

Aus dem
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Klaus Pfeffer

**Die Anwendung von bbFISH zur schnellen speziesspezifischen
Erreger-Diagnostik in respiratorischen Sekreten von Patienten mit
Verdacht auf eine beatmungsassoziierte Pneumonie**

Dissertation

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

vorgelegt von

Vanessa Triesch

2015

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Colin MacKenzie

Zweitgutachter: Prof. Dr. med Detlef Kindgen-Milles

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung: Einteilung der Lungenentzündung anhand unterschiedlicher Kriterien	4
1.1. Infektiöse und nicht-infektiöse Pneumonien	4
1.2. Primäre und sekundäre Pneumonien	4
1.3. Alveoläre und interstitielle Pneumonien	4
1.4. Typische und atypische Pneumonien	5
1.5. Ambulante und nosokomiale Pneumonien	5
1.5.1. Sonderform der nosokomialen Pneumonie: Die beatmungs-assoziierte Pneumonie	6
1.5.1.1. Bedeutung	6
1.5.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren	7
1.5.1.3. Pathogene	9
1.5.1.4. Diagnose	10
1.5.1.4.1 Klinische Diagnose	10
1.5.1.4.2 Radiologische Diagnose	11
1.5.1.4.3 Mikrobiologische Diagnose	12
1.6. Ziel der Arbeit	17
2. Materialien	19
2.1. bbFISH	19
2.2. Kultur	19
2.3. Patientenmaterial	20
3. Methoden	21
3.1. Bearbeitung der klinischen Proben	21
3.2. bbFISH	21

3.2.1. Probenaufarbeitung.....	21
3.2.1. Auswertung	22
4. Ergebnisse	26
4.1. Untersuchtes und insgesamt erfasstes Keimspektrum	26
4.2. Sensitivität und Spezifität der bbFISH.....	27
4.3. Diagnostische Genauigkeit der einzelnen Beacons	28
4.4. Ausschließlich mittels der bbFISH detektierte Bakterien.....	31
5. Diskussion	32
6. Zusammenfassung.....	39
7. Abkürzungsverzeichnis.....	41
8. Literaturverzeichnis.....	42
9. Danksagungen	50
10. Eidesstattliche Versicherung.....	51

1. Einleitung: Einteilung der Lungenentzündung anhand unterschiedlicher Kriterien

Die Pneumonie ist definitionsgemäß eine Entzündung des Alveolarraums und/oder des Interstitiums. Sie kann unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt werden. Beispiele für solche Einteilungen sind Unterscheidungen zwischen infektiösen und nicht-infektiösen, zwischen primären und sekundären, alveolären und interstitiellen, typischen und atypischen oder ambulant und im Krankenhaus erworbenen (nosokomialen) Pneumonien.

1.1. Infektiöse und nicht-infektiöse Pneumonien

Grundsätzlich ist eine Differenzierung zwischen infektiöser und nicht-infektiöser Genese der Lungenentzündung sinnvoll. Nicht-infektiöse Ursachen sind unter anderem Allergien, Intoxikationen, Bestrahlung oder Fremdkörper. Die weitaus häufiger vorkommenden infektiösen Pneumonien werden durch Viren und Bakterien und auch etwas seltener durch Pilze oder Parasiten verursacht.

1.2. Primäre und sekundäre Pneumonien

Unter Berücksichtigung der Begleitumstände spricht man beim Auftreten einer Pneumonie ohne Vorerkrankung von einer primären Pneumonie. Tritt die Entzündung in einer durch eine andere Grunderkrankung vorgeschädigten Lunge auf, handelt es sich um eine sekundäre Pneumonie. Beispiele für letztere sind die Stauungspneumonie bei Herzinsuffizienz, eine Pneumonie auf dem Boden einer COPD oder als Folge einer Lungenembolie (Infarktpneumonie).

1.3. Alveoläre und interstitielle Pneumonien

Eine pathologisch-anatomische Einteilung der Pneumonie unterscheidet die alveoläre Pneumonie und die interstitielle Pneumonie.

Bei der alveolären Pneumonie ist die Entzündung in den Lungenbläschen, den Alveolen, lokalisiert. Die Ursache ist meist eine bakterielle oder mykotische Infektion. Diese Pneumonie wird anhand der Ausbreitung der Entzündungsreaktion weiter untergliedert in eine Lobärpneumonie, bei der ganze Lungenlappen betroffen sind, und in eine Bronchopneumonie, bei der die Entzündung herdförmig und multifokal in der Umgebung der

Bronchien entsteht. Diese Herde können jedoch im weiteren Verlauf der Erkrankung konfluieren und so auch einen ganzen Lappen befallen.

Die interstitiellen Pneumonien sind durch hauptsächlich im interstitiellen Lungengewebe ablaufende Entzündungen gekennzeichnet. Hier werden akute und chronische Verlaufsformen voneinander abgegrenzt, die sich auch hinsichtlich ihrer Ätiologie unterscheiden. Während akute interstitielle Lungenentzündungen vor allem viral bedingt sind, handelt es sich bei den chronischen interstitiellen Pneumonien um eine ätiologisch sehr heterogene Gruppe. Neben Viren kommen unter anderem medikamentöse, metabolische, physikalische, immunologische und inhalative Ursachen infrage.

1.4. Typische und atypische Pneumonien

In dieser Klassifikation steht der klinische Verlauf im Vordergrund der Betrachtung. Der typische Verlauf ist charakterisiert durch akutes Einsetzen der Symptomatik mit Schüttelfrost und Fieber, Husten mit rotbraunem Sputum und stark beeinträchtigtem Allgemeinbefinden, die Auskultation ergibt klingende Rasselgeräusche und im Röntgenbild sind dichte, großflächige Verschattungen sichtbar. Atypische Pneumonien beginnen hingegen langsam mit leichtem Fieber und eher selten mit Schüttelfrost, trockenem Husten mit wenig bis fehlendem Auswurf, häufig mit Cephalgien und Myalgien und insgesamt nur mäßig beeinträchtigtem Allgemeinbefinden.

1.5. Ambulante und nosokomiale Pneumonien

Unter klinischen Gesichtspunkten ist die Unterscheidung zwischen ambulant erworbenen und nosokomialen Pneumonien eine der wichtigsten Einteilungen. Hier steht der Zeitpunkt des Auftretens im Vordergrund. Ambulant erworbene Lungenentzündungen (engl. community-acquired pneumonia, CAP) entstehen außerhalb des Krankenhauses, wogegen nosokomiale Pneumonien (engl. hospital-acquired pneumonia, HAP) während eines Krankenhausaufenthaltes erworben werden (1). Sie weisen signifikante Unterschiede hinsichtlich der ursächlichen Keime und der damit verbundenen Mortalität auf. Die HAP manifestiert sich definitionsgemäß mindestens 48 Stunden nach Aufnahme. Sie ist die insgesamt zweithäufigste aller nosokomialen Infektionen und stellt unter ihnen die führende Todesursache dar. (2)

1.5.1. Sonderform der nosokomialen Pneumonie: Die beatmungs-assoziierte Pneumonie

Bei der beatmungsassoziierten Pneumonie (engl. ventilator-associated pneumonia, VAP), die sich nach mehr als 48 Stunden endotrachealer Intubation entwickelt, handelt es sich um eine Sonderform der HAP. Mehr als 80% aller nosokomialen Pneumonien sind mit invasivem Atemwegsmanagement (das heißt mit Intubation oder Tracheotomie) und mechanischer Beatmung verbunden (3). Auf Intensivstationen ist die VAP die häufigste nosokomiale Infektion und tritt bei 10-25 % aller beatmeten Patienten (4;5) mit einer Gesamtmortalität zwischen 33-71% auf (6;7). Fagon et. al ermittelten in einer Fall-Kontroll-Studie eine der VAP direkt zurechenbare Sterblichkeit von 27 %, bezogen auf eine durch Antibiotika-resistente Keime hervorgerufene VAP sogar von 43 % (8).

Nach klinischen Gesichtspunkten werden die VAP und auch die HAP in zwei Formen eingeteilt: Die early-onset HAP/VAP tritt innerhalb der ersten 4 Tage nach Krankenhausaufnahme auf, die late-onset HAP/VAP nach mindestens 5 Tagen. Diese Unterscheidung ist bedeutsam, da sich häufig nicht nur die ursächlichen Pathogene unterscheiden, sondern im Allgemeinen auch der Krankheitsverlauf weniger schwer und die Prognose besser ist bei der early-onset HAP/VAP (9-11).

1.5.1.1. Bedeutung

Die beatmungsassoziierte Pneumonie ist nicht nur mit einer erhöhten Mortalität, sondern auch mit einer erhöhten Verweildauer im Krankenhaus und massiv erhöhten Kosten verbunden. Letztere abzuschätzen gestaltet sich als sehr kompliziert und schwierig, da sie von vielen verschiedenen Faktoren abhängen, die in unterschiedlichen Ländern variieren können, wie zum Beispiel der Organisation des Krankenhauses und der Intensivstation selbst, Kosten von Antibiotika etc. (12).

Im Jahr 1992 schätzen die amerikanischen „Centers for Disease Control and Prevention“ die zusätzliche Verweildauer auf 5,9 Tage und die Extrakosten auf 5.683 Dollar pro HAP-Fall (13). Neuere Beurteilungen gehen von weitaus höheren Kosten aus, die zwischen 20.000 und 40.000 Dollar pro HAP- oder VAP-Fall auf der Intensivstation vermutet werden (1;14;15). Eine von Juni 1988 bis September 1989 in Deutschland durchgeführte Studie zur Bestimmung der verlängerten Verweildauer und der auf beatmungsassoziierte Pneumonien auf Intensivstationen zurückzuführenden Kosten ermittelte eine durchschnittliche längere

Verweildauer von 10,13 Tagen und durchschnittliche zurechenbare Kosten von damals 14,253 Mark (US\$ 8,800) (16).

Bei der Studie handelte es sich um eine prospektive Kohortenstudie mit 270 Patienten einer universitären anästhesiologischen Intensivstation, die über mehr als 24 Stunden Beatmung benötigten. Um die zu messenden Größen durch weitere Einflussfaktoren möglichst wenig zu verfälschen, wurden den Patienten, die eine VAP entwickelten, ein bis maximal fünf Kontrollpatienten zugeordnet, die sich nicht infizierten. Grundlage dieses Zuordnungsverfahrens waren vier Bedingungen, die bei Fall- und Kontrollpatient übereinstimmen mussten: 1.: Die gleiche der Beatmung zugrunde liegende Ursache. 2.: Das Alter, wobei jedoch ein Altersunterschied von bis zu 10 Jahren toleriert wurde. 3.: Die Gesamtbeatmungszeit des Kontrollpatienten musste mindestens so lange sein wie die Beatmungszeit des Falles vor Auftreten der Pneumonie. Hiermit sollte eine möglichst gleiche Wahrscheinlichkeit, an einer VAP zu erkranken, zwischen beiden Patientengruppen gewährleistet werden. 4.: Der Gesamtaufenthalt des Kontrollpatienten auf der Intensivstation musste mindestens gleich der Aufenthaltszeit des Falles bis zum Einsetzen der Pneumonie sein, um wiederum beide Patientengruppen zeitlich annähernd demselben Risiko, an einer VAP zu erkranken, auszusetzen.

Von den 78 Fällen wurden die 21 (26,9 %) Todesfälle und die 23 (29,5%) Patienten ausgeschlossen, denen keine passenden Kontrollen zugeteilt werden konnten, sodass 34 zur Ergebnisanalyse verblieben. Nach Ansicht der Autoren solle jedoch bei der Ergebnisevaluation berücksichtigt werden, dass es sich bei dem Patientenkollektiv um Schwerstkranke handele und die Ergebnisse daher nicht auf alle beatmeten Patienten übertragen werden könnten. Auch der mögliche Einfluss von ausgeschlossenen Fällen, denen keine Kontrollen zugeordnet werden konnten, müsse berücksichtigt werden. Da es sich im Falle dieser Studie dabei aber um eher noch schwerer kranke Patienten handele, sei eher mit einer Unterschätzung als mit einer Überschätzung der anfallenden zusätzlichen ICU-Tage und Kosten zu rechnen.

1.5.1.2. Pathogenese und Risikofaktoren

Die gesunde Lunge kann sich mittels verschiedener Abwehrmechanismen (zum Beispiel Opsonisierung, Phagozytose etc.) vor dem Erregereintritt in die peripheren Atemwege

schützen, sodass sie bei gesunden Individuen steril sind. Sind diese Mechanismen zum Beispiel durch eine vorübergehend herabgesetzte Immunität gestört oder handelt es sich um hochvirulente Erreger, kann es zur Infektion und zur Entwicklung einer Lungenentzündung kommen.

Bei nosokomialen bzw. beatmungsassoziierten Pneumonien können Pathogene die Lunge durch kontinuierliche oder hämatogene Ausbreitung, Inhalation oder Aspiration erreichen. Der kontinuierliche und auch der hämatogene Weg sind sehr selten, sodass der Aspiration hierbei die größte Bedeutung zukommt (17). Eine Vielzahl von Studien stimmt darin überein, dass die der Aspiration vorangehende oropharyngeale Keimbesiedlung bei der Entwicklung einer VAP eine essentielle Rolle spielt. Oropharyngeale Besiedlung mit verschiedenen Anaerobiern ist ein häufiges, auch in gesunden Individuen auftretendes Phänomen. Das Vorkommen von Gramnegativen wie *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter baumannii* ist bei Gesunden jedoch selten und steigt mit der Länge des Krankenhausaufenthaltes (1;18-20). 1992 zeigte eine Studie von Johanson und Mitarbeitern, dass 23% der Patienten einer internistischen Intensivstation, deren respiratorischer Trakt mit Gramnegativen besiedelt worden war, eine nosokomiale Pneumonie entwickelten, aber nur 3,3 % der nicht-besiedelten Patienten (21).

Schwerstkranke Patienten auf einer Intensivstation haben potenziell eine Vielzahl von Risikofaktoren, die teilweise über ihren Beitrag zur oropharyngealen Kolonisation oder auch durch Erhöhung des Aspirationsrisikos auch die Wahrscheinlichkeit steigern, an einer beatmungsassoziierten Pneumonie zu erkranken. Beispiele für Risikofaktoren sind: Alter, liegende Position des Kopfes und vorherige Antibiotikaaanwendung (22), COPD, Thorax- oder Oberbauchchirurgie und herabgesetzte Bewusstseinslage (23) sowie Reintubation und die Dauer der mechanischen Beatmung als einer der wichtigsten Risikofaktoren (24). Letzterer ist möglicherweise jedoch nicht konstant über die Zeit, denn eine große Kohortenstudie ermittelte für die erste Woche der MV ein Risiko von 3 % pro Tag, für die zweite Woche 2 % pro Tag und noch 1% pro Tag für die dritte und alle darauffolgenden Wochen (25).

Angesichts der hohen Mortalität ist es wichtig, anhand solcher Faktoren jene Patienten zu identifizieren, deren Konstitution eine hohe Wahrscheinlichkeit bedingt, eine VAP zu entwickeln, um präventive Ansätze anwenden oder bei beginnender Symptomatik möglichst schnell weitere diagnostische Schritte einzuleiten zu können.

1.5.1.3. Pathogene

Es ist unter anderem deswegen sinnvoll, Pneumonien nach dem Entstehungsort der Infektion in CAP und HAP bzw. VAP einzuteilen, da sich die ursächlichen Pathogene in der Regel deutlich unterscheiden. *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* und methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* (MSSA) sind typische bakterielle Erreger der CAP und auch der early-onset HAP/VAP. Das heißt, sie werden meist von Antibiotika-sensiblen Keimen ausgelöst und haben daher eine deutlich bessere Prognose als die late-onset HAP/VAP (26). Late-onset HAP/VAP-Infektionen hingegen werden häufig durch gramnegative Stäbchen wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp. und *Acinetobacter* spp., aber auch durch methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) verursacht.

Die folgende von Chastre und Fagon (12) zusammengestellte Tabelle zeigt die Ätiologie der beatmungsassoziierten Pneumonie, die in einer Vielzahl von Studien (10;10;24;27-47;47;48) mittels bronchoskopischer Techniken in 1689 VAP-Episoden mit 2490 Pathogenen beobachtet wurde.

Tabelle 1: Ätiologische Aufteilung der Erreger von beatmungsassoziierten Pneumonien nach Chastre et al. (12)

Pathogen	Häufigkeit (%)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24.4
<i>Acinetobacter</i> spp.	7.9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1.7
<i>Enterobacteriaceae</i> *	14.1
<i>Haemophilus</i> spp.	9.8
<i>Staphylococcus aureus</i> †	20.4
<i>Streptococcus</i> spp.	8.0
Koagulase-negative Staphylokokken	1.4
<i>Neisseria</i> spp.	2.6
Anaerobier	0.9
Pilze	0.9
Andere	3.8

* Die Enterobacteriaceae teilen sich weiter auf in: *Klebsiella* spp., 15.6%; *Escherichia coli*, 24.1%; *Proteus* spp., 22.3%; *Enterobacter* spp., 18.8%; *Serratia* spp., 12.1%; *Citrobacter* spp., 5.0%; *Hafnia alvei*, 2.1%.

† 55,7 % der Staphylococci waren Methicillin-resistent und 44,3 % Methicillin-sensibel.

Die Rate an polymikrobiellen Infektionen schwankt in der Literatur zwischen 30 und 70 % (49;50).

Unter den am häufigsten auftretenden VAP-Erregern befinden sich Pathogene, die auch als „Hochrisiko-Pathogene“ bezeichnet werden: unter anderem *Pseudomonas aeruginosa* und *Acinetobacter* spp. Ersterer gehört zu den führenden Todesursachen bei beatmeten Patienten (3). Sowohl für *Pseudomonas aeruginosa* (51) (12) als auch für *Acinetobacter* spp. werden Mortalitätsraten von um die 70% beschrieben (12). Crouch et. al (51) beobachteten in ihrer Studie zur *Pseudomonas*-VAP eine dem Keim direkt zurechenbare Mortalität von mindestens 38 %. Zu den häufigsten zum Tod führenden Komplikationen der Erkrankung gehörten der septische Schock und multiples Organversagen. Die hohe zurechenbare Mortalität ist unter anderem zurückzuführen auf das häufige Vorkommen von inadäquater initialer Antibiotikatherapie aufgrund multipler Resistenzen (51;52). In der Studie von Crouch et al. betrug diese Rate an inadäquater Medikation 67 %. Auch *Acinetobacter baumannii* ist ein beträchtliches therapeutisches Problem, weil es mittlerweile Stämme gibt, die (zumindest in vitro) resistent gegen alle herkömmlichen Antibiotika sind (53).

Obwohl Häufigkeitsverteilungen wie die von Chastre und Fagon zusammengestellte Tabelle nützliche Instrumente in der VAP-Behandlung sind, ist es wichtig zu wissen, dass hinsichtlich des Auftretens der Pathogene sowohl zwischen verschiedenen Institutionen als auch zwischen einzelnen Stationen zum Teil große Unterschiede bestehen (47;54;55). So können zum Beispiel, je nach zugrundeliegenden lokalen Risikofaktoren, auch *Pseudomonas aeruginosa* und MRSA eine wichtige Rolle bei der early-onset VAP spielen (56).

1.5.1.4. Diagnose

1.5.1.4.1 Klinische Diagnose

Eine beatmungsassoziierte Pneumonie wird in der Regel vermutet, wenn ein Patient die folgenden klinischen Kriterien aufweist, die von den US Centers for Disease Control and Prevention definiert wurden: 1. Auftreten eines neuen oder progressiven Infiltrats im Röntgen-Thorax; 2. Fieber; 3. Leukozytose; 4. Eitriges respiratorisches Sekret (57). Diese

Kriterien sind sehr sensitiv, aber wenig spezifisch, denn es gibt auch eine Vielzahl an nicht-infektiösen Ursachen, die sich auf diese Art äußern können. Solche Gründe für Fieber und pulmonale Herde sind zum Beispiel: chemische Aspiration ohne Infektion, Atelektase, Lungenembolie, ARDS, Lungenblutung, Lungenkontusion, infiltrative Tumoren, Strahlenpneumonitis oder Medikamenten – bzw. Überempfindlichkeitsreaktionen (1).

Um eine objektivere VAP-Diagnose zu ermöglichen (58), entwickelten Pugin et al. (59) den Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS), der unter anderem klinische Merkmale wie Fieber, Leukozytenzahl, Röntgen-Thorax-Befunde und Kulturergebnisse von Trachealsekreten kombiniert. Eine Punktzahl von mehr als 6 Punkten war mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für eine Pneumonie verbunden. In einer prospektiven Studie von Fabregas et al. (60) ergab das Vorkommen von Infiltraten im Röntgen-Thorax zusammen mit zwei von drei klinischen Kriterien (Leukozytose, eitrig-sekretorische Sekrete, Fieber) eine Sensitivität von 69 % und eine Spezifität von 75 %, der CPIS eine Sensitivität von 77 % und eine Spezifität von 42 %.

Luyt et al. evaluierten den potenziellen Nutzen eines Algorithmus, der auf dem CPIS basierte, Patienten mit bakterieller VAP zu identifizieren und zu behandeln, verglichen mit einer bronchoskopisch gestützten Strategie (61). Anhand der CPIS-Strategie wären an Tag 3 53% der Patienten ohne VAP unnötigerweise antibiotisch therapiert worden.

Allerdings kann die mehrfache Evaluation des CPIS auch ein geeignetes Mittel sein, die antibiotische Therapie sicher zu unterbrechen, was zu signifikant niedrigeren Therapiekosten, antimikrobiellen Resistenzen und Superinfektionen führen kann, ohne die Krankenhausaufenthaltsdauer oder die Mortalität ungünstig zu beeinflussen (62;63).

1.5.1.4.2 Radiologische Diagnose

Die Aufnahme eines Thorax-Röntgenbildes zählt zu den Standardmaßnahmen bei Verdacht auf eine Lungenentzündung, denn ein neu aufgetretenes oder progressives Infiltrat ist ein im Allgemeinen angewendetes klinisches Diagnosekriterium, wie schon in Abschnitt 1.5.1.4.1. erwähnt. Obwohl es also weiterhin eine wichtige Rolle bei der Evaluation von Patienten mit Verdacht auf Pneumonie spielt, ist es dann am hilfreichsten, wenn es ohne pathologischen Befund ist und die Pneumonie damit weitgehend ausschließt, denn eine asymmetrische Verdichtung kann auch durch eine Vielzahl nicht-infektiöser Ursachen hervorgerufen

werden, wie zum Beispiel von Lungenembolien, Lungenemphysemen, Atelektasen oder symmetrischen kardiopulmonalen Ödemen (12;64).

Eine Studie, in der verschiedene radiologische Zeichen auf ihre Genauigkeit hin getestet wurden, eine Pneumonie alleine, in Kombination mit anderen Zeichen oder in Kombination mit klinischen Parametern vorhersagen zu können, kam zu dem Ergebnis, dass keines der untersuchten röntgenographischen Merkmale eine diagnostische Genauigkeit von mehr als 68 % hatte (65). Nur das Luftbronchogramm, das sich in mehreren Studien als sehr spezifisch für die VAP-Diagnose herausgestellt hat, war in der Lage, 64 % aller Pneumonien in der Gesamtgruppe vorauszusagen. Bei ARDS-Patienten allerdings korrelierte keines der radiologischen Zeichen mit dem Vorliegen einer Pneumonie. Insgesamt wurden von den 30 Patienten, die die radiologischen und klinischen Kriterien der VAP erfüllten, nur 13 dieser Fälle durch eine Autopsie bestätigt, woraus sich eine falsch-positive Rate von 57 % ergibt.

1.5.1.4.3 Mikrobiologische Diagnose

Die mikrobiologische Diagnose der VAP besteht in der Regel aus der kulturellen Erregeranzucht und der direkten mikroskopischen Untersuchung des jeweiligen Patientenmaterials, das sowohl mittels bronchoskopischer als auch nicht-bronchoskopischer Techniken gewonnen werden kann. In den folgenden Abschnitten soll darauf jeweils näher eingegangen werden.

Mikroskopie: Gramfärbung

Mit der Gramfärbung und der anschließenden mikroskopischen Auswertung können Bakterien und Hefen in respiratorischen Sekreten nachgewiesen werden. Die Bedeutung dieser Technik in der VAP-Diagnose wird zum Teil sehr unterschiedlich bewertet.

In einer Meta-Analyse aus dem Jahr 2012 zur Beantwortung genau dieser Frage lag der negativ prädiktive Wert der Gramfärbung (bei einer gegebenen Prävalenz von 20-30%) bei 91 %, während der positiv prädiktive Wert nur 40 % betrug (66). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass eine negative Gramfärbung mit einer sehr niedrigen Wahrscheinlichkeit für das Vorliegen einer VAP assoziiert ist, eine positive Gramfärbung allerdings recht unspezifisch ist. Außerdem bestand in der Studie eine beträchtliche Diskrepanz zwischen den in der Gramfärbung und den in der Kultur detektierten Erregern, sodass der Fund eines

einigen Erregertyps in der Gramfärbung nicht zu einer Verschmälerung der initialen Antibiotikatherapie führen sollte, bis die Kulturergebnisse letztendlich vorliegen. Eine andere Studie, die unter anderem die qualitative Übereinstimmung zwischen Gramfärbung und quantitativen Kulturen analysierte, zeigte, dass die Korrelation in 39% (26 von 67 VAP) komplett, in 28% (19 von 67 VAP) partiell und in 33% (22 von 67 VAP) gar nicht vorhanden war (67). Die Autoren folgerten daraus, dass die Gramfärbung trotz der insgesamt guten Übereinstimmung nur bedingt geeignet ist für die schnelle VAP-Diagnose und obendrein nicht verlässlich ist hinsichtlich einer frühen Therapieanpassung.

Veinstein et al. evaluierten einen auf Schweregrad-Kriterien und Gramfärbung basierenden Algorithmus zum Umgang mit Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie (68). Mittels dieses Algorithmus gelang in 80 % der Fälle die korrekte Identifikation und Handhabung, was sich sowohl auf die 83 % der Patienten mit bestätigter Pneumonie bezieht, die einer entsprechenden Therapie zugeführt worden waren, als auch auf die 74 % ohne Infektion, die somit keine Therapie benötigen hatten.

Biomarker

Auch Laborparameter können in diagnostische Überlegungen einbezogen werden und zum Teil auch prognostisch von Bedeutung sein. Dazu gehören das C-reaktive Protein (CRP), das Procalcitonin und der humane soluble triggering receptor expressed on myeloid cells (sTREM-1).

CRP und Procalcitonin

Für das CRP wurden, je nach gewählten Diagnosekriterien, unterschiedlich gute Ergebnisse beschrieben; Bei einer diagnostischen Grenze von 9.6 mg/dl wurde eine Sensitivität von 87% eine Spezifität von 88 % für die VAP-Diagnose beobachtet (69), während andere Autoren bei einer Grenze von 109.5 mg/L (10.95 mg/dl – also minimal höher als die in der vorherigen Studie gewählte Grenze) von einer Sensitivität von 56.5 % und einer Spezifität von 61.5% berichten (70). Lisboa et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen Serum-CRP, Bakterienbelastung, die durch quantitative Trachealsekret-Kulturen bestimmt wurde, und adäquater Antibiotikatherapie und fanden heraus, dass das CRP ein nützlicher Surrogatparameter der Bakterienbelastung in VAP-Patienten ist und dass mittels einer CRP-Verlaufskontrolle das Ansprechen einer Antibiotikatherapie beurteilt werden kann (71). Eine

weitere prospektive Kohortenstudie kam zu dem Schluss, dass ein Absinken des CRP und auch des Procalcitonin starke Anzeichen für das Überleben von VAP-Patienten sind (72).

Neben diesem prognostischen Aspekt des Procalcitonin könnte dessen Kombination mit dem CPIS den effektiven Ausschluss falsch-positiver VAP-Diagnosen ermöglichen (70;73). Liao et al. evaluierten die Rolle des Procalcitonin in der VAP-Diagnose und ermittelten eine Sensitivität von 73.9 % und eine Spezifität von 80.8 % bei einem angewendeten Schwellenwert von 0.31 µg/l. (70)

STREM -1

Das sTREM-1-Glykoprotein wurde in hohen Konzentrationen bei Patienten mit bakterieller VAP nachgewiesen und diesbezüglich sogar als möglicher alleiniger Marker diskutiert (74). In einer prospektiven Studie wurde sTREM-1 im ausgeatmeten Ventilator-Kondensat bei 11 von 14 VAP-Patienten, aber nur bei 1 von 9 Patienten ohne Pneumonie nachgewiesen (75). Die sTREM-1-Spiegel in den mit Pneumonien assoziierten Kondensaten waren zudem signifikant höher. Entsprechende Werte in der BAL-Flüssigkeit werden zum Teil jedoch als nicht signifikant unterschiedlich beschrieben und sind deshalb möglicherweise nicht zur Diagnosefindung geeignet (75;76). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass auch andere Erkrankungen wie Tumoren und eine Reihe von Entzündungen sTREM-1-Level erhöhen können (77;78). Wu et al. zeigten allerdings, dass sTREM-1-Konzentrationen im Verlauf signifikant abnahmen in überlebenden Patienten mit kulturpositiver VAP, während sie bei sterbenden Patienten signifikant zunahmen (79). Für diese Messungen ergab sich 7-9 Tage nach initialer Diagnosestellung eine Sensitivität von 90% und eine Spezifität von 87.5 %, um die Mortalität voraussagen zu können.

Quantitative/qualitative Kulturen

Qualitative Kulturen sind eine sehr sensitive Methode für die VAP-Diagnose, jedoch nur wenig spezifisch (49). Daher ist sie mit einer hohen Rate an falsch-positiven Ergebnissen verbunden, zurückzuführen auf bakterielle Kolonisation, die wiederum bei einer Vielzahl von Intensiv-Patienten vorkommt (12). Eine Therapieentscheidung, die sich nur auf qualitative Kulturen stützt, kann in erhöhtem Kostenaufwand und unnötigem Antibiotikaeinsatz mit folglichem bakteriellen Resistenzbildungen resultieren (80). Aufgrund ihres hohen negativ prädiktiven Wertes ist eine negative qualitative Kultur jedoch, zumindest wenn im Vorfeld

keine Antibiotikatherapie stattgefunden hat bzw. geändert wurde, ein ausreichender Beweis, um eine VAP-Diagnose zu revidieren und somit eine laufende antimikrobielle Therapie zu unterbrechen (49;80).

Die Grundidee bei der Bestimmung der Bakterienbelastung mithilfe quantitativer Kulturen ist eine mögliche Differenzierung zwischen Kolonisation und Infektion (58). Es wird davon ausgegangen, dass die Überschreitung eines definierten Schwellenwertes für eine Infektion spricht. Hierbei gelten für unterschiedliche diagnostische Techniken zum Teil auch unterschiedliche Grenzwerte; Die American Thoracic Society schlägt für quantitative Kulturen einer Protected-specimen-brush (PSB)-Probe eine Schwelle von 10^3 sogenannten Kolonie-bildenden Einheiten (colony forming units) pro Milliliter (cfu/ml), für quantitative Kulturen von Flüssigkeit gewonnen durch bronchoalveoläre Lavage (BAL) 10^4 cfu/ml und für quantitative Kulturen aus Trachealsekret 10^5 bzw. 10^6 cfu/ml (81). Verschiedene Faktoren verfälschen jedoch die Kulturergebnisse und machen die genannten Schwellen für diese Fälle unbrauchbar. Eine vorangegangene Antibiotikatherapie beispielsweise führt möglicherweise zu einem falsch-negativen Ergebnis, während eine chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*engl. chronic obstructive pulmonary disease, COPD*) auch ohne Pneumonie schon eine erhöhte Anzahl an Bakterien in der Lunge und somit auch ein falsch-positives Ergebnis verursachen kann (64).

Auch wenn qualitative Kulturen in der Regel in der VAP-Diagnostik bevorzugt eingesetzt werden (80), schlussfolgerten einige Studien, dass letztendlich keine der beiden Techniken der anderen überlegen ist. Camargo et al. verglichen quantitative und qualitative Kulturen aus Trachealsekreten von VAP-Patienten in einer prospektiven Studie (82). Dabei wiesen erstere bei einem Schwellenwert von 10^5 cfu/ml eine Sensitivität von 65 % und eine Spezifität von 48 % auf, bei 10^6 cfu/ml entsprechend 26 % Sensitivität und 78 % Spezifität. Hinsichtlich der qualitativen Kulturen betrug die Sensitivität 81 % und die Spezifität 23 %. Trotz dieser recht großen Unterschiede bezüglich der Sensitivitäten und Spezifitäten waren die errechneten positiv prädiktiven Werte mit je 21%, 20% und 18 % und die negativ prädiktiven Werte mit je 87 %, 83 % und 86 % sehr ähnlich. Die Autoren schlossen daraus, dass quantitative Kulturen in ausgewählten schwerstkranken Patienten eine verminderte Sensitivität gegenüber qualitativen Kulturen haben und sie diese somit bei der Bestätigung von klinischen VAP-Diagnosen und bei der Therapieanpassung nicht ersetzen sollten. Eine

Analyse von Berton et al. von verschiedenen Studien zu dieser Thematik zeigte, dass es keine Evidenz darüber gibt, dass der Einsatz quantitativer Kulturen respiratorischer Sekrete in verringerter Mortalität, in verringerter Zeit mechanischer Beatmung bzw. auf der Intensivstation oder in erhöhten Raten an Antibiotikawechsel verglichen mit qualitativen Kulturen resultiert (83).

Bronchoskopische/nicht-bronchoskopische Techniken (Endotracheale Aspirate vs. BAL/PSB)

Eine Vielzahl von Studien beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob bronchoskopische (BAL/PSB) oder nicht-bronchoskopische Techniken (endotracheale Aspirate, EA) geeigneter in der VAP-Diagnostik sind.

Kulturen endotrachealer Sekrete können diesbezüglich ein adäquates Mittel sein (12;84). Es ist aufgrund einer möglichen oropharyngealen und trachealen Kolonisation zwar nicht möglich, mithilfe dieser gewonnenen mikrobiologischen Daten einen Rückschluss darauf zu ziehen, ob sich die identifizierten trachealen Keime zudem tatsächlich auch in der Lunge befinden und somit überhaupt als Erreger infrage kommen, und auch ein damit verbundener eventueller unnötiger Antibiotikaeinsatz bzw. eine Übertherapie mit Breitspektrum-Antibiotika ist problematisch (12). Allerdings ist es unwahrscheinlich, dass ein auslösendes Pathogen in einem endotrachealen Aspirat nicht vorhanden ist, sodass entsprechende Kulturergebnisse in Abwesenheit eines multiresistenten Keimes dazu verwendet werden können, eine Deeskalationstherapie, also den Wechsel auf ein Medikament mit einem schmaleren Spektrum, einzuleiten (84). Außerdem sind EA-Kulturen ein kostengünstiger und weit verbreiteter Ansatz (49), während invasive bronchoskopische Methoden mit einem wenn auch niedrigen Risiko für z.B. kardiale Arrhythmien, Hypoxämie oder Bronchospasmus assoziiert sind (12).

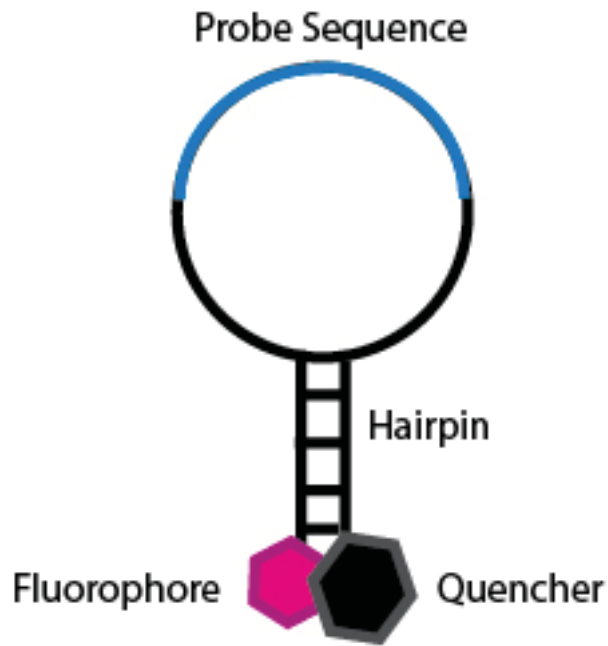
In bestimmten Situationen existieren sicherlich gute Gründe, das eine oder das andere Verfahren zu bevorzugen. Einige Studien zeigen aber, dass das Outcome der Patienten, das heißt die Mortalität, die Intensivstationsverweildauer und die Länge der mechanischen Beatmung, von der verwendeten diagnostischen Technik unbeeinflusst bleibt (36;83;85;86). Obwohl der Einsatz invasiver Techniken häufiger zu Therapieänderungen führte, wirkte sich das nicht auf die Mortalität aus (85;86).

1.6. Ziel der Arbeit

Ein wichtiger und gleichzeitig kritischer Aspekt der kulturellen Anzucht von Erregern im Allgemeinen ist die Tatsache, dass sie bis zu 48 Stunden andauern kann. Obwohl in der Literatur zur Zeit noch Uneinigkeit darüber besteht, auf welchem Weg dies erreicht werden soll, herrscht jedoch weitgehend Konsens darüber, dass eine schnelle VAP-Diagnose und eine schnelle initiale adäquate Therapieeinleitung eine sehr bedeutende Determinante des Patienten-Outcomes ist (3;31;87).

Ziel dieser Arbeit war es daher, durch ein neues Verfahren, die beacon-based Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (bbFISH), eine Methode zu testen, mit der die Identifikation der wichtigsten gram-negativen respiratorischen Pathogene innerhalb einer Stunde gelingen soll und auf deren Grundlage die empirische Therapie gegebenenfalls schon in kurzer Zeit moduliert werden könnte.

Die bbFISH ist eine modifizierte Variante der konventionellen FISH, bei der „molecular beacons“, kurz Beacons, verwendet werden. Beacons sind kurze DNA-Sonden, die in nicht gebundener Form in einer Haarnadelstruktur vorliegen, an deren 5'- und 3'- Ende ein Fluorophor und ein Quencher, der das Fluoreszenzsignal des Fluorophors unterdrückt, gekoppelt sind (88). In dieser Struktur liegen Quencher und Fluorophor dicht nebeneinander, was zu einem stark verminderten bzw. keinem Fluoreszenzsignal führt (89). Hybridisiert jedoch der „Loop“ des Beacons mit der jeweiligen komplementären Zielsequenz, ändert sich die räumliche Konformation der Sonde, sodass Quencher und Fluorophor voneinander getrennt werden und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Ein wesentlicher Vorteil der Haarnadelstruktur liegt darin, dass längere Sonden verwendet werden können, die besser binden und weniger zeitaufwändige Waschschriffe vorgenommen werden müssen. Herkömmliche FISH-Methoden, wie etwa PNA-FISH (peptide nucleic acid), haben den Nachteil, dass die Sonden so kurz wie möglich sein sollen, um die Handhabbarkeit zu ermöglichen. Dadurch, dass die Oligonucleotid-Sequenz kurz ist, braucht man einen sehr stringenten Waschschriff, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Längere Sonden-Sequenzen binden sehr stark und spezifisch, sind aber in deren Handhabbarkeit schwer zu verwenden. Die Bildung einer Haarnadelstruktur reduziert sehr stark die gesamte Länge der Sonden und damit werden die Anwendungsmöglichkeiten erhöht.



Copyright Daniel Horspool mit Genehmigung zur Verwendung

Abb.1: Schematische Abbildung der Struktur eines Beacons

Um zu prüfen, ob die bbFISH ein geeignetes Mittel zur schnellen speziesspezifischen Erregerdiagnostik in respiratorischen Sekreten bei Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie ist, wurden von November 2010 bis Mai 2011 452 respiratorische Sekrete einer interdisziplinären chirurgischen Intensivstation unter Verwendung der bbFISH untersucht und mit einem Goldstandard, der konventionellen mikrobiologischen Anzucht und Analyse, verglichen.

2. Materialien

2.1. bbFISH

respiFISH HAP Gram - Panel (miacom diagnostics GmbH, Merowingerplatz 1a 40225 Düsseldorf)

- Clearance Buffer
0,174g TCEP
0,25g Dextransulfat
0,25ml Biotin (8mM)
12,5ml Tris/HCl pH 9,5 (1M) mit $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$ auf 250ml auffüllen
- 10x Stopp – Puffer
50ml MgCl_2 (1M)
430ml NaCl (5M)
500ml Tris/HCl pH 8,3 (1M)
20ml $\text{d}_d\text{H}_2\text{O}$
- Mounting Medium
- Immersionsöl

Ethanol 96 %, vergällt (Carl Roth GmbH & Co. KG, Schoemperlenstr. 3-5, 76185 Karlsruhe)

Heizplatte 52 °C (PST-60 HL plus Thermo Shaker von lab4you)

Heizplatte mit Hybridisierungskammer 52°C (von UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Fraunhofer Str. 11 , 82152 Planegg)

2.2. Kultur

MacConkey-Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Am Lippeglacis 4-8, 46483 Wesel)

Kochblutagar (bioMérieux Deutschland GmbH, Weberstraße 8, 72622 Nürtingen)

Columbia – Agar (bioMérieux Deutschland GmbH, Weberstraße 8, 72622 Nürtingen)

2.3. Patientenmaterial

Untersucht wurden 452 respiratorische Sekrete (Trachealsekrete, Sputum, bronchoalveoläre Lavagen (BAL) und Bronchialsekrete) von beatmeten Patienten der interdisziplinären chirurgischen Intensivstation des Universitätsklinikums Düsseldorf. In diesem Zusammenhang wurde ein positives Ethikvotum von der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Studiennummer 4445 eingeholt. Respiratorische Sekrete werden von Patienten mit Verdacht auf Pneumonie durch blindes tiefes Absaugen der Trachea bzw. endoskopisch gewonnen als BAL oder Bronchialsekret. Da die Qualität eines Sekretes im mikrobiologischen Sinne sehr unterschiedlich sein kann und beim Absaugen unter nicht direkter Sicht nicht gewährleistet werden kann, dass der vermutliche Infektionsort tatsächlich erreicht wurde, verwendet man in der diagnostischen Mikrobiologie die Gramfärbung als Qualitätskontrolle. Die Anwesenheit von Leukozyten und deren Anzahl geben einen Hinweis auf die Qualität des Materials. Sind wenige Leukozyten und/oder proportional viele Epithelzellen im Vergleich zu Leukozyten vorhanden, gilt das Material als minderwertig. In solchen Materialien erwartet man nur, die Keime einer Besiedlung nachzuweisen und nicht die, die eine pathogene Bedeutung haben, zu isolieren. In die Studie einbezogen wurden alle Sekrete, die in der Gramfärbung vereinzelt, mäßig oder reichlich Leukozyten aufwiesen; Diejenigen mit einer ganz vereinzelt Anzahl oder gar keinen Leukozyten wurden nicht in die Studie aufgenommen.

3. Methoden

3.1. Bearbeitung der klinischen Proben

Die gesammelten Patientenmaterialien wurden parallel zur Auswertung in der Routine-Diagnostik sowohl durch die bbFISH untersucht als auch auf Nährböden (MacConkey-Agar, Columbia-Agar und Kochblutagar) mittels Drei-Ösen-Verfahren ausgestrichen und die Platten über Nacht bei 36 °C bei Raumluft (MacConkey) bzw. in 5 % CO₂ angereicherter Luft (Columbia-Agar und Kochblut-Agar) inkubiert. Die Untersuchungen der Routine-Diagnostik wurden in keiner Weise beeinflusst und mit standardisierten mikrobiologischen Methoden durchgeführt. Der Untersucher, der die bbFISH bewertet hat, hatte keine Kenntnisse dieser Ergebnisse. Diskrepante Ergebnisse zwischen bbFISH und Kultur wurden durch die Ergebnisse der Kulturen der Routine-Diagnostik überprüft. Diese Fälle wurden unter Verwendung der parallel ausgestrichenen Platten kontrolliert und weiter bearbeitet. Als „ganz vereinzelt“ wird das Bakterienwachstum bezeichnet, wenn in nur einem Quadranten der ausgestrichenen Agarplatte Bakterien zu sehen sind. Ist dies in zwei Quadranten der Fall, wird das Wachstum entsprechend als „vereinzelt“, in drei Quadranten als „mäßig“ und in vier Quadranten als „reichlich“ quantifiziert.

3.2. bbFISH

3.2.1. Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Proben beginnt mit der Mucolyse. Dazu wird in das Röhrchen mit dem jeweiligen Sekret Clearance Buffer hinzugegeben. Hierbei ist es schwierig, eine allgemeingültige Aussage zur Menge des benötigten Puffers abzugeben, da hinsichtlich der Konsistenz der Patientenmaterialien große Unterschiede bestehen (von flüssig bis viskös); Handelt es sich bei der zu untersuchenden Probe um eine klare Flüssigkeit ohne visköse Anteile, ist die Anwendung des Clearance Buffers nicht notwendig. Im Normalfall wird die Probe jedoch zunächst ungefähr in einem 1:1 Verhältnis mit Puffer verdünnt und anschließend geschüttelt, bis eine möglichst homogene Flüssigkeit entstanden ist. Ist dieser Zustand noch nicht erreicht oder ist die gänzliche Auflösung der festen Sekretbestandteile nicht möglich, wird die Probe 1-2 Minuten abgestellt und danach erneut geschüttelt. In den meisten Fällen ist an dieser Stelle nun ein weiterer Verdünnungsschritt erforderlich: Ein kleiner Teil des noch zu viskösen Sekrets wird in ein 1,5 ml Tube pipettiert. Das Gefäß wird mit Clearance Buffer aufgefüllt und wiederum geschüttelt.

Als nächstes wird das verflüssigte Sekret auf einen Objektträger mit 8 Feldern aufgetragen mit je 10 µl pro Feld. Die Objektträger werden auf eine Heizplatte (52° C) gelegt, bis das Material eingetrocknet ist (ca. 5 Minuten). Auf jedes Feld werden 10 µl Lysis-Puffer pipettiert und ebenfalls ca. 5 Minuten auf einer Heizplatte getrocknet, bevor die Objektträger in ein 96%iges tagesfrisches Ethanolbad eingelegt werden. Nachdem das Ethanol auf der Heizplatte verdampft ist, werden pro Feld 10 µl der jeweiligen Sonden appliziert. Die Objektträger werden mit speziell gefertigten Hybridisierungsdeckeln versehen, um ein Verdunsten der Sonden zu vermeiden, und dann 10 Minuten auf einer Heizplatte mit Hybridisierungskammer bei 52 °C inkubiert. Danach werden die Hybridisierungsdeckel wieder von den Proben entfernt.

Anschließend erfolgt das Einlegen in ein Bad mit Stopp-Puffer für 1 Minute. Es ist wichtig, dass dieser Zeitraum um nicht mehr als höchstens 15-20 Sekunden überschritten wird. Der Puffer ist nach 15 oder spätestens 20 Proben auszuwechseln. Nach diesem Stopp-Bad werden die Proben kurz in ein zweites Ethanolbad (96 %) eingetunkt und erneut auf der Heizplatte getrocknet. Pro Feld wird ein Tropfen Mounting-Medium zentral aufgetragen, bevor zuletzt auf jeden Objektträger ein Deckgläschen aufgelegt wird.

3.2.2. Auswertung

Zur optischen Auswertung der Proben wurde ein Fluoreszenzmikroskop des Types BX 41 der Firma Olympus bei einer 100-fachen Vergrößerung verwendet. Dazu wurden alle 8 Objektträgerfelder in 2 Kanälen, einem roten und einem grünen Kanal, untersucht. Verwendet wurden hier zwei Fluoreszenzfilter mit einem Absorptionsmaximum bei $\lambda = 494$ nm bzw. 554 nm. Jede Auswertung beginnt mit der Positivkontrolle auf Feld 1 im roten Kanal. Hier fluoreszieren zunächst alle vorhandenen Bakterien. Das gesamte Feld wurde auf solche fluoreszierenden Keime abgesehen. Als positiv zu werten ist ein Signal im roten Kanal nur dann, wenn es im grünen Kanal (das heißt in diesem Fall in der Negativkontrolle) nicht ebenfalls zu sehen ist. Bei persistierendem Leuchten im 2. Kanal würde es sich um Autofluoreszenz handeln.

Abb.2:

Abb.3:

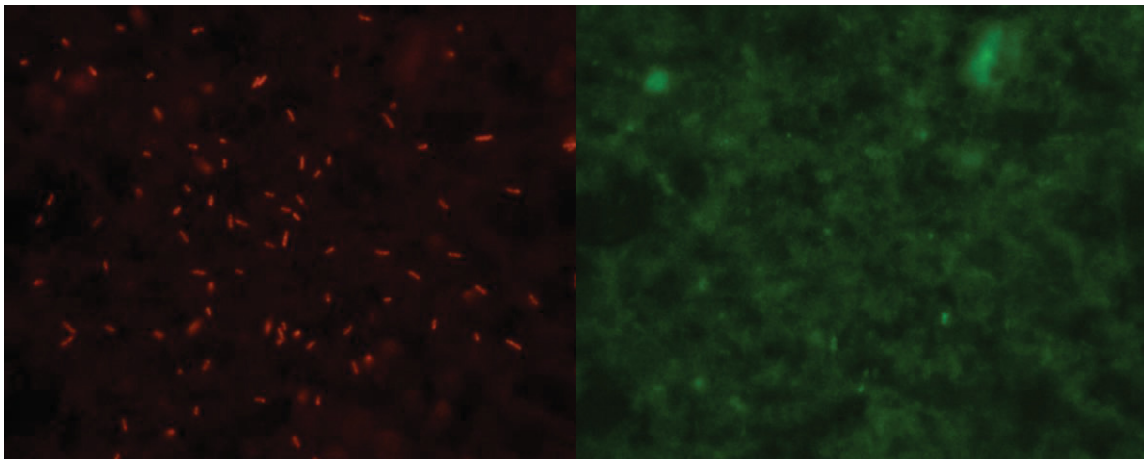


Abbildung 2 und 3 Positiv - und Negativkontrolle: Respiratorisches Sekret wurde mit Hybridisierungssonde für Eubakterien für 10 Min. bei 52 °C inkubiert und danach die Reaktion gestoppt wie in der Methoden beschrieben. Es handelt sich hierbei um ein positives Signal im roten Kanal (Abbildung 2) und nicht um Autofluoreszenz, da die fluoreszierenden stäbchenförmigen Bakterien im grünen Kanal, der Negativkontrolle (Abbildung 3), nicht vorhanden sind.

Ist in Feld 1 kein Leuchten zu finden, sind entweder keine oder zu wenige Keime in der Probe vorhanden. In wenigen Fällen kann dies auch bedeuten, dass die Hybridisierung fehlgeschlagen ist. Innerhalb der Studie wurden die restlichen Felder auch dann begutachtet, wenn die Positivkontrolle negativ war, um möglichst keine Bakterien zu übersehen und eine eventuell fehlgeschlagene Hybridisierung auf Feld 1 auszuschließen. Nach Feld 1 folgte die Auswertung auf allen weiteren Feldern. Ein positives Leuchten auf Feld 3 im roten Kanal bedeutet beispielsweise das Vorhandensein von *Escherichia coli*.

Die Quantifizierung der Keime wurde folgendermaßen vorgenommen: Der Fund von einzelnen Bakterien auf dem ganzen Feld wurde mit „1 = vereinzelt“ bewertet, von 3 bis 5 Keimen in fast jedem Sichtfeld des Mikroskops mit „2 = mäßig“ und jede Keimzahl, die noch darüber hinausging, mit „3 = reichlich“.

Tabelle 2: Verwendete Sonden.

Feld	Roter Kanal	Grüner Kanal
1	Positivkontrolle	Negativkontrolle
2	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3	<i>Escherichia coli</i>	<i>Acinetobacter</i> spp.
4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
5	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>
6	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Moraxella catarrhalis</i>
7	<i>Proteus mirabilis</i>	
8	<i>Proteus vulgaris</i>	

Hier werden die in der Studie getesteten Sonden, ihre jeweilige Position auf dem Objektträger und der Kanal, in dem sie zu beurteilen sind, aufgelistet. Auf die Felder 2 bis 6 werden je zwei Sonden appliziert. Die in der mittleren Spalte enthaltenen Beacons fluoreszieren im roten Kanal, die in der rechten Spalte im grünen Kanal. Die Negativkontrolle auf Feld 1 im grünen Kanal stellt keine Sonde dar, sondern sie dient zusammen mit der Positivkontrolle der Überprüfung, ob die Hybridisierung erfolgreich war.

Auf den folgenden Seiten ist eine beispielhafte Auswertung einer Probe, in der *Escherichia coli* und *Stenotrophomonas maltophilia* detektiert wurden, abgebildet. Mit dem Eubakterien-Feld sind auf Bild A zunächst alle Bakterien zu sehen, die sich in dem Sekret befanden, d.h. in diesem Fall sowohl *Escherichia coli* als auch *Stenotrophomonas maltophilia*, während Bild B die zugehörige Negativkontrolle darstellt. Da *E. coli* der Familie der *Enterobacteriaceae* angehört, war auch das entsprechende Feld positiv (Bild C und Bild D mit Negativkontrolle). Die Bilder E und G zeigen die jeweiligen artenspezifischen Felder für *Escherichia coli* (Bild E) und *Stenotrophomonas maltophilia* (Bild G) mit den jeweiligen Negativkontrollen auf Bild F und Bild H.

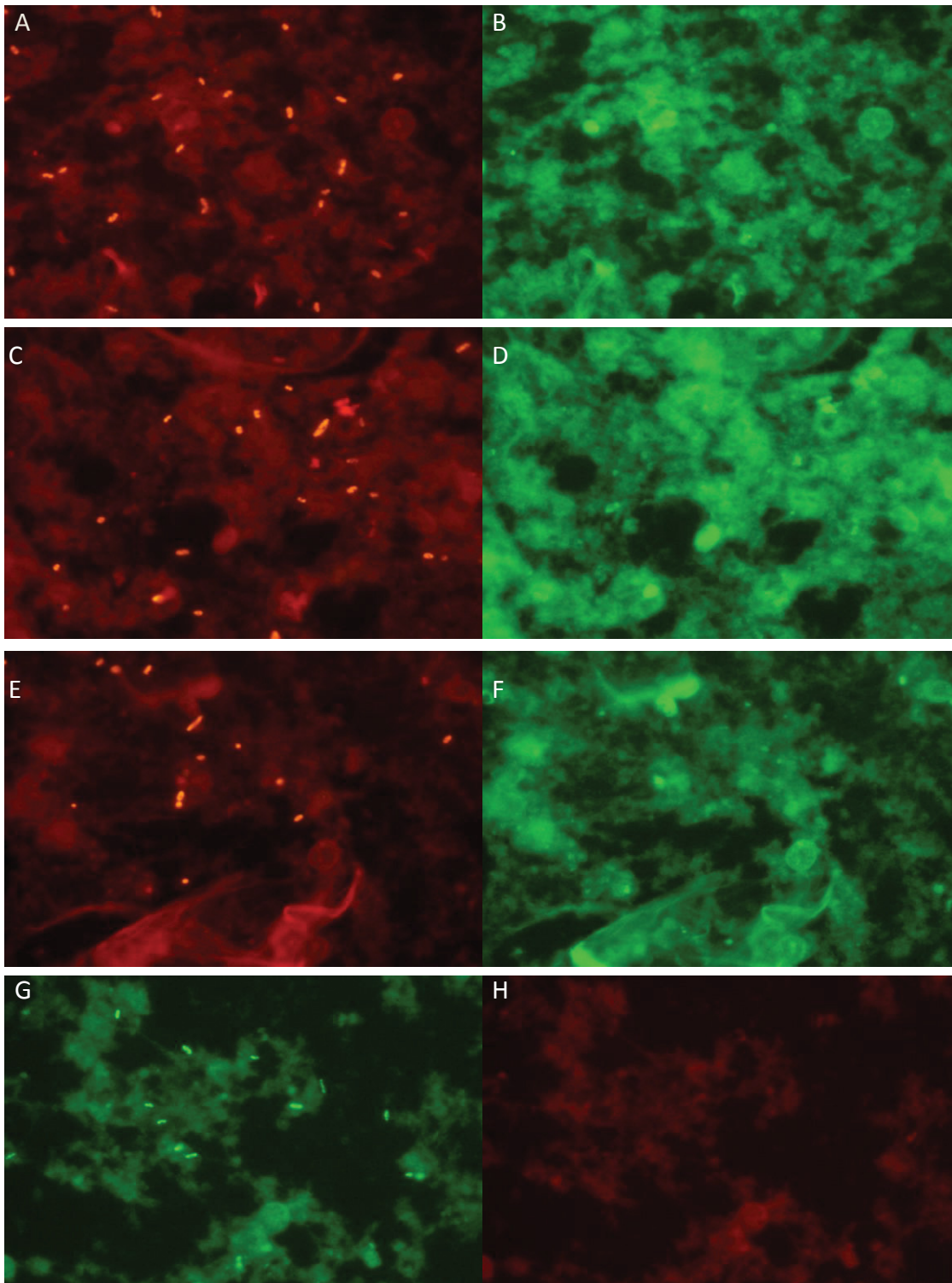


Abb.4: Mikroskopische Auswertung respiratorischer Sekrete. Material wurde fixiert und hybridisiert mit der Eubakterien-Sonde (Bild A und B), der *Enterobacteriaceae*-Sonde (Bild C und D), der *Escherichia coli*-Sonde (Bild E und F) und der *Stenotrophomonas maltophilia*-Sonde (Bild G und H). Die Bilder A, C und E zeigen positive Ergebnisse Sonden-markierter, rot leuchtender Bakterien im roten Kanal ($\lambda_{Ex} = 554\text{nm}/ \lambda_{Em} = 576\text{nm}$), die Bilder B, D und F die jeweiligen Negativkontrollen im grünen Kanal ($\lambda_{Ex} = 494 \text{ nm}/ \lambda_{Em} = 520 \text{ nm}$). Auf Bild G ist ein positives Ergebnis grün leuchtender Bakterien, die mit der *Stenotrophomonas maltophilia*-Sonde markiert sind, im grünen Kanal ($\lambda_{Ex} = 494 \text{ nm}/ \lambda_{Em} = 520 \text{ nm}$) zu sehen, Bild H im roten Kanal ($\lambda_{Ex} = 554\text{nm}/ \lambda_{Em} = 576\text{nm}$) ist die entsprechende Negativkontrolle. Alle Bilder stellen repräsentative Felder bei 1000-facher Vergrößerung dar.

4. Ergebnisse

Insgesamt wurden 452 Patientenproben im Zeitraum von September 2010 bis April 2011 in die Studie eingeschlossen. Darunter befanden sich 415 Trachealsekrete (TS), 11 Bronchialsekrete (BS), 19 bronchioalveoläre Lavagen (BAL), 6 Sputa und 1 Drainagesekret (DS).

4.1. Untersuchtes und insgesamt erfasstes Keimspektrum

Tabelle 3 zeigt die gramnegativen Bakterien, deren Beacons in der Studie angewandt wurden und deren jeweilige Häufigkeiten in den untersuchten Proben. *Enterobacteriaceae* waren mit 143 Fällen mit Abstand die größte Erregergruppe; *Escherichia coli* trat innerhalb dieser Familie mit 24 Fällen am häufigsten auf. *Moraxella catarrhalis* wurde in keiner der Proben gefunden.

Tabelle 3: Verteilung der nachgewiesenen Spezies unter den positiven respiratorischen Sekreten (N= 254)

Bakterien	Relative Häufigkeiten in %
<i>Enterobacteriaceae</i>	56,3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16,1
<i>Escherichia coli</i>	12,6
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9,4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	7,9
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	7,1
<i>Haemophilus influenzae</i>	5,5
<i>Acinetobacter</i> spp. (davon <i>Acinetobacter baumannii</i>)	5,5 1,2
<i>Proteus mirabilis</i>	2,4
<i>Serratia marcescens</i>	1,97
<i>Proteus vulgaris</i>	0,39
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0

Aufgeführte Prozentzahlen ergeben sich aus der absolut ermittelten Anzahl des jeweiligen Erregers im Verhältnis zur Gesamtzahl der positiven respiratorischen Sekrete (N=254). Die Summe aller relativen Häufigkeiten ist größer als 100 % aufgrund polymikrobieller Proben.

4.2. Sensitivität und Spezifität der bbFISH

Diese Vierfeldertafeln zeigen die Testergebnisse der bbFISH verglichen mit den als Referenz festgelegten Ergebnissen der bakteriellen Kulturen. Den Tafeln liegen jeweils unterschiedliche Diagnosekriterien zugrunde. Tabelle 4 beinhaltet die rohen Daten, in der beispielsweise auch sehr geringe nicht detektierte Keimzahlen als falsch negatives Ergebnis gewertet wurden. Auf dieser Grundlage ergeben sich eine Sensitivität von 71,26 % und eine Spezifität von 94,4 %.

Tabelle 4: Anzahl der positiven bzw. negativen Kulturergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der bbFISH

		bbFISH		Gesamt
		positiv	negativ	
Kultur	positiv	181	73	254
	negativ	11	187	198
Gesamt		192	260	452

Sensitivität: 71,26 % ; Spezifität: 94,4 %

In Tabelle 5 und 6 wurden Ergebnisse als negativ bzw. als positiv gewertet, wenn es sich dabei um eine ganz vereinzelt bzw. um eine vereinzelt Anzahl an Bakterien handelte. Enthielt eine Probe beispielsweise eine (über die Auswertung der Kulturen definierte) ganz vereinzelt Anzahl an Bakterien, die aber unter Anwendung der bbFISH nicht detektiert wurden, wurde dieses Ergebnis in der Tabelle 4 den falsch negativen Ergebnissen zugeordnet, in Tabelle 5 jedoch den richtig negativen Ergebnissen. Bei Tabelle 6 wurde mit demselben Prinzip verfahren, wobei hierbei auch vereinzelt (und nicht nur ganz vereinzelt) mit der bbFISH falsch bewertete Keimzahlen als vernachlässigbar galten und jeweils als richtig positiv oder richtig negativ bewertet wurden. Diese Toleranz ganz vereinzelter Keimzahlen (oder auch vereinzelter, siehe Tabelle 6) macht durchaus Sinn, da die bakterielle Kolonisation der Atemwege ein häufiges Phänomen bei Intensivpatienten ist (12) und das Vorkommen einer geringen Anzahl von Bakterien somit oft nicht auf die Präsenz einer VAP hinweist. Auch die Interpretation quantitativer Kulturen funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip (siehe 1.5.1.4.3 Mikrobiologische Diagnose, Abschnitt quantitative/qualitative Kulturen); Von einer Infektion wird erst ab einem bestimmten Schwellenwert ausgegangen,

um so möglichst Kolonisation und Infektion voneinander unterscheiden zu können und die Rate an falsch positiven Ergebnissen durch die Kolonisation zu verringern (12).

Aus dieser Vorgehensweise resultierten eine Sensitivität von 77,1 % und eine Spezifität von 95,8 % für Tabelle 5, eine Sensitivität von 85,65 % und eine Spezifität von 98,25 % für Tabelle 6.

Tabelle 5: Anzahl der positiven bzw. negativen Kulturergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der bbFISH ¹

		bbFISH		Gesamt
		positiv	negativ	
Kultur	positiv	185	55	240
	negativ	9	203	212
Gesamt		194	258	452

¹ Bezüglich der Kulturergebnisse wurde hier nur ein semi-quantitatives Wachstum von mehr als ganz vereinzelt (siehe Methoden Kap. 3.1) als positiv betrachtet.

Sensitivität: 77,1 % ; Spezifität: 95,8 %

Tabelle 6: Anzahl der positiven bzw. negativen Kulturergebnisse im Vergleich zu den Ergebnissen der bbFISH ²

		bbFISH		Gesamt
		positiv	negativ	
Kultur	positiv	191	32	223
	negativ	4	225	229
Gesamt		195	257	452

² Bezüglich der Kulturergebnisse wurde hier nur ein semi-quantitatives Wachstum von mehr als vereinzelt (siehe Methoden Kap. 3.1) als positiv betrachtet.

Sensitivität: 85,65 % ; Spezifität: 98,25 %

4.3. Diagnostische Genauigkeit der einzelnen Beacons

Weiterhin wurden die Sensitivitäten für jedes Beacon einzeln bestimmt (Tabelle 7, 8 und 9). Sie errechneten sich als der prozentuale Anteil der positiven FISH-Ergebnisse an den positiven Kulturergebnissen. Während Tabelle 7 wieder die Gesamt-Daten zeigt, wurden in den beiden anderen Tabellen alle Kulturergebnisse mit einem semiquantitativen Wert von

ganz vereinzelt (Tabelle 8) oder vereinzelt (Tabelle 9) als negativ betrachtet und werden in der Spalte „Kultur positiv“ dieser Tabellen daher nicht aufgeführt. Daraus ergibt sich zum Beispiel für *Pseudomonas aeruginosa* in Tabelle 7 mit 41 positiven Kulturen und davon 35 positiven bbFISH eine Sensitivität von 85,4 %. In Tabelle 8 wurden von den 41 positiven Kulturen aufgrund zweier ganz vereinzelt negativer Ergebnisse 2 Kulturen abgezogen; Die Sensitivität beträgt bei 39 positiven Kulturen und 35 positiven bbFISH nun also 89,7 %. Bei 4 vereinzelt falsch negativen Ergebnissen zeigt Tabelle 9 entsprechend mit 35 positiven Kulturen und 35 positiven bbFISH eine 100 %ige Sensitivität.

Vergleicht man die einzelnen Sensitivitäten und auch die verschiedenen Tabellen untereinander, wird deutlich, dass die Sonden von *Serratia marcescens* und *Proteus vulgaris* mit 100 %iger und die von *Stenotrophomonas maltophilia* mit 94,4 %iger Sensitivität insgesamt am zuverlässigsten sind. Werden die bereits beschriebenen Kriterien von Tabelle 8 angewandt, erreicht auch die *Pseudomonas aeruginosa*-Sonde 100 %. Für *Klebsiella pneumoniae* wurden mit 30,0 %, 37,5 % bzw. 46,2 % die schlechtesten Resultate beobachtet. Da *Moraxella catarrhalis* in keiner der 452 Proben detektiert wurde, konnte die Funktionsfähigkeit des entsprechenden Beacons innerhalb der Studie nicht beurteilt werden.

Tabelle 7: Sensitivitäten der einzelnen Sonden

Beacons	Kultur positiv	bbFISH positiv	Sensitivität
<i>Enterobacteriaceae</i>	143	103	72,0 %
<i>Escherichia coli</i>	32	17	53,1 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	20	6	30,0 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	24	16	66,7 %
<i>Serratia marcescens</i>	5	5	100 %
<i>Proteus mirabilis</i>	6	3	50,0 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	100 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	41	35	85,4 %
<i>Acinetobacter</i> spp.	14	8	57,1 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18	17	94,4 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	14	12	85,7 %
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	0	-

Tabelle 8: Sensitivitäten der einzelnen Sonden ³

Beacons	Kultur positiv	bbFISH positiv	Sensitivität
<i>Enterobacteriaceae</i>	127	103	81,1 %
<i>Escherichia coli</i>	31	17	54,8 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	16	6	37,5 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	23	16	69,6 %
<i>Serratia marcescens</i>	5	5	100 %
<i>Proteus mirabilis</i>	5	3	60,0 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	100 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	39	35	89,7 %
<i>Acinetobacter</i> spp.	14	8	57,1 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18	17	94,4 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	14	12	85,7 %
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	0	-

³ Bezüglich der Kulturergebnisse wurde hier nur ein semi-quantitatives Wachstum von mehr als ganz vereinzelt (siehe Methoden Kap. 3.1) als positiv betrachtet.

Tabelle 9: Sensitivitäten der einzelnen Sonden ⁴

Beacons	Kultur positiv	bbFISH positiv	Sensitivität
<i>Enterobacteriaceae</i>	113	103	91,2 %
<i>Escherichia coli</i>	23	17	73,9 %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	6	46,2 %
<i>Klebsiella oxytoca</i>	19	16	84,2 %
<i>Serratia marcescens</i>	5	5	100 %
<i>Proteus mirabilis</i>	4	3	75,0 %
<i>Proteus vulgaris</i>	1	1	100 %
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	35	35	100 %
<i>Acinetobacter</i> spp.	14	8	57,1 %
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	18	17	94,4 %
<i>Haemophilus influenzae</i>	14	12	85,7 %
<i>Moraxella catarrhalis</i>	0	0	-

⁴ Bezüglich der Kulturergebnisse wurde hier nur ein semi-quantitatives Wachstum von mehr als vereinzelt (siehe Methoden Kap. 3.1) als positiv betrachtet.

4.4. Ausschließlich mittels der bbFISH detektierte Bakterien

In einigen Fällen gelang es, unter Verwendung der bbFISH Pathogene zu identifizieren, die zumindest initial mittels der Kulturauswertung nicht gefunden worden waren. Das betrifft insgesamt 19 zusätzlich detektierte Pathogene in 18 verschiedenen Proben. Siebzehn dieser 18 Proben waren polymikrobiell, d.h. sie enthielten mehr als eine Bakterienart, und im Falle der 18. Probe konnte die bbFISH im Gegensatz zur Kultur eine speziesspezifische Identifikation leisten. Tabelle 10 listet diese zusätzlichen Keime auf und wie oft sie in welcher Menge (mittlere 3 Spalten) und auch insgesamt (rechte Spalte) entdeckt wurden. Bei 9 der 19 Funde handelte es sich um eine vereinzelte, bei 7 um eine mäßige und bei 3 um eine reichliche Keimzahl. *Pseudomonas aeruginosa* wurde mit 5 Malen am häufigsten ergänzend gefunden. Ganz vereinzelte Keimzahlen wurden in dieser Auflistung nicht berücksichtigt.

Tabelle 10: Anzahl der Erreger, die von der bbFISH detektiert und bei einer erneuten bakteriellen Anzucht identifiziert wurden

	Quantität			
	vereinzelte	mäßig	reichlich	Gesamt
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	-	-	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	-	-	1
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	1	1
<i>Proteus mirabilis</i>	2	1	-	3
<i>Proteus vulgaris</i>	1	-	-	1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3	2	-	5
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	2	-	2
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	2	1	3
<i>Haemophilus influenzae</i>	1	-	1	2
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-	-	-	-
	9	7	3	19

Die parallel ausgetrichenen Kulturen der Proben (das heißt zusätzlich zur Routine - Diagnostik angelegte Kulturen (siehe Methoden Kap. 3.1)), bei denen die bbFISH einen solchen „zusätzlichen“ Keim identifizieren konnte, wurden nochmals überprüft und der mit der bbFISH detektierte Erreger gezielt gesucht.

5. Diskussion

In dieser Dissertation wurde untersucht, ob es sich bei der bbFISH um eine geeignete Methode in der Erregerdiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie handelt. Bei der Beantwortung dieser Frage müssen verschiedene Aspekte einbezogen werden.

Einer dieser Aspekte ist die Sensitivität und die Spezifität des Verfahrens. Werden auch ganz vereinzelte Bakterien bei der Ergebnisauswertung der Kulturen der 452 Sekrete berücksichtigt, ergibt sich eine Sensitivität von 71,26 % und eine Spezifität von 94,4 %; Bleiben ganz vereinzelte bzw. vereinzelte Keimzahlen unbeachtet bei der Kulturauswertung, beträgt die Sensitivität 77,1 % bzw. 85,65 % und die Spezifität 95,8 % bzw. 98,25 %. Diese Gesamt-Ergebnisse deuten darauf hin, dass die bbFISH eine sensitive und sehr spezifische Methode in der Erregerdiagnostik von Patienten mit Verdacht auf VAP ist. Das Ausklammern der geringen Keimzahlen ist eine durchaus sinnvolle Überlegung in der VAP-Diagnose, denn auch quantitative Kulturen funktionieren nach dem Prinzip, eine definierte geringe Menge an Bakterien zu vernachlässigen und erst ab einer gewissen Schwelle als positiv zu gelten, um dem Problem der Unterscheidung zwischen Kolonisation und Infektion gerecht zu werden, was schon unter Punkt 1.5.1.4.3.3. beschrieben wurde. Einen solchen diagnostischen Schwellenwert für die bbFISH zu definieren, könnte das Ziel weiterführender klinischer Studien werden.

Neben der Gesamt-Sensitivität sind jedoch auch die Sensitivitäten jeder einzelnen Sonde von Bedeutung, besonders die von potentiell multiresistenten Keimen wie *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* und weiteren potentiellen ESBL-Bildnern wie *Escherichia coli* und *Klebsiella* spp. Obwohl das Vorkommen von multiresistenten Bakterien zwischen verschiedenen Institutionen und sogar zwischen verschiedenen Stationen innerhalb eines Hauses stark variieren kann (54), ist *Pseudomonas aeruginosa* insgesamt einer der am häufigsten auftretenden VAP-Pathogene (12) mit einer Gesamtmortalität von ca. 70 % und einer zurechenbaren Mortalität von ca. 40 % (8;51). Auch in dieser Studie folgte *Pseudomonas aeruginosa* mit 41 Fällen hinter den *Enterobacteriaceae* mit 143 Fällen auf Platz 2. Es hat sich herausgestellt, dass die Sonde dieses Erregers mit 100 %iger Sensitivität (vereinzelte Keimzahlen vernachlässigt) einen sehr zuverlässigen Keimnachweis liefert.

Für *Acinetobacter* spp. wurde eine ähnliche Gesamt- und zurechenbare Mortalität beobachtet (8). Eine korrekte Erregeridentifikation mittels der bbFISH gelang hier in 8 von 14 Fällen, was zu einer Sensitivität von 57,1 % führt und damit zum Zeitpunkt der Untersuchungen die zweitschwächste Sonde darstellt. Dieses Ergebnis könnte unter anderem zwei Gründe haben: Erstens könnte die Hybridisierung in den 6 Fällen fehlgeschlagen sein. Außerdem ist es denkbar, dass trotz erfolgter Hybridisierung aufgrund des schwachen Leuchtens der *Acinetobacter*-Sonde bei möglicherweise stark vorhandenem Hintergrund (Detritus, Erythrozyten etc.), der ebenfalls bis zu einem gewissen Grad leuchtet, die Bakterien in der Probe nicht gesehen werden konnten. Eine stärkere Verdünnung der Sekrete bietet hierbei eine nur sehr eingeschränkte Lösung des Problems, denn bei zu starker Verdünnung besteht die Gefahr, dass sich verhältnismäßig wenige Bakterien in zu viel Flüssigkeit verteilen und für die Auswertung auf dem Objektträger ein Teil abpipettiert wird, der gar keine Bakterien enthält. In einem Zentrum, in dem *Acinetobacter*-Pneumonien gehäuft vorkommen, ist eine solche Sensitivität möglicherweise problematisch. Allerdings sind *Acinetobacter*-Pneumonien mit 7,9 %iger Häufigkeit (12) insgesamt betrachtet weitaus seltener als *Pseudomonas*-Pneumonien. Eine Überarbeitung der Sonde oder eine Verfeinerung des Probenaufarbeitungsablaufes und der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung könnte bereits eine höhere Sensitivität zur Folge haben.

Als ungünstiges Ergebnis erscheint die Tatsache, dass die *Klebsiella pneumoniae* – Sonde mit 30 %iger Sensitivität, wenn jegliche Keimzahl berücksichtigt wird und mit 37,5 % und 46,2 % bei vernachlässigter ganz vereinzelter bzw. vereinzelter Keimzahl die unzuverlässigste Erregeridentifikation liefert. Es hat sich jedoch herausgestellt, dass der Grund hierfür wahrscheinlich in einer initial verwendeten defekten Menge an Beacons liegt, denn ab dem Zeitpunkt, an dem jene verbraucht und neue verwendet worden waren, konnten von einigen weiteren Klebsiellen-Proben nur noch 2 mit vereinzelter Keimzahl nicht korrekt identifiziert werden, sodass sich die Sensitivität von anfänglich ca. 20 % auf die genannten Werte steigern konnte. Dies lässt vermuten, dass eine erneute Erprobung der Sonde mit einem deutlich besseren Ergebnis verbunden wäre.

Alle weiteren Sonden weisen Sensitivitäten zwischen 73,9 und 100 % auf. Da es sich bei der bbFISH im Gegensatz zur kulturellen Anzucht um einen Schnelltest handelt, kann sie als solcher nicht an die Sensitivität der Kultur heranreichen und muss deshalb diesbezüglich

auch mit anderen Maßstäben gemessen werden, sodass man hierbei von guten Ergebnissen sprechen kann.

Moraxella catarrhalis wurde weder kulturell noch mittels der bbFISH in einer der 452 Proben nachgewiesen. Daher sollte in der klinischen Routinediagnostik über einen Ersatz dieses Beacons nachgedacht werden. Eine Möglichkeit wäre hier eine *Staphylococcus aureus*-Sonde, da MRSA auf vielen Intensivstationen ein großes Problem darstellt (90). Laut der von Chastre und Fagon zusammengestellten Daten ist *Staphylococcus aureus* hinsichtlich beatmungsassoziierter Pneumonien hinter *Pseudomonas aeruginosa* insgesamt betrachtet mit 20,4 % der zweithäufigste Erreger; 55,7 % der Staphylokokken waren Methicillin-resistent und 44,3 % Methicillin-sensibel. Rello et al. (91) beobachteten in einer Studie für MRSA-VAP eine 120-fach erhöhte Mortalität gegenüber VAP, die von Methicillin-sensiblen Staphylokokken ausgelöst wurden. Eine Unterscheidung zwischen resistenten und sensiblen Stämmen ist zwar mittels der bbFISH nicht möglich, jedoch könnte bei der Diagnose einer Staphylokokken-Pneumonie mit einer MRSA-Therapie begonnen werden, die dann bei Vorliegen der Resistenzlage gegebenenfalls umgestellt würde. Diese Überlegung ist jedoch abhängig von der Inzidenz der MRSA-Pneumonie auf der jeweiligen Station; Bei einer hohen Inzidenz kann ein solches Vorgehen durchaus in Erwägung gezogen werden, bei einer niedrigen Inzidenz würde das allerdings wenig Sinn machen.

Es hat sich herausgestellt, dass die bbFISH gegenüber der Kultur zwei Hauptvorteile hat. Erstens liegen die Ergebnisse der bbFISH schon, nach Ankunft im Labor, nach ca. 45 Minuten vor, während die kulturelle Anzucht bis zu 48 Stunden dauert. Außerdem scheint die bbFISH einzelne Pathogene bei polymikrobiellen Infektionen besser identifizieren zu können.

Auch wenn nach wie vor in Abwesenheit eines Goldstandards in der VAP-Diagnostik (92) Uneinigkeit über die zu verwendende diagnostische Technik oder Strategie herrscht, sind sich die Experten einig darin, dass die frühe Gabe einer adäquaten Antibiotikatherapie von enormer Bedeutung für das Outcome von VAP-Patienten ist (3;31;87). Das bedeutet, dass das Outcome sowohl von der Geschwindigkeit des Therapiebeginns als auch von der korrekten Wahl der Medikamente abhängt, denn eine inadäquate initiale Antibiotikatherapie ist mit signifikant höherer Mortalität assoziiert als eine adäquate Therapie (31;93-95). Einige Autoren schlagen vor, auf jeder Station in jeder Institution Daten über die vorherrschenden Erreger und deren antimikrobielle Empfindlichkeiten zu sammeln

und die empirische Therapie nach diesen lokal erhobenen Informationen zu richten (1;47;54;96), um die Zeit zu überbrücken, bis die definitiven kulturellen Ergebnisse und das entsprechende Antibiogramm vorliegen. Unter Verwendung der bbFISH könnte man den bzw. die Erreger allerdings sehr viel schneller genau differenzieren und mit den epidemiologischen Daten hinsichtlich der Resistenzlage eines bzw. mehrerer konkreter Erreger die Wahrscheinlichkeit einer adäquaten initialen Antibiotikatherapie stark erhöhen. Verschiedene Studien geben Hinweise darauf, dass eine auf bakteriellen Kulturen basierende Therapieanpassung nach initial inadäquater Behandlung das Outcome von Patienten nicht mehr verbessern kann (31;97), sodass ein solcher Ansatz umso wichtiger erscheint. In welchem Ausmaß ein solches Vorgehen das Outcome von VAP-Patienten positiv beeinflussen kann, sollte in weiterführenden Studien evaluiert werden.

Inwieweit der zweite Vorteil, die verbesserte Erregeridentifikation in polymikrobiellen Proben, klinisch bedeutsam sein könnte, ist weitaus schwieriger zu beurteilen. Studien zur Beantwortung der Frage, ob polymikrobielle Infektionen das Outcome von VAP-Patienten beeinflussen, weisen unterschiedliche Ergebnisse auf (50;98;99). In einer Studie von Teixeira et al. war das Risiko für eine initial inadäquate Antibiotikatherapie, die mit höherer Mortalität assoziiert war, zweifach erhöht bei Patienten mit late-onset-VAP und dreifach erhöht bei durch multiresistente Keime hervorgerufenen Pneumonien oder bei polymikrobiellen Infektionen. Combes et al. (50) konnten in ihrer Studie zur Erfassung der Inzidenz und des Outcome polymikrobieller VAP allerdings trotz eines prozentual geringeren Anteils adäquater initialer Antibiotikatherapie in ihrer polymikrobiellen Gruppe (75 % adäquate Therapien gegenüber 92 % in der monomikrobiellen Gruppe) keinen statistisch signifikanten Unterschied bezüglich der Mortalität feststellen. Nicht-fermentierende Gramnegative und MRSA traten in den beiden untersuchten Gruppen in ähnlicher Häufigkeit auf. Die Autoren schlussfolgerten, dass der Bakterientyp in diesem Kontext einen wichtigeren prognostischen Faktor darstellt als die Anzahl der beteiligten Bakterien. Auch wenn also vorerst unklar bleibt, ob polymikrobielle Infektionen einen Risikofaktor für ein schlechteres Outcome bei VAP-Patienten darstellen, ist zumindest nicht auszuschließen, dass dies je nach lokaler Bakterienflora und antimikrobieller Resistenzlage der Fall sein könnte.

Der häufigste Grund für das Versagen einer Antibiotikabehandlung ist das Vorliegen von resistenten Keimen (100;101). Teixeira et al. beobachteten in ihrer Studie, dass eine Infektion mit multiresistenten Bakterien das Risiko für ein Therapieversagen bei VAP-

Patienten um den Faktor 3 erhöht (98). Potentiell resistente gramnegative Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp. und als grampositiver Vertreter MRSA zählen zu den häufigsten Pathogenen, die mit einer inadäquaten Behandlung verbunden sind (93). *Pseudomonas*-Stämme, die gegen fast alle verfügbaren Medikamente resistent sind, sind keine Rarität mehr (102). Gleiches gilt für *Acinetobacter baumannii*, dessen Stämme mit steigender Frequenz sogar unempfindlich gegenüber allen herkömmlichen Antibiotika sind (103). In einer Studie von Namiduru et al. zur antibiotischen Resistenz bakterieller VAP auf chirurgischen Intensivstationen (53) wiesen 3 von 60 Stämmen eine solche Resistenzlage auf. In Ländern wie Griechenland hingegen sind bis zu 50% der Klebsiellen auf Intensivstationen gegen Carbapeneme resistent (104).

Durch das vermehrte Auftreten von multiresistenten Pathogenen ist die Therapie der beatmungsassoziierten Pneumonie deutlich schwieriger geworden (105). Zwei maßgebliche Aspekte bestimmen die Strategie in der VAP-Therapie (1): Erstens müssen antimikrobielle Substanzen verwendet werden, die mutmaßlich gegen alle an der Infektion beteiligten Erreger wirksam sind; Zweitens soll der unnötige Einsatz von Antibiotika begrenzt werden, um die Selektion multiresistenter Erreger zu vermeiden (1). Die Strategie der antimikrobiellen De-Eskalation vereint diese beiden Prinzipien, um das Outcome von VAP-Patienten zu optimieren (1). Eine initial empirische Breitspektrum-Antibiotika-Therapie wird unter Berücksichtigung mikrobiologischer und klinischer Daten in eine Therapie mit weniger Antibiotika oder engerem Wirkungsspektrum überführt, ihre Dauer kann reduziert werden oder sie kann in ausgewählten Patienten sogar gestoppt werden (106), was die antimikrobielle Exposition und somit den Selektionsdruck zur Resistenzbildung reduziert (87). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ein solcher Ansatz zu signifikant geringeren Therapiekosten, antimikrobiellen Resistenzen und Superinfektionen führt, ohne dabei die Länge der Krankenhausverweildauer oder die Mortalität ungünstig zu beeinflussen (63;107).

Normalerweise werden Kulturergebnisse respiratorischer Sekrete zu einer der genannten möglichen Therapiemodifikationen herangezogen (106). Hier könnte allerdings auch die bbFISH als wesentlich schnellere Methode genutzt werden: In Abwesenheit von potentiell multiresistenten Keimen, wie beispielsweise *Pseudomonas aeruginosa*, dessen Sonde sich als sehr zuverlässig erwiesen hat, könnte von Beginn an auf ein schmaleres Wirkungsspektrum zurückgegriffen werden, was sowohl die Bildung von Resistenzen als auch unnötige Antibiotikakosten weiter eingrenzen könnte.

Obwohl die konventionelle Anzucht von Erregern ein fester Bestandteil in der VAP-Diagnostik ist, hat sie auch ihre Grenzen. Bahrani-Mougeot et al. (108) führten in ihrer Studie eine molekulare Analyse von Bakterien durch, die die Mundhöhle und die Lunge von Trauma-Intensivpatienten, die eine VAP entwickelten, besiedelten und verglichen diese Spezies miteinander. Sie verwendeten dazu ein kulturunabhängiges Verfahren (einschließlich PCR) und fanden eine deutlich größere Vielfalt bakterieller Pathogene als bisher in der Literatur beschrieben. In 56 % der Fälle wurden Pathogene detektiert, die bis jetzt nicht von mikrobiologischen Laboratorien, die Standard-Maßnahmen anwenden, identifiziert worden waren. Abgesehen davon konnten mehr als die Hälfte der Bakterien, die bereits in der Mundhöhle identifiziert worden waren, noch nicht angezüchtet werden (109). Es besteht also die Möglichkeit, dass es nicht kultivierbare Spezies gibt, die bislang nicht als potenzielle VAP-Erreger gelten (58). Sollten weitere Studien diesen Verdacht bestätigen, könnte die bbFISH auch hinsichtlich dieses Aspektes als nicht kulturbasierendes Verfahren eine nützliche Ergänzung in der mikrobiologischen Diagnostik darstellen, wenn es gelingen sollte, auch von den jeweiligen Pathogenen Sonden zu entwickeln.

Eine große Vielfalt an möglichen Erregern macht es allerdings erstens kaum möglich und unter Umständen auch zu teuer, in Einzelfällen alle potenziellen VAP-Pathogene mit der bbFISH abdecken zu können. Dies macht nochmals deutlich, dass das Sammeln von Daten über die lokal am häufigsten auftretenden Erreger (und deren Resistenzen) sehr wichtig ist.

Trotz der zumindest teilweise klinisch bedeutsamen Vorteile, die die bbFISH gegenüber der Kultivierung von Bakterien hat, kann und sollte sie die Letztere in der mikrobiologischen Diagnostik der VAP nicht ersetzen, sondern sie stellt vielmehr eine Ergänzung dar, vor allem um die zeitliche Lücke zu schließen, die aus der Dauer der Bebrütung der Kulturen resultiert. Die Resistenzbestimmung, die zwar bei der kulturellen Auswertung, nicht jedoch mit der bbFISH durchgeführt werden kann, spielt hierbei die wichtigste Rolle. Außerdem sind die Kulturen in der Detektion von Bakterien in respiratorischen Sekreten die sensitivere Methode. Gründe hierfür liegen unter anderem neben den in seltenen Fällen auftretenden fehlgeschlagenen Hybridisierungen auch in der Art und Weise, wie Proben für die bbFISH vorbereitet werden müssen. Manche Sekrete, zum Beispiel solche, die viele Erythrozyten enthalten, müssen stark verdünnt werden, damit in der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung nicht so viel ebenfalls in gewissem Maße fluoreszierender Hintergrund vorhanden ist, sodass vorhandene Bakterien überhaupt gesehen werden können. Diese

Vorgehensweise könnte dazu führen, dass eine schon in der Originalprobe ohnehin geringe Keimzahl herausgewaschen wird. Erstens bleibt es jedoch fraglich, inwieweit eine solch geringe Anzahl überhaupt klinisch relevant wäre und zweitens ist eine so starke Verdünnung bei der Mehrzahl der Proben nicht notwendig. Wird bei einer Probe eine größere Menge Clearance Buffer angewandt, sollte das in der Routinediagnostik dokumentiert werden, um eine geringe Keimzahl, die sich möglicherweise aus der Evaluation einer solchen Probe ergeben könnte, nicht zu unterschätzen.

Bei der Bewertung der Sensitivität und Spezifität der bbFISH muss, wie schon erwähnt, auch berücksichtigt werden, dass es sich im Gegensatz zur Anzucht von Bakterien um einen Schnelltest handelt, der insofern ohnehin nicht dieselbe diagnostische Sensitivität erzielen kann. Außerdem liegt die Bedeutung der mikrobiologischen Diagnostik nicht nur in der Diagnose der Pneumonie selbst, sondern vor allem auch in der Leitung der empirischen antimikrobiellen Therapie (58), und auf die Möglichkeiten der bbFISH diesbezüglich ist bereits an früherer Stelle hingewiesen worden. Auf dieser Grundlage sind die Daten der bbFISH durchaus vielversprechend. Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten darauf hin, dass es sich bei der bbFISH um eine nützliche Methode zur schnellen speziesspezifischen Erregerdiagnostik bei Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie handelt.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob es sich bei der bbFISH um eine geeignete Methode zur schnellen und speziesspezifischen Erregeridentifikation in respiratorischen Sekreten von Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie handelt. Dazu wurden von November 2010 bis Mai 2011 452 respiratorische Sekrete einer interdisziplinären chirurgischen Intensivstation mit diesem Verfahren untersucht und mit einem Goldstandard, der konventionellen Anzucht und Analyse, verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die bbFISH mit einer Sensitivität von 85,65 % und einer Spezifität von 98,25 % (basierend auf einem semi-quantitativen Schwellenwert der Bakterienkulturen \leq vereinzelt) ein wertvolles Instrument in der mikrobiologischen Diagnostik der VAP darstellen könnte.

Als Schnelltest ist sie zwar weniger sensitiv als die konventionelle kulturelle Erregeranzucht und ermöglicht im Vergleich zum Goldstandard keine Resistenzbestimmung, die für eine adäquate Antibiotikatherapie unersetzlich ist. Sie bietet jedoch zwei Vorteile, von der mindestens einer von entscheidender Bedeutung ist: Mithilfe der bbFISH ist eine Erregeridentifikation schon innerhalb von ca. 45 Minuten möglich, wogegen dies bei der kulturellen Anzucht erst nach 48 Stunden der Fall ist. Die bbFISH könnte diese zeitliche Lücke überbrücken und insbesondere unter Berücksichtigung lokaler Daten zur Resistenzlage des entsprechenden identifizierten Pathogens die Chance einer adäquaten initialen Antibiotikatherapie erheblich steigern, welche eine der bedeutendsten Faktoren hinsichtlich des Patienten-Outcomes ist (3;31;87). Insbesondere auf Stationen mit hoher Inzidenz von *Pseudomonas aeruginosa*, der zum Teil multiple Resistenzen aufweist (110), ist dessen Ausschluss an einer Beteiligung an einer Infektion von hohem Interesse für die medikamentöse Therapie. Problematischer könnte der Einsatz der bbFISH in Kliniken sein, in denen *Acinetobacter baumannii* ein häufiges Problem darstellt, da die entsprechende Sonde mit 57,1 %iger Sensitivität deutlich weniger zuverlässig ist als beispielsweise die *Pseudomonas aeruginosa*-Sonde mit einer Sensitivität von 100% (bei einem semi-quantitativen Schwellenwert der Bakterienkulturen \leq vereinzelt).

Inwieweit die Mortalität unter Anwendung der bbFISH bei Patienten mit Verdacht auf beatmungsassoziierte Pneumonie gesenkt werden kann, sollte in weiterführenden klinischen Studien untersucht werden. Auch die Frage, ob der zweite Vorteil, nämlich die Fähigkeit,

polymikrobielle Infektionen in einigen Fällen besser detektieren zu können als die kulturelle Anzucht, klinisch bedeutsam ist, könnte in einer weiteren Studie geklärt werden.

7. Abkürzungsverzeichnis

COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CAP	community-acquired pneumonia
HAP	hospital-acquired pneumonia
VAP	ventilator-associated pneumonia
ICU	intensive care unit
MV	mechanical ventilation
MSSA	Methicillin-sensibler Staphylococcus aureus
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
CPIS	Clinical Pulmonary Infection Score
ARDS	acute respiratory distress syndrome
sTREM-1	soluble triggering receptor expressed on myeloid cells
CRP	C-reaktives Protein
PSB	protected-specimen-brush
CFU	colony forming units
BAL	bronchoalveoläre Lavage
EA	endotracheale Aspirate
bbFISH	beacon-based Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
DNA	Desoxyribonukleinsäure
PNA	peptide nucleic acid
BS	Bronchialsekret
TS	Trachealsekret
DS	Drainagesekret
PCR	polymerase chain reaction
TCEP	Tris (2-carboxyethyl) phosphat

8. Literaturverzeichnis

- (1) Kollef MH. What is ventilator-associated pneumonia and why is it important? *Respir Care* 2005; 50(6):714-721.
- (2) Gross PA, Neu HC, Aswapokee P, Van Antwerpen C, Aswapokee N. Deaths from nosocomial infections: experience in a university hospital and a community hospital. *Am J Med* 1980; 68(2):219-223.
- (3) Koulenti D, Rello J. Hospital-acquired pneumonia in the 21st century: a review of existing treatment options and their impact on patient care. *Expert Opin Pharmacother* 2006; 7(12):1555-1569.
- (4) Pittet D, Harbarth S. What techniques for diagnosis of ventilator-associated pneumonia? *Lancet* 1998; 352(9122):83-84.
- (5) Craven DE, Steger KA. Nosocomial pneumonia in mechanically ventilated adult patients: epidemiology and prevention in 1996. *Semin Respir Infect* 1996; 11(1):32-53.
- (6) Bowton DL. Nosocomial pneumonia in the ICU--year 2000 and beyond. *Chest* 1999; 115(3 Suppl):28S-33S.
- (7) Fagon JY, Chastre J, Vuagnat A, Trouillet JL, Novara A, Gibert C. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in intensive care units. *JAMA* 1996; 275(11):866-869.
- (8) Fagon JY, Chastre J, Hance AJ, Montravers P, Novara A, Gibert C. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med* 1993; 94(3):281-288.
- (9) Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(5):1711-1725.
- (10) Rello J, Ausina V, Ricart M, Castella J, Prats G. Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator-associated pneumonia. 1993. *Chest* 2009; 136(5 Suppl):e30.
- (11) Gadani H, Vyas A, Kar AK. A study of ventilator-associated pneumonia: Incidence, outcome, risk factors and measures to be taken for prevention. *Indian J Anaesth* 2010; 54(6):535-540.
- (12) Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165(7):867-903.
- (13) Public health focus: surveillance, prevention, and control of nosocomial infections. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 1992; 41(42):783-787.
- (14) Rello J, Ollendorf DA, Oster G, Vera-Llonch M, Bellm L, Redman R et al. Epidemiology and outcomes of ventilator-associated pneumonia in a large US database. *Chest* 2002; 122(6):2115-2121.

- (15) Warren DK, Shukla SJ, Olsen MA, Kollef MH, Hollenbeak CS, Cox MJ et al. Outcome and attributable cost of ventilator-associated pneumonia among intensive care unit patients in a suburban medical center. *Crit Care Med* 2003; 31(5):1312-1317.
- (16) Kappstein I, Schulgen G, Beyer U, Geiger K, Schumacher M, Daschner FD. Prolongation of hospital stay and extra costs due to ventilator-associated pneumonia in an intensive care unit. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992; 11(6):504-508.
- (17) Rello J, Diaz E. Pneumonia in the intensive care unit. *Crit Care Med* 2003; 31(10):2544-2551.
- (18) Lynch JP, III. Hospital-acquired pneumonia: risk factors, microbiology, and treatment. *Chest* 2001; 119(2 Suppl):373S-384S.
- (19) Cross JT, Jr., Campbell GD, Jr. Therapy of nosocomial pneumonia. *Med Clin North Am* 2001; 85(6):1583-1594.
- (20) Bergmans DC, Bonten MJ, van Tiel FH, Gaillard CA, van der GS, Wilting RM et al. Cross-colonisation with *Pseudomonas aeruginosa* of patients in an intensive care unit. *Thorax* 1998; 53(12):1053-1058.
- (21) Johanson WG, Jr., Pierce AK, Sanford JP, Thomas GD. Nosocomial respiratory infections with gram-negative bacilli. The significance of colonization of the respiratory tract. *Ann Intern Med* 1972; 77(5):701-706.
- (22) Kollef MH. Ventilator-associated pneumonia. A multivariate analysis. *JAMA* 1993; 270(16):1965-1970.
- (23) Celis R, Torres A, Gatell JM, Almela M, Rodriguez-Roisin R, Agusti-Vidal A. Nosocomial pneumonia. A multivariate analysis of risk and prognosis. *Chest* 1988; 93(2):318-324.
- (24) Torres A, Aznar R, Gatell JM, Jimenez P, Gonzalez J, Ferrer A et al. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142(3):523-528.
- (25) Cook DJ, Walter SD, Cook RJ, Griffith LE, Guyatt GH, Leasa D et al. Incidence of and risk factors for ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. *Ann Intern Med* 1998; 129(6):433-440.
- (26) Kollef MH, Micek ST. *Staphylococcus aureus* pneumonia: a "superbug" infection in community and hospital settings. *Chest* 2005; 128(3):1093-1097.
- (27) Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Pierre J, Darne C et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. Prospective analysis of 52 episodes with use of a protected specimen brush and quantitative culture techniques. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(4):877-884.
- (28) Chastre J, Trouillet JL, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Clavier H, Dombret MC et al. Nosocomial pneumonia in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(4 Pt 1):1165-1172.
- (29) Markowicz P, Wolff M, Djedaini K, Cohen Y, Chastre J, Delclaux C et al. Multicenter prospective study of ventilator-associated pneumonia during acute respiratory distress

- syndrome. Incidence, prognosis, and risk factors. ARDS Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161(6):1942-1948.
- (30) Rello J, Rue M, Jubert P, Muses G, Sonora R, Valles J et al. Survival in patients with nosocomial pneumonia: impact of the severity of illness and the etiologic agent. *Crit Care Med* 1997; 25(11):1862-1867.
- (31) Rello J, Gallego M, Mariscal D, Sonora R, Valles J. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(1):196-200.
- (32) Baker AM, Meredith JW, Haponik EF. Pneumonia in intubated trauma patients. Microbiology and outcomes. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(1):343-349.
- (33) Timsit JF, Chevret S, Valcke J, Misset B, Renaud B, Goldstein FW et al. Mortality of nosocomial pneumonia in ventilated patients: influence of diagnostic tools. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(1):116-123.
- (34) Leal-Noval SR, Marquez-Vacaro JA, Garcia-Curiel A, Camacho-Larana P, Rincon-Ferrari MD, Ordonez-Fernandez A et al. Nosocomial pneumonia in patients undergoing heart surgery. *Crit Care Med* 2000; 28(4):935-940.
- (35) Meduri GU, Reddy RC, Stanley T, El Zeky F. Pneumonia in acute respiratory distress syndrome. A prospective evaluation of bilateral bronchoscopic sampling. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(3):870-875.
- (36) Ruiz M, Torres A, Ewig S, Marcos MA, Alcon A, Lledo R et al. Noninvasive versus invasive microbial investigation in ventilator-associated pneumonia: evaluation of outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(1):119-125.
- (37) Fagon JY, Chastre J, Wolff M, Gervais C, Parer-Aubas S, Stephan F et al. Invasive and noninvasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2000; 132(8):621-630.
- (38) Rello J, Valles J, Jubert P, Ferrer A, Domingo C, Mariscal D et al. Lower respiratory tract infections following cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. *Clin Infect Dis* 1995; 21(2):310-314.
- (39) Montravers P, Fagon JY, Chastre J, Lecso M, Dombret MC, Trouillet JL et al. Follow-up protected specimen brushes to assess treatment in nosocomial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(1):38-44.
- (40) Marik PE, Careau P. The role of anaerobes in patients with ventilator-associated pneumonia and aspiration pneumonia: a prospective study. *Chest* 1999; 115(1):178-183.
- (41) Dore P, Robert R, Grollier G, Rouffineau J, Lanquetot H, Charriere JM et al. Incidence of anaerobes in ventilator-associated pneumonia with use of a protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(4 Pt 1):1292-1298.
- (42) Rello J, Ausina V, Castella J, Net A, Prats G. Nosocomial respiratory tract infections in multiple trauma patients. Influence of level of consciousness with implications for therapy. *Chest* 1992; 102(2):525-529.

- (43) Croce MA, Fabian TC, Schurr MJ, Boscarino R, Pritchard FE, Minard G et al. Using bronchoalveolar lavage to distinguish nosocomial pneumonia from systemic inflammatory response syndrome: a prospective analysis. *J Trauma* 1995; 39(6):1134-1139.
- (44) Timsit JF, Cheval C, Gachot B, Bruneel F, Wolff M, Carlet J et al. Usefulness of a strategy based on bronchoscopy with direct examination of bronchoalveolar lavage fluid in the initial antibiotic therapy of suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2001; 27(4):640-647.
- (45) Sole VJ, Fernandez JA, Benitez AB, Cardenosa Cendrero JA, Rodriguez dC. Impact of quantitative invasive diagnostic techniques in the management and outcome of mechanically ventilated patients with suspected pneumonia. *Crit Care Med* 2000; 28(8):2737-2741.
- (46) George DL, Falk PS, Wunderink RG, Leeper KV, Jr., Meduri GU, Steere EL et al. Epidemiology of ventilator-acquired pneumonia based on protected bronchoscopic sampling. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158(6):1839-1847.
- (47) Rello J, Sa-Borges M, Correa H, Leal SR, Baraibar J. Variations in etiology of ventilator-associated pneumonia across four treatment sites: implications for antimicrobial prescribing practices. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160(2):608-613.
- (48) Trouillet JL, Chastre J, Vuagnat A, Joly-Guillou ML, Combaux D, Dombret MC et al. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug-resistant bacteria. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(2):531-539.
- (49) Torres A, Carlet J. Ventilator-associated pneumonia. European Task Force on ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2001; 17(5):1034-1045.
- (50) Combes A, Figliolini C, Trouillet JL, Kassis N, Wolff M, Gibert C et al. Incidence and outcome of polymicrobial ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2002; 121(5):1618-1623.
- (51) Crouch BS, Wunderink RG, Jones CB, Leeper KV, Jr. Ventilator-associated pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*. *Chest* 1996; 109(4):1019-1029.
- (52) Jimenez P, Torres A, Rodriguez-Roisin R, de la Bellacasa JP, Aznar R, Gatell JM et al. Incidence and etiology of pneumonia acquired during mechanical ventilation. *Crit Care Med* 1989; 17(9):882-885.
- (53) Namiduru M, Gungor G, Karaoglan I, Dikensoy O. Antibiotic resistance of bacterial ventilator-associated pneumonia in surgical intensive care units. *J Int Med Res* 2004; 32(1):78-83.
- (54) Flanders SA, Collard HR, Saint S. Nosocomial pneumonia: state of the science. *Am J Infect Control* 2006; 34(2):84-93.
- (55) Joseph NM, Sistla S, Dutta TK, Badhe AS, Parija SC. Ventilator-associated pneumonia: a review. *Eur J Intern Med* 2010; 21(5):360-368.
- (56) Ibrahim EH, Ward S, Sherman G, Kollef MH. A comparative analysis of patients with early-onset vs late-onset nosocomial pneumonia in the ICU setting. *Chest* 2000; 117(5):1434-1442.

- (57) CDC definitions for nosocomial infections, 1988. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139(4):1058-1059.
- (58) Lisboa T, Rello J. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: is there a gold standard and a simple approach? *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21(2):174-178.
- (59) Pugin J, Auckenthaler R, Mili N, Janssens JP, Lew PD, Suter PM. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143(5 Pt 1):1121-1129.
- (60) Fabregas N, Ewig S, Torres A, El Ebiary M, Ramirez J, de la Bellacasa JP et al. Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax* 1999; 54(10):867-873.
- (61) Luyt CE, Chastre J, Fagon JY. Value of the clinical pulmonary infection score for the identification and management of ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2004; 30(5):844-852.
- (62) Luna CM, Blanzaco D, Niederman MS, Matarucco W, Baredes NC, Desmery P et al. Resolution of ventilator-associated pneumonia: prospective evaluation of the clinical pulmonary infection score as an early clinical predictor of outcome. *Crit Care Med* 2003; 31(3):676-682.
- (63) Singh N, Rogers P, Atwood CW, Wagener MM, Yu VL. Short-course empiric antibiotic therapy for patients with pulmonary infiltrates in the intensive care unit. A proposed solution for indiscriminate antibiotic prescription. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162(2 Pt 1):505-511.
- (64) Koenig SM, Truitt JD. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(4):637-657.
- (65) Wunderink RG, Woldenberg LS, Zeiss J, Day CM, Ciemins J, Lacher DA. The radiologic diagnosis of autopsy-proven ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1992; 101(2):458-463.
- (66) O'Horo JC, Thompson D, Safdar N. Is the gram stain useful in the microbiologic diagnosis of VAP? A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 55(4):551-561.
- (67) Duflo F, Allaouchiche B, Debon R, Bordet F, Chassard D. An evaluation of the Gram stain in protected bronchoalveolar lavage fluid for the early diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Anesth Analg* 2001; 92(2):442-447.
- (68) Veinstein A, Brun-Buisson C, Derrode N, Alvarez A, Pinsard M, Robert R et al. Validation of an algorithm based on direct examination of specimens in suspected ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2006; 32(5):676-683.
- (69) Povoia P, Coelho L, Almeida E, Fernandes A, Mealha R, Moreira P et al. C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(2):101-108.
- (70) Liao XL, Jin XD, Kang Y, Deng YY, Zhang ZW, Zhou Y et al. [Role of procalcitonin in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia]. *Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2010; 22(3):142-145.

- (71) Lisboa T, Seligman R, Diaz E, Rodriguez A, Teixeira PJ, Rello J. C-reactive protein correlates with bacterial load and appropriate antibiotic therapy in suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2008; 36(1):166-171.
- (72) Seligman R, Meisner M, Lisboa TC, Hertz FT, Filippin TB, Fachel JM et al. Decreases in procalcitonin and C-reactive protein are strong predictors of survival in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2006; 10(5):R125.
- (73) Ramirez P, Garcia MA, Ferrer M, Aznar J, Valencia M, Sahuquillo JM et al. Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2008; 31(2):356-362.
- (74) Siranovic M, Kovac J, Gopcevic S, Kelecic M, Kovac N, Rode B et al. Human soluble TREM-1: lung and serum levels in patients with bacterial ventilator associated pneumonia. *Acta Clin Croat* 2011; 50(3):345-349.
- (75) Horonenko G, Hoyt JC, Robbins RA, Singarajah CU, Umar A, Pattengill J et al. Soluble triggering receptor expressed on myeloid cell-1 is increased in patients with ventilator-associated pneumonia: a preliminary report. *Chest* 2007; 132(1):58-63.
- (76) Oudhuis GJ, Beuving J, Bergmans D, Stobberingh EE, ten Velde G, Linssen CF et al. Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 in bronchoalveolar lavage fluid is not predictive for ventilator-associated pneumonia. *Intensive Care Med* 2009; 35(7):1265-1270.
- (77) Ho CC, Liao WY, Wang CY, Lu YH, Huang HY, Chen HY et al. TREM-1 expression in tumor-associated macrophages and clinical outcome in lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(7):763-770.
- (78) Yasuda T, Takeyama Y, Ueda T, Shinzeki M, Sawa H, Takahiro N et al. Increased levels of soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 in patients with acute pancreatitis. *Crit Care Med* 2008; 36(7):2048-2053.
- (79) Wu CL, Lu YT, Kung YC, Lee CH, Peng MJ. Prognostic value of dynamic soluble triggering receptor expressed on myeloid cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with ventilator-associated pneumonia. *Respirology* 2011; 16(3):487-494.
- (80) Luna CM, Chirino A. Qualitative cultures in ventilator-associated pneumonia - can they be used with confidence? *Crit Care* 2004; 8(6):425-426.
- (81) Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171(4):388-416.
- (82) Camargo LF, De Marco FV, Barbas CS, Hoelz C, Bueno MA, Rodrigues M, Jr. et al. Ventilator associated pneumonia: comparison between quantitative and qualitative cultures of tracheal aspirates. *Crit Care* 2004; 8(6):R422-R430.
- (83) Berton DC, Kalil AC, Teixeira PJ. Quantitative versus qualitative cultures of respiratory secretions for clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 2012; 1:CD006482.
- (84) Niederman MS. The argument against using quantitative cultures in clinical trials and for the management of ventilator-associated pneumonia. *Clin Infect Dis* 2010; 51 Suppl 1:S93-S99.

- (85) Shorr AF, Sherner JH, Jackson WL, Kollef MH. Invasive approaches to the diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2005; 33(1):46-53.
- (86) Sanchez-Nieto JM, Torres A, Garcia-Cordoba F, El Ebiary M, Carrillo A, Ruiz J et al. Impact of invasive and noninvasive quantitative culture sampling on outcome of ventilator-associated pneumonia: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(2):371-376.
- (87) Rello J, Vidaur L, Sandiumenge A, Rodriguez A, Gualis B, Boque C et al. De-escalation therapy in ventilator-associated pneumonia. *Crit Care Med* 2004; 32(11):2183-2190.
- (88) Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol* 1996; 14(3):303-308.
- (89) Kuechenmeister LJ, Anderson KL, Morrison JM, Dunman PM. The use of molecular beacons to directly measure bacterial mRNA abundances and transcript degradation. *J Microbiol Methods* 2009; 76(2):146-151.
- (90) Shaw MJ. Ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 2005; 11(3):236-241.
- (91) Rello J, Torres A, Ricart M, Valles J, Gonzalez J, Artigas A et al. Ventilator-associated pneumonia by *Staphylococcus aureus*. Comparison of methicillin-resistant and methicillin-sensitive episodes. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150(6 Pt 1):1545-1549.
- (92) Aucar JA, Bongera M, Phillips JO, Kamath R, Metzler MH. Quantitative tracheal lavage versus bronchoscopic protected specimen brush for the diagnosis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. *Am J Surg* 2003; 186(6):591-596.
- (93) Kollef MH. Inadequate antimicrobial treatment: an important determinant of outcome for hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 2000; 31 Suppl 4:S131-S138.
- (94) Kuti EL, Patel AA, Coleman CI. Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. *J Crit Care* 2008; 23(1):91-100.
- (95) Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzon J, Violi D, Prignoni A et al. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J* 2006; 27(1):158-164.
- (96) Pilvinis V, Stirbiene I. [Ventilator associated pneumonia: risk factors, diagnosis, treatment and prevention]. *Medicina (Kaunas)* 2003; 39(11):1057-1064.
- (97) Luna CM, Vujacich P, Niederman MS, Vay C, Gherardi C, Matera J et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111(3):676-685.
- (98) Teixeira PJ, Seligman R, Hertz FT, Cruz DB, Fachel JM. Inadequate treatment of ventilator-associated pneumonia: risk factors and impact on outcomes. *J Hosp Infect* 2007; 65(4):361-367.
- (99) Mariya JN, Sistla S, Kumar DT, Shankar BA, Rasitha D, Chandra PS. Outcome of ventilator-associated pneumonia: Impact of antibiotic therapy and other factors. *Australas Med J* 2012; 5(2):135-140.

- (100) Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate antimicrobial treatment of infections: a risk factor for hospital mortality among critically ill patients. *Chest* 1999; 115(2):462-474.
- (101) Eggimann P, Revelly JP. Should antibiotic combinations be used to treat ventilator-associated pneumonia? *Semin Respir Crit Care Med* 2006; 27(1):68-81.
- (102) Garau J, Gomez L. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(2):135-143.
- (103) Koulenti D, Rello J. Gram-negative bacterial pneumonia: aetiology and management. *Curr Opin Pulm Med* 2006; 12(3):198-204.
- (104) Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing K. pneumoniae in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis* 2010; 50(3):364-373.
- (105) Fridkin SK. Increasing prevalence of antimicrobial resistance in intensive care units. *Crit Care Med* 2001; 29(4 Suppl):N64-N68.
- (106) Niederman MS. De-escalation therapy in ventilator-associated pneumonia. *Curr Opin Crit Care* 2006; 12(5):452-457.
- (107) Micek ST, Ward S, Fraser VJ, Kollef MH. A randomized controlled trial of an antibiotic discontinuation policy for clinically suspected ventilator-associated pneumonia. *Chest* 2004; 125(5):1791-1799.
- (108) Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Barbuto S, Brennan MT, Noll J et al. Molecular analysis of oral and respiratory bacterial species associated with ventilator-associated pneumonia. *J Clin Microbiol* 2007; 45(5):1588-1593.
- (109) Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA et al. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J Bacteriol* 2001; 183(12):3770-3783.
- (110) Garau J, Gomez L. *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2003; 16(2):135-143.

9. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich noch einigen Personen herzlich danken, die mich auf unterschiedliche Art und Weise bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben:

Herrn Professor Colin R. MacKenzie für die ausgezeichnete Betreuung sowohl in fachlicher als auch in menschlicher Hinsicht und für die vielen Stunden, die er für diese Dissertation geopfert hat.

Birgit und Raquel, dass sie bei Fragen immer ein offenes Ohr für mich hatten.

Miacom Diagnostics und insbesondere Eve, dass sie Teile des Materials zur Verfügung gestellt und mich bei der Einarbeitung und Anwendung der bbFISH unterstützt haben.

Meiner Familie, die immer an mich geglaubt und jeden meiner Wege begleitet hat.

Volker, der immer an meiner Seite war und mir in schwierigen Momenten die nötige Zuversicht zurückgegeben hat.

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ort, Datum

(Vanessa Triesch)