

Erweiterung der etablierten Diagnostik bei neonataler Sepsis durch Sequenzierung mikrobieller zellfreier DNA

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Nils Julian

Balks

aus Hannover

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. Florian Kipfmüller
2. Gutachterin: Prof. Dr. Gabriele Bierbaum

Tag der Mündlichen Prüfung: 10.01.2025

Aus der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1. Deutsche Zusammenfassung	7
1.1 Einleitung	7
1.2 Material und Methoden	8
1.2.1 Studiendesign und Patienten	8
1.2.2 Routine Sepsis Diagnostik und Blutkulturen	12
1.2.3 Next-Generation Sequenzierung	13
1.3 Ergebnisse	13
1.3.1 Blutkultur Ergebnisse	14
1.3.2 Auswertung der NGS-Ergebnisse	15
1.3.3 Mit NGS identifizierte Spezies	16
1.3.4 NGS-positive und Blutkultur-negative Fälle	17
1.3.5 Einfluss von Antibiotika auf Detektionsrate	18
1.4 Diskussion	22
1.5 Zusammenfassung	27
1.6 Literaturverzeichnis	28
2. Veröffentlichung	34
Abstract	35
Introduction	35
Materials and Methods	36
Results	38

Discussion	40
References	43
Supplementary materials	46
3. Danksagung	59

Abkürzungsverzeichnis

NGS	Next-Generation Sequenzierung
BK	Blutkultur
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cfDNA	Zellfreie DNA
mcfDNA	Mikrobielle zellfreie DNA
LOS	Late-Onset Sepsis
NEO-KISS	Neonatologisches Krankenhaus Infektionssurveillance-System
CRBSI	Katheterassoziierte Blutstrominfektion
ZVK	Zentralvenöser Katheter
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IQR	Interquartilsabstand
CMV	Cytomegalovirus
EUCAST	Europäisches Komitee für Antimikrobielle Empfindlichkeitstestung
MALDI-TOF MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Massenspektrometrie
Van	Vancomycin
Amp/Sul	Ampicillin-Sulbactam
Pip/Taz	Piperacillin-Tazobactam
Mero	Meropenem
Tobra	Tobramycin

Fluco

Fluconazol

ECLCO

Enterobacter cloacae Komplex

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

Trotz der Verfügbarkeit einer Vielzahl an Antibiotika und empirischer Antibiotikaregime für verschiedene Infektionsherde bleibt die neonatale Sepsis aufgrund ihrer oft unspezifischen und variablen Präsentation (Coggins und Glaser, 2022) weltweit noch immer eine Hauptursache für neonatale Morbidität und Mortalität (Cohen-Wolkowicz et al., 2009; Fleischmann et al., 2021; Stoll et al., 2002; Wynn, 2016). Aufgrund des Risikos eines schweren Verlaufes, sind besonders sehr unreife Frühgeborene und hospitalisierte Neugeborene stark gefährdet (Boghossian et al., 2013; Greenberg et al., 2017). Um diese schweren Verläufe, geprägt durch potentiell letale akute und langfristige Organfunktionsstörungen, zu verhindern, ist bei Sepsisverdacht zeitnah eine empirische Antibiotikatherapie zu beginnen. Die Verzögerung einer Antibiotikabehandlung bei septischen Neugeborenen ist mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden (Schmatz et al., 2020). Es ist unbedingt erforderlich, dass vor Beginn einer Antibiotikatherapie Blutkulturen gewonnen werden, um den ursächlichen Erreger der Sepsis kulturell zu isolieren und so eine gezielte Therapie zu ermöglichen. Die unmittelbare Verabreichung einer empirischen Antibiotikatherapie erhöht die Überlebenschance der Patienten, senkt jedoch die Wahrscheinlichkeit eines kulturellen Erregernachweises und setzt so die Patienten möglicherweise einer längerfristigen Therapie mit Breitbandantibiotika aus, welche mit Nebenwirkungen wie Toxizität, Resistenzentwicklung und negativen Einflüssen auf das Mikrobiom verbunden sind (Carr et al., 2017; Coggins und Glaser, 2022; Patel et al., 2009; Reyman et al., 2022).

Da viel Erfahrung bei der Interpretation von Blutkulturbefunden besteht, sie das Erstellen eines Antibiogramms erlauben und sie im Vergleich zu Sequenzierungen oder PCR-Diagnostik vergleichsweise günstig sind, gelten Blutkulturen weiterhin als der „Goldstandard“ zum Nachweis einer Bakteriämie. Die Nachteile von Blutkulturen sind, dass die Bakterien Zeit benötigen um zu wachsen, die Nachweiswahrscheinlichkeit vom entnommenen Blutvolumen abhängt und trotz moderner Flüssigkulturmedien ein Nachweis nicht immer gelingt, z.B. bei intrazellulären Erregern oder falls vor Abnahme Antibiotika verabreicht wurden (Mukhopadhyay et al., 2022; Schelonka et al., 1996).

Diagnostische Methoden auf Basis von DNA-Sequenzierung können Krankheitserreger aus peripherem Blut oder anderen Körperflüssigkeiten nachweisen und könnten eine Alternative zur Blutkultur-Diagnostik darstellen. Insbesondere bei Frühgeborenen und Neugeborenen ist der Vorteil, dass nur eine kleine Blutmenge für die Sequenzierung von mikrobieller zellfreier DNA (mcfDNA) benötigt wird (Patel et al., 2016; Persad et al., 2021). Die Sequenzierung zellfreier DNA (cfDNA) in der Blutprobe mit anschließendem Herausfiltern von humaner cfDNA erlaubt die Erfassung von strikt non-humaner, mikrobieller cfDNA. Eine qualitative Erfassung der kurzen Nukleotidsequenzen (Reads) erlaubt Rückschlüsse auf die Erregeridentität, während die quantitative Begutachtung der Erreger-spezifischen Reads erlaubt zwischen einer Infektion und Kontamination zu unterscheiden (Brenner et al., 2018; Grumaz et al., 2019). Da diese Methode mcfDNA-Fragmente und keine lebenden Erreger nachweist, sind auch nach Beginn einer antibiotischen Therapie Erregernachweise möglich (Han et al., 2020). Durch Next-Generation Sequenzierungen (NGS) könnte die Zeit bis zum Erregernachweis in der modernen Sepsisdiagnostik verkürzt werden, was eine schnellere Umstellung auf eine gezielte, erregerspezifische Therapie oder das Absetzen einer Antibiotikabehandlung ermöglichen könnte (Chen et al., 2022). Die Sequenzierung von mcfDNA aus Blut von Neugeborenen ist ein vielversprechender Ansatz, zu dem jedoch bislang nur begrenzt publizierte Daten vorliegen (Agudelo-Pérez et al., 2023; Chen et al., 2022).

Daher war das Ziel dieser prospektiven Machbarkeitsstudie, die diagnostische Leistung der NGS-Methode DISQVER® bei neonatalen Patienten mit Verdacht auf Sepsis im Vergleich zu Blutkulturen zu untersuchen.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Studiendesign und Patienten

Eingeschlossen in diese prospektive, single-center Studie wurden Neugeborene, die in den ersten 28 Lebenstagen auf die neonatologische Intensivstation des Universitätsklinikums Bonn (UKB) aufgenommen wurden und bei denen zwischen dem Alter von 72 Stunden bis 3 Monaten eine diagnostische Abklärung wegen des Verdachts auf eine Late-Onset Sepsis (LOS) durchgeführt wurde. Im Zeitraum von September 2020 bis Juli 2022 wurden 125 Patienten in die Studie eingeschlossen. Die Ethikkommission der Universität Bonn hat die Studie genehmigt (Studienregistrierungsnummer: 114/22).

Vor der Teilnahme an der Studie wurde eine schriftliche Einverständniserklärung der Eltern oder gesetzlichen Vertretern eingeholt.

In dieser Studie wurde Sepsis gemäß den etablierten Kriterien des deutschen neonatologischen Krankenhaus Infektionssurveillance-Systems (NEO-KISS) definiert (Leistner et al., 2013; Kipfmueller et al., 2015). Diese Kriterien umfassen klinische Anzeichen, Blutkulturbefunde sowie Laborparameter (CRP, IL-6, Leukozyten- und Thrombozytenzahl) in Übereinstimmung mit anderen Sepsis-Klassifikationen (Wynn, 2016; Wynn et al., 2014). Anhand der Sepsis Kriterien wurden die Patienten einer von drei Gruppen zugeordnet: 1) Blutkultur-positive Sepsis, 2) Blutkultur-negative Sepsis, 3) Verdacht auf Sepsis. Darüber hinaus wurden gesunde Neugeborene ohne Infektionszeichen in eine Validationsgruppe 4 aufgenommen, um die erforderlichen Qualitätsparameter für die Probenaufbereitung und die Basiswerte für mcfDNA bei Neugeborenen zu bestimmen (Tabelle 1).

Tab. 1: Gruppeneinteilung

Gruppe	Definition
1 Sepsis, Blutkultur positiv	Klinische Zeichen einer Sepsis und positiver Erregernachweis in Blutkultur.
2 Sepsis, Blutkultur negativ	Klinische Zeichen einer Sepsis, negative Blutkultur, Antibiotikatherapie für mindestens 5 Tage.
3 Sepsisverdacht	Verdacht auf Sepsis, negative Blutkulturen, Antibiotikatherapie für weniger als 5 Tage. Absetzen der Antibiotika bei nicht bestätigtem Sepsisverdacht.
4 Validierungsgruppe	Keine Zeichen einer Infektion.

Übernommen aus dem englischsprachigen Original von Balks et al., 2024.

Von den 125 eingeschlossenen Patienten wurden 57 Blutkulturen und 134 Proben für die mcfDNA-Sequenzierung gewonnen. Insgesamt wurden acht Proben von mehrfach getesteten Patienten in die Studie aufgenommen. Sechs Patienten wurden aufgrund eines zweiten Verdachts auf Sepsis zweimal in die Studie aufgenommen, ein Patient aus demselben Grund dreimal berücksichtigt. Unzureichende Mengen an Plasma (n = 7), cfDNA (n = 27), Qualität oder Konzentration der Sequenzierungsbibliotheken (n = 18) oder Alter über 3 Monate führten zum Ausschluss aus der Studie. Es wurden insgesamt 52 NGS-Proben und deren korrespondierende Blutkulturbefunde (n=11) von einer weiteren Untersuchung ausgeschlossen, 35 gehörten zur Validationsgruppe 4, 8 zu Gruppe 2 und 9 zu Gruppe 3 (Abbildung 1).

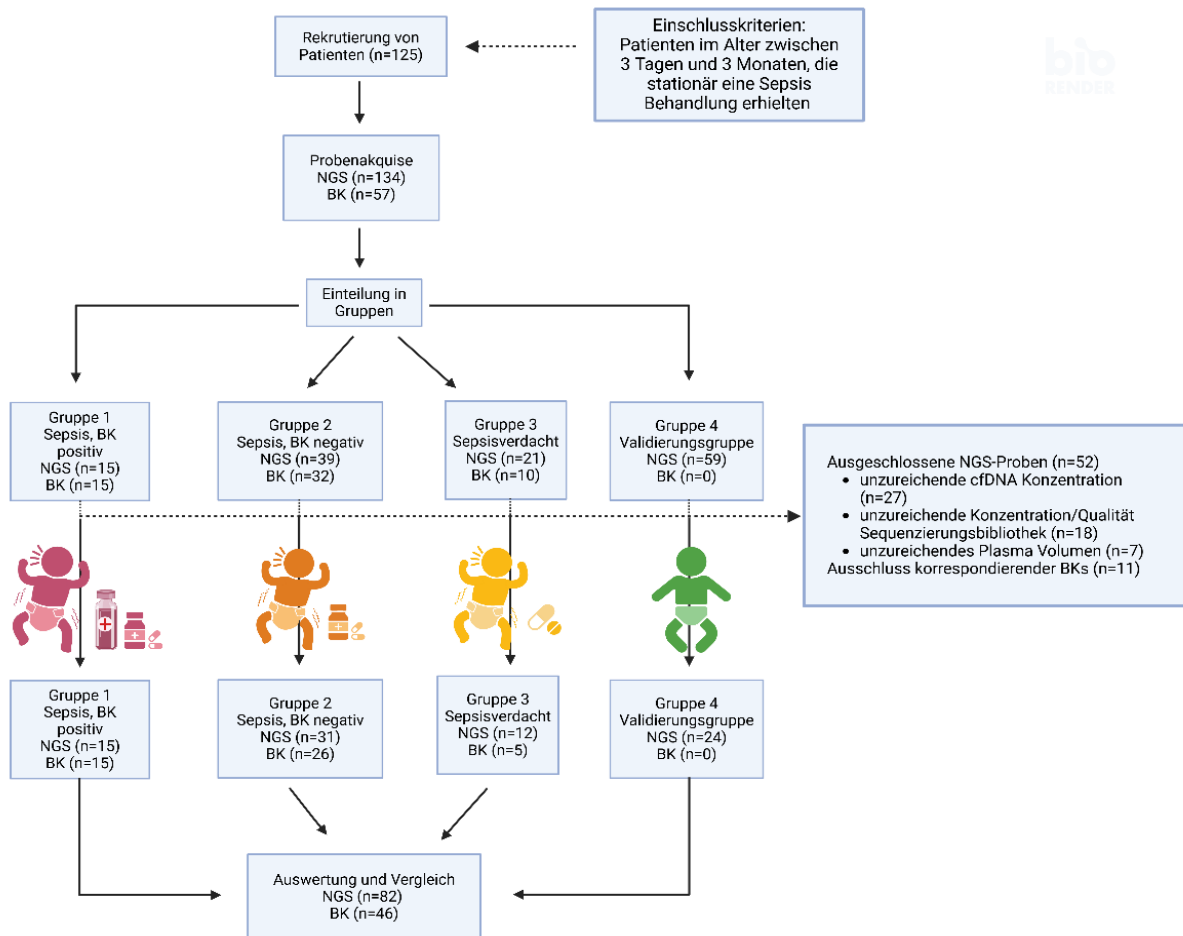


Abb. 1: Flussdiagramm Studienablauf. Übernommen aus dem englischsprachigen Original von Balks et al., 2024.

In der finalen Auswertung wurden 82 NGS-Proben von 74 Patienten (41 männlich, 33 weiblich) mit 46 Blutkulturbefunden verglichen (Tabelle 2 und S2). Bei 5 Patienten aus Gruppe 2 und 7 Patienten aus Gruppe 3 konnte aufgrund unzureichendem klinischen Verdachts, schlechter klinischer Verfassung oder erfolgloser Versuche keine Blutkultur zum Vergleich gewonnen werden. Des Weiteren wurden bei Patienten in der Validierungsgruppe 4 keine Blutkulturen gewonnen. Um die Plausibilität des DISQVER® Tests zu evaluieren, wurden die NGS-Ergebnisse mit Blutkulturbefunden, weiteren mikrobiologischen oder virologischen Befunden, dem klinischen Bild des Patienten und der Einschätzung der behandelnden Ärzte verglichen. Da durch das Fehlen von Blutkulturen viele NGS-Ergebnisse nicht mit Blutkulturen verglichen werden konnten, wurde ein composite reference standard errechnet (Tabelle S4).

Tab. 2: Charakteristika der Studienkohorte und der jeweiligen Gruppen

	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4
Patienten	74	14	25	12	23
Gewonnene NGS-Proben	82	15	31	12	24
NGS positive Proben	24	11	8	3	2
Gewonnene Blutkulturen	46	15	26	5	0
Positive Blutkulturen	15	15	0	0	0
Gestationsalter (Median [IQR] in Wochen)	35,1 [27,0-39,0]	35,0 [26,9-37,9]	32,1 [24,4-36,0]	33,5 [29,6-34,9]	39,56 [38,9-40,0]
Alter bei Probengewinnung (Median [IQR] in Tagen)	6 [3-42]	34 [11-61]	10 [3-62]	5 [3-36]	3 [3-3]
Geburtsgewicht (Median [IQR] in Kilogramm)	2,52 [0,95-3,52]	1,27 [0,79-3,06]	1,37 [0,75-3,28]	1,85 [1,26-2,44]	3,65 [3,45-3,85]
Überlebensrate	82,9 % (68/82)	60,0 % (9/15)	77,4 % (24/31)	91,7 % (11/12)	100 % (24/24)

Die Diskrepanz zwischen der Anzahl an Patienten und Proben (82 Proben von 74 Patienten) wird durch einen erneuten Sepsisverdacht bei Studienpatienten erklärt. So wurden bei 6 Patienten an 2 unterschiedlichen Zeitpunkten Probenabnahmen durchgeführt und bei einem 7. Patient an 3 unterschiedlichen Zeitpunkten Proben gewonnen. Insgesamt wurden so 82 NGS- und 46 BK-Befunde von 74 Patienten gewonnen.

1.2.2 Routine Sepsis Diagnostik und Blutkulturen

Bei Verdacht auf Sepsis wurden routinemäßig Blutproben zur Messung der Entzündungsparameter CRP und IL-6, ein vollständiges Blutbild, sowie steril Blutkulturen (BD BACTEC™ Peds Plus™, mit einem Inokulationsvolumen von 0,5 ml bei Frühgeborenen und 1 ml bei reifen Neugeborenen) gewonnen. Für die Validierungsgruppe wurden Blutproben zur gleichen Zeit wie das Neugeborenen-Screening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen abgenommen, jedoch keine Blutkulturen. Die Blutkulturen wurden zur weiteren Bearbeitung an das Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) übermittelt. Die Blutkulturen wurden gemäß dem Standardprotokoll bis zu maximal 5 Tage (120 Stunden) bebrütet (BD Bactec FX, Becton Dickinson and Company). Bei kulturellem Wachstum erfolgte die Identifizierung der Mikroorganismen mittels MALDI-TOF MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Massenspektrometrie, bioMérieux VITEK® MS). In allen Fällen wurden verabreichte Antibiotikatherapien dokumentiert. In allen Fällen, in denen eine antibiotische Behandlung bereits vor der Probenentnahme stattfand, wurde deren möglicher Einfluss auf die Detektionsrate von Blutkulturen und NGS bewertet. Bei positiven Blutkulturen erfolgten Empfindlichkeitstestungen über den VITEK® 2 XL (bioMérieux), um die Wirksamkeit der empirischen Antibiotikatherapien zu beurteilen.

Um zwischen einer Infektion und einer Kontamination der Blutkulturen zu unterscheiden wurde der klinische Zustand, Diagnosen der Patienten und das Wachstum desselben Erregers in weiteren mikrobiologischen Proben bewertet. Berücksichtigt wurden Erregerbefunde aus weiteren Blutkulturen, Trachealsekreten, Spitzen von zentralvenösen Kathetern (ZVK) oder Screening Abstrichen, die innerhalb von 2 Wochen vor oder nach BK- und NGS-Abnahme gewonnen wurden. Es wurde dokumentiert, ob Fremdkörper wie ZVKs oder Drainagen vorlagen, bei Verdacht auf katheterassoziierte Blutstrominfektionen (CRBSI) wurde des Weiteren die Zeit bis zur Positivität der Blutkulturen nachgehalten. Die Diagnostik zum Nachweis viraler Erreger wurde am Institut für Virologie des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

1.2.3 Next-Generation Sequenzierung

Blutproben für die Next-Generation Sequenzierung (NGS) von mcfDNA wurden zur gleichen Zeit und am gleichen Abnahmeort wie die routinemäßig gewonnenen Blutproben zur Sepsisdiagnostik entnommen. Das Probenvolumen für NGS betrug 0,5 ml EDTA-Plasma (Sarstedt K3 EDTA). Die Proben wurden für 10 Minuten bei 3000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die Sequenzierung zu Noscendos Labor nach Reutlingen verschickt. Dort erfolgte nach Isolation und Konzentration der DNA die Erstellung von Sequenzierungsbibliotheken. Nach anschließenden Qualitätskontrollen erfolgte die Sequenzierung via NextSeq550 (Illumina). Im Anschluss wurden die Sequenzierungsergebnisse mittels bioinformatischer Analyse mit der für neonatale Proben angepassten Plattform DISQVER® ausgewertet.

Alle Ergebnisse der DISQVER®-Analyse wurden mit den korrespondierenden Blutkulturbefunden verglichen. Dabei wurde bewertet, ob die Ergebnisse übereinstimmend waren (d.h., derselbe Erreger im NGS als auch der Blutkultur nachgewiesen wurde), oder nicht übereinstimmend waren (d.h., der Erreger nur durch eine der beiden Modalitäten nachgewiesen wurde oder unterschiedliche Erreger nachgewiesen wurden). Alle Proben wurden einer Plausibilitätsprüfung unterzogen, in der die Grunderkrankung des Patienten, der klinische Verlauf sowie Ergebnisse anderer mikrobiologischer und virologischer Tests wie Analabstriche, Nasenrachenabstriche, Trachealsekrete usw. berücksichtigt wurden.

1.3 Ergebnisse

Das Gestationsalter unserer Kohorte betrug im Median 35,1 Wochen (IQR 27,0-39,0) und 25 von 74 Patienten wurden vor der 30. Schwangerschaftswoche geboren (Tabelle 2 und S2). Die Probenentnahme wurde im Median am 6. Lebenstag durchgeführt (IQR 3-42). Abgesehen von Frühgeburtlichkeit waren die häufigsten zugrunde liegenden Erkrankungen gastrointestinalen Ursprungs (Nekrotisierende Enterokolitis, Darm- oder Kolonperforation, Mekoniumileus, Ösophagusatresie, Morbus Hirschsprung). Danach folgten Fehlbildungen oder Erkrankungen des Herzens und der Lunge (kongenitale Zwerchfellhernie, hypoplastisches Linksherzsyndrom, Fallot-Tetralogie, persistierender Ductus arteriosus, Ventrikelseptumdefekt, kongenitaler Chylothorax, Pneumothorax und Pneumonie (Tabelle S2)).

1.3.1 Blutkultur Ergebnisse

Insgesamt wurden in 46 von 82 Fällen Blutkulturen gewonnen. Davon waren 15 positiv (32,6 %) und 31 blieben negativ (67,4 %). Eine Blutkultur zeigte das Wachstum von mehreren Erregern, während in 14 von 15 Blutkulturen nur ein Erreger nachweisbar war. In den korrespondierenden Plasma Proben konnte DISQVER® in 5 von 15 mcfDNA desselben Bakteriums nachweisen. In 4 von 15 Proben wurde mcfDNA mehrerer Bakterien festgestellt, darunter auch die Bakterien, die in den Blutkulturen gewachsen waren (Tabelle 3). In 6 Fällen wurde entweder ein anderes Bakterium als in den Kulturen nachgewiesen (2/6) oder DISQVER® konnte keine bakterielle mcfDNA nachweisen (4/6 falsch negativ). Bei einem Patienten mit Verdacht auf eine katheterassoziierte Infektion, bei dem in einem Intervall von 14 Tagen 2 Blutkulturen abgenommen wurden, wuchs jeweils *Staphylococcus epidermidis*. In beiden Fällen waren die DISQVER®-Ergebnisse negativ. In 2 weiteren Proben konnte kulturell *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen werden, die DISQVER®-Ergebnisse verblieben auch hier negativ. In den Kulturen mit divergierenden NGS-Ergebnissen konnte kulturell *Acinetobacter ursingii* nachgewiesen werden, während DISQVER® Reads von Cytomegalovirus (CMV) detektierte, bei der zweiten divergierenden Probe wurden kulturell mehrere Bakterien nachgewiesen (*Enterobacter cloacae* Komplex, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus capitis*), hier detektierte DISQVER® die mcfDNA von *Corynebacterium otitidis*, *Alloiococcus otitidis*, *Raoultella planticola* und *Corynebacterium afermentans*. Sämtliche Blutkultur-Ergebnisse wurden als „true positive“ bewertet. Das Wachstum von *Staphylococcus epidermidis* wurde ebenfalls als positiv und nicht als Kontamination gewertet, da der Patient das passende Bild einer katheterassoziierten Infektion hatte und die Blutkulturen nur eine kurze Bebrütungsdauer von 17 h und 37 h bis zur Positivität benötigten. Sofern genug Restmaterial für eine Wiederholung der Sequenzierung vorlag, wurden die Untersuchungen bei den diskrepanten Ergebnissen wiederholt. Bei den 2 falsch negativen DISQVER®-Ergebnissen, in deren korrespondierenden Blutkulturen *Staphylococcus epidermidis* anzüchtbar war, war nicht genug Restmaterial vorhanden. Untersuchungen der anderen 4 Proben bestätigten den initialen DISQVER®-Befund.

Feine genotypische Unterschiede innerhalb eines bakteriellen Genoms können durch molekulare Nachweisverfahren wie Sequenzierungen nachgewiesen werden, sodass häufiger eine Differenzierung bis auf das Spezies-Level möglich ist. Die Identifizierung kulturell nachgewiesener Keime via MALDI-TOF MS ist weniger häufig so genau, sodass beispielsweise bei Nachweis von *Enterobacter cloacae* häufig nur der übergeordnete Komplex (ECLCO) angegeben werden kann. Dies gilt es bei der Interpretation der identifizierten Erreger zu beachten, hat jedoch keine klinische oder therapeutische Bedeutung.

Für die 46 Fälle in denen Ergebnisse von Blutkulturen und DISQVER® vorlagen wurde vergleichend die Sensitivität und Spezifität für DISQVER® errechnet (Sensitivität 73,33 %, Spezifität 74,19 %; Tabelle S3 Anhang).

1.3.2 Auswertung der NGS-Ergebnisse

Es wurden insgesamt 82 NGS-Untersuchungen durchgeführt. Von diesen zeigte DISQVER® bei 58 Fällen (70,7 %) ein negatives und in 24 Fällen (29,3 %) ein positives Ergebnis. Die Ergebnisse der Blutkulturen und DISQVER® waren in 9 von 15 Fällen (60 %) übereinstimmend, d.h. kulturell und in der Sequenzierung wurden die gleichen Erreger identifiziert (Tabelle 3). In 75 von 82 Fällen (91,46 %) wurden die DISQVER®-Ergebnisse als plausibel bewertet. Von insgesamt 7 Fällen mit zweifelhaftem DISQVER®-Ergebnissen wurden 4 als falsch negativ bewertet. In diesen Patienten waren in den Blutkulturen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* und *Staphylococcus epidermidis* gewachsen, bei klinischen und laborchemischen Zeichen einer Sepsis. In den übrigen 3 unklaren Fällen wurde bei einem Patienten, bei dem kein klinischer Verdacht auf eine Aspergillose bestand, *Aspergillus niger* mcfDNA nachgewiesen. Zusätzlich wurden *Kytococcus sedentarius* und *Gardnerella vaginalis* als eher unwahrscheinliche Sepsis-Erreger nachgewiesen (Tabelle 4). Das positive percent agreement zwischen DISQVER® und dem composite reference standard wurde als 82,61 % berechnet, das negative percent agreement betrug 91,43 % (Tabelle S4).

1.3.3 Mit NGS identifizierte Spezies

DISQVER® wies in den 24 positiven Fällen mcfDNA von 29 verschiedenen Bakterien, zwei verschiedenen Viren und zwei verschiedenen Pilzen nach (Abbildung 2). Es war nicht in allen Fällen möglich die Bakterien anhand der mcfDNA bis auf das Spezies Level zu identifizieren, in diesen Fällen wurden die Reads für eine übergeordnete Gruppe oder das Genus der Bakterien angegeben (Beispiele sind *Enterobacter cloacae* Komplex oder *Citrobacter species*). Bei 11 von 24 positiven Proben (45,8 %) konnte DISQVER® mcfDNA von mehr als einem Erreger nachweisen, während kulturell außer bei 1 von 15 Proben (6,7 %) nur ein Erreger nachgewiesen werden konnte. Der Nachweis von mcfDNA multipler Erreger war mit einem gastrointestinalen Infektionsherd (6/11) und Frühgeburtlichkeit assoziiert (10/11). Im Gegensatz dazu war der Nachweis von cfDNA nur eines einzelnen Bakteriums oder Pilzes (9/24) weniger häufig mit Frühgeburtlichkeit assoziiert (2/9). Patientencharakteristika, NGS-Ergebnisse und Anzahl der detektierten Reads sind im Anhang einzusehen (Tabelle S1).

Virale cfDNA wurde in 4 von 24 DISQVER®-positiven Proben nachgewiesen. In 3 Proben wurde CMV und in einer Probe das humane Betaherpesvirus 6B (HHV-6B) detektiert. In keiner dieser 4 Proben wurde mcfDNA von Pilzen oder Bakterien nachgewiesen. Während des Krankenhausaufenthaltes wurden bei 15 Patienten Testungen auf virale Erreger durchgeführt. Von diesen fielen 14 negativ aus, während ein Patient einen CMV-Nachweis im Urin, Trachealsekret, sowie in der NGS zeigte. Bei fehlendem klinischen Verdacht einer viralen Infektion wurde bei den verbleibenden 3 Patienten mit positivem Virusnachweis im NGS keine virologische Diagnostik durchgeführt.

DISQVER® detektierte cfDNA von 2 verschiedenen Pilzen in 2 Proben. In diesen beiden Proben konnte cfDNA von *Aspergillus niger* und *Candida albicans* nachgewiesen werden, jedoch keine cfDNA von Bakterien oder Viren.

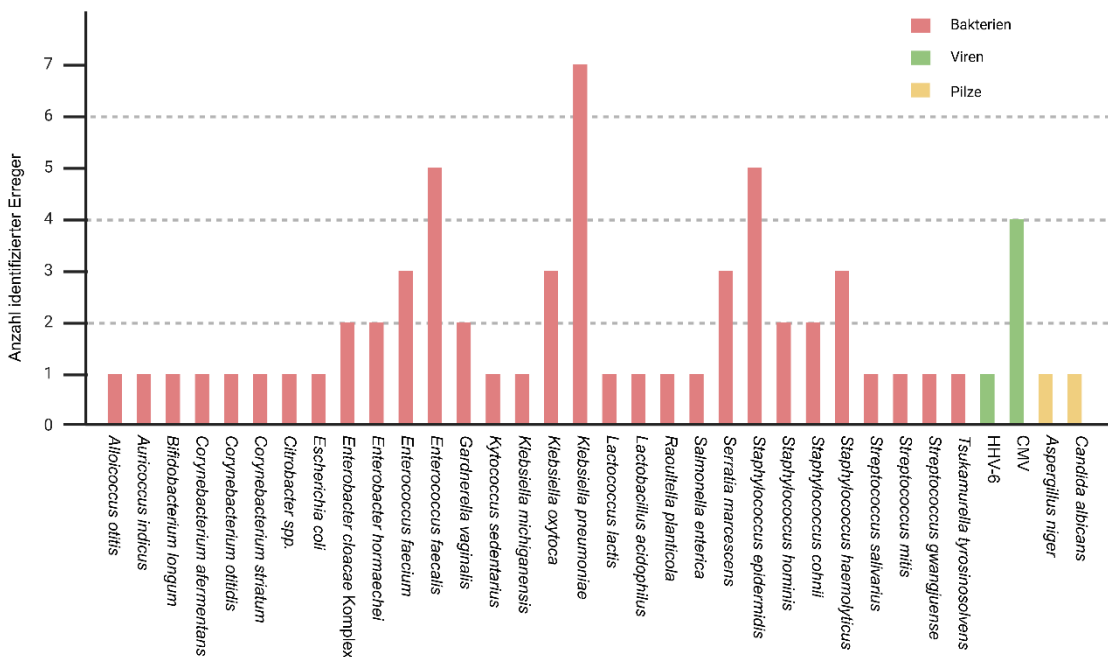


Abb. 2: Durch DISQVER® detektierte Mikroorganismen. Übernommen aus dem englischsprachigen Original von Balks et al., 2024.

1.3.4 NGS-positive und Blutkultur-negative Fälle

Durch DISQVER® wurde in 7 Fällen mcfDNA von Bakterien nachgewiesen, die potentiell in Kultur hätten wachsen können, in denen die Blutkulturen jedoch negativ blieben. Mit Antibiotika anbehandelt wurde vor Probengenentnahme nur einer dieser 7 Patienten. DISQVER® detektierte in 3 Fällen mcfDNA von Erregern, die nicht im Rahmen der routinemäßigen mikrobiologischen Untersuchung identifiziert wurden und nicht durch den klinischen Verlauf der Patienten zu erklären waren (*Kytococcus sedentarius*, *Gardnerella vaginalis*, *Aspergillus niger*). In 4 von 7 Proben konnte eine hohe Anzahl Reads an mcfDNA bakterieller Erreger nachgewiesen werden, die mit der klinischen Diagnose der Patienten übereinstimmten und ebenfalls in anderen mikrobiologischen Tests nachgewiesen wurden (Tabelle 4).

1.3.5 Einfluss von Antibiotika auf Detektionsrate

Der Einfluss von Antibiotika auf die Detektionsrate in Blutkulturen und NGS wurde in Gruppen 1, 2 und 3 untersucht (58 Fälle), da die Validierungsgruppe keine Infektion hatte und keine Blutkulturen gewonnen wurden. In 16 von 58 der Sepsis-Verdachtsmomente (27,6 %) hatten die Patienten vor Probenentnahme eine Antibiotikatherapie (5 in Gruppe 1, 9 in Gruppe 2 und 2 in Gruppe 3, Tabelle S2). In allen 11 Proben von Gruppe 2 und 3 konnte weder kulturelles Wachstum noch mcfDNA nachgewiesen werden. In den Blutkulturen von 5 der 16 Patienten (Gruppe 1) wuchsen trotz vorheriger Antibiotikabehandlung Bakterien in den Blutkulturen (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter ursingii* und *Staphylococcus epidermidis*). In 3 dieser 5 Fälle wuchsen Bakterien, die resistent gegen die verordnete empirische Antibiotikatherapie waren. In 2 der 3 resistenten Bakterien ließ sich die Resistenz auf einen erwartet inherent-resistenten Phänotyp zurückführen. Aus Proben von 5 der 16 mit Antibiotika anbehandelten Patienten ließ sich mcfDNA verschiedener Erreger nachweisen, darunter *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Gardnerella vaginalis* und CMV. Die DISQVER®-Ergebnisse waren in 3 von 5 Fällen mit den Blutkulturergebnissen übereinstimmend (Tabelle 3). Die Entnahme von Blutkulturen und Probenmaterial für NGS erfolgte in 42 der 58 Sepsis-Verdachtsmomente (72,4 %) vor dem Beginn einer empirischen Antibiotikatherapie. Blutkulturen hatten in diesen Fällen eine Nachweisrate von 23,8 % (10/42) und NGS eine Nachweisrate 38,1 % (16/42).

Tab. 3: Blutkulturbefunde und DISQVER®-Ergebnisse im Vergleich

Proben-nummer	Antibiotika vor Probenentnahme	Blutkulturbefunde	Plausibilität	Resistenz gegen empirische Therapie nach Probenentnahme	DISQVER®-Ergebnisse	Bewertung der NGS-Ergebnisse	Übereinstimmung von BK und NGS
2	Nein	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Positiv	Ja
3 ^d	Nein	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	Negativ	Falsch negativ	Nein
4 ^d	Ja Van + Pip/Taz	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^a	Ja	Nein Van + Mero	Negativ	Falsch negativ	Nein
16	Nein	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex	Ja	Nein Van + Pip/Taz	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positiv	Ja
57	Nein	<i>Candida albicans</i>	Ja	Ja ^c Van + Mero	<i>Candida albicans</i>	Positiv	Ja
89	Nein	<i>Enterobacter cloacae</i> Komplex, <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	<i>Corynebacterium otitidis</i> , <i>Alloiococcus otitis</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Corynebacterium afermentans</i>	Unterschiedliche Ergebnisse	Nein
104	Ja Van + Pip/Taz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^a	Ja	Nein Van + Pip/Taz + Fluco	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Positiv	Ja
106	Nein	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Ja	Nein Van + Mero	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus gwangjuense</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	Positiv	Ja
107	Nein	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Ja	Nein Van + Mero	<i>Enterobacter</i> spp.	Positiv	Ja
112	Nein	<i>Serratia marcescens</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Positiv	Ja
114	Nein	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	Negativ	Falsch negativ	Nein

Proben-nummer	Antibiotika vor Probenentnahme	Blutkulturbefunde	Plausibilität	Resistenz gegen empirische Therapie nach Probenentnahme	DISQVER®-Ergebnisse	Bewertung der NGS-Ergebnisse	Übereinstimmung von BK und NGS
116	Ja Amp/Sul + Tobra	<i>Serratia marcescens</i> ^b	Ja	Ja Amp/Sul + Tobra	<i>Serratia marcescens</i>	true positive	Ja
121	Ja Van + Pip/Taz	<i>Acinetobacter ursingii</i> ^b	Ja	Ja Van + Pip/Taz	<i>Humanes Cytomegalovirus</i>	Unterschiedliche Ergebnisse	Nein
125	Nein	<i>Escherichia coli</i>	Ja	Nein Van + Pip/Taz	Negativ	Falsch negativ	Nein
134	Yes Amp/Sul	<i>Escherichia coli</i>	Ja	Ja Amp/Sul	<i>Escherichia coli</i>	Positiv	Ja
5/15		Bakterien 14/15 Pilze 1/15	Plausibel 15/15	Resistenz 4/15	NGS positiv 11/15 NGS negativ 4/15	Positiv 9/15 Falsch negativ 4/15 Unterschied 2/15	Übereinstimmung 9/15
Die Ergebnisse von Blutkultur und DISQVER® stimmten in 9 von 15 Fällen überein. Von 15 mit DISQVER® erzielten Ergebnissen, wurden 4 als falsch negativ gewertet und 2 zeigte keine Übereinstimmung mit den Blutkulturbefunden. Eine Antibiotikatherapie vor Probenentnahme wurde in 5 von 15 Fällen dokumentiert. Trotz der Empfindlichkeit der Bakterien gegen die gewählte Therapie, zeigten 2 von 5 Blutkulturen Wachstum ^a . Bei 3 dieser 5 Fälle wuchsen Bakterien, die resistent gegen die empirische Therapie waren, wobei dies in 2 von 3 Fällen auf eine natürliche Resistenz des Erregers ^b bzw. das Fehlen eines Antimykotikums in der empirischen Therapie ^c zurückgeführt werden konnte. Alle Blutkulturbefunde wurden durch Mikrobiologen und Neonatologen mit Erfahrung in Infektiologie anhand Klinik und Grunderkrankung des Patienten, sowie mikrobiologischer Routine Diagnostik, als plausibel bewertet. Proben 3 und 4 wurden bei einem Patienten innerhalb eines Intervalls von 2 Wochen gewonnen ^d .							

In 7 Proben konnte durch DISQVER® mcfDNA von Bakterien nachgewiesen werden, während in den korrespondierenden Blutkulturen kein Keimnachweis gelang. In Zusammenschau mit klinischen, laborchemischen und weiteren mikrobiologischen Befunden wurden 4 dieser 7 NGS-Ergebnisse als plausibel gewertet. Als unplausibel wurden 3 NGS-Ergebnisse gewertet, die weder durch den klinischen Verlauf des Patienten erklärt werden konnten oder in weiteren mikrobiologischen Proben gefunden wurden. Zur Beurteilung der Wirksamkeit der empirischen Antibiotikatherapie wurden bei den Bakterien eine Wildtyp Empfindlichkeit vorausgesetzt, da die Identifizierung eines Erregers via NGS keine Informationen über Antibiotikaempfindlichkeiten liefert. Der Begriff Flora beschreibt hier Bakterien, die eine Körperregion bevorzugt besiedeln (z.B. ein Hautabstrich mit Nachweis von *Staphylococcus epidermidis*).

1.4 Diskussion

In den letzten Jahren hat die Analyse von zellfreier DNA zunehmend Anwendung in Bereichen von personalisierter Medizin, Hämato-Onkologie, Pränataldiagnostik oder der Identifikation von pathogenen Keimen gefunden (Guy et al., 2019; Han et al., 2020; Pietrzak et al., 2023; Wu et al., 2020; Zhu et al., 2023). Der letzte Punkt und der Umstand, dass möglicherweise per Sequenzierung die Detektionsrate von anspruchsvollen Erregern, strikt anaeroben oder intrazellulären Erregern erhöht werden könnte, war der Ursprung für diese Arbeit (Han et al., 2020; He et al., 2022).

Klassische pädiatrische Blutkulturmedien, welche in unserer Klinik und dieser Studie, verwendet wurden enthalten ein aerobes Milieu zur Anzucht von Bakterien. Da die meisten bakteriellen Infektionen bei pädiatrischen Patienten durch aerobe oder fakultativ anaerobe Bakterien verursacht werden, aerobe Medien auch das Wachstum von Hefepilzen ermöglichen und das nötige Blutvolumen zum Beimpfen von Blutkulturen gerade bei neonatologischen Patienten eine größere Rolle spielt als bei Erwachsenen, wird in der Pädiatrie die Verwendung von aeroben Blutkulturmedien empfohlen. Die Verwendung aerober Medien reduziert jedoch die Nachweiswahrscheinlichkeit strikt anaerober Bakterien und verlängert die Zeit, die benötigt wird um fakultativ anaerobe Bakterien anzuzüchten. Da bei neonatologischen Patienten, sowie auch in unserer Kohorte, häufig gastrointestinale Erkrankungen Ursprung von Infektionen sind und strikt anaerobe oder fakultativ anaerobe Bakterien hier häufig eine Rolle spielen (Marcus et al., 2016; Zaidi et al., 1995) sollte untersucht werden, ob die Sequenzierung von Patientenblut einen Detektionsvorteil gegenüber Blutkulturen bietet. Infektionen gastrointestinalen Ursprungs sind nicht nur häufiger mit dem Nachweis von strikt anaeroben bzw. fakultativ anaeroben Bakterien, sondern auch mit dem Nachweis mehrerer Erreger assoziiert (polymikrobielle Infektionen) (Fukushima et al., 2022). In dieser Studie wurde durch DISQVER® insbesondere bei Frühgeborenen und Patienten mit intraabdominellen Infektionsfoci mcfDNA mehrerer Bakterien nachgewiesen. Ob es sich bei diesen Nachweisen um echte polymikrobielle Infektionen oder transiente Bakteriämien aufgrund unreifer Schleimhautbarrieren bei Frühgeburtlichkeit handelt, bleibt unklar.

Die Sensitivität bei der Diagnose einer Sepsis oder Blutstrominfektion kann durch den Einsatz von NGS erhöht werden, da diese Methode auch nach Beginn einer Antibiotikabehandlung angewendet werden kann, während Blutkulturen in solchen Fällen möglicherweise nur begrenzt Ergebnisse liefern (Han et al., 2020; Wang et al., 2021). In unserer Studie beobachteten wir jedoch keine erhöhte Nachweisrate von

Krankheitserregern durch NGS im Vergleich zu Blutkulturen bei Patienten, die vor Probenentnahme Antibiotika erhalten hatten. Frühere Studien haben eine relativ kurze Halbwertszeit cfDNA von 16 Minuten bis 2 Stunden beschrieben (Han und Lo, 2021; Solanky et al., 2022). Diese kurze Halbwertszeit oder das Fehlen eines metastasierenden Infektionsherds mit kontinuierlicher Freisetzung von mcfDNA könnte erklären, warum wir bei diesen mit Antibiotika anbehandelten Patienten keine erhöhte Erkennungsrate durch NGS im Vergleich zu Blutkulturen beobachtet haben (Eichenberger et al., 2022).

Ob die via NGS identifizierten Erreger von akut klinischer Relevanz oder auf Kontaminationen bei Abnahme oder der Laborprozesse zurückzuführen sind bzw. der Nachweis aufgrund einer transienten Bakteriämie bei unreifen Schleimhautbarrieren zurückzuführen ist, stellt eine zentrale Herausforderung an Ärztinnen und Ärzte, die diese Ergebnisse interpretieren müssen (Pietrzak et al., 2023). Bei einem Patienten wurde in der Sequenzierung cfDNA von *Aspergillus niger* detektiert, da dieser Patient keinen Verdacht oder klinische Zeichen einer Aspergillose hatte, wurde dieser Nachweis beispielsweise als Kontamination bewertet. Um das Risiko von Kontaminationen der entnommenen Proben in Zukunft zu reduzieren, empfehlen wir die Verwendung von Probenröhrchen mit Stabilisierungsmedien, die Erreger inaktivieren, aber Nukleinsäuren für die NGS konservieren. Zudem ist es entscheidend zu beurteilen, ob nachgewiesene mcfDNA eine aktive Infektion oder lediglich Reste von Erregern darstellt, welche zuvor vom Immunsystem beseitigt wurden. Dies ist insbesondere bei neonatologischen Patienten mit unreifen oder beeinträchtigten Schleimhautbarrieren von Relevanz. Dieses Problem sollte in weiteren Studien untersucht werden, wenn NGS zur Sepsis Diagnostik bei Früh- und Neugeborenen Verwendung finden soll. Durch Sequenzierungen kann mcfDNA von kulturell schwer anzüchtbaren, anspruchsvollen Bakterien nachgewiesen werden. Ebenso kann jedoch der Nachweis von Bakterien gelingen, die als selten pathogen bzw. traditionell als Teil der Flora gewertet wurden und in der Sepsisdiagnostik vermutlich für Kliniker und Patienten keine Rolle spielen. Ein Beispiel aus dieser Studie ist der Nachweis von mcfDNA von *Corynebacterium otitidis*, *Alloiococcus otitidis*, *Raoultella planticola* und *Corynebacterium afermentans*, während kulturell *Enterobacter cloacae* Komplex, *Staphylococcus epidermidis* und *Staphylococcus capitis*

nachgewiesen wurden. Diese NGS-Ergebnisse wurden als unplausibel bewertet, da sie vermutlich die Detektion von Flora und nicht von Sepsiserregern widerspiegeln (Patient 89, Tabelle 3). Eine potentielle Überbehandlung von in der Sequenzierung nachgewiesener Flora stellt ein Risiko für Patienten dar. Daher wird empfohlen, die Erregernachweise der NGS mit Mikrobiologen oder Infektiologen zu besprechen und den klinischen Kontext sowie andere mikrobiologische oder virologische Befunde in die Behandlungsentscheidung mit einfließen zu lassen.

Die Tatsache, dass durch DISQVER® derzeit keine Informationen zur antimikrobiellen Empfindlichkeit der Erreger geliefert werden kann, stellt eine der Haupteinschränkungen dieser Modalität im Vergleich zu kulturellen Verfahren dar. In Zukunft könnte es jedoch möglich sein, nicht nur Erreger anhand ihrer cfDNA zu identifizieren, sondern auch DNA-Fragmente nachzuweisen, die Gene enthalten, die eine Resistenz gegen bestimmte Antibiotika vermitteln (Resistenzgene), sowie spezifische mcfDNA Muster zu erkennen, die mit bereits bekannten Mustern an Antibiotikaresistenzen in Zusammenhang stehen (Grumaz et al., 2016). Jedoch ist es nicht einfach phänotypische Resistenzen aus dem Genotyp eines Erregers vorherzusagen, da sie selten an ein einzelnes Gen geknüpft sind oder die in einem Resistenzgen enthaltene Information nicht immer phänotypisch exprimiert wird (stille Mutation) (Alonso et al., 2011; Jeukens et al., 2019; Mahfouz et al., 2020). Weitere Studien sind notwendig um zu klären, ob die Sequenzierung von mcfDNA Antibiotikaresistenzen adäquat vorhersagen kann, entweder durch den Nachweis von Resistenzgenen oder durch die Zuordnung von Genotyp zu Phänotyp (genotype-phenotype matching), und wie sich dies auf Therapieentscheidungen der behandelnden Ärztinnen und Ärzte auswirken wird.

Dies sollte jedoch die potenziellen klinischen Auswirkungen, wie eine Anpassung oder Intensivierung einer Antibiotikabehandlung, nicht schmälern, die bereits durch die alleinige Erregeridentifizierung, auch ohne Resistenzbefunde, entstehen können. Ein gutes Beispiel aus dieser Studie ist der Nachweis von *Candida albicans*, da empirische Antibiotikaregime in der Regel keine Antimykotika enthalten (Patient 57, Tabelle 3 oder S1). Ein weiteres Beispiel aus dieser Studie ist der Nachweis von *Serratia marcescens* in einem Frühgeborenen, welches bei Verdacht auf eine Neugeboreneninfektion zunächst leitliniengerecht mit Ampicillin/Sulbactam und einem Aminoglykosid, in unserer Einrichtung Tobramycin, behandelt wurde (Patient 116, Tabelle 3 oder S1) (AWMF, 2021). Aktuelle Empfehlungen des European Committee on

Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) raten bei schweren Infektionen wie Septitiden von einer Monotherapie mit Aminoglykosiden ab (EUCAST, 2021; EUCAST 2020). Angesichts der natürlichen Resistenz von *Serratia marcescens* gegen Ampicillin/Sulbactam (EUCAST 2023) würde die Anwendung dieses empirischen Regimes im Wesentlichen zu einer Monotherapie führen. Zudem sind bei Stämmen von *Serratia marcescens* zunehmend Resistenzen gegen Aminoglykoside zu beobachten (Tavares-Carreón et al., 2023). Da es sich bei dieser Studie primär um eine Machbarkeitsstudie handelte, wurden die NGS-Ergebnisse nicht in Echtzeit an die Kliniker zurückgemeldet und hatten somit keinen Einfluss auf die Entscheidungen der behandelnden Ärzte. Retrospektiv wurden klinisches Bild der Patienten, Befunde von NGS und mikrobiologischer Diagnostik (Blutkultur, Screening Abstriche etc.), sowie Antibiotikatherapie durch Mikrobiologen und Infektiologen analysiert. Nach retrospektiver Analyse hätte der Nachweis von *Serratia marcescens* durch DISQVER® zu einer Therapieänderung geführt.

Unter allen Fällen mit negativen Blutkulturen (Gruppe 2 und 3) hatten in dieser Studie 7 ein positives NGS-Ergebnis. Von diesen 7 Fällen konnten bei 4 signifikante Mengen an mcfDNA von Bakterien detektiert werden, welche auch in weiteren mikrobiologischen Proben gefunden wurden und mit der Diagnose der Patienten übereinstimmten (Tabelle 4). Dies deutet darauf hin, dass NGS möglicherweise Infektionen erkannt hat, die durch die Kulturen übersehen wurden. Keiner dieser 4 Patienten hatte zum Zeitpunkt der Probenentnahme eine Antibiotikatherapie. Die retrospektive Analyse der Antibiotikatherapien dieser 7 Patienten ergab, dass die Erreger in 6 von 7 Fällen sensibel auf die empirische Antibiotikatherapie waren. Somit hätte sich aus dem NGS-Befund keine Änderung der Therapie ergeben. Der noch offene siebte Fall, bei dem die Therapie möglicherweise unzureichend gewesen wäre, wurde als Kontamination gewertet (*Aspergillus niger*).

Es wurden ferner 4 Fälle dokumentiert, in denen die Blutkulturen positiv waren, während die NGS-Ergebnisse negativ ausfielen. In 2 dieser Fälle konnten kulturell *Klebsiella pneumoniae* und *Escherichia coli* nachgewiesen werden. Die 2 weiteren Proben wurden bei dem gleichen Patienten in einem Intervall von 14 Tagen gewonnen. Kulturell konnte in beiden Fällen *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen werden. Die Sequenzierung konnte keine Reads dieses Erregers nachweisen. Da *Staphylococcus epidermidis* ein häufiger Kontaminant von Blutkulturen ist, bei dem Patienten jedoch der Verdacht auf eine katheterassoziierte Blutstrominfektion bestand, wurde die Zeit bis zur Positivität der Blutkulturen evaluiert. Da in den Blutkulturen bereits nach relativ kurzer Zeit (17 h bzw.

37 h) Wachstum detektiert wurde und der klinische Verdacht auf eine Katheterinfektion bestand, wurde dieser Befund eher als Hinweis auf eine echte Bakteriämie und nicht als Kontamination gewertet (Proben 3 und 4, Tabelle S2) (Doern et al., 2020). Diese 4 negativen DISQVER®-Ergebnisse wurden als falsch-negativ gewertet.

Obwohl es nicht das Ziel unserer Studie war, zu überprüfen ob DISQVER® auch effektiv virale cfDNA nachweisen kann, haben wir eine weitere potentielle Anwendung der NGS entdeckt: die Diagnose von Infektionen, die durch DNA-Viren (wie CMV) verursacht werden. Dieses Thema bedarf einer vertieften Untersuchung in zukünftigen Forschungsprojekten.

Einige Limitationen im Design dieser Studie müssen anerkannt werden. Die Studienpopulation war hinsichtlich der Grunderkrankungen, des Gestationsalters und des Geburtsgewichts sehr heterogen. Die Kohorte umfasste sowohl reife als auch frühgeborene Neugeborene, darunter solche mit angeborenen Fehlbildungen wie Zwerchfellhernien, Herzfehlern oder gastrointestinalen Fehlbildungen, sowie Patienten, die operativ behandelt wurden, und solche, die keine Operation benötigten. Die Gruppenzuordnung könnte aufgrund der relativ unspezifischen Symptomatik, die mit einer Blutstrominfektion oder Sepsis einhergehen und der variablen Definition einer Late-onset Sepsis beeinträchtigt sein. Hier sind insbesondere 8 von 26 Patienten aus Gruppe 3 hervorzuheben, die zwar erhöhte Infektparameter und klinische Zeichen einer Sepsis zeigten, jedoch nur eine 5-tägige Therapie erhielten und überlebten. Dies mag darauf hindeuten, dass der initiale Verdacht auf eine Sepsis falsch war. Des Weiteren wurden aufgrund ethischer Bedenken bei Patienten in der Validierungsgruppe 4 keine Blutkulturen entnommen. Um Blutkulturen und NGS zu vergleichen, wäre auch bei den Patienten der Validierungsgruppe eine Blutkulturentnahme wünschenswert gewesen, da uns so Informationen über den Einfluss möglicher Blutkulturkontaminationen in dieser Gruppe fehlen, während die DISQVER®-Ergebnisse in Gruppe 4 bei 22 von 24 Fällen negativ blieben. Bei Erwachsenen konnte gezeigt werden, dass DISQVER® zwischen niedrigen mcfDNA-Spiegeln und klinisch signifikanten mcfDNA-Mengen, die auf eine Infektion hindeuten, unterscheiden kann. Um festzustellen, ob der DISQVER®-Algorithmus weiter angepasst werden muss, um niedrigere mcfDNA-Schwellenwerte bei Neugeborenen zu berücksichtigen, oder ob eine größere Menge an Plasma erforderlich ist, um die hohe Anzahl an Proben (52 von 134) die nicht verarbeitet werden konnten, zu reduzieren und die Nachweise von Flora zu minimieren, sind zusätzliche Daten notwendig. Wie bereits bei Erwachsenen und kürzlich auch bei Neugeborenen beschrieben, könnte die Ursache für die niedrigen cfDNA-Konzentrationen, insbesondere

in der Validierungsgruppe, darin liegen, dass gesunde Individuen im Vergleich zu septischen Patienten generell geringere cfDNA-Konzentrationen aufweisen (Lenz et al., 2022). Zusätzlich wäre es bei abweichenden Ergebnissen zwischen NGS und Blutkultur hilfreich gewesen, eine dritte diagnostische Methode wie PCR einzubeziehen. Dies war jedoch aufgrund des begrenzten Probenmaterials nicht möglich.

1.5 Zusammenfassung

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass DISQVER® bei neonatologischen Patienten mikrobielle zellfreie DNA von pathogenen sowie nicht-pathogenen Bakterien, Pilzen und Viren nachweisen kann, selbst wenn Blutkulturen negative Ergebnisse liefern. Obwohl die Next-Generation Sequenzierung das Potential besitzt, herkömmliche Diagnosemethoden, etwa bei polymikrobiellen intraabdominellen Infektionen, zu verfeinern und zu einer früheren erregerspezifischen Behandlung führen kann, konnten in unserer Studie auch falsch-negative NGS-Ergebnisse beobachtet werden. Des Weiteren zeigte sich bei Patienten, die vor Probenentnahme Antibiotika erhalten hatten, keine verbesserte Nachweisrate mit Next-Generation Sequenzierung im Vergleich zu Blutkulturen. Die Interpretation der Sequenzierungs-Ergebnisse ist mitunter komplex und unterstreicht die Notwendigkeit, diese mit Infektiologen und Mikrobiologen zu diskutieren, sie in Verbindung mit klinischen und mikrobiologischen Daten zu betrachten, um eine optimale klinische Anwendung zu gewährleisten.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Agudelo-Pérez S, Fernández-Sarmiento J, Rivera León D, Peláez RG. Metagenomics by next-generation sequencing (mNGS) in the etiological characterization of neonatal and pediatric sepsis: A systematic review. *Front Pediatr* 2023; 11: 1011723

Alonso M, Palacios JJ, Herranz M, Penedo A, Menéndez Á, Bouza E, García De Viedma D. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 2688–2690

AWMF, 2021: 'Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI) der Deutschen Gesellschaft für Kinder-und Jugendmedizin (DGKJ) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen'. https://register.awmf.org/assets/guidelines/024-008I_S2k_Bakterielle_Infektionen_Neugeborene_2021-03-abgelaufne.pdf (Zugriffsdatum 11.05.2024)

Boghossian NS, Page GP, Bell EF, Stoll BJ, Murray JC, Cotten CM, Shankaran S, Walsh MC, Laptook AR, Newman NS, Hale EC, McDonald SA, Das A, Higgins RD. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J Pediatr* 2013; 162: 1120-1124

Brenner T, Decker SO, Grumaz S, Stevens P, Bruckner T, Schmoch T, Pletz MW, Bracht H, Hofer S, Marx G, Weigand MA, Sohn K. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSiS-Trial): Study protocol of a prospective, observational, noninterventional, multicenter, clinical trial. *Medicine (Baltimore)* 2018; 97: e9868

Carr JP, Burgner DP, Hardikar RS, BATTERY JP. Empiric antibiotic regimens for neonatal sepsis in Australian and New Zealand neonatal intensive care units. *J Paediatr Child Health* 2017; 53: 680–684

Chen L, Zhao Y, Wei J, Huang W, Ma Y, Yang X, Liu Y, Wang J, Xia H, Lou Z. Metagenomic Next-Generation Sequencing for the Diagnosis of Neonatal Infectious Diseases. *Microbiol Spectr* 2022; 10: e0119522

Coggins SA, Glaser K. Updates in Late-Onset Sepsis: Risk Assessment, Therapy, and Outcomes. *NeoReviews* 2022; 23: 738–755

Cohen-Wolkowicz M, Moran C, Benjamin DK, Cotten CM, Clark RH, Smith PB. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr Infect Dis J* 2009; 28: 1052–1056

Doern GV, Carroll KC, Diekema DJ, Garey KW, Rupp ME, Weinstein MP, Sexton DJ. 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* 2020; 33: e00009-19

Eichenberger EM, Vries CR de, Ruffin F, Sharma-Kuinkel B, Park L, Hong D, Scott ER, Blair L, Degner N, Holleman DH, Blauwkamp TA, Ho C, Seng H, Shah P, Wanda L, Fowler VG, Ahmed AA. Microbial Cell-Free DNA Identifies Etiology of Bloodstream Infections, Persists Longer Than Conventional Blood Cultures, and Its Duration of Detection Is Associated With Metastatic Infection in Patients With *Staphylococcus aureus* and Gram-Negative Bacteremia. *Clin Infect Dis* 2022; 74: 2020–2027

EUCAST, 2020: Guidance Document on Implementation and Use of the Revised Aminoglycoside Breakpoints.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Aminoglycoside_guidance_document_20200121.pdf (Zugriffsdatum: 11.05.2024)

EUCAST, 2021: Guidance document breakpoints in brackets.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Breakpoints_in_brackets.pdf (Zugriffsdatum: 11.05.2024)

EUCAST, 2023: Definitions of ‘Expected Phenotypes’ Expected Phenotypes, Version 1.2.

https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2023/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf (Zugriffsdatum: 11.05.2024)

Fleischmann C, Reichert F, Cassini A, Horner R, Harder T, Markwart R, Tröndle M, Savova Y, Kisson N, Schlattmann P, Reinhart K, Allegranzi B, Eckmanns T. Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Arch Dis Child* 2021; 106: 745-752

Fukushima S, Hagiya H, Fujita K, Kamiyama S, Yamada H, Kishida M, Otsuka F.

Clinical and microbiological characteristics of polymicrobial bacteremia: a retrospective, multicenter study. *Infection* 2022; 50: 1233–1242

Greenberg RG, Kandefer S, Do BT, Smith PB, Stoll BJ, Bell EF, Carlo WA, Laptook AR, Sánchez PJ, Shankaran S, van Meurs KP, Ball MB, Hale EC, Newman NS, Das A, Higgins RD, Cotten CM. Late-onset Sepsis in Extremely Premature Infants: 2000-2011. *Pediatr Infect Dis J* 2017; 36: 774–779

Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, Stevens P, Glanz K, Decker SO, Hofer S, Weigand MA, Brenner T, Sohn K. Enhanced Performance of Next-Generation Sequencing Diagnostics Compared With Standard of Care Microbiological Diagnostics in Patients Suffering From Septic Shock. *Crit Care Med* 2019; 47: e394-e402

Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, Brenner T, Haeseler A von, Sohn K. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med* 2016; 8: 1–13

Guy C, Haji-Sheikhi F, Rowland CM, Anderson B, Owen R, Lacbawan FL, Alagia DP. Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: Results from a large US clinical laboratory. *Mol Genet Genomic Med* 2019; 7: e545

Han D, Li R, Shi J, Tan P, Zhang R, Li J. Liquid biopsy for infectious diseases: a focus on microbial cell-free DNA sequencing. *Theranostics* 2020; 10: 5501-5513

Han DS, Lo YM. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet* 2021; 37: 758–770

He P, Wang J, Ke R, Zhang W, Ning P, Zhang D, Yang X, Shi H, Fang P, Ming Z, Li W, Zhang J, Dong X, Liu Y, Zhou J, Xia H, Yang S. Comparison of metagenomic next-generation sequencing using cell-free DNA and whole-cell DNA for the diagnoses of pulmonary infections. *Front Cell Infect Microbiol* 2022; 12: 1042945

Jeukens J, Freschi L, Kukavica-Ibrulj I, Emond-Rheault JG, Tucker NP, Levesque RC. Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann N Y Acad Sci* 2019; 1435: 5–17

Kipfmueller F, Schneider J, Prusseit J, Dimitriou I, Zur B, Franz AR, Bartmann P, Mueller A. Role of Neutrophil CD64 Index as a Screening Marker for Late-Onset Sepsis

in Very Low Birth Weight Infants. PLoS ONE 2015; 10: e0124634

Leistner R, Piening B, Gastmeier P, Geffers C, Schwab F. Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: current data from the National Surveillance System NEO-KISS. Klin Padiatr 2013; 225: 75–80

Lenz M, Maiberger T, Armbrust L, Kiwit A, Wense A von der, Reinshagen K, Elrod J, Boettcher M. cfDNA and DNases: New Biomarkers of Sepsis in Preterm Neonates—A Pilot Study. Cells 2022; 11: 192

Mahfouz N, Ferreira I, Beisken S, Haeseler A von, Posch AE. Large-scale assessment of antimicrobial resistance marker databases for genetic phenotype prediction: a systematic review. J Antimicrob Chemother 2020; 75: 3099–3108

Marcus G, Levy S, Salhab G, Mengesha B, Tzuman O, Shur S, Burke E, Mayeda RC, Cochavi L, Perluk I, Zaidenstein R, Lazarovitch T, Dadon M, Marchaim D. Intra-abdominal Infections: The Role of Anaerobes, Enterococci, Fungi, and Multidrug-Resistant Organisms. Open Forum Infect Dis 2016; 3: ofw232

Mukhopadhyay S, Briker SM, Flannery DD, Dhudasia MB, Coggins SA, Woodford E, Walsh EM, Li S, Puopolo KM, Kuzniewicz MW. Time to Positivity of Blood Cultures in Neonatal Late-Onset Bacteremia. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed 2022; 107: 583-588

Patel RM, Knezevic A, Shenvi N, Hinkes M, Keene S, Roback JD, Easley KA, Josephson CD. Association of Red Blood Cell Transfusion, Anemia, and Necrotizing Enterocolitis in Very Low-Birth-Weight Infants. JAMA 2016; 315: 889–897

Patel SJ, Oshodi A, Prasad P, Delamora P, Larson E, Zaoutis T, Paul DA, Saiman L. Antibiotic use in neonatal intensive care units and adherence with Centers for Disease Control and Prevention 12 Step Campaign to Prevent Antimicrobial Resistance. Pediatr Infect Dis J 2009; 28: 1047–1051

Persad E, Sibrecht G, Ringsten M, Karlelid S, Romantsik O, Ulinder T, Do Nascimento, Israel Junior Borges, Bjorklund M, Arno A, Bruschettini M. Interventions to minimize blood loss in very preterm infants-A systematic review and meta-analysis. PLoS ONE 2021; 16: e0246353

Pietrzak B, Kawacka I, Olejnik-Schmidt A, Schmidt M. Circulating Microbial Cell-Free

DNA in Health and Disease. *Int J Mol Sci* 2023; 24: 3051

Reyman M, van Houten MA, Watson RL, Chu MLJ, Arp K, Waal WJ de, Schiering I, Plötz FB, Willems RJ, van Schaik W, Sanders EA, Bogaert D. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat Commun* 2022; 13: 893

Schelonka RL, Chai MK, Yoder BA, Hensley D, Brockett RM, Ascher DP. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J Pediatr* 1996; 129: 275–278

Schmatz M, Srinivasan L, Grundmeier RW, Elci OU, Weiss SL, Masino AJ, Tremoglie M, Ostapenko S, Harris MC. Surviving Sepsis in a Referral Neonatal Intensive Care Unit: Association between Time to Antibiotic Administration and In-Hospital Outcomes. *J Pediatr* 2020; 217: 59-65.e1

Solanky D, Ahmed AA, Fierer J, Golts E, Jones M, Mehta SR. Utility of Plasma Microbial Cell-Free DNA Decay Kinetics After Aortic Valve Replacement for *Bartonella* Endocarditis: Case Report. *Front Trop Dis* 2022; 3: 842100

Stoll BJ, Hansen N, Fanaroff AA, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Lemons JA, Donovan EF, Stark AR, Tyson JE, Oh W, Bauer CR, Korones SB, Shankaran S, Laptook AR, Stevenson DK, Papile LA, Kenneth Poole W. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285–291

Tavares-Carreón F, Anda-Mora K de, Rojas-Barrera IC, Andrade A. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ* 2023; 11: e14399

Wang J, Zeng Y, Wang S, Liu H, Zhang D, Zhang W, Wang Y, Ji H. Swine-derived probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibits growth and adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and mediates host defense. *Front Microbiol* 2018; 9: 1364

Wang L, Guo W, Shen H, Guo J, Wen D, Yu Y, Wu W. Plasma Microbial Cell-Free DNA Sequencing Technology for the Diagnosis of Sepsis in the ICU. *Front Mol Biosci* 2021; 8: 659390

Wu J, Hu S, Zhang L, Xin J, Sun C, Wang L, Ding K, Wang B. Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics* 2020; 10: 4544-4556

Wynn JL. Defining Neonatal Sepsis. *Curr Opin Pediatr* 2016; 28: 135-140

Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 2014; 15: 523–528

Zaidi AK, Knaut AL, Mirrett S, Reller LB. Value of routine anaerobic blood cultures for pediatric patients. *J Pediatr* 1995; 127: 263–268

Zhu Y, Gan M, Ge M, Dong X, Yan G, Zhou Q, Yu H, Wang X, Cao Y, Lu G, Wu B, Zhou W. Diagnostic Performance and Clinical Impact of Metagenomic Next-Generation Sequencing for Pediatric Infectious Diseases. *J Clin Microbiol* 2023; 61: e0011523

Die Abbildungen in dieser Arbeit wurden durch den Erstautor mit Hilfe von biorender.com, unter Einhaltung von Lizenz- und Veröffentlichungsrechten, erstellt.

2. Veröffentlichung

CLINICAL RESEARCH ARTICLE OPEN



Microbial cell-free DNA-sequencing as an addition to conventional diagnostics in neonatal sepsis

Julian Balks^{1,2}, Silke Grumaz³, Sonia Mazzitelli³, Ulrike Neder³, Lotte Lemloh¹, Tamene Melaku¹, Kirsten Glaser⁴, Andreas Mueller¹ and Florian Kipfmüller¹✉

© The Author(s) 2024

BACKGROUND: Bloodstream infections remain a challenge for neonatologists, as traditional culture-based methods are time-consuming and rely on adequate blood volume. Next-generation sequencing (NGS) offers an alternative, as it can identify microbial cell-free DNA (mcfDNA) in a small blood sample, providing rapid pathogen detection. This study aimed to assess the diagnostic performance of DISQVER®-NGS compared to blood cultures in neonatal patients with suspected sepsis.

METHODS: In neonates with suspected sepsis, blood cultures and samples for NGS were prospectively collected. Patients were divided into four categories: 1) sepsis, blood culture positive, 2) clinical sepsis, culture negative, 3) suspected sepsis, 4) validation cohort.

RESULTS: NGS detected bacterial, viral or fungal mcfDNA in 24 of 82 samples. Blood cultures were collected in 46 of 84 patients (15/46 positive). DISQVER® correctly identified pathogens in 9/15 patients with a positive blood culture, two with intrinsic resistance to their antibiotic regimen. In seven samples NGS reported the mcfDNA of bacteria that could have theoretically grown in culture but did not.

CONCLUSIONS: NGS may enhance sensitivity in sepsis diagnostics by detecting mcfDNA in neonates with suspected sepsis. Interpreting NGS results requires correlation with clinical data, laboratory values, and routine microbiological tests for a comprehensive understanding of the patient's condition.

Pediatric Research; <https://doi.org/10.1038/s41390-024-03448-1>

IMPACT:

- Conventional blood culture methods have limitations in accuracy and turnaround time.
- The study aimed to investigate the diagnostic performance of the Next-Generation Sequencing method DISQVER® compared to traditional blood cultures in neonatal patients with suspected sepsis.
- Our findings suggest that NGS has the potential to augment the precision of conventional diagnostic techniques, can lead to improved detection of pathogens and targeted treatment approaches in neonatal sepsis.
- It is emphasized that further validation and integration with clinical and microbiological data are required to ensure optimal clinical utility.

INTRODUCTION

Bloodstream infections (BSIs) remain a major challenge for term and especially preterm infants in neonatal intensive care units. Hospitalized neonates and very immature preterm infants are at highest risk.^{1,2} Despite the availability of a variety of antibiotics and empiric antibiotic regimens for different foci of infection, neonatal sepsis is still a major cause of neonatal morbidity and mortality worldwide.^{3–7} The clinical presentation of neonatal sepsis is nonspecific and variable.⁷ Timely initiation of appropriate antimicrobial treatment is critical to prevent acute and long-term organ dysfunction as well as life-threatening deterioration. Studies demonstrated that delayed initiation of empiric antibiotic

treatment for suspected neonatal sepsis was associated with increased sepsis-related mortality.⁸ While prompt empiric antibiotic administration improves patient survival, the chance of culturing the causative pathogen of sepsis decreases after initiation, warranting the collection of blood cultures before antibiotics are administered.⁹ Also, treatment with broad-spectrum empiric antibiotics must be balanced against potential side-effects including antibiotic selection pressure, the development of multi-drug resistant bacteria, antibiotic associated toxicities or negative impacts on the microbiome.^{7,10,11} Ultimately, the identified pathogen should guide the selection of an individual antibiotic regime.

¹Division of Neonatology and Pediatric Intensive Care, Children's Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany. ²Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP), University Hospital Bonn, Bonn, Germany. ³Noscendo, Duisburg, Germany. ⁴Division of Neonatology, Department of Women's and Children's Health, University Medical Center Leipzig, Leipzig, Germany. ✉email: florian.kipfmueeller@ukbonn.de

Received: 15 March 2024 Revised: 4 June 2024 Accepted: 24 July 2024
Published online: 14 August 2024

Table 1. Patient classification.

Group	Description	Definition
1	Sepsis, blood culture positive	Episodes in which patients had at least one positive blood culture and clinical signs of sepsis or necrotizing enterocolitis.
2	Sepsis, blood culture negative	Episodes in which patients had negative blood cultures but had clinical signs of sepsis or necrotizing enterocolitis and were treated with antibiotics for at least 5 days.
3	Suspicion of Sepsis	Episodes in which patients were suspected to have a sepsis, were started on antibiotic therapy, but whose therapy lasted less than 5 days because the treating physicians reassessed when infection was considered unlikely.
4	Validation group	Patients without clinical signs of sepsis

Blood cultures remain the “gold standard” for the detection of bacteremia. Cultural diagnostic techniques offer several advantages, such as being relatively cost-effective compared to nucleic acid amplification methods or DNA sequencing and allow testing of antibiotic susceptibilities. However, the fundamental problem with blood cultures is that growth is dependent on time and blood culture volume.^{12,13} Despite advances in culturing techniques bacterial growth may not occur due to preanalytical errors, lack of certain growth requirements, the use of antibiotics prior to sample collection or, in particular in neonates, insufficient blood culture volume.¹²

Sequencing-based diagnostic approaches can identify pathogens from peripheral blood and may offer an alternative to conventional blood cultures. The comparatively small volume of blood required for pathogen-detection by sequencing of microbial cell-free DNA (mcfDNA) is particularly important in premature and newborn infants.^{14,15} Sequencing of cell-free DNA (cfDNA) and bioinformatic filtering of raw reads is followed by qualitative assessment of the mcfDNA, potentially enabling pathogen identification and quantification. Assessing the read count of individual pathogens is one way to distinguish between infection and contamination.¹⁶ Sequencing of mcfDNA from patients' blood samples¹⁷ is a promising approach with limited published data in neonates.^{18,19} Because the method sequences mcfDNA fragments rather than live pathogens, it can provide accurate results even after antimicrobial therapy has been initiated.²⁰ Next-Generation Sequencing (NGS) could shorten the turnaround time of modern sepsis diagnostics, allowing for faster de-escalation to pathogen-directed therapy¹⁹ or termination of antibiotic treatment.

Aim of this prospective feasibility study was to investigate the diagnostic performance of the NGS method DISQVER® compared to blood cultures in neonatal patients with suspected sepsis.

METHODS

Study design and patients

The study was designed as a prospective, single-center study. Neonates admitted during the first 28 days of life to the neonatal intensive care unit (level III) of the University Hospital Bonn (UKB) receiving a diagnostic workup for suspected late-onset sepsis (LOS) at an age of 72 h to 3 months were included in the study. Between September 2020 and July 2022, 125 patients were enrolled in the study. The ethics committee of the University of Bonn approved the study (Study registration number: 114/22). Written informed consent was obtained initially from parents or legal representatives before participation in the study.

In this study, sepsis was defined according to the established criteria of the German neonatal infection surveillance system (NEO-KISS).^{21,22} These criteria include clinical signs, blood culture findings, laboratory markers (CRP, IL-6, leukocyte and thrombocyte count) in line with other sepsis classifications.^{6,23} Patients were allocated to one of three groups: 1) blood culture-positive sepsis, 2) blood culture-negative sepsis, 3) suspected sepsis. Additionally, healthy newborns without infection were recruited as a validation group to establish initially required sample preparation quality parameters and baselines for microbial cell-free DNA. These patients were allocated to group 4: patients without clinical signs of infection (Table 1).

Of the 125 enrolled patients, 57 blood cultures and 134 samples for mcfDNA sequencing were collected. Six patients were included twice in

the study due to a second episode of suspected sepsis, while one patient was included three times for the same reason. Overall, eight samples were added from repeatedly tested patients.

Exclusion criteria: Infants older than 3 months or patients receiving palliative care were excluded from the study. Other reasons for exclusion were an inability to perform NGS due to insufficient plasma volume ($n = 7$), insufficient amounts of cell-free DNA ($n = 27$) or insufficient concentrations/quality of sequencing libraries ($n = 18$). Among these 52 NGS samples which were not considered for further analysis, 35 belonged to the validation group (group 4), while 8 and 9 were from group 2 and group 3, respectively. Along with the 52 NGS samples also their matching blood cultures (where available) were excluded ($n = 11$, 6 from group 2 and 5 from group 3), this included 1 duplicate sample (Fig. 1).

Finally, mcfDNA sequencing was performed in 82 blood samples from 74 (41 male and 33 female) patients (Table 2 and Supplementary Table S2). Out of the 82 mcfDNA sequencing results, 46 could be matched to blood culture results. This was due to several reasons such as the absence of blood cultures in the validation group, occasional unsuccessful attempts to collect blood cultures, inability to collect blood cultures due to the patient's clinical condition, or inadequate clinical suspicion of an infection to warrant blood culture collection. Due to the aforementioned reasons five patients from group 2 and seven patients from group 3 did not have a blood culture drawn during their infectious episode.

As many NGS results, including the validation collective, could not be matched to BCs due to a lack of BC results, a case-by-case assessment was performed additionally, serving as a composite reference standard. To evaluate the plausibility of the DISQVER® test, results obtained by sequencing were compared to 1) blood culture results, 2) results of other routine microbiological or virologic examinations and 3) the patient's clinical course, the combination of all 3 together with the physicians' assessment serving as a composite reference standard.

Routine sepsis diagnostics and blood cultures

When sepsis was clinically suspected, blood samples were routinely collected for sepsis evaluation. Inflammatory markers (CRP, IL-6), a complete blood count (CBC) and blood cultures were obtained (BD BACTEC™ Peds Plus™—inoculation volume 0.5 ml for preterm and 1.0 ml for term neonates). Blood samples for the validation group were taken from healthy newborns at the same time of the newborn bloodspot screening (for congenital metabolic disorders) and did not include the collection of a blood culture. Blood samples were sent to the central laboratory at University Hospital Bonn for measurement of inflammatory markers (CRP, IL-6, CBC) while the blood cultures were sent to the Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP) at Bonn University Hospital immediately after collection. Blood cultures were incubated in the BD Bactec FX (Becton, Dickinson and Company) according to standard protocol for a maximum of 5 days (120 h). Identification of organisms was achieved by MALDI-TOF MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry—bioMérieux VITEK® MS). The VITEK® 2 XL (bioMérieux) was used for automated susceptibility testing. Antibiotic regimens administered were documented for all cases. In instances where antibiotic treatment occurred before sampling, the potential impact on the detection rates of NGS and blood cultures was evaluated. Antibiotic susceptibility testing results were documented for patients with positive blood cultures to assess the efficacy of empiric antibiotic treatments provided. To distinguish between true infection and contamination, several factors were evaluated: growth of the same organism in another microbiologic sample collected within 2 weeks prior or after collection of NGS and BC (e.g., another blood culture, tracheal secretion, tip of removed central venous catheter, screening

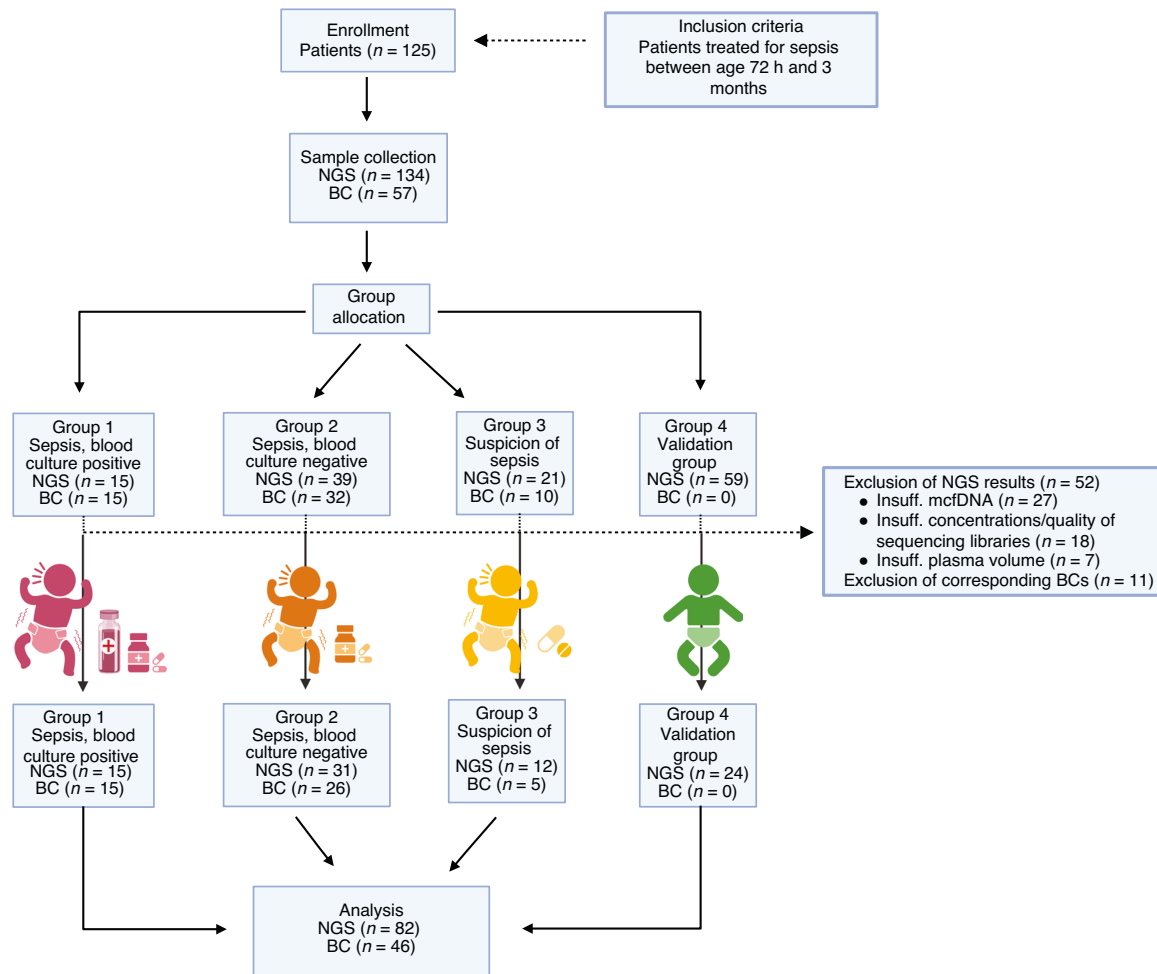


Fig. 1 Study flowchart. Between September 2020 and July 2022, 125 patients were enrolled and allocated to 4 groups. Sampling yielded 57 blood culture and 134 mcfDNA samples. Due to secondary septic episodes 6 patients were included twice and one patient three times. Overall, 8 samples were added from repeatedly tested patients. Due to insufficient plasma volume ($n = 7$), insufficient cell-free DNA ($n = 27$), and insufficient quality of sequencing libraries ($n = 18$) 52 NGS samples and their corresponding blood culture results (where available) were excluded ($n = 11$). Leaving 82 NGS and 46 BC results for comparative analysis. Abbreviations: NGS Next-Generation sequencing, BC blood culture, insuff. insufficient, n number of samples.

swabs), the patients' clinical condition or the presence of implanted devices and the possibility of catheter related blood stream infections (CRBSI) and time to positivity of blood cultures (growth in <96 h).

For confirmation or exclusion of suspected viral etiologies, samples such as tracheal secretions, anal swabs, cerebrospinal fluid or EDTA plasma were sent to the Virology department at Bonn University Hospital for PCR diagnostics.

Next-generation sequencing diagnostics

The blood samples required for NGS of microbial cell-free DNA were collected simultaneously with and at the same site as the routine blood samples for sepsis examination. In our study, we collected 0.5 ml blood in Sarstedt K3 EDTA sample tubes (Sarstedt, Nümbrecht, Germany). Collected blood samples for NGS were centrifuged at 3000 rpm for 10 min. Plasma was frozen at -80°C and later transported to the collaborating laboratory of Noscendo in Tuebingen, Germany, for sequencing and bioinformatic evaluation with their DISQVER® platform optimized for neonatal samples. For sequencing, the frozen plasma samples were thawed on ice, centrifuged at 16,000 rpm for 10 min at 4°C to remove remaining cellular debris and/or cryoprecipitates and supernatants were transferred to fresh reaction tubes. 100 μl was brought to 1100 μl with sterile $1 \times \text{PBS}$ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts) and DNA was isolated with the QIAAsymphony DSP Circulating DNA kit (Qiagen, Hilden, Germany) on a

QIAAsymphony DSP instrument (Qiagen, Hilden, Germany). DNA concentrations were measured using a Qubit dsDNA HS assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts), and samples having a concentration higher or equal to 0.03 ng/ μl were used for library preparation on a Hamilton NGS STAR (Hamilton, Bonaduz, Switzerland) instrument. Sequencing libraries were again quantified and quality assessed using the aforementioned Qubit kit as well as the Fragment Analyzer HS NGS Fragment assay (Agilent, Santa Clara, California) on a Fragment Analyzer 5300 instrument (Agilent, Santa Clara, California). Subsequently, samples that passed our quality assessment were sequenced with 75 bp read length and a minimum of 25 Mio reads per sample on an Illumina NextSeq550 instrument (Illumina, San Diego, California).

Raw sequencing data was subjected to various QC controls comprising, PHRED score filtering, adapter trimming, complexity filtering as well as k-mer-based contamination screening. To pass the quality filter, read quality needs to surpass a Phred score of 20 and achieve a minimal length of 50 bp after quality control. All data generated was analyzed using Noscendo's CE-IVD platform DISQVER®.

All DISQVER® results were compared to the corresponding BC results. We evaluated whether the results were concordant (same pathogen detected by blood culture and NGS analysis) or discordant (pathogen only detected by one technique or different pathogens detected). In all cases, the plausibility of the BC and NGS results were evaluated based on the

Table 2. Overview group characteristics

	Overall	Group 1	Group 2	Group 3	Group 4
Patients	74	14	25	12	23
NGS samples analyzed	82	15	31	12	24
NGS positive	24	11	8	3	2
BC samples analyzed	46	15	26	5	0
BC positive	15	15	0	0	0
Gestational age (median [IQR] in weeks)	35.1 [27.0–39.0]	35.0 [26.9–37.9]	32.1 [24.4–36.0]	33.5 [29.6–34.9]	39.56 [38.9–40.0]
Age at sample collection (median [IQR] in days)	6 [3–42]	34 [11–61]	10 [3–62]	5 [3–36]	3 [3]
Birth weight (median [IQR] in kg)	2.52 [0.95–3.52]	1.27 [0.79–3.06]	1.37 [0.75–3.28]	1.85 [1.26–2.44]	3.65 [3.45–3.85]
Survival	82.9% (68/82)	60.0% (9/15)	77.4% (24/31)	91.7% (11/12)	100% (24/24)

Overall, 74 patients yielded 82 NGS and 46 BC results. Due to a second episode of suspected sepsis, six patients were included in the study twice and one patient three times, adding eight samples from repeatedly tested patients and explaining the discrepancy between numbers of patients and samples per group (74 patients and 82 samples). NGS Next-Generation sequencing, cfDNA cellfree DNA, BC blood culture, IQR interquartile range.

patient's clinical course, underlying disease, and viral or microbiological diagnostic tests performed 2 weeks prior to or after BC and NGS sample collection (anal swabs, nasopharyngeal swabs, tracheal secretions, etc.).

RESULTS

The median gestational age in our cohort was 35.1 weeks (IQR 27.0–39.0), with 25 of 74 patients born earlier than 30 weeks gestation (Table 2 and Supplementary Table S2). Median age at sample acquisition was 6 days (IQR 3–42). Apart from prematurity, the most common underlying conditions were of gastrointestinal origin (including necrotizing enterocolitis, intestinal or colonic perforation, meconium ileus, esophageal atresia, Hirschsprung's disease), followed by malformations or conditions of the heart and lung (congenital diaphragmatic hernia, hypoplastic left heart syndrome, Tetralogy of Fallot, persistent ductus arteriosus, ventricular septal defect, congenital chylothorax, pneumothorax, pneumonia—Supplementary Table S2).

Results of blood cultures

Blood cultures were obtained in 46 of 82 cases, 15 turned positive (32.6%) while 31 remained negative (67.4%). One blood culture grew more than one bacterium. 14 of 15 blood cultures revealed the growth of only one pathogen. In the corresponding plasma samples, DISQVER® detected mcfDNA of the same bacterium in 5 of 15 cases, while mcfDNA of several bacteria (including the bacteria grown in culture) was detected in 4 of 15 samples (Table 3). In 6 cases, there was either a negative DISQVER® result (4/6 false negative) or the DISQVER® and blood culture result differed (2/6). Two blood cultures taken from a patient with a 14-day interval revealed *S. epidermidis*, DISQVER® results were negative in both instances. Two other cultures grew *E. coli* and *K. pneumoniae*, respectively but had a negative DISQVER® result. When *A. ursingii* grew in culture, DISQVER® reported reads of Cytomegalovirus (CMV). In the one culture that exhibited growth of multiple bacteria (*E. cloacae* complex, *S. epidermidis* and *S. capitis*), sequencing revealed cfDNA of *Corynebacterium otitidis*, *Alloicoccus otitidis*, *Raoultella planticola* and *Corynebacterium afermentans*. All blood culture results were deemed true positive. The growth of *S. epidermidis* in two cultures was deemed positive due to a short time to positivity (17 h and 37 h respectively) and matching clinical picture of a catheter-associated infection. Where possible, discrepant samples were repeated for NGS analysis. With exception of the two cases of *S. epidermidis* positive blood culture, where not enough remnant material was left, the other four samples were repeated and initial DISQVER® results were confirmed.

Sensitivity and specificity of DISQVER® based on comparison to BC results were calculated for the 46 samples where results for both methods were available and were found to be 73.33% and 74.19%, overall accuracy was at 73.91% (Supplementary Table S3, Supplementary Fig. 1).

Evaluation of NGS results

Of all 82 results in total, DISQVER® results were negative in 58 of 82 (70.7%) and positive in 24 of 82 (29.3%) cases. DISQVER® and blood cultures yielded concordant results in 9 of 15 cases (60%) in other words, the cfDNA of the same pathogen that was found in the blood culture was also found in mcfDNA sequencing (Table 3). DISQVER® results were deemed plausible in 75 of 82 cases (91.46%). In 4 of 7 implausible cases, DISQVER® results were deemed to be false negative. In these patients, blood cultures were positive for *K. pneumoniae*, *E. coli* and in two cases *S. epidermidis* associated with clinical signs of sepsis (Table 3).

In the three remaining inconclusive cases *Aspergillus niger* mcfDNA was identified in a sample from a patient without any clinical suspicion of aspergillosis. Additionally, mcfDNA of *Kytococcus sedentarius*, a bacterium unlikely to be the causative pathogen of sepsis, was detected, as well as mcfDNA of *Gardnerella vaginalis* in a term neonate who had received antibiotics prior to sample collection (Table 4).

Positive percent agreement between DISQVER® results and the composite reference standard was calculated to be 82.61%, negative percent agreement 91.43% and overall accuracy were at 87.93% (Supplementary Table S4).

Species identified in NGS results

In the 24 positive DISQVER® results, 29 different bacterial pathogens, two different viral and two different fungal pathogens, were detected (Fig. 2). In 11 out of 24 (45.8%) of samples, DISQVER® detected mcfDNA of more than one different pathogen.

The sequencing results of 18 of 24 (75%) positive NGS samples yielded bacterial cfDNA of 29 different bacterial species or genera. In cases where identification down to the species levels of bacteria was not possible, the read counts for the genera or a group within the genera were reported (e.g., *Enterobacter cloacae* complex or *Citrobacter* spp.) (Fig. 2). DISQVER® detected mcfDNA of multiple bacteria in 11 of 24 samples (45.8%) while blood cultures showed the presence of more than 1 pathogen in only 1 of 15 positive blood cultures (6.7%). Generally, the presence cfDNA of multiple bacteria was associated with an abdominal focus of infection (6/11) and prematurity (10/11) while the detection of cfDNA of only one bacterial or fungal pathogen (9/24) was less associated with prematurity (2/9). See the supplementary for a breakdown of the

Table 3. Comparison of positive blood culture with DISQVER® results (Group 1).

Sample number	Antibiotic prior to sampling	Pathogen in blood culture (BC)	Plausibility	Resistance to empiric antibiotics after sampling	Detection of microbial cfDNA in NGS	Evaluation of NGS results	Concordance between BC and NGS
2	No	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	true positive	Yes
3 ^a	No	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	Negative	false negative	No
4 ^a	Yes Van + Pip/Taz	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ^b	Yes	No Van + Mero	Negative	false negative	No
16	No	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Yes	No Van + Pip/Taz	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	true positive	Yes
57	No	<i>Candida albicans</i>	Yes	Yes ^c Van + Mero	<i>Candida albicans</i>	true positive	Yes
89	No	<i>Enterobacter cloacae</i> complex, <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	<i>Corynebacterium otitidis</i> , <i>Alloiococcus otitis</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Corynebacterium afermentans</i>	differing results	No
104	Yes Van + Pip/Taz	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^{b, d}	Yes	No Van + Pip/Taz + Fluco	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ^d	true positive	Yes
106	No	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Yes	No Van + Mero	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus gwangjuense</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	true positive	Yes
107	No	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	Yes	No Van + Mero	<i>Enterobacter spp.</i>	true positive	Yes
112	No	<i>Serratia marcescens</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	<i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	true positive	Yes
114	No	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	Negative	false negative	No
116	Yes Amp/Sul + Tobra	<i>Serratia marcescens</i> ^{d, e}	Yes	Yes Amp/Sul + Tobra	<i>Serratia marcescens</i> ^d	true positive	yes
121	Yes Van + Pip/Taz	<i>Acinetobacter ursingii</i> ^e	Yes	Yes Van + Pip/Taz	<i>Human Cytomegalovirus</i>	differing results	No
125	No	<i>Escherichia coli</i>	Yes	No Van + Pip/Taz	Negative	false negative	No
134	Yes Amp/Sul	<i>Escherichia coli</i> ^d	Yes	Yes Amp/Sul	<i>Escherichia coli</i> ^d	true positive	Yes

Table 3. continued

Sample number	Antibiotic prior to sampling	Pathogen in blood culture (BC)	Plausibility	Resistance to empiric antibiotics after sampling	Detection of microbial cfDNA in NGS	Evaluation of NGS results	Concordance between BC and NGS
5/15		bacteria 14/15 fungi 1/15	plausible 15/ 15	Resistance 4/15	NGS positive 11/15 NGS negative 4/15	true positive 9/ 15 false negative 4/15 differing 2/15	concordant 9/15

Concordant results of NGS and BC were found in 9 out of 15 samples (NGS detected cfDNA of the same pathogen that was found in blood culture). The NGS results of these nine cases were deemed true positive. In 6 out of 15 cases, DISCOVER[®] showed false negative results (4/6) or results differed from blood culture (2/6). In five cases antibiotics were administered prior to sampling. Plausibility of blood culture results was assessed by infectious disease experts and microbiologists, based on underlying disease, patient's clinical course and routine microbiologic tests performed within two weeks of sample collection. *Enterobacter cloacae* complex: Seven species of the genus *Enterobacter* belong to the *Enterobacter cloacae* complex (ECLCO): *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hommaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis*, *E. mori*. These species share phenotypic and, importantly, genotypic characteristics. MALDI-TOF MS often identifies ECLCO but may fail to reliably identify the different species that comprise the complex. Molecular methods like PCR or sequencing identify the genetic differences within the complex and can thus more reliably determine which species of ECLCO is present. For this reason, *Enterobacter cloacae* detected in blood culture is often reported as ECLCO, while NGS often reports the same bacteria to the exact species of ECLCO. This difference is of no clinical or therapeutic concern.

^aVancomycin, *Pip/Taz* Piperacillin/Tazobactam, *Amp/Sul* Ampicillin/Sulbactam, *Tobra* Tobramycin, *Mero* Meropenem, *Fluco* Fluconazole, NGS Next-Generation sequencing, BC blood culture.

^bSample numbers 3 and 4 were collected from the same patient during two different septic episodes 14 days apart.

^cBacteria grew in 2 of 5 pre-treated cultures despite the bacteria's susceptibility to the therapy.

^dA fourth pathogen resistant to empiric therapy was *Candida albicans*.

^eConcordant results in BC and NGS were observed in 3 samples collected after antibiotic administration.

^fBacterial resistance to the already administered antibiotic therapy was observed in 3 out of those 5 cases, of which 2 can be explained by intrinsic resistances of the detected bacteria.

NGS results, read counts and patient characteristics (Supplementary Table S1).

Viral cfDNA was detected in 4 of 24 DISCOVER[®] positive samples (Human cytomegalovirus (CMV) in 3 samples, Human betaherpesvirus 6B (HHV-6B) in 1 sample). No fungal or bacterial cfDNA was detected in all 4 samples that showed the presence of viral cfDNA. Specific testing for viral pathogens during the clinical course was performed in 15 patients. These tests remained negative in 14 of 15 cases while 1 of 15 patients was CMV positive in tracheal secretions and urine. NGS also detected CMV cfDNA in this patients' sample (Supplementary Table S2, patient 6). In the remaining 3 cases in which viral cfDNA was detected, there was no clinical suspicion of a viral infection and thus no virologic diagnostics were ordered by the clinicians.

Fungal cfDNA was detected in 2 of 24 DISCOVER[®] positive samples - *Aspergillus niger* and *Candida albicans* mcfDNA, respectively. No bacterial or viral cfDNA was detected in the two samples with fungal cfDNA. The patient with *Candida albicans* cfDNA had matching blood culture results. This patients' empiric antibiotic regimen did not include an antifungal drug. The NGS detection of *Aspergillus niger* cfDNA could not be confirmed by blood culture. Since there was no clinical suspicion of an aspergillosis, no further microbiologic tests were done on this patient.

Potential value of positive NGS results

We recorded seven cases in which sequencing reported the mcfDNA of bacteria that could potentially have grown in blood cultures but that had negative blood culture results.

In three of seven cases, the microorganisms whose mcfDNA was detected by NGS were not found in routine microbiological screening and their presence was not explained by the patient's clinical course (*Kytococcus sedentarius*, *Gardnerella vaginalis*, *Aspergillus niger*). Out of the seven samples, four showed high read counts of mcfDNA of bacteria that were also found in routine microbiological screening samples and matched their clinical diagnosis (Table 4).

Impact of antibiotic therapy on pathogen detection

In 16 of the 58 infectious episodes (27.6%—Group 1, 2 and 3), patients were already on antibiotic treatment when blood cultures and NGS samples were collected (5 in group 1, 9 in group 2, and 2 in group 3, Supplementary Table S2). Blood cultures did not exhibit growth, nor could mcfDNA be detected, in 11 of those 16 pre-treated cases (only group 2 and 3). Bacteria grew in the blood cultures of 5 of 16 patients (all group 1) despite prior antibiotic therapy (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter ursingii* and *Staphylococcus epidermidis*). Cultures from three of these five patients grew bacteria resistant to the empiric therapy chosen, of which two were due to an expected resistant phenotype. DISCOVER[®] results were congruent in three of five cases (Table 3). McfDNA was detected in 5 of the 16 pretreated samples (31.25%) (*Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, CMV and *Gardnerella vaginalis*).

In 42 of 58 infectious episodes (72.4%) no antibiotics had been administered prior to sampling. The detection rate here was 23.8% (10/42) for blood cultures while NGS detection rate was 38.1% (16/42).

DISCUSSION

In recent years, the collection of cell-free DNA from patient samples has found increasing application in clinical medicine, personalized medicine, tumor diagnostics, prenatal diagnostics or pathogen identification.^{20,24–27} Sequencing of mcfDNA may increase detection of fastidious bacteria such as anaerobes or intracellular organisms.^{20,28} Standard pediatric blood culture bottles used in our clinic and this study (BD BACTEC[™] Peds Plus[™])

Table 4. Matching clinical picture and routine microbiologic sampling to DISQVER® results in blood culture-negative cases.

Sample number	Group	Diagnosis	CRP (mg/l), IL-6 (pg/ml), Leukocytes (/μl)	Antibiotic prior to sampling	Empiric therapy –adequate?	Microbiology results, other than blood culture	Next-Generation sequencing result	Plausibility of NGS results
Concordance between NGS, microbiology (other than BC) and clinical course								
88	2	Chorioamnionitis, microcolon, small bowel perforation	248, 15844, 3050	No	Yes Van + Mero	Anal swab— <i>Enterobacter cloacae</i> complex, <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i>	Yes
101	2	Gastric perforation, pulmonary hemorrhage, meconium plug syndrome, inguinal hernia	382, 1874, 2500	No	Yes Van + Pip/Taz	Pharyngeal swab— <i>Klebsiella oxytoca</i> Anal swab - <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Yes
122	2	Meconium ileus, necrotizing enterocolitis, small bowel perforation	20, 257, 16150	No	Yes Van + Pip/Taz	Pharyngeal swab— <i>Klebsiella oxytoca</i> Anal swab— <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Citrobacter freundii</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Salmonella enterica</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	Yes
133	2	Sepsis, biventricular heart failure	15, 426836, 7800	No	Yes Van + Pip/Taz	Pharyngeal rinse— <i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	Yes
Discordance between NGS, microbiology (other than BC) and clinical course								
14	2	Sepsis	67, 1367, 15040	No	Yes Amp/Sul	None	<i>Kytococcus sedentarius</i>	No
103	2	Left-sided congenital diaphragmatic hernia	28, 55, 18320	Yes	Yes Van + Pip/Taz	Skin and anal swab—Flora	<i>Gardnerella vaginalis</i>	No
111	3	Suspected late onset sepsis	<0.6, 3.8, 17100	No	No therapy	None	<i>Aspergillus niger</i>	No

NGS detected mcfDNA in seven cases while BCs remained negative. Antibiotics were administered to one of seven patients before sampling. Criteria for the plausibility of NGS results—concordance with microbiology and clinical course—were met by four of seven samples. Cases with mcfDNA of microorganisms not found in other microbiologic samples or unexplained by clinical course were deemed implausible (3/7). As NGS does not yield antibiotic susceptibilities, wild-type susceptibilities were assumed for evaluation of adequacy of empiric antibiotic therapy. Flora: this refers to bacteria commonly found at the target site. These are considered non-pathogenic if confined to that site, e.g., *Staphylococcus epidermidis* found in a skin swab. *Enterobacter cloacae* complex: Seven species of the genus *Enterobacter* belong to the *Enterobacter cloacae* complex (ECLCO): *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis*, *E. mori*. These species share phenotypic and, importantly, genotypic characteristics. MALDI-TOF MS often identifies ECLCO but may fail to reliably identify the different species that comprise the complex. Molecular methods like PCR or sequencing identify the genetic differences within the complex and can thus more reliably determine which species of ECLCO is present. For this reason, *Enterobacter cloacae* detected in blood culture is often reported as ECLCO, while NGS often reports the same bacteria to the exact species of ECLCO. This difference is of no clinical or therapeutic concern.

Van Vancomycin, Pip/Taz Piperacillin/Tazobactam, Amp/Sul Ampicillin/Sulbactam, Mero Meropenem, CRP C-reactive protein, IL-6 interleukin 6, NGS next-generation sequencing, BC blood culture.

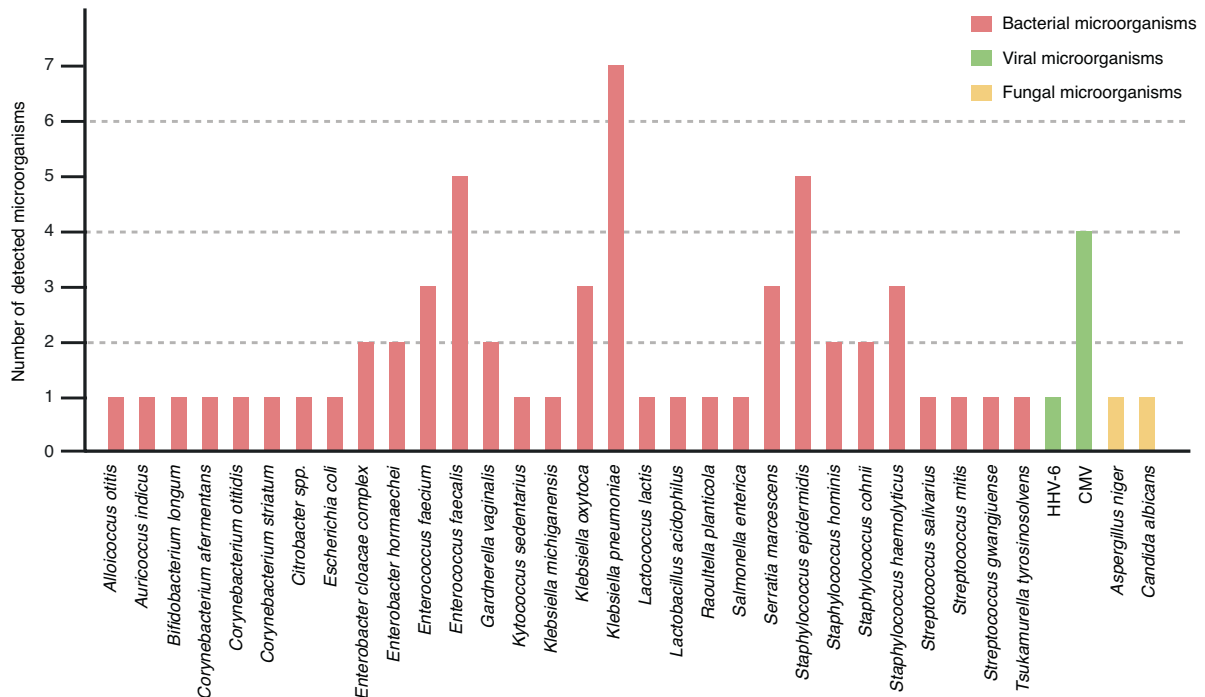


Fig. 2 Microorganisms detected by DISQVER® mcfDNA sequencing. In the 24 positive DISQVER® results, 29 different bacterial microorganisms, along with two different viral and two different fungal microorganisms, were detected.

contain an aerobic environment, since most bacterial infections are caused by aerobic or facultative anaerobic bacteria. This decreases the chance of culturing strictly anaerobic bacteria commonly seen in intraabdominal infections.^{29,30} Due to competition among various bacteria in the shared culture medium blood cultures often identify only a single bacterial species (Supplementary Table S1).³¹ NGS reported mcfDNA of multiple pathogens, especially in premature patients or patients with intraabdominal infections. Whether this represents a true polymicrobial infection, common in patients with intraabdominal infections,³² or transient bacteremia caused by dysfunctional or immature mucosal barriers, remains unclear.

NGS has the potential to increase sensitivity in diagnosis of sepsis or BSIs, since it is applicable even after initiation of an antibiotic regimen, whereas culture may yield limited results in this setting.^{20,33} Contrarily, we did not observe a higher rate of pathogen detection using sequencing compared to blood cultures in patients who received antibiotics prior to sampling in this study. Previous studies described a relatively short half-life of human cfDNA of 16 min to 2 h.^{34,35} The short half-life of cfDNA or the absence of a metastatic focus of infection with continuous release of mcfDNA might explain why we did not observe an increased detection rate using NGS compared to culture in patients treated with antibiotics prior to sample collection.³⁶

The challenge associated with this emerging technology lies in comprehending whether the identified pathogen is either of acute clinical relevance, or the result of a contamination of reagents/laboratory processes, or reflects a transient bacteremia that arises from an impaired function of mucosal barriers.²⁶ The detection of *Aspergillus niger* cfDNA in NGS, without any clinical signs of aspergillosis, is likely indicative of contamination. To decrease the risk of plasma sample contamination in future studies, we recommend the use of sampling vials containing stabilization media which inactivates pathogens but preserves nucleic acid for NGS. Additionally, it's crucial to assess whether mcfDNA represents active infection or merely remnants of pathogens previously

cleared by immune cells in situations of suspected impaired mucosal barrier function, as it is often seen in this patient population.²⁰ This is an important issue which still needs to be further investigated when using NGS for sepsis diagnosis in preterm and term infants. To prevent overtreatment of potential flora or contaminants detected by NGS, we recommend seeking guidance from an infectious disease specialist or microbiologist as well as considering the clinical context and other microbiologic findings when making treatment decisions.

DISQVER® has the potential to detect mcfDNA of bacteria that have been traditionally classified as part of the normal flora, rarely pathogenic or fastidious bacteria missed by conventional cultural diagnostic techniques. At present it is unclear how relevant the detection of mcfDNA from such bacteria is for clinicians and patients. By way of example, we may refer to the detection of *Corynebacterium otitis*, *Alloicoccus otitis*, *Raoultella planticola* and *Corynebacterium afermentans* mcfDNA in the DISQVER® samples, while cultures grew *E. cloacae* complex, *S. epidermidis* and *S. capitis*. In the setting of sepsis diagnosis the NGS results were deemed implausible since it likely represents detection of flora rather than pathogenic bacteria (Patient 89, Table 3).

Currently, one of the main limitations of DISQVER® is its inability to provide information regarding antimicrobial susceptibility. In the future, it may be possible not only to identify the pathogen, but also to detect resistance genes or even patterns of specific mcfDNA that can be associated with certain patterns of previously described antimicrobial resistance. DNA fragments containing genes that confer resistance to certain antibiotics can be detected by sequencing.³⁷ However, it is known that genotypic resistance to specific antibiotics may not always be expressed phenotypically (silent mutation) and phenotypic resistance is not easily predictable from the genotype, since it is infrequently linked to single genes.^{38–40} Future studies are needed to determine whether sequencing mcfDNA can predict antibiotic resistance either by detection of resistance genes or by genotype-phenotype matching, and how this will impact clinical decision-making.

The identification of a pathogen alone, even without susceptibility results, may also have significant clinical implications such as modification or escalation of treatment. A good example is the identification of a fungal pathogen, like *Candida albicans*, since empiric antibiotic treatments usually do not contain an antifungal drug (patient 57, Table 3 or Supplementary Table S1). Another example from this study is an infection with *Serratia marcescens* in a preterm infant initially treated with ampicillin/sulbactam and tobramycin (patient 116, Table 3 or Supplementary Table S1). The typical empiric regimen for neonatal sepsis comprises ampicillin/sulbactam combined with an aminoglycoside⁴¹ (tobramycin in our setting). However, current EUCAST recommendations advise against aminoglycoside monotherapy for severe infections like sepsis.^{42,43} Given *Serratia marcescens*' intrinsic resistance to ampicillin/sulbactam,⁴⁴ following the empiric regimen would essentially result in monotherapy. Furthermore, there is a growing trend of aminoglycoside resistance among *Serratia marcescens* strains.^{45,46} It is important to note that since this was primarily a feasibility study, the NGS results were not reported back to the clinicians in real-time and thus did not influence clinical decision-making. In a retrospective analysis of the empiric antibiotic therapy, clinical picture, blood culture, screening and NGS results by infectious disease experts and microbiologists this NGS result would have led to a change in therapy.

The present study revealed seven cases in which a positive sequencing result was obtained, and blood cultures were negative. Four of seven individuals presented considerable read counts of mcfDNA from the same bacteria identified in routine microbiological sampling and that was consistent with their clinical diagnosis (Table 4), suggesting that NGS may have identified infections that were missed by culture. In retrospect, the empiric antibiotic therapies subsequently initiated in these patients were adequate in 6 out of 7 cases thus NGS results would have not led to a change in therapy. The remaining case, where therapy might have been inadequate, was deemed a contaminant (*Aspergillus niger*).

Additionally, we recorded four cases in which a positive blood culture was reported but NGS was negative. Among these four cases, two involved the growth of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in culture, while NGS results were negative. In the remaining two cases *Staphylococcus epidermidis* was cultured in a patient with a suspected CRBSI but NGS did not generate reads for this bacterium. Considering the possibility of CRBSI, the time to positivity (TTP) of the two BCs was evaluated. The staphylococci in both cultures exhibited growth within 17 and 37 h, respectively. The clinical suspicion of a CRBSI and this relatively short TTP may hint at a true bacteremia rather than contamination.⁴⁷ (Sample 3 and 4, Supplementary Table S2). The DISQVER® results of these four cases were considered unlikely.

In our study, we have discovered an additional potential application for NGS, namely, the identification of viral pathogens (DNA viruses), such as CMV. It was not the focus of our study whether DISQVER® could serve as an appropriate diagnostic tool for detecting infections caused by DNA viruses but this topic warrants further investigation in future research.

Some limitations in the design of this study need to be acknowledged. The heterogeneity of previously published LOS definitions²³ and the relatively unspecific clinical symptoms associated with bloodstream infections and clinical sepsis might be a limitation for the group allocation in our study. It is noteworthy that 8 of 26 patients in group 2, who exhibited clinical signs of sepsis and elevated inflammatory markers, received antibiotic therapy for only 5 days. These patients demonstrated clinical improvement and survived, suggesting that their initial sepsis diagnosis may have been less likely. In order to compare the diagnostic value of blood cultures and NGS, the validation group patients should have undergone blood culture collection. However, this was not feasible due to ethical considerations.

Consequently, we lack information about potential blood culture contaminations in the validation group while the mcfDNA levels in most patients in this group were too low for detection by DISQVER®. In adults DISQVER® has the potential to distinguish between minimal amounts of mcfDNA and levels of mcfDNA that are clinically significant and indicative of infection.¹⁷ Additional data is needed to determine whether the DISQVER® algorithm needs to be further adapted to lower neonatal mcfDNA thresholds, sequencing libraries updated or if a higher amount of plasma is required to reduce the high number of samples that were not processable by NGS (52/134) and reduce the detection or reporting of flora. The lack in sufficient cfDNA in the sample material, especially in the validation group, might be attributed to usually lower cfDNA concentrations in healthy individuals in comparison to septic patients, as already observed for adult patients but recently also shown for neonates.⁴⁸ Additionally, due to the limited sample material it was not possible to compare to duplicates/pairs for blood culture and for NGS or even to a third diagnostic technique, such as PCR, which would have been especially useful in case of discordant results. Furthermore, the study population was heterogeneous, including term and preterm neonates, and neonates with congenital anomalies such as congenital diaphragmatic hernia and congenital heart defects, as well as patients who did or did not undergo surgical therapy.

CONCLUSION

Our findings demonstrate that DISQVER® can detect mcfDNA from both pathogenic and likely non-pathogenic bacteria, fungi and viruses, even when blood cultures yield negative results. While NGS has the potential to refine conventional diagnostic methods, such as in intraabdominal polymicrobial infections, and may lead to improved, pathogen-directed treatment, our study also revealed false negative NGS results. Notably, we found no improved detection rates with NGS compared to blood culture in patients who had antibiotics prior to sample collection. In summary, interpreting NGS results remains challenging, underscoring the necessity for consultation with infectious disease specialists and integration with clinical and microbiological data to ensure optimal clinical utility.

DATA AVAILABILITY

The datasets generated and analyzed during the current study are not publicly available. Most data are available in the supplementary tables. Further information is available from the corresponding author upon reasonable request.

REFERENCES

- Greenberg, R. G. et al. Late-onset sepsis in extremely premature infants: 2000–2011. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **36**, 774–779 (2017).
- Boghossian, N. S. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight infants from singleton and multiple-gestation births. *J. Pediatr.* **162**, 1120–1124 (2013).
- Fleischmann, C. et al. Global incidence and mortality of neonatal sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Arch. Dis. Child.* **106**, 745–752 (2021).
- Cohen-Wolkowicz, M. et al. Early and late onset sepsis in late preterm infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, 1052–1056 (2009).
- Stoll, B. J. et al. Late-onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* **110**, 285 LP–285291 (2002).
- Wynn, J. L. Defining neonatal sepsis. *Curr. Opin. Pediatr.* **28**, 135 (2016).
- Coggins, S. A. & Glaser, K. Updates in late-onset sepsis: risk assessment, therapy, and outcomes. *Neoreviews* **23**, 738–755 (2022).
- Schmatz, M. et al. Surviving sepsis in a referral neonatal intensive care unit: association between time to antibiotic administration and in-hospital outcomes. *J. Pediatr.* **217**, 59–65.e1 (2020).
- Carr, J. P., Burgner, D. P., Hardikar, R. S. & Buttery, J. P. Empiric antibiotic regimens for neonatal sepsis in Australian and New Zealand neonatal intensive care units. *J. Paediatr. Child Health* **53**, 680–684 (2017).

10. Patel, S. J. et al. Antibiotic use in neonatal intensive care units and adherence with Centers for Disease Control and Prevention 12 step campaign to prevent antimicrobial resistance. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **28**, 1047–1051 (2009).
11. Reyman, M. et al. Effects of early-life antibiotics on the developing infant gut microbiome and resistome: a randomized trial. *Nat. Commun.* **13**, 893 (2022).
12. Schelonka, R. L. et al. Volume of blood required to detect common neonatal pathogens. *J. Pediatr.* **129**, 275–278 (1996).
13. Mukhopadhyay, S. et al. Time to positivity of blood cultures in neonatal late-onset bacteraemia. *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed.* **107**, 583–588 (2022).
14. Persad, E. et al. Interventions to minimize blood loss in very preterm infants—a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **16**, e0246353 (2021).
15. Patel, R. M. et al. Association of red blood cell transfusion, anemia, and necrotizing enterocolitis in very low-birth-weight infants. *JAMA* **315**, 889–897 (2016).
16. Brenner, T. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in sepsis (Next GeneSIS-Trial). *Medicine* **97**, e9868 (2018).
17. Grumaz, S. et al. Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock. *Crit. Care Med.* **47**, e394–e402 (2019).
18. Agudelo-Pérez, S., Fernández-Sarmiento, J., Rivera León, D. & Peláez, R. G. Metagenomics by next-generation sequencing (mNGS) in the etiological characterization of neonatal and pediatric sepsis: a systematic review. *Front. Pediatr.* **11**, 1011723 (2023).
19. Chen, L. et al. Metagenomic next-generation sequencing for the diagnosis of neonatal infectious diseases. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0119522 (2022).
20. Han, D. et al. Liquid biopsy for infectious diseases: a focus on microbial cell-free DNA sequencing. *Theranostics* **10**, 5501 (2020).
21. Leistner, R., Piening, B., Gastmeier, P., Geffers, C. & Schwab, F. Nosocomial infections in very low birthweight infants in Germany: current data from the National Surveillance System NEO-KISS. *Klin. Pediatr.* **225**, 75–80 (2013).
22. Kipfmüller, F. et al. Role of neutrophil CD64 index as a screening marker for late-onset sepsis in very low birth weight infants. *PLoS One* **10**, 1–15 (2015).
23. Wynn, J. L. et al. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr. Crit. Care Med.* **15**, 523 (2014).
24. Wu, J. et al. Tumor circulome in the liquid biopsies for cancer diagnosis and prognosis. *Theranostics* **10**, 4544 (2020).
25. Guy, C. et al. Prenatal cell-free DNA screening for fetal aneuploidy in pregnant women at average or high risk: results from a large US clinical laboratory. *Mol. Genet. Genom. Med.* **7**, e545 (2019).
26. Pietrzak, B., Kawacka, I., Olejnik-Schmidt, A. & Schmidt, M. Circulating microbial cell-free DNA in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **24**, 3051 (2023).
27. Zhu, Y. et al. Diagnostic performance and clinical impact of metagenomic next-generation sequencing for pediatric infectious diseases. *J. Clin. Microbiol.* **61**, e0011523 (2023).
28. He, P. et al. Comparison of metagenomic next-generation sequencing using cell-free DNA and whole-cell DNA for the diagnoses of pulmonary infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **12**, 1684 (2022).
29. Zaidi, A. K. M., Knaut, A. L., Mirrett, S. & Reller, L. B. Value of routine anaerobic blood cultures for pediatric patients. *J. Pediatr.* **127**, 263–268 (1995).
30. Marcus, G. et al. Intra-abdominal infections: the role of anaerobes, enterococci, fungi, and multidrug-resistant organisms. *Open Forum Infect. Dis.* **3**, ofw232 (2016).
31. Wang, J. et al. Swine-derived probiotic *Lactobacillus plantarum* inhibits growth and adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* and mediates host defense. *Front. Microbiol.* **9**, 1364 (2018).
32. Fukushima, S. et al. Clinical and microbiological characteristics of polymicrobial bacteremia: a retrospective, multicenter study. *Infection* **50**, 1233–1242 (2022).
33. Wang, L. et al. Plasma microbial cell-free DNA sequencing technology for the diagnosis of sepsis in the ICU. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 487 (2021).
34. Han, D. S. C. & Lo, Y. M. D. The nexus of cfDNA and nuclease biology. *Trends Genet.* **37**, 758–770 (2021).
35. Solanky, D. et al. Utility of plasma microbial cell-free DNA decay kinetics after aortic valve replacement for *Bartonella endocarditis*: case report. *Front. Trop. Dis.* **3**, 842100 (2022).
36. Eichenberger, E. M. et al. Microbial cell-free DNA identifies etiology of blood-stream infections, persists longer than conventional blood cultures, and its duration of detection is associated with metastatic infection in patients with staphylococcus aureus and gram-negative bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **74**, 2020–2027 (2022).
37. Grumaz, S. et al. Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med.* **8**, 1–13 (2016).
38. Alonso, M. et al. Isolation of *Mycobacterium tuberculosis* strains with a silent mutation in *rpoB* leading to potential misassignment of resistance category. *J. Clin. Microbiol.* **49**, 2688–2690 (2011).
39. Jeukens, J. et al. Genomics of antibiotic-resistance prediction in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1435**, 5–17 (2019).
40. Mahfouz, N., Ferreira, I., Beisken, S., von Haeseler, A. & Posch, A. E. Large-scale assessment of antimicrobial resistance marker databases for genetic phenotype prediction: a systematic review. *J. Antimicrob. Chemother.* **75**, 3099–3108 (2020).
41. AWMF. Leitlinie der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin (GNPI) der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie (DGPI) der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin (DGKJ) und der Deutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (DGGG), Bakterielle Infektionen bei Neugeborenen, accessed: 11 May 2024. Available at: https://register.awmf.org/assets/guidelines/024-008l_S2k_Bakterielle_Infektionen_Neugeborene_2021-03-abgelaufne.pdf (2021).
42. EUCAST. Guidance document breakpoints in brackets. Accessed 11 May 2024. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Breakpoints_in_brackets.pdf (2021).
43. EUCAST. Guidance Document on Implementation and Use of the Revised Aminoglycoside Breakpoints. Accessed 11 May 2024. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Guidance_documents/Aminoglycoside_guidance_document_20200121.pdf (2020).
44. EUCAST. Definitions of 'Expected Phenotypes', Version 1.2. Accessed 11 May 2024. Available at: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Expert_Rules/2023/Expected_Resistant_Phenotypes_v1.2_20230113.pdf (2023).
45. Celine Herra, M. S. & Frederick R. Falkner, B. A. *Serratia marcescens*—infectious disease and antimicrobial agents. Accessed 14 March 2023. Available at: <http://www.antimicrobe.org/b26.asp> (2023).
46. Tavares-Carreón, F., De Anda-Mora, K., Rojas-Barrera, I. C. & Andrade, A. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ* **11**, e14399 (2023).
47. Doern, G. V. 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.* **33**, e00009–e00019 (2020).
48. Lenz, M. et al. cfDNA and DNases: new biomarkers of sepsis in preterm neonates —a pilot study. *Cells* **11**, 192 (2022).

ACKNOWLEDGEMENTS

We like to thank all colleagues of the neonatology and intensive care medicine department of the University Hospital Bonn for their assistance in blood sample collection throughout this project. The figures in this publication were created using Biorender.com, in compliance with publication and licensing rights.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors contributed to the study conception, design, sample or data acquisition. The draft of this manuscript was written by Julian Balks and changed according to the comments and input of co-authors. All co-authors approved of this final manuscript.

FUNDING

The authors declare that no funds, grants, or other support were received during the preparation of this manuscript. The costs of the sequencing studies were covered by Noscendo. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

COMPETING INTERESTS

We must disclose a potential conflict of interest: S.G. is the co-founder and an employee of Noscendo, the company behind the DISQVER® platform. Noscendo covered the costs of the sequencing studies. S.M. and U.N. are also employees of Noscendo. There are no further conflicts of interest regarding the remaining authors. We are committed to transparency and want to assure you that this potential conflict of interest has not influenced the integrity or objectivity of our findings.

CONSENT STATEMENT

Prior to their involvement in the study, written informed consent was obtained from parents or legal representatives, explicitly detailing the purpose and procedures of the research. Additionally, it was ensured that parents not only consented to their

child's participation but also explicitly agreed to the publication of the collected data for scientific or academic purposes.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41390-024-03448-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Florian Kipfmüller.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

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



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Supplementary Material: Microbial cell-free DNA-sequencing as an addition to conventional diagnostics in neonatal sepsis

Julian Balks ^{1,2}, Silke Grumaz ³, Sonia Mazzitelli ³, Ulrike Neder ³, Lotte Lemloh ¹, Tamene Melaku ¹, Kirsten Glaser ⁴, Andreas Mueller ¹, Florian Kipfmueller ^{*1}

Affiliations

¹ Division of Neonatology and Pediatric Intensive Care, Children's Hospital, University of Bonn, Bonn, Germany

² Institute of Medical Microbiology, Immunology and Parasitology (IMMIP), University Hospital Bonn, Bonn, Germany

³ Noscendo, Duisburg, Germany

⁴ Division of Neonatology, Department of Women's and Children's Health, University Medical Center Leipzig, Leipzig, Germany

Corresponding Author

Florian Kipfmueller MD

Department of Neonatology and Pediatric Intensive Care,

Children's Hospital, University of Bonn,

Venusberg-Campus 1, 53127 Bonn, Germany

Phone: +49 – 228 – 287 37843

E-mail: florian.kipfmueller@ukbonn.de

Supplementary Table S1 - Positive NGS results

Sample number	Group	Gestational age (weeks)	Pre-maturity	Birth weight (kg)	Diagnosis	Antibiotic prior to sampling	Blood culture result	NGS results with read counts	mcfDNA of multiple pathogens
2	1	29.8	VPT	1.27	DCDA, sepsis	No	Klebsiella oxytoca	Klebsiella oxytoca 1054, Klebsiella pneumoniae 664, Staphylococcus epidermidis 443	yes
16	1	36.3	LPT	2.40	LUTO	No	Enterobacter cloacae complex	Enterobacter cloacae 4547, Staphylococcus hominis 2185, Enterobacter hormaechei 2042, Staphylococcus epidermidis 698, Streptococcus salivarius 437, Enterococcus faecalis 296, Streptococcus mitis 187, Klebsiella pneumoniae 56	yes
57	1	38.8	Term	3.91	MMIHS	No	Candida albicans	Candida albicans 211	no
89	1	23.3	EPT	0.75	NEC, IVH, RDS, PDA, SBS	No	Enterobacter cloacae complex, Staphylococcus capitis, Staphylococcus epidermidis	Corynebacterium otitidis 460, Alloiooccus otitis 65, Raoultella planticola 77, Corynebacterium afermentans 38	Yes
104	1	24.8	EPT	0.74	Omphalocele	Yes	Klebsiella pneumoniae	Klebsiella pneumoniae 464	No
106	1	27.1	EPT	0.94	Intestinal stenosis and resection	No	Staphylococcus epidermidis strain I, Staphylococcus epidermidis strain II (two phenotypically different strains)	Staphylococcus epidermidis 2652, Bifidobacterium longum 485, Klebsiella pneumonia 272, Streptococcus gwangjuense 217, Serratia marcescens 182, Staphylococcus haemolyticus 139, Corynebacterium striatum 72, Enterococcus faecalis 45, Gardnerella vaginalis 45	Yes
107	1	38.1	Term	3.40	Hirschsprung's disease	No	Enterobacter cloacae	Enterobacter spp. 629	No

12	1	35.0	LPT	1.30	Esophageal atresia	No	Serratia marcescens	Staphylococcus haemolyticus 4250, Staphylococcus epidermidis 1363, Serratia marcescens 1214, Enterococcus faecium 20	Yes
116	1	23.1	EPT	0.56	Sepsis	Yes	Serratia marcescens	Serratia marcescens 19747	No
121 *	1	35.1	LPT	1.13	Leftsided CDH, PPHN, ECMO	Yes	Acinetobacter ursingii	CMV 4309	No
134	1	37.8	Term	2.96	NEC	Yes	Escherichia coli	Escherichia coli 206	No
6	2	24.1	EPT	0.74	CMV pneumonia, PDA, ROP, PVL, BPD	No	No growth	CMV 273	No
14	2	40.7	Term	3.68	LOS	No	No growth	Kytococcus sedentarius 33	No
88	2	23.1	EPT	0.48	Chorioamnionitis, microcolon, IP	No	No growth	Enterococcus faecalis 820, Enterobacter hormaechei 302	Yes
101	2	24.4	EPT	0.47	EPT, abdominal perforation, ROP, pulmonary hemorrhage, MPS, cholestasis, IH, BPD	No	No growth	Klebsiella pneumoniae 977, Lactococcus lactis 68, Citrobacter spp. 58, Enterococcus faecalis 42	Yes
103	2	38.5	Term	3.40	Leftsided CDH	Yes	No growth	Gardnerella vaginalis 27	No
119 *	2	35.1	LPT	1.13	Leftsided CDH, PPHN, ECMO	No	No blood culture collected	CMV 65	No
122	2	27.0	EPT	1.13	IP, meconium ileus, NEC	No	No growth	Klebsiella oxytoca 20574, Klebsiella pneumoniae 1986, Lactobacillus acidophilus 535, Salmonella enterica 149, Enterococcus faecium 36	Yes
133	2	27.0	EPT	1.06	Sepsis, VSD	No	No growth	Klebsiella pneumoniae 5533, Klebsiella michiganensis 3722, Klebsiella oxytoca 1471	Yes

13	3	35.7	LPT	2.40	Stueve-Wiedemann syndrome, PPHN	No	No blood culture collected	Staphylococcus epidermidis 216, Staphylococcus cohnii 99, Staphylococcus haemolyticus 42, Staphylococcus hominis 68, Enterococcus faecalis 28	Yes
83	3	33.5	LPT	1.73	Maternal TCA use	No	No blood culture collected	Human betaherpesvirus 6B 447	No
111	3	38.4	Term	3.47	LOS	No	No growth	Aspergillus niger 17	No
47	4	39.4	Term	3.90	None	No	No blood culture collected	Staphylococcus cohnii 631	No
49	4	39.8	Term	3.80	None	No	No blood culture collected	Auricoccus indicus 24, Tsukamurella tyrosinosolvens 21	Yes

Positive NGS results. The table depicts the 24 positive NGS results with read counts (number of times a specific nucleotide sequence has been read) with an overview about the patients diagnoses, gestational age, weight as well as blood culture results. NGS detected mcfDNA of multiple microorganisms in 11 of 24 positive cases. The presence of mcfDNA of multiple bacteria was associated with abdominal focus of infection (6/11) and prematurity (10/11). * = same patient different septic episodes, Abbreviations: extremely preterm (EPT <28wks), very preterm (VPT 28-32 wks), late preterm (LPT 32-37wks), ventricular septal defect (VSD), congenital diaphragmatic hernia (CDH), late onset sepsis (LOS), lower urinary tract obstruction (LUTO), necrotizing enterocolitis (NEC), megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (MMIHS), retinopathy (ROP), periventricular leukomalacia (PVL), bronchopulmonary dysplasia (BPD), persistent ductus arteriosus (PDA), Tetralogy of Fallot (TOF), intraventricular hemorrhage (IVH), respiratory distress syndrome (RDS), persistent pulmonary hypertension (PPHN), renal failure (RF), extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), intestinal perforation (IP), Left heart hypoplastic syndrome (LHS), short bowel syndrome (SBS), meconium plug syndrome (MPS), inguinal hernia (IH), tricyclic antidepressants (TCA), dichorionic diamniotic twins (DCDA), Cytomegalovirus (CMV). Enterobacter cloacae complex: Seven species of the genus Enterobacter belong to the Enterobacter cloacae complex (ECLCO): E. cloacae, E. asburiae, E. hormaechei, E. kobei, E. ludwigii, E. nimipressuralis, E. mori. These species share phenotypic and, importantly, genotypic characteristics. MALDI-TOF MS often identifies ECLCO but may fail to reliably identify the different species that comprise the complex. Molecular methods like PCR or sequencing identify the genetic differences within the complex and can thus more reliably determine which species of ECLCO is present. For this reason, Enterobacter cloacae detected in blood culture is often reported as ECLCO, while NGS often reports the same bacteria to the exact species of ECLCO. This difference is of no clinical or therapeutic concern.

Supplementary Table S2 – Cohort overview

Sample number	Gestational age (weeks)	Birthweight (in grams)	Diagnosis	Group	Antibiotic prior to sampling	Antibiotic therapy and duration	Survival	Blood culture result	NGS detection	Microbiology results, other than blood culture	Virologic diagnostic
2	29.8	1270	VPT, DCDA, sepsis	1	no	Van + Pip/Taz-> Van + Mero 10d	survived	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	CSF: neg.	TS: resp. panel neg.
3 *	38.0	3160	rightsided CDH, CRBSI	1	no	Van + Pip/Taz + Mico -> Van + Mero + Ampho B 14d	deceased	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negative	TS: neg.	/
4 *	38.0	3160	rightsided CDH, CRBSI	1	yes	Line + Mero + Ampho B 10d	deceased	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	negative	TS: yeasts	/
16	36.2	2400	LPT, LUTO	1	no	Van + Pip/Taz 10d	survived	<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Streptococcus salivarius</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Streptococcus mitis</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Flora	/
57	38.8	3910	MMIHS	1	no	Van / Mero -> + Fluco 14d	survived	<i>Candida albicans</i>	<i>Candida albicans</i>	Thr, AS: <i>Citrobacter koseri</i>	/
89 =	23.2	750	EPT, NEC, IVH, RDS, PDA, SBS	1	no	Van + Pip/Taz -> Van + Mero 36d	survived	<i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Corynebacterium otitidis</i> , <i>Alloicoccus otitis</i> , <i>Raoultella planticola</i> , <i>Corynebacterium afermentans</i>	Thr: <i>Enterobacter cloacae</i>	/
104	24.8	740	EPT, omphalocele	1	yes	Van + Pip/Taz -> Van + Mero 23d	deceased	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	TS, AS: <i>Klebsiella pneumoniae</i> I+II (two phenotypically different strains)	/

106	27.1	940	EPT, intestinal stenosis and resection	1	no	Van + Mero 9d	survived	<i>Staphylococcus epidermidis</i> strain I, <i>Staphylococcus epidermidis</i> strain II (two phenotypically different strains)	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Streptococcus gwangjuense</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Corynebacterium striatum</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Gardnerella vaginalis</i>	Thr, AS: <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Serratia marcescens</i>	/
107	38.1	3400	Hirschsprung's disease	1	no	Van + Mero 11d	survived	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter</i> spp.	ThrR, Thr: <i>Enterobacter cloacae</i> , AS: <i>Enterobacter cloacae</i> I + II (two phenotypically different strains)	Thr: resp. panel neg.
112	35.0	1300	LPT, esophageal atresia	1	no	Van + Pip/Taz 11d	survived	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Serratia marcescens</i> , <i>Enterococcus faecium</i>	AS, Axilla, Thr: <i>Serratia marcescens</i>	/
114	31.0	830	LPT, TOF	1	no	Van + Pip/Taz (1d) → Van + Mero 1d	deceased	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negative	TS: <i>Staphylococcus aureus</i>	/
116	23.1	560	EPT	1	yes	Amp/Sul (7d) + Tobra (1d) → Van + Mero 3d	deceased	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Serratia marcescens</i>	CVC: <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus capitis</i> ; TS: <i>Serratia marcescens</i>	/
121 *	35.1	1130	LPT, PPHN, DCDA	1	yes	Van + Pip/Taz → Van + Mero 22d	deceased	<i>Acinetobacter ursingii</i>	Human Cytomegalovirus	TS, AS: <i>Klebsiella oxytoca</i>	/
125	26.7	750	EPT, T21, VSD	1	no	Van + Pip/Taz → Van + Mero 10d	survived	<i>Escherichia coli</i>	negative	AS: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i> ; Thr: <i>Klebsiella oxytoca</i>	/
134	37.8	2960	NEC	1	yes	Amp/Sul (3d) → Van + Mero 16d	survived	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	Thr: <i>Escherichia coli</i>	/
5	32.1	1200	LPT, gastroschisis	2	no	Van + Mero 10d	survived	no detection	negative	/	/

6 *	24.1	741	EPT, PDA, ROP, PVL, BPD	2	no	Van + Pip/Taz 12d	deceased	no detection	Human betaherpesvirus 5 (CMV)	/	Thr: Covid-19 neg.; U, TS: CMV pos.
7 *	24.1	741	EPT, PDA, ROP, PVL, BPD, CMV pneumonia	2	no	Van + Pip/Taz + Mico + Valganci 15d	deceased	no detection	negative	/	Thr: resp. panel and Covid-19 neg.
10	35.1	2920	LPT, neck teratoma	2	yes	Amp/Sul 17d	survived	no detection	negative	TS: <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	/
11	38.7	3400	leftsided CDH	2	no blood culture collected	Van + Mero 9d	survived	no blood culture collected	negative	/	/
12	27.7	620	EPT, IVH, PDA	2	no	Van + Pip/Taz 10d	survived	no detection	negative	Thr: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	ThrR: resp. panel neg.
14	40.7	3680	LOS	2	no	Amp/Sul 5d	survived	no detection	<i>Kytococcus sedentarius</i>	/	/
17	35.4	2470	VPT, LOS, RDS1°	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no detection	negative	/	/
19	34.5	2300	VPT, RDS	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no detection	negative	SS: <i>Serratia marcescens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	/
25	26.7	1110	EPT, DCDA, PPHN, PDA, IVH	2	no blood culture collected	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no blood culture collected	negative	Thr, AS, SS: <i>Klebsiella aerogenes</i>	U: CMV neg.
34	39.0	3480	/	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no detection	negative	/	Thr: Covid-19 neg.
39 *	24.1	650	EPT, IP, PDA, RF	2		Van + Mero 10d	survived	no blood culture collected	negative	/	ThrR: resp. Panel neg.

					no blood culture collected						
40	35.0	3200	LPT, suspected LOS	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no detection	negative	TS: <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	/
60	38.1	4200	LHS	2	yes	Van + Mero + Mico 9d	survived	no detection	negative	/	Thr: Rhinovirus
82 =	23.2	750	EPT, NEC, IVH, RDS, PDA, SBS	2	yes	Amp/Sul + Tobra (2d) -> Van + Mero (10d) 12d	survived	no detection	negative	/	/
84 *	24.1	650	EPT, IP, RF, peritoneal dialysis	2	yes	Amp/Sul + Tobra (7d) -> Van + Mero (16d) 23d	survived	no detection	negative	/	/
87	36.7	3500	LPT	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	survived	no detection	negative	/	/
88	23.1	480	EPT, Amnioninfection syndrome, microcolon, IP	2	no	Van + Mero 10d	survived	no detection	<i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Enterobacter hormaechei</i>	AS: <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	/
101 *	24.4	470	EPT, abdominal perforation, ROP, pulmonary hemorrhage, MPS, cholestasis, IH, BPD	2	no	Amp/Sul + Tobra 5d	deceased	no detection	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Citrobacter spp.</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Thr: <i>Klebsiella oxytoca</i> ; AS: <i>Klebsiella oxytoca</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i>	Thr: resp. panel neg.; St: Enteritisvirus neg.

103	38.5	3400	leftsided CDH	2	yes	Van + Pip/Taz (5d) -> Van + Mero (12d) 17d	deceased	no detection	<i>Gardnerella vaginalis</i>	SS, AS: Flora	/
133	27.0	1060	EPT, sepsis	2	no	Van + Pip/Taz 1d	deceased	no detection	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Klebsiella michiganensis</i> , <i>Klebsiella oxytoca</i>	ThrR: <i>Klebsiella oxytoca</i>	/
1	34.1	1900	leftsided CDH	3	yes	Van + Mero 2d	deceased	no detection	negative	/	/
13	35.7	2400	LPT, Stueve- Wiedemann syndrome, PPHN	3	no blood culture collected	Amp/Sul + Tobra 2d	survived	no blood culture collected	<i>Staphylococcus epidermidis</i> , <i>Staphylococcus cohnii</i> , <i>Staphylococcus haemolyticus</i> , <i>Staphylococcus hominis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>	Thr: <i>Serratia marcescens</i>	/
18	32.7	2000	LPT, hyperbilirubinemia	3	no blood culture collected	Amp/Sul + Tobra 1d	survived	no blood culture collected	negative	/	/
20	24.8	650	EPT, DCDA	3	no	Van + Pip/Taz 2d	survived	no detection	negative	SS and NS: <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i>	/
21	26.2	990	EPT	3	no blood culture collected	Amp/Sul 3d	survived	no blood culture collected	negative	/	Thr: CMV neg.
25	34.5	3020	LPT, chylothorax, pneumothorax	3	no blood culture collected	Amp/Sul + Tobra 1d	survived	no blood culture collected	negative	/	/
33	33.4	1800	LPT, RDS, pneumothorax, PPHN	3	yes	Amp/Sul + Tobra 1d	survived	no detection	negative	/	Thr: Covid- 19 neg.
83	33.4	1730	LPT, maternal TCA therapy	3	no blood culture collected	Amp/Sul + Tobra 1d	survived	no blood culture collected	Human betaherpesvirus 6B	/	/
98	39.0	2570	IVH 3°, PDA	3		Amp/Sul + Tobra 1d	survived	no blood culture collected	negative	SS, Thr, AS: neg.	/

					no blood culture collected						
99	30.5	1350	VPT, TTTS, IVH 1°	3	no	Amp/Sul + Tobra 2d	survived	no detection	negative	SS, Thr, AS: neg.	/
111	38.4	3470	suspected LOS	3	no	Amp/Sul + Tobra 2d	survived	no detection	<i>Aspergillus niger</i>	/	Thr: Covid-19 neg.
130	26+6	800	EPT, TTTS acceptor	3	no blood culture collected	Van + Mero 2d	survived	no blood culture collected	negative	SS and Thr: <i>Staphylococcus haemolyticus</i>	/
23	24.8	500	EPT, ASD, PDA, sepsis	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	Thr and AS: <i>Escherichia coli</i> , <i>Enterobacter cloacae</i>	ThrR: resp. panel neg.
29	39.7	2950	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
30	40.2	3280	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	WS neck: no growth	/
32	40.1	3450	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
44	38.8	3200	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
47	39.4	3150	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	<i>Staphylococcus cohnii</i>	/	/
49	39.8	3770	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	<i>Auricoccus indicus</i> , <i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	/	/
51	39.7	3050	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
58	38.1	3480	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
61	39.0	3350	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
65	40.0	3580	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
69	40.1	3220	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
70	39.2	3800	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
72	39.2	3640	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
73	40.2	3450	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/

74	38.8	3170	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
79	39.7	3075	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
81	26.2	740	EPT, MCMA	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	Thr: <i>Staphylococcus aureus</i> , AS: <i>Klebsiella pneumoniae</i>	/
90	40.2	3900	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
92	39.7	3275	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
93	39.4	3150	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
95	40.2	3600	none	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/
97	38.1	4050	leftsided CDH	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	SS, Thr, AS: neg.	/
115 ⁼	23.2	750	EPT, NEC, IVH, RDS, PDA, SBS	4	no	none	survived	no blood culture collected	negative	/	/

The cohort consisted of 75 patients from which 82 NGS and 46 BCs were collected. The patients' gestational age, birthweight and diagnoses are presented along the results of BC (where available), NGS and corresponding microbiologic, virologic sampling (+ - 2 weeks around time of septic episode). If no virologic or microbiologic sampling (other than blood culture) was performed, this is indicated in the table with a slash (/). Antibiotic regimens and their duration are listed. In case regimens were changed this is indicated by an arrow "→". Short durations may be seen in patients who passed away under therapy (e.g. 114 or 133). Due to a potential negative effect on cultural diagnostics, it is noted if antibiotic therapy was started prior to sample collection. Due to a second episode of suspected sepsis, 6 patients were included in the study twice* and 1 patient three times*, adding 8 samples from repeatedly tested patients.

Abbreviations: extremely preterm (EPT <28wks), very preterm (VPT 28-32 wks), late preterm (LPT 32-37wks), ventricular septal defect (VSD), congenital diaphragmatic hernia (CDH), late onset sepsis (LOS), megacystis-microcolon-intestinal hypoperistalsis syndrome (MMIHS), necrotizing enterocolitis (NEC), retinopathy (ROP), periventricular leukomalacia (PVL), bronchopulmonary dysplasia (BPD), persistent ductus arteriosus (PDA), tetralogy of Fallot (TOF), atrial septal defect (ASD), intraventricular hemorrhage (IVH), respiratory distress syndrome (RDS), persistent pulmonary hypertension (PPHN), renal failure (RF), catheter-related bloodstream infection (CRBSI), extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), intestinal perforation (IP), Left heart hypoplastic syndrome (LHS), short bowel syndrome (SBS), meconium plug syndrome (MPS), inguinal hernia (IH), tricyclic antidepressants (TCA), dichorionic diamniotic twins (DCDA), monochorionic monoamniotic twin (MCMA), Twin-to-twin transfusion syndrome (TTTS), Vancomycin (Van), Linezolid (Line), Piperacillin/Tazobactam (Pip/Taz), Ampicillin/Sulbactam (Amp/Sul), Tobramycin (Tobra), Meropenem (Mero), Fluconazol (Fluco), Miconazol (Mico), liposomal Amphotericin B (Ampho-B), Valganciclovir (Valganci), Next-Generation sequencing (NGS), Throat swab (Thr), Throatrinse (ThrR), Skin swab (SS), Anal swab (AS), Nasal swab (NS), Wound swab (WS), Tracheal secretions (TS), Central venous catheter tip (CVC), Stool (St), Urine (U), **Virology:** Respiratory multiplex PCR Panel (resp. panel) (bioMérieux BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia Panel - included Influenza virus A, B, Parainfluenza virus 1-4, Respiratory syncytial virus (RSV), Human metapneumovirus (HMPV), endemic Coronaviridae (NL63, OC43, 229E, HKU1), Human Rhinovirus/Enterovirus, Adenovirus. For detection of SARS-CoV-2 (Covid-19), Cytomegalovirus (CMV), Parechovirus and Bocavirus specific PCRs were used), **Flora** (this refers to bacteria commonly found at the target site. These are considered non-pathogenic if confined to that site, e.g. *Staphylococcus epidermidis* found in a skin swab), screening swabs that did not show any bacterial growth, not even flora, are described as negative (neg.). **Enterobacter cloacae complex:** Seven species of the genus *Enterobacter* belong to the *Enterobacter cloacae* complex (ECLCO): *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. nimipressuralis*, *E. mori*. These species share phenotypic and, importantly, genotypic characteristics. MALDI-TOF MS often identifies ECLCO but may fail to reliably identify the different species that comprise the complex. Molecular methods like PCR or sequencing identify the genetic differences within the complex and can thus more reliably determine which species of ECLCO is present. For this reason, *Enterobacter cloacae* detected in blood culture is often reported as ECLCO, while NGS often reports the same bacteria to the exact species of ECLCO. This difference is of no clinical or therapeutic concern.

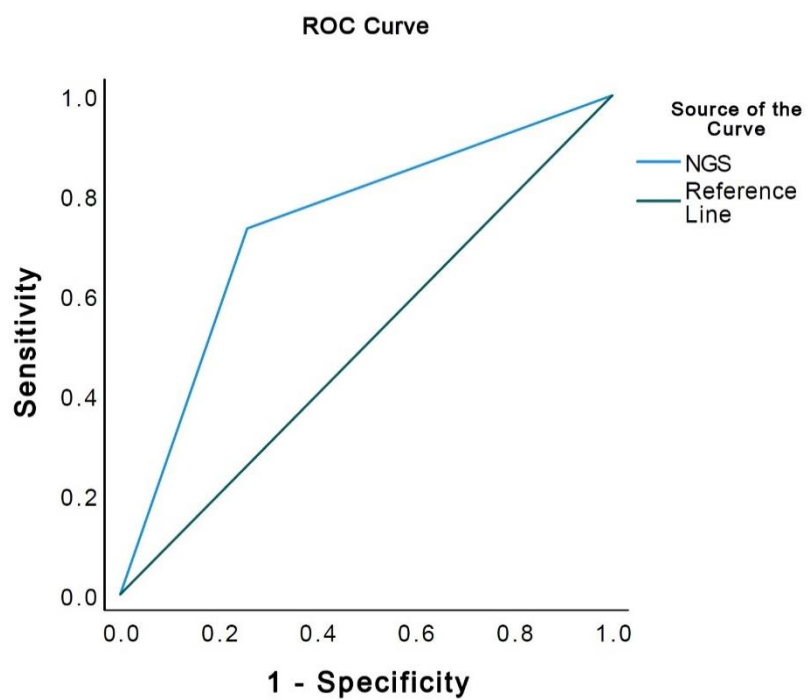
Supplementary Table S3 Sensitivity and Specificity based on 46 samples with results for both tests

		Blood culture		Statistic	Value	95% confidence interval (CI)
		+	-			
DISQVER	+	11	8	Sensitivity	73.33%	44.90% to 92.21%
	-	4	23	Specificity	74.19%	55.39% to 88.14%
				Positive Likelihood Ratio	2.84	1.45 to 5.56
				Negative Likelihood Ratio	0.36	0.15 to 0.85
				Disease prevalence	32.61%	19.53% to 48.02%
				Positive Predictive Value	57.89%	41.29% to 72.89%
				Negative Predictive Value	85.19%	70.78% to 93.17%
				Accuracy	73.91%	58.87% to 85.73%

n=11, samples that were NGS positive and BC positive (this includes 2 samples where NGS and BC differed); n=4, samples with positive BC and negative NGS; n=8, samples that were NGS positive and BC negative; n=23, samples that were blood culture and NGS negative. **Abbreviations:** Next-Generation sequencing (NGS), blood culture (BC)

Supplementary Table S4 Positive percent agreement and negative percent agreement based on composite reference standard for 58 samples (Group 1, 2 and 3).

		Composite STD (standard deviation)		Statistic	Value	95% confidence interval (CI)
		+	-			
DISQVER	+	19	3	Positive Percent Agreement	82.61%	61.22% to 95.05%
	-	4	32	Negative Percent Agreement	91.43%	76.94% to 98.20%
DISQVER results: true positive (n=19) false positive (n=3) false negative (n=4) true negative (n=32)				Positive Likelihood Ratio	9.64	3.21 to 28.90
				Negative Likelihood Ratio	0.19	0.08 to 0.47
				Disease prevalence	39.66%	27.05% to 53.36%
				Positive Predictive Value	86.36%	67.87% to 95.00%
				Negative Predictive Value	88.89%	76.55% to 95.15%
				Accuracy	87.93%	76.70% to 95.01%
True positive (n=19), samples that were NGS positive and plausible; False positive NGS results (n=3), sample number 14 (<i>Kytococcus sedentarius</i>), 103 (<i>Gardnerella vaginalis</i>) and 111 (<i>Aspergillus niger</i>); False negative (n=4), samples that were BC positive and NGS negative; True negative (n=32), samples that were blood culture and NGS negative. Abbreviations: Next-Generation sequencing (NGS), blood culture (BC)						



Supplementary Figure 3 - Receiver operating curve for NGS to predict a positive BC. The area under the curve was 0.738 (95% CI: 0.579 -0.896), $p=0.003$.

3. Danksagung

Ich danke meiner Frau Nataliya, durch ihre Geduld und ihren Ansporn hat sie mich besonders unterstützt. Ich danke auch meinem Betreuer und allen Kollegen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.