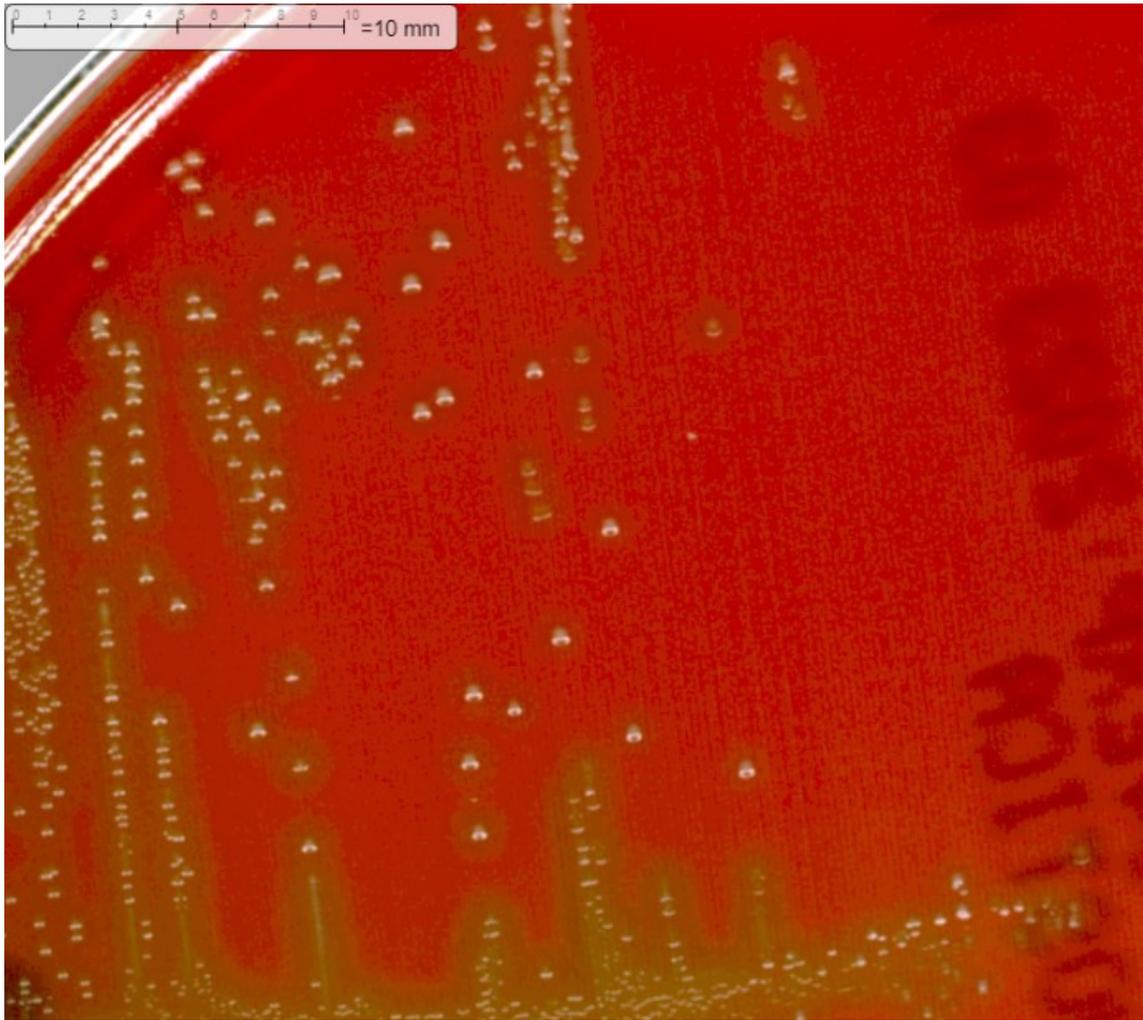


Abb. 20: Pleomorphismus von *Aerococcus urinae*
Dargestellt ist eine Reinkultur von *A. urinae* auf CNA-Agar nach 48h Inkubation in Raumluft

Im Gegensatz zu *Aerococcus* spp. ist für *Actinotignum schaalii* eindeutig nachgewiesen, dass die optimalen Wachstumsbedingungen einer Inkubation in CO₂-angereicherter oder anaerober Atmosphäre und einer Inkubationszeit von 2-3 Tagen entsprechen [12, 18, 19, 21, 41]. Von Nielsen *et al.* [19] konnte in einer Untersuchung von 55 Isolaten zwar ein feines Wachstum von *A. schaalii* nach 24 Stunden Inkubation in 5% CO₂ nachgewiesen werden, gut sichtbar waren die Kolonien aber erst nach 48 Stunden Bebrütung. Durch das langsame, oder sogar fehlende Wachstum unter suboptimalen Inkubationsbedingungen, wird *A. schaalii* häufig nicht erkannt und neben der ähnlich aussehenden begleitenden Flora leicht übersehen [42].

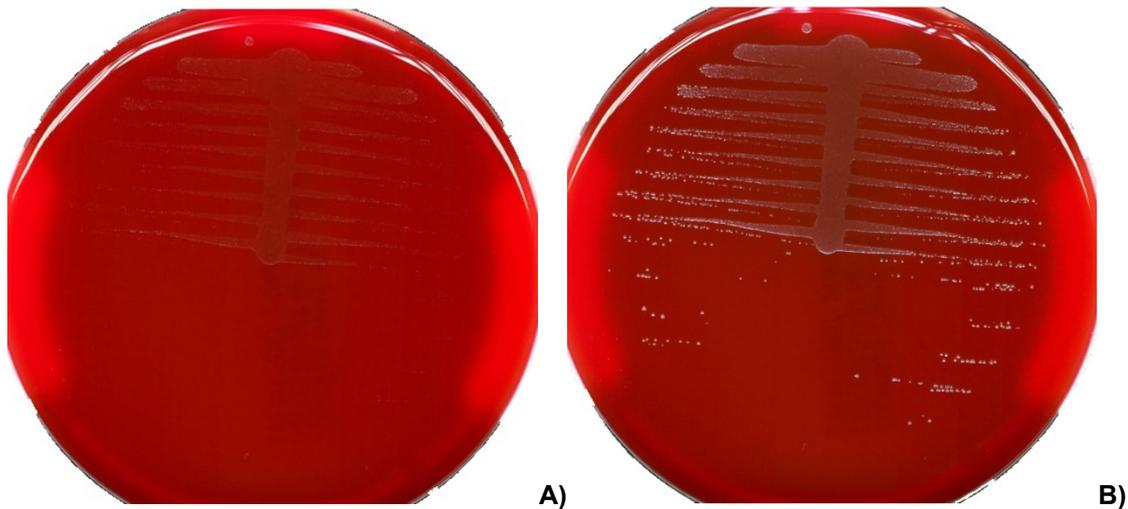


Abb. 21: Morphologie von *Actinotignum schaalii*
 A) nach 24 Stunden Inkubation in Raumluft; B) nach 48 Stunden Inkubation in Raumluft

In dieser Studie lag die Nachweisrate für *Actinotignum schaalii* bei 0,2%, trotz der nicht optimalen Bebrütungsbedingungen. Es liegen nur sehr begrenzt publizierte Daten zur Prävalenz oder Inzidenz vor. Lediglich von Nielsen *et al.* [19] wurde eine Prävalenz von 0,6% beschrieben. Allerdings sind die Daten nicht miteinander vergleichbar, da sich diese Zahl auf eine Subpopulation von Patienten bezieht, die älter als 60 Jahre sind und urogenitale prädisponierende Faktoren aufweisen. Zudem besteht ein weiterer Unterschied darin, dass hier eine klinische Signifikanz bereits bei $\geq 10^3$ CFU/mL angenommen wurde und bei Nielsen *et al.* ab $\geq 10^5$ CFU/mL.

Der Nachweis von *Actinotignum schaalii* könnte, trotz der nicht optimalen Inkubationsatmosphäre, durch die digitale Bilderfassung begünstigt sein, da die hochauflösenden Bilder in 2 verschiedenen Belichtungsmodi (Auflicht und Durchlicht) aufgenommen werden und zusätzlich eine Zoom-Funktion eine bessere Detektion erlaubt.

Corynebacterium urealyticum konnte in keiner der 4993 untersuchten Proben nachgewiesen werden. Die Angaben zur Inzidenz sind sehr unterschiedlich beschrieben und variieren zwischen 0,03% (Walkden *et al.*) [30] und 0,32% (Nebreda-Mayoral *et al.*) [31]. Erklärt werden können die unterschiedlichen Nachweisraten durch die verschieden definierten Erfassungsgrenzen und Inkubationsbedingungen. So wurde bei Nebreda-Mayoral *et al.* für 72 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und Keimzahlen ab $\geq 10^3$ CFU/mL als relevant erfasst, bei Walkden *et al.* hingegen wurde für 48 Stunden bei 5% CO₂ inkubiert

und erst ab einer Keimzahl von $\geq 10^5$ CFU/mL von einem relevanten Nachweis ausgegangen. Die fehlende Detektion könnte begründet sein durch die zu kurze Inkubationszeit, da diese Spezies sehr langsam wächst und bis zu 72 Stunde für ein suffizientes Wachstum benötigt [26, 35, 43]. Die optimale Inkubationsatmosphäre und Temperatur von $36 \pm 1^\circ\text{C}$ auf einem bluthaltigen Nährmedium war allerdings in dieser Arbeit gewährleistet. Außerdem wurde mit einem Teststamm geprüft, ob die Anzucht auf den verwendeten Nährmedien in Raumluftatmosphäre grundsätzlich möglich ist. Es zeigte sich hierbei ein feines Wachstum von *C. urealyticum* nach 24h, allerdings nur auf CNA-Agar, jedoch nicht auf CHROMagar.

4.2 Pilze

In der MiQ 02 [39] wird zur Detektion von *Candida* spp. empfohlen, die Inkubationszeit um bis zu 72 Stunden zu verlängern. Eine direkte Referenz hierzu wurde allerdings nicht angegeben. Es werden lediglich zwei Publikationen von Kauffmann *et al.* [44, 45] in der Literaturliste aufgeführt, in denen zwar auch die Inkubation für 72 Stunden empfohlen wird, hier aber Bezug genommen wird auf eine Veröffentlichung von Kauffmann *et al.* im Jahr 1974 [46], in welcher aber keine Aussage zur Inkubationszeit getroffen wird und es sich lediglich um Case Reports handelt.

In dieser Studie wurden insgesamt 556 Proben auf den Nachweis von *Candida* spp. untersucht. Es wurde bei 100 Proben *Candida* spp. nachgewiesen. 12,2% (68 Proben) waren bereits nach 18 Stunden Inkubation positiv, weitere 4,5% (25 Proben) nach 24 Stunden und nochmal 1,3% (7 Proben) nach 48 Stunden. Eine fortgeführte Inkubation von insgesamt 72 Stunden erbrachte keinen weiteren Nachweis.

Die nach 48 Stunden ermittelten 7 positiven Urinproben (1,3%) zeigten in 5 Proben eine Kontamination mit $\geq 10^3$ CFU/mL urogenitaler Flora und lassen daher keine Beurteilung der Relevanz zu. Bei einer weiteren Probe wurde neben *Candida* spp. ein uropathogenes Bakterium in relevanter Keimzahl angezüchtet und stellt daher auch die ätiologische Relevanz des *Candida* spp. Nachweises in Frage. Lediglich in einer Probe lag *Candida* spp. in Reinkultur, mit begleitender Leukozyturie, vor, wobei es sich um einen Katheterurin handelte.

Das Fehlen von Leukozyten in der Probe spricht gegen eine Candida-HWI und

daher ist eine Unterscheidung zwischen Infektion und Kolonisation nicht möglich. Insgesamt ist die Diagnosestellung einer durch *Candida* spp. verursachten Harnwegsinfektion schwierig. Grundsätzlich sollte eine asymptomatische Candidurie nicht mit Antimykotika therapiert werden, mit Ausnahme von neutropenen Patienten, Frühgeborenen und Patienten, bei denen eine urologische Manipulation geplant ist [47–49]. Um die Diagnose einer Harnwegsinfektion durch *Candida* spp. zu stellen, wird empfohlen, durch eine wiederholte, möglichst steril gewonnene, Urinprobe, die Candidurie zu verifizieren, sowie klinische Symptome und Risikofaktoren (z.B. vorangegangene Antibiotikatherapie, einliegendes Fremdmaterial, Nierenfunktionsstörungen, Diabetes mellitus) zu erfassen und bei der Diagnosestellung zu berücksichtigen. Besonders schwierig ist die Bewertung bei Nachweis von *Candida* spp. aus Katheterurin, da hier die Leukozytenbestimmung weitaus weniger spezifisch ist und eine Quantifizierung nicht mit einer Infektion korreliert [45, 50]. In solchen Fällen wäre es sinnvoll sich auf Weiterbildungsmaßnahmen der einsendenden Kolleg*innen zu konzentrieren, um deutlich zu machen wann eine Candida-Infektion im Urogenitaltrakt zu erwarten wäre und wie solche Proben am besten gekennzeichnet würden.

4.3 Total Lab Automation (TLA) mit WASP® und WASPLab®

Im Vergleich zur konventionellen Verarbeitung von Urinproben ermöglicht die Bearbeitung der Proben mit WASP® eine standardisierte Verarbeitung der Proben. Nach dem automatisierten Ansetzen der Agarplatten erfolgt die sofortige Inkubation (anstatt des Sammelns aller Platten bis die letzte Probe bearbeitet wurde), welche für alle Kulturmedien identisch ist. Hieraus resultiert eine frühzeitigere Detektion von bakteriellem Wachstum, die vor allem den hochauflösenden digitalen Fotografien geschuldet ist und damit auch zusätzlich eine frühere und feinere morphologische Unterscheidung der Bakterien gestattet [51, 52]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass sich mit TLA eine Reduktion der Inkubationszeit erreichen lässt [53]. Dies gilt insbesondere für Gram-negative Organismen, für Gram-positive Bakterien, wie den anspruchsvollen Uropathogenen, kann eine zu kurze Inkubation allerdings zu

einer verringerten Sensitivität der Detektion führen, wie in einer Studie von Bailey *et al.* [38] gezeigt wurde und im Einklang mit den hier ermittelten Daten steht.

4.4 Algorithmus

Unter Anwendung des neuen Algorithmus wurden nach 18 Stunden Inkubation bereits 77% aller anspruchsvollen Uropathogene nachgewiesen. Weitere 15% wurden nach verlängerter Inkubation der Proben mit positivem Leukozytennachweis angezüchtet. Hierfür mussten insgesamt 16% der Urinproben länger inkubiert werden.

Proben ohne oder vereinzelt Leukozytennachweis und ohne Wachstum bzw. $\leq 10^3$ CFU/mL würden, entsprechend des Algorithmus, als nicht klinisch relevant betrachtet und nicht weiter inkubiert werden. Von den Proben mit negativem Leukozytennachweis waren nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden 5 Proben mit *Aerococcus urinae* positiv. Vier Proben zeigten erst nach 24 bis 48 Stunden ein Wachstum von *Actinotignum schaalii*. Diese werden bei Anwendung des neuen Algorithmus nicht mehr detektiert, was allerdings keine klinischen Konsequenzen hätte, da es sich bei diesen Proben klinisch betrachtet um eine Bakteriurie und nicht um eine Harnwegsinfektion handelt. Auch aus ökonomischer Sicht erscheint eine verlängerte Inkubation von 54% der Proben nicht gerechtfertigt für diese ätiologisch fraglichen Nachweise.

Anhand des Algorithmus konnte eine Standard-Inkubationszeit von 18 Stunden ermittelt werden, welche ausreichend ist, für die sichere Detektion typischer Uropathogene. Mittels gezielter Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 bzw. 48 Stunden nach Differenzierung der Proben über den Leukozytenstatus, wird zudem eine Reduktion der verlängerten Inkubation um 54% erreicht.

4.5 Schlussfolgerungen

Durch die Einführung einer TLA mittels WASPLab® erfolgt eine Standardisierung der Bearbeitung von Urinproben. Durch die gleichbleibenden Verarbeitungs-, Inkubations- und Fotografie-Bedingungen wird zudem eine schnellere Wachstumsdetektion ermöglicht. Über den neuen Algorithmus wird nicht nur die Inkubationskapazität gesenkt, sondern vor allem der Nutzungsgrad der Bildgebungseinheit sowie der notwendigen Plattenbewegung verringert. Aufgrund dieser Prozessoptimierung des Systems kann die Quantität der

Probenbearbeitung gesteigert werden bei gleichbleibender Qualität der Untersuchung und sicherer Detektion von anspruchsvollen Uropathogenen.

5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Neugent ML, Hulyalkar NV, Nguyen VH, Zimmern PE, Nisco NJ de (2020) Advances in Understanding the Human Urinary Microbiome and Its Potential Role in Urinary Tract Infection. *mBio* 11, 10.1128/mBio.00218-20.
2. Lawson PA, Falsen E, Truberg-Jensen K, Collins MD (2001) *Aerococcus sanguicola* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 475–479, 10.1099/00207713-51-2-475.
3. Christensen JJ, Korner B, Kjaergaard H (1989) *Aerococcus*-like organism-- an unnoticed urinary tract pathogen. *APMIS* 97: 539–546, 10.1111/j.1699-0463.1989.tb00828.x.
4. Miller PH, Facklam RR, Miller JM (1996) Atmospheric growth requirements for *Alloiococcus* species and related gram-positive cocci. *J Clin Microbiol* 34: 1027–1028, 10.1128/jcm.34.4.1027-1028.1996.
5. WILLIAMS RE, HIRCH A, COWAN ST (1953) *Aerococcus*, a new bacterial genus. *J Gen Microbiol* 8: 475–480, 10.1099/00221287-8-3-475.
6. Christensen JJ, Vibits H, Ursing J, Korner B (1991) *Aerococcus*-like organism, a newly recognized potential urinary tract pathogen. *J Clin Microbiol* 29: 1049–1053, 10.1128/jcm.29.5.1049-1053.1991.
7. Christensen JJ, Kilian M, Fussing V, Andresen K, Blom J, et al. (2005) *Aerococcus urinae*: polyphasic characterization of the species. polyphasic characterization of the species. *APMIS* 113: 517–525, 10.1111/j.1600-0463.2005.apm_183.x.
8. Zhang Q, Kwok C, Attorri S, Clarridge JE (2000) *Aerococcus urinae* in urinary tract infections. *J Clin Microbiol* 38: 1703–1705, 10.1128/JCM.38.4.1703-1705.2000.
9. Schuur PM, Kasteren ME, Sabbe L, Vos MC, Janssens MM, et al. (1997) Urinary tract infections with *Aerococcus urinae* in the south of The Netherlands. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 16: 871–875, 10.1007/BF01700552.
10. Senneby E, Petersson A-C, Rasmussen M (2015) Epidemiology and antibiotic susceptibility of aerococci in urinary cultures. *Diagn Microbiol Infect Dis* 81: 149–151, 10.1016/j.diagmicrobio.2014.11.009.

11. Rasmussen M (2016) *Aerococcus*: an increasingly acknowledged human pathogen. *Clin Microbiol Infect* 22: 22–27, 10.1016/j.cmi.2015.09.026.
12. Sturm PDJ, van Eijk J, Veltman S, Meuleman E, Schülin T (2006) Urosepsis with *Actinobaculum schaalii* and *Aerococcus urinae*. *J Clin Microbiol* 44: 652–654, 10.1128/JCM.44.2.652-654.2006.
13. Hilt EE, McKinley K, Pearce MM, Rosenfeld AB, Zilliox MJ, et al. (2014) Urine is not sterile: use of enhanced urine culture techniques to detect resident bacterial flora in the adult female bladder. *J Clin Microbiol* 52: 871–876, 10.1128/JCM.02876-13.
14. Sierra-Hoffman M, Watkins K, Jinadatha C, Fader R, Carpenter JL (2005) Clinical significance of *Aerococcus urinae*: a retrospective review. *Diagn Microbiol Infect Dis* 53: 289–292, 10.1016/j.diagmicrobio.2005.06.021.
15. Rasmussen M (2013) *Aerococci* and *aerococcal* infections. *J Infect* 66: 467–474, 10.1016/j.jinf.2012.12.006.
16. Cattoir V, Kobal A, Legrand P (2010) *Aerococcus urinae* and *Aerococcus sanguinicola*, two frequently misidentified uropathogens. *Scand J Infect Dis* 42: 775–780, 10.3109/00365548.2010.485576.
17. Lawson PA, Falsen E, Akervall E, Vandamme P, Collins MD (1997) Characterization of some *Actinomyces*-like isolates from human clinical specimens: reclassification of *Actinomyces suis* (Soltys and Spratling) as *Actinobaculum suis* comb. nov. and description of *Actinobaculum schaalii* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47: 899–903, 10.1099/00207713-47-3-899.
18. Reinhard M, Prag J, Kemp M, Andresen K, Klemmensen B, et al. (2005) Ten cases of *Actinobaculum schaalii* infection: clinical relevance, bacterial identification, and antibiotic susceptibility. *J Clin Microbiol* 43: 5305–5308, 10.1128/JCM.43.10.5305-5308.2005.
19. Nielsen HL, Søby KM, Christensen JJ, Prag J (2010) *Actinobaculum schaalii*: a common cause of urinary tract infection in the elderly population. Bacteriological and clinical characteristics. *Scand J Infect Dis* 42: 43–47, 10.3109/00365540903289662.
20. Olsen AB, Andersen PK, Bank S, Søby KM, Lund L, et al. (2013) *Actinobaculum schaalii*, a commensal of the urogenital area. *BJU Int* 112: 394–397, 10.1111/j.1464-410X.2012.11739.x.

21. Bank S, Jensen A, Hansen TM, Søby KM, Prag J (2010) *Actinobaculum schaalii*, a common uropathogen in elderly patients, Denmark. *Emerg Infect Dis* 16: 76–80, 10.3201/eid1601.090761.
22. Lotte R, Lotte L, Ruimy R (2016) *Actinotignum schaalii* (formerly *Actinobaculum schaalii*): a newly recognized pathogen-review of the literature. *Clin Microbiol Infect* 22: 28–36, 10.1016/j.cmi.2015.10.038.
23. Barberis C, Budia M, Palombarani S, Rodriguez CH, Ramírez MS, et al. (2017) Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Actinomyces* and related genera reveals an unusual clindamycin resistance among *Actinomyces urogenitalis* strains. *J Glob Antimicrob Resist* 8: 115–120, 10.1016/j.jgar.2016.11.007.
24. Cattoir V (2012) *Actinobaculum schaalii*: review of an emerging uropathogen. *J Infect* 64: 260–267, 10.1016/j.jinf.2011.12.009.
25. Cattoir V, Varca A, Greub G, Prod'hom G, Legrand P, et al. (2010) In vitro susceptibility of *Actinobaculum schaalii* to 12 antimicrobial agents and molecular analysis of fluoroquinolone resistance. *J Antimicrob Chemother* 65: 2514–2517, 10.1093/jac/dkq383.
26. Soriano F, Ponte C, Santamaria M, Aguado JM, Wilhelmi I, et al. (1985) *Corynebacterium* group D2 as a cause of alkaline-encrusted cystitis: report of four cases and characterization of the organisms. *J Clin Microbiol* 21: 788–792, 10.1128/jcm.21.5.788-792.1985.
27. Soriano F, Ponte C, Santamaría M, Castilla C, Fernández Roblas R (1986) In vitro and in vivo study of stone formation by *Corynebacterium* group D2 (*Corynebacterium urealyticum*). *J Clin Microbiol* 23: 691–694, 10.1128/jcm.23.4.691-694.1986.
28. Soriano F, Aguado JM, Ponte C, Fernández-Roblas R, Rodríguez-Tudela JL (1990) Urinary tract infection caused by *Corynebacterium* group D2: report of 82 cases and review. *Rev Infect Dis* 12: 1019–1034, 10.1093/clinids/12.6.1019.
29. Soriano F, Rodríguez-Tudela JL, Fernández-Roblas R, Aguado JM, Santamaría M (1988) Skin colonization by *Corynebacterium* groups D2 and JK in hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 26: 1878–1880, 10.1128/jcm.26.9.1878-1880.1988.

30. Walkden D, Klugman KP, Vally S, Naidoo P (1993) Urinary tract infection with *Corynebacterium urealyticum* in South Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 12: 18–24, 10.1007/BF01997051.
31. Nebreda-Mayoral T, Muñoz-Bellido JL, Garcia-Rodríguez JA (1994) Incidence and characteristics of urinary tract infections caused by *Corynebacterium urealyticum* (*Corynebacterium* group D2). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 13: 600–604, 10.1007/BF01971313.
32. Pitcher D, Soto A, Soriano F, Valero-Guillén P (1992) Classification of coryneform bacteria associated with human urinary tract infection (group D2) as *Corynebacterium urealyticum* sp. nov. *Int J Syst Bacteriol* 42: 178–181, 10.1099/00207713-42-1-178.
33. Funke G, Graevenitz A von, Clarridge JE, Bernard KA (1997) Clinical microbiology of coryneform bacteria. *Clin Microbiol Rev* 10: 125–159, 10.1128/CMR.10.1.125.
34. Salem N, Salem L, Saber S, Ismail G, Bluth MH (2015) *Corynebacterium urealyticum*: a comprehensive review of an understated organism. *Infect Drug Resist* 8: 129–145, 10.2147/IDR.S74795.
35. Soriano F, Fernández-Roblas R (1988) Infections caused by antibiotic-resistant *Corynebacterium* group D2. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 7: 337–341, 10.1007/BF01962333.
36. Zimmermann S (2021) Laboratory Automation in the Microbiology Laboratory: an Ongoing Journey, Not a Tale? *J Clin Microbiol* 59, 10.1128/JCM.02592-20.
37. Thomson RB, McElvania E (2019) Total Laboratory Automation: What Is Gained, What Is Lost, and Who Can Afford It? *Clin Lab Med* 39: 371–389, 10.1016/j.cll.2019.05.002.
38. Bailey AL, Burnham C-AD (2019) Reducing the time between inoculation and first-read of urine cultures using total lab automation significantly reduces turn-around-time of positive culture results with minimal loss of first-read sensitivity. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 38: 1135–1141, 10.1007/s10096-019-03512-3.
39. Schubert S, Podschun R, Gatermann S, Fünfstück R, Naber KG, et al. (2020) *Harnwegsinfektionen*. (3rd edn), Elsevier Urban et Fischer, München.

40. Aguirre M, Collins MD (1992) Phylogenetic analysis of some *Aerococcus*-like organisms from urinary tract infections: description of *Aerococcus urinae* sp. nov. *J Gen Microbiol* 138: 401–405, 10.1099/00221287-138-2-401.
41. Beguelin C, Genne D, Varca A, Tritten M-L, Siegrist HH, et al. (2011) *Actinobaculum schaalii*: clinical observation of 20 cases. *Clin Microbiol Infect* 17: 1027–1031, 10.1111/j.1469-0691.2010.03370.x.
42. Kline KA, Lewis AL (2016) Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiol Spectr* 4, 10.1128/microbiolspec.UTI-0012-2012.
43. Ryan M, Murray PR (1994) Prevalence of *Corynebacterium urealyticum* in urine specimens collected at a university-affiliated medical center. *J Clin Microbiol* 32: 1395–1396, 10.1128/jcm.32.5.1395-1396.1994.
44. Kauffman CA (2014) Diagnosis and management of fungal urinary tract infection. *Infect Dis Clin North Am* 28: 61–74, 10.1016/j.idc.2013.09.004.
45. Kauffman CA, Fisher JF, Sobel JD, Newman CA (2011) *Candida* urinary tract infections--diagnosis. *Clin Infect Dis* 52 Suppl 6: S452-6, 10.1093/cid/cir111.
46. Kauffman CA, Tan JS (1974) *Torulopsis glabrata* renal infection. *Am J Med* 57: 217–224, 10.1016/0002-9343(74)90446-x.
47. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, et al. (2012) ESCMID* guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect* 18 Suppl 7: 19–37, 10.1111/1469-0691.12039.
48. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, et al. (2016) Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 62: e1-50, 10.1093/cid/civ933.
49. Groll AH, Buchheidt D, Heinz W, Bellmann R, Cornly O, et al. (2020) S1 Leitlinie Diagnose und Therapie von *Candida* Infektionen: Gemeinsame Empfehlungen der Deutschsprachigen Mykologischen Gesellschaft (DMyKG) und der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (PEG). https://register.awmf.org/assets/guidelines/082-005I_S1_Diagnose-Therapie-Candida-Infektionen_2020-09.pdf.

50. Alfouzan WA, Dhar R (2017) Candiduria: Evidence-based approach to management, are we there yet? *J Mycol Med* 27: 293–302, 10.1016/j.mycmed.2017.04.005.
51. Quiblier C, Jetter M, Rominski M, Mouttet F, Böttger EC, et al. (2016) Performance of Copan WASP for Routine Urine Microbiology. *J Clin Microbiol* 54: 585–592, 10.1128/JCM.02577-15.
52. Dauwalder O, Landrieve L, Laurent F, Montclos M de, Vandenesch F, et al. (2016) Does bacteriology laboratory automation reduce time to results and increase quality management? *Clin Microbiol Infect* 22: 236–243, 10.1016/j.cmi.2015.10.037.
53. Cherkaoui A, Renzi G, Vuilleumier N, Schrenzel J (2019) Copan WASPLab automation significantly reduces incubation times and allows earlier culture readings. *Clin Microbiol Infect* 25: 1430.e5-1430.e12, 10.1016/j.cmi.2019.04.001.