

Mikrobiologische Untersuchungstechniken

F.-Ch. Bange, A. Heim

17.1 Einleitung – 270

17.2 Bakteriologie und Mykologie – 270

17.2.1 Gram-positive Kokken – 271

17.2.2 Gram-positive Stäbchen – 272

17.2.3 Gram-negative Kokken – 272

17.2.4 Gram-negative Stäbchen – 272

17.2.5 Nicht in der Gramfärbung sichtbare Bakterien – 274

17.2.6 Pilze – 275

17.3 Virologie – 276

17.3.1 Abstrichtechniken für virologische Untersuchungen – 276

17.3.2 Andere Materialien aus dem Respirationstrakt – 276

17.3.3 RNA-Viren – 277

17.3.4 DNA-Viren – 280

Literatur – 283

17.1 Einleitung

Ausgehend von den einzelnen Erregern werden im Folgenden Nachweismethoden vorgestellt und bewertet. Unterschieden werden:

- direkte Erregernachweise (mikroskopisches Präparat, molekulare Nachweismethoden, Kultur, Antigennachweise) und
- indirekte Erregernachweise (serologische Untersuchungen bzw. Antikörpernachweise).

Molekulare Methoden finden besonders in der virologischen Infektionsdiagnostik breitere Anwendung, da die Virusisolation auf Zellkulturen im Gegensatz zum kulturellen Nachweis von Bakterien zeitaufwendig ist. Molekulare Nachweismethoden erlauben wie auch die Antigennachweismethoden einen schnellen Nachweis der Viren und sind mindestens so sensitiv wie die zeitaufwendige Virusisolation. Außerdem ermöglichen sie bei immunsupprimierten Patienten die schnelle Diagnose opportunistischer Infektionen (z.B. CMV) und haben darüber hinaus einen hohen Stellenwert bei der Therapiekontrolle. Diagnostisch irreführend kann aber bei einigen Viren der molekulare Nachweis persistierender Infektionen sein, die nicht in ätiologischem Zusammenhang zur akuten Atemwegserkrankung stehen. Auf dieses diagnostische Problem wird bei den einzelnen Erregern eingegangen.

Zum Nachweis bakterieller Infektionserreger haben molekulare Verfahren eine geringere Bedeutung. Sie werden bei den Infektionserregern eingesetzt, bei denen kulturelle Verfahren zu langsam oder zu wenig sensitiv sind. Dazu zählen *Mycobacterium tuberculosis*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae* und *Chlamydia pneumoniae*. Bei *Mycobacterium tuberculosis* sollte parallel zu den molekularen Nachweisverfahren immer auch der kulturelle Nachweis versucht werden, da letztere Methode sensitiver ist und eine Resistenztestung ermöglicht. Genauere Angaben über Anwendung und Sensitivität finden sich bei den Ausführungen zu den einzelnen Erregern (s. unten).

Erregergruppen und ihre (wichtigsten) Vertreter

Gram-positive Kokken:

- *Staphylococcus aureus*
- *Streptococcus pneumoniae*
- *Streptococcus pyogenes*

Gram-positive Stäbchen:

- *Corynebacterium diphtheriae*

Gram-negative Kokken:

- *Moraxella catarrhalis*

Gram-negative Stäbchen:

- *Bordetella pertussis*
- *Pseudomonas aeruginosa* (stellvertretend für Nonfermenter)



- *Klebsiella pneumoniae* (stellvertretend für Enterobacteriaceae)
- *Haemophilus influenzae*
- *Legionella pneumophila*

Nicht Gram-anfärbbare Bakterien:

- *Chlamydia pneumoniae*
- *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberkulöse Mykobakterien
- *Mycoplasma pneumoniae*

Pilze:

- *Aspergillus*
- *Candida*
- *Pneumocystis jirovecii*

Viren:

- RNA-Viren:
 - Influenzaviren
 - Rhinoviren
 - RSV (Respiratory Syncytial Virus)
 - MPV (humanes Metapneumovirus)
 - Coronaviren
 - Adenoviren
 - Bocavirus
 - Polyomaviren (KI und Wu)
- DNA-Viren:
 - EBV (Epstein-Barr-Virus)
 - CMV (humanes Cytomegalievirus)
 - HSV (Herpes-simplex-Virus)

17.2 Bakteriologie und Mykologie

Für den Transport von Proben werden Abstrichtupfer in Nährstoffmedien oder sterilen Schraubröhrchen verwendet. Für den Transport einiger weniger bakterieller Infektionserreger sind Spezialnährböden notwendig. Im Folgenden finden sich allgemeine Anmerkungen zu den verschiedenen Probenmaterialien.

Häufige Materialien aus dem unteren Respirationstrakt sind Sputum, induziertes Sputum, Tracheal- und Bronchialsekret und die bronchoalveoläre Lavage (BAL)-Flüssigkeit. Die Materialien werden üblicherweise in sterile Röhrchen gefüllt und ohne weitere Zusätze bei Raumtemperatur zum Labor transportiert. Sollte ein unmittelbarer Transport zum Labor nicht möglich sein, können die Proben bei Raumtemperatur gelagert werden.

In der Regel werden Infektionen des unteren Respirationstrakts durch eine Bakterienspezies hervorgerufen und diese kann im Präparat dargestellt werden. Die Gramfärbung und bakterienspezifische Färbungen, z.B. die Ziehl-Neelsen-Färbung zum Nachweis von säurefesten Stäbchen, erlauben eine erste Beurteilung unmittelbar nach Eingang der Probe im Labor. Allerdings ist die Sensitivität für den Nachweis von

bakteriellen Infektionserregern im mikroskopischen Präparat um ein Vielfaches (10000-fach) geringer als in der Kultur. Die Sensitivität kann durch die Verwendung von antikörperbasierten Immunfluoreszenztests erhöht werden. Mit dieser Methodik ist auch eine Speziesdiagnose (z.B. *Pneumocystis jirovecii*, *Legionella pneumophila*) schon im mikroskopischen Präparat möglich.

Die Entzündungsreaktion bei Infektionen des unteren Respirationstrakts wird durch das vermehrte Auftreten von Leukozyten (Granulozyten, Lymphozyten) in Sputum und BAL-Flüssigkeit sichtbar. Eine zytologische Beurteilung der Materialien ist sinnvoll. Neben Leukozyten sollte das Auftreten von Plattenepithelzellen beurteilt werden. Plattenepithelzellen finden sich im Oropharynx, nicht aber im unteren Respirationstrakt. Das vermehrte Auftreten von Plattenepithelzellen bei fehlenden Leukozyten stellt die Wertigkeit der Proben für die Infektionsdiagnostik im unteren Respirationstrakt infrage. Darüber hinaus ist eine quantitative Kulturanlage von BAL-Flüssigkeiten sinnvoll. Werden mehr als 10^5 Bakterien/ml Probe kultiviert, ist eine Infektion wahrscheinlich, bei weniger als 10^4 Bakterien/ml Probe handelt es sich eher um eine Kontamination.

Die Wahl der Probe beeinflusst die Sensitivität und Spezifität der Diagnostik in Abhängigkeit von der Fragestellung. Wird eine *Staphylococcus aureus*- oder *Pneumocystis jirovecii*-Pneumonie vermutet, ist bei beiden Fragestellungen die BAL dem Sputum überlegen, allerdings aus unterschiedlichen Gründen. *Pneumocystis jirovecii* wird in ausreichender Menge in den Alveolen, nicht jedoch im oberen Respirationstrakt gefunden. Das Sputum hat bei dieser Fragestellung eine geringe Sensitivität. *Staphylococcus aureus* hingegen gehört zur Normalflora im oberen Respirationstrakt. Sputum ist daher häufig positiv und zu wenig spezifisch. Grundsätzlich sind alle Materialien aus dem unteren Respirationstrakt und, aufgrund der Säurefestigkeit, auch der Magensaft geeignet (die Bakterien gelangen mit verschlucktem Material aus dem Respirationstrakt in den Magensaft). Allerdings wird hier das Morgensputum bevorzugt, weil es einfach zu gewinnen und gleichzeitig sensitiv und spezifisch für die Diagnose einer Lungentuberkulose ist. Selbst wenn der Patient kein Sputum produziert, hat induziertes (nach Inhalation von hyperosmolarem Kochsalz) Sputum im Vergleich zum Magensaft eine höhere Sensitivität für den Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis*.

Die beiden häufigsten Materialien aus dem oberen Respirationstrakt sind der Rachen- und der Nasenabstrich. Rachen- und Nasenabstriche werden in ein Universaltransportmedium inokuliert und können bei Raumtemperatur verschickt werden. Sollte ein unmittelbarer Transport zum Labor nicht möglich sein, können die Proben bei Raumtemperatur gelagert werden. Mit diesem Standardverfahren gelingt der Nachweis von Streptokokken und Staphylokokken. Auf Besonderheiten zur Probengewinnung z.B. zum Nachweis von *Bordetella*, die mit einem Dacron-Tupfer erfolgen muss, wird bei den erregerspezifischen Ausführungen (s. unten) hingewiesen.

17.2.1 Gram-positive Kokken

Staphylococcus aureus

- **Untersuchungsmaterialien**
(► **Untersuchungstechniken**)

Es eignen sich:

- Rachenabstrich, Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Kultur)

Pneumonien durch *Staphylococcus aureus* werden bei Neugeborenen und beatmeten Patienten beobachtet. *Staphylococcus aureus* gehört zur Normalflora (ca. 20–30% aller Patienten) im oberen Respirationstrakt.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Mikroskopischer Nachweis**

Die Erreger sind in der Gram-Färbung als Gram-positive Kokken erkennbar, die in typischen Haufen oder Tetradern liegen.

- ■ **Kultur**

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie die phänotypische Empfindlichkeitstestung bilden die Basis der mikrobiologischen Diagnostik. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h. Resistenztestungen sind unproblematisch und benötigen weitere 24 h. Zur Detektion von Übertragungen haben sich molekulare Analyseverfahren (Pulsfeldgelelektrophorese, Multi Locus Sequence Typisierung, Spa-Typisierung) etabliert. Darüber hinaus sind für den sofortigen Nachweis von oxacillinresistenten *Staphylococcus aureus*-Stämmen molekulare Nachweise etabliert.

Streptococcus pneumoniae (Pneumokokken)

- **Untersuchungsmaterialien**
(► **Untersuchungstechniken**)

Es eignen sich:

- Rachenabstrich, Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Kultur)
- Urin (► Antigennachweis)

Wird eine Pneumokokkenpneumonie vermutet, eignen sich Sputa, Bronchialsekrete oder BAL-Flüssigkeiten als Untersuchungsmaterialien. Es muss mit ca. 5% asymptomatischen Trägern gerechnet werden. Im Urin ist der schnelle Nachweis von Pneumokokkenantigen möglich.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Mikroskopie**

Pneumokokken sind in der Gram-Färbung als Gram-positive Diplokokken mikroskopisch sichtbar.

- ■ **Antigennachweis**

Der Nachweis des Pneumokokkenantigens erfolgt im Urin. Als Antigen wird das pneumokokkenspezifische C-Polysaccharid verwendet, das mit der bakteriellen Zellwand assoziiert ist. Die Sensitivität liegt bei 50–80%, die Spezifität bei 90%. Der Test ist auch bei asymptomatischen Trägern positiv.

■ ■ Kultur

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie die phänotypische Empfindlichkeitstestung bilden die Basis der mikrobiologischen Diagnostik bei Pneumokokken. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h. Resistenztestungen sind unproblematisch und benötigen weitere 24 h.

Streptococcus pyogenes (Gruppe A-Streptokokken)

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenabstrich (► Antigennachweis, Kultur)

Streptococcus pyogenes (A-Streptokokken) ist der Erreger einer Pharyngitis. *Streptococcus pyogenes* wird in Abstrichen nachgewiesen, die gezielt von den Tonsillen bzw. aus dem Pharynx entnommen werden. Die asymptomatische Trägerrate kann bis zu 20% betragen.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweis

Der Nachweis des *Streptococcus-pyogenes*-Antigens erfolgt im Rachenabstrich. Als Antigen wird das Gruppe A-Polysaccharid verwendet, das spezifisch für *Streptococcus pyogenes* ist. Die Sensitivität schwankt zwischen 58 und 96%.

■ ■ Kultur

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie die phänotypische Empfindlichkeitstestung bilden die Basis der mikrobiologischen Diagnostik bei *Streptococcus pyogenes*. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h.

17.2.2 Gram-positive Stäbchen

Corynebacterium diphtheriae

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenabstrich, Nasopharyngealabstrich (► Mikroskopie, Kultur)

Corynebacterium diphtheriae führt zu einer Tonsillitis bzw. Pharyngitis mit grau-bräunlichen Belägen und einer begleitenden Lymphknotenschwellung. Als Untersuchungsmaterialien eignen sich Rachenabstriche oder Nasopharyngealabstriche. Es wird eine mehrmalige Probenentnahme empfohlen, um die Sensitivität des Nachweises zu erhöhen.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Mikroskopie

Bei Verdacht auf Diphtherie können im Probenmaterial mithilfe der Färbung nach Neisser oder Löffler Stäbchenbakterien mit typischen Polkörperchen nachgewiesen werden.

■ ■ Kultur

Der kulturelle Nachweis sowie die phänotypische Empfindlichkeitstestung bilden die Basis der mikrobiologischen Diagnostik. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h. Entscheidend für die Diagnose ist der Nachweis des Diphtherietoxins. Dieser ist erst nach Anzucht der Bakterien möglich. Häufig wird der Toxinachweis nicht vor Ort durchgeführt, sondern der Bakterienstamm zur weiteren Untersuchung in ein Referenzlabor verschickt.

17.2.3 Gram-negative Kokken

Moraxella catarrhalis

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Kultur)

Moraxella catarrhalis ist bei Kindern nach Pneumokokken und nicht typisierbarem *Haemophilus influenzae* der dritthäufigste bakterielle Erreger einer Otitis media. Grundsätzlich sind alle Materialien aus dem Respirationstrakt für den Erregernachweis geeignet. Die Besiedlung des oberen Respirationstrakts kann bei Kindern bis zu 50% betragen.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Mikroskopie

Moraxella catarrhalis sind mikroskopisch als Gram-negative Diplokokken zu erkennen.

■ ■ Kultur

Die Anzucht des Erregers bildet die Basis der mikrobiologischen Diagnostik. Sie ist unproblematisch und benötigt 24–48 h. Resistenztestungen sind nach weiteren 24 h verfügbar.

17.2.4 Gram-negative Stäbchen

Bordetella pertussis

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Nasopharyngeale Sekrete bzw. Abstriche (► molekulare Nachweise, Kultur)
- Serum (► Antikörper gegen *Bordetella*)

Bordetella pertussis ist der Erreger des Keuchhustens. Für die Anzucht des Erregers bzw. den molekularen Nachweis werden nasopharyngeale Sekrete oder Abstriche benötigt. Sekrete können mittels Aspiration gewonnen und sollten nativ in sterilen Schraubgefäßen transportiert werden. Darüber hinaus kann mit flexiblen Abstrichtupfern Material aus dem Nasopharynx gewonnen werden. Der Tupfer sollte für den Transport in ein geeignetes Medium (Amies, Regan-Lowe) gegeben werden.

Darüber hinaus können spezifische Antikörper gegen *Bordetella pertussis* im Serum der Patienten nachgewiesen werden.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Molekulare Nachweismethoden**

PCR-basierte Nachweise haben sich in den letzten Jahren etabliert. Die Sensitivität ist höher als beim kulturellen Nachweis. Im Gegensatz zur Kultur ist eine PCR-basierte Diagnostik des Erregers auch nach 3- bis 4-wöchiger Hustendauer möglich.

- ■ **Kultur**

Die Anzucht des Erregers gelingt nur auf Spezialnährböden. Die Kultur benötigt 3–7 Tage. Bei Säuglingen liegt die Sensitivität des kulturellen Nachweises bei 70%, wohingegen sie bei Jugendlichen mit einer Hustendauer von mehr als 2 Wochen auf unter 10% fällt.

- ■ **Serologische Nachweismethoden**

Bei Kindern und Jugendlichen wird Pertussis üblicherweise durch den Nachweis spezifischer Antikörper im Serum diagnostiziert. Als Antigen wird das Pertussistoxin und das filamentöse Hämagglutinin verwendet. Pertussistoxin ist Bestandteil des Impfstoffs. Daher werden sowohl bei Erkrankten als auch bei Geimpften Antikörper gegen Pertussistoxin nachgewiesen. Niedrige IgG-Antikörper-Spiegel gegen Pertussistoxin werden bei vielen Kindern und Jugendlichen gefunden. Inzwischen steht ein WHO-Referenzstandard für die Quantifizierung der IgG-Spiegel zur Verfügung. Werden im Serum des Patienten mehr als 100 IE/ml IgG-Antikörper gegen Pertussistoxin nachgewiesen, gilt eine frische Infektion als wahrscheinlich.

Haemophilus influenzae

- **Untersuchungsmaterialien**
- ▶ **Untersuchungstechniken**

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret (▶ Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (▶ Mikroskopie, Kultur)

Haemophilus influenzae verursacht Erkrankungen im gesamten Respirationstrakt. Die vorhandene Kapsel erlaubt die Typisierung von *Haemophilus influenzae*. Man findet aber auch nicht bekapselte Stämme, die als »nicht typisierbar« bezeichnet werden. Kapseltyp b verursacht Pneumonien und Epiglottitiden. Nicht typisierbare Stämme führen zu Sinusitiden und Otitiden. Grundsätzlich sind alle Materialien aus dem Respirationstrakt geeignet (Sputa, Bronchialsekrete, BAL-Flüssigkeiten).

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Mikroskopie**

Haemophilus influenzae ist in der Gram-Färbung als Gram-negatives Stäbchenbakterium sichtbar.

- ■ **Kultur**

Die Anzucht des Erregers gelingt, wenn die beiden Wachstumsstoffe Hämin und Nikotin-Adenin-Dinukleotid (NAD)

in den Nährböden verfügbar sind. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h. Resistenztestungen benötigen weitere 24 h. Die Typisierung erfolgt mit an Latex-Partikeln gebundenen Antikörpern, die spezifisch für die 6 Kapseltypen a–f sind.

Legionella pneumophila

- **Untersuchungsmaterialien**
- ▶ **Untersuchungstechniken**

Es eignen sich:

- BAL-Flüssigkeit (▶ Antigennachweis, molekulare Nachweise, Kultur)
- Urin (▶ Antigennachweis)

Eine durch *Legionella pneumophila* verursachte Pneumonie wird auch als Legionärskrankheit bezeichnet. Erkrankungen mit *Legionella pneumophila* sind bei pädiatrischen Patienten selten und werden meist als Folge nosokomialer Infektionen beobachtet. Da Legionellen langsamer wachsen als die Normalflora im oberen Respirationstrakt, sind primär sterile Materialien wie BAL-Flüssigkeiten für den kulturellen Nachweis besonders gut geeignet. Die Anzucht erfordert die Verwendung besonderer Nährböden. Der Verdacht auf eine Legionellose sollte dem Labor mitgeteilt werden. Sowohl in Materialien des Respirationstrakts als auch im Urin ist ein Antigennachweis möglich.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Antigennachweis**

Zum Nachweis von Legionellen im Respirationstrakt wird ein fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper gegen ein Membranprotein von *Legionella pneumophila* eingesetzt. Die mit dem Antikörper überschichtete Patientenprobe wird unter dem Fluoreszenzmikroskop beurteilt. Die Sensitivität liegt zwischen 30% und 60%.

Im Urin wird als Antigen die O-spezifische Seitenkette des LPS verwendet. Als Nachweissystem nutzt man verschiedenen Techniken, z.B. den innerhalb von Minuten durchzuführenden immunochromatografischen Kartentest (»Schwangerschaftstest«) oder den aufwendigeren ELISA. Die Tests sind sehr spezifisch (>99,9%). Die Sensitivität schwankt zwischen 50% und 90% und steigt mit der Erkrankungsintensität. Der Test wird innerhalb der ersten 3 Tage nach Auftreten der Symptome positiv und kann trotz erfolgreicher Behandlung über Wochen positiv bleiben.

- ■ **Molekulare Nachweismethoden**

Aufgrund der schlechten Sensitivität des kulturellen Nachweises haben sich molekulare Verfahren inzwischen fest etabliert. Besonders geeignet für den molekularen Nachweis sind Proben, die durch eine BAL gewonnen wurden (Sensitivität 80–100%).

- ■ **Kultur**

Für die Anzucht der Erreger sind Spezialnährböden notwendig. Typischerweise findet man ein Wachstum nach 3–5 Tagen. Eine Empfindlichkeitstestung für Legionellen ist nicht etabliert. Resistenzen gegen Makrolide, Chinolone oder Rifampicin wurden bisher nicht beschrieben.

Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Kultur)

Pseudomonas aeruginosa verursacht üblicherweise nosokomiale Pneumonien bei intensivpflichtigen oder immunsupprimierten Patienten. *Pseudomonas aeruginosa* führt darüber hinaus bei Patienten mit zystischer Fibrose zu einer chronischen Besiedlung des Respirationstrakts und zu rezidivierenden Pneumonien. *Escherichia coli* und *Klebsiella pneumoniae* gehören zu den Enterobacteriaceae. Diese Gruppe von Bakterien verursacht nosokomiale Pneumonien. Grundsätzlich sind alle Materialien aus dem Respirationstrakt zum Nachweis geeignet. Die Besiedlung des Respirationstrakts liegt in der Normalbevölkerung bei <5%, allerdings steigt diese Quote bei intensivpflichtigen, beatmeten Patienten auf >50%.

■ Untersuchungstechniken ■ Mikroskopischer Nachweis

Die Erreger sind mikroskopisch als Gram-negative Stäbchen sichtbar.

■ Kultur

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie die phänotypische Empfindlichkeitstestung bilden die Basis der mikrobiologischen Diagnostik. Die Anzucht des Erregers benötigt 24–48 h. Resistenztestungen sind unproblematisch und benötigen weitere 24 h.

17.2.5 Nicht in der Gramfärbung sichtbare Bakterien

Chlamydia pneumoniae

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- BAL-Flüssigkeit (► Molekulare Nachweise)
- Serum (► Antikörper gegen *Chlamydia pneumoniae*)

Chlamydia pneumoniae verursacht ambulant erworbene Pneumonien. Proben aus dem unteren Respirationstrakt (BAL-Flüssigkeit) sind für den direkten Erregernachweis geeignet. Daneben können für *Chlamydia pneumoniae* spezifische Antikörper in Sera der Patienten nachgewiesen werden.

■ Untersuchungstechniken ■ Molekulare Nachweismethoden

Molekulare Verfahren sind inzwischen fester Bestandteil der *Chlamydia pneumoniae*-Diagnostik. Allerdings fehlen bisher Studien, die eine zuverlässige Aussage über Sensitivität und Spezifität dieser Nachweismethode ermöglichen. Dennoch

gilt sie derzeit als geeignetes Verfahren für den direkten Erregernachweis.

■ Serologie

Es steht ein ELISA zur Verfügung, der sowohl IgG- als auch IgA-Antikörper gegen *Chlamydia pneumoniae* nachweist. Der ELISA erlaubt die Differenzierung zwischen abgelaufener, persistierender und akuter Infektion mit *Chlamydia pneumoniae*.

Mycobacterium tuberculosis, nicht tuberkulöse Mykobakterien

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret, BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, molekulare Nachweise, Kultur)
- Vollblut (► Interferon- γ -Release-Assay [IGRA])

Mycobacterium tuberculosis (Mtb) verursacht bei Kindern Pneumonien und intrathorakale Lymphadenitiden. In den letzten Jahren werden *Mycobacterium abscessus* und *Mycobacterium avium* (beide gehören zu den nicht tuberkulösen Mykobakterien, NTM) vermehrt als Erreger chronischer Pneumonien bei Patienten mit zystischer Fibrose gefunden. Drei Morgensputa von verschiedenen Tagen garantieren eine hohe Sensitivität. Wird kein Sputum produziert, kann induziertes Sputum (z.B. durch Inhalation von hyperosmolarem Kochsalz) gewonnen werden. Beide Verfahren haben eine höhere Sensitivität als Magensaft. Magensaft kann aber zur Diagnostik verwendet werden, wenn es nicht möglich ist, Sputa zu generieren (z.B. bei Kleinkindern). Es ist darauf zu achten, dass der Magensaft möglichst schnell nach Entnahme neutralisiert wird. Darüber hinaus sind Bronchialsekrete und BAL-Flüssigkeit als Probenmaterial geeignet. Die Materialien sollten in sterilen Schraubgefäßen und nicht in Abstrichtupfern transportiert werden. Neben den Direktnachweisen ist der Nachweis von Mtb-spezifischen T-Zellen (IGRA-Test) aus Vollblut möglich.

■ Untersuchungstechniken ■ Mikroskopie

Alle Materialien werden mithilfe der Ziehl-Neelsen-Färbung gefärbt und auf säurefeste Stäbchen untersucht.

■ Molekulare Nachweismethoden

Der Vorteil der molekularen Diagnostik ist für den Nachweis des langsam wachsenden Mtb offensichtlich: das Verfahren ermöglicht eine definitive Aussage in weniger als 24 h, wohingegen die Kultur wenigstens 2–3 Wochen benötigt. Der molekulare Nachweis ist sehr spezifisch, jedoch weniger sensitiv als die Kultur. Inzwischen kann auch die Empfindlichkeit von Mtb gegenüber den beiden wichtigsten Basisedikamenten, Isoniazid und Rifampicin, mithilfe molekularer Methoden innerhalb weniger Stunden bestimmt werden. Auch für den molekularen Nachweis von nicht tuberkulösen Mykobakterien stehen Methoden zur Verfügung.

■ ■ Kultur

Der kulturelle Nachweis ist der Goldstandard in der mikrobiologischen Tuberkulose-Diagnostik. Mtb wird auf speziellen Nährböden angezüchtet. Auf Festnährböden benötigt eine Kultur 3 Wochen, in Flüssignährböden gelingt die Anzucht der Bakterien in 10–14 Tagen. Die klassische phänotypische Empfindlichkeitstestung bei Mtb benötigt 1–2 Wochen, sodass selbst unter optimalen Bedingungen vom Einsenden des Materials bis zum Vorliegen des vollständigen Antibiogramms mindestens 1 Monat vergeht. Es gibt wenige Mykobakterien, die deutlich schneller (innerhalb von 3 Tagen) wachsen, z.B. *Mycobacterium abscessus*.

■ ■ Interferon- γ -Release-Assay

Der Interferon- γ -Release-Assay (IGRA) basiert auf dem Nachweis von Interferon- γ produzierenden, Mtb-spezifischen T-Lymphozyten im Vollblut des Patienten. Im Gegensatz zum klassischen Hauttest bleibt der IGRA bei BCG-Geimpften negativ. Wie der Hauttest unterscheidet auch der IGRA nicht zwischen einer latenten und aktiven Tuberkulose. Der Test kommt für den Ausschluss einer latenten Tuberkulose (z.B. vor Therapie mit TNF- α -Antagonisten) oder einer kürzlich stattgefundenen Infektion (z.B. bei Personen mit Kontakten zu einem Patienten mit offener Tuberkulose) zum Einsatz.

Mycoplasma pneumoniae

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret, BAL-Flüssigkeit (► molekulare Nachweise)
- Serum (► Antikörper gegen *Mycoplasma pneumoniae*)

Mycoplasma pneumoniae verursacht ambulant erworbene Pneumonien. Mykoplasmen finden sich besonders an Flimmerepithelien. Nasopharyngealabstriche, Bronchialsekrete oder BAL-Flüssigkeiten, aber auch Sputa sind für den direkten Erregernachweis geeignet. Neben dem Direktnachweis mithilfe der PCR können für *Mycoplasma pneumoniae* spezifische Antikörper im Serum der Patienten detektiert werden.

■ Untersuchungstechniken ■ ■ Molekulare Nachweismethoden

Molekulare Verfahren sind inzwischen als fester Bestandteil der *Mycoplasma pneumoniae*-Diagnostik etabliert. Die Sensitivität der Methoden wird als gut eingeschätzt. Der molekulare Direktnachweis ist für die Diagnose der akuten Infektion geeignet.

■ ■ Serologie

Der Antikörperrnachweis ist die am weitesten verbreitete Methode für die Diagnose einer Mykoplasmeninfektion. Es steht ein ELISA zur Verfügung, der sowohl IgG-, IgA- und IgM-Antikörper gegen *Mycoplasma pneumoniae* nachweist. Der Antikörperrnachweis gelingt 1 Woche nach Krankheitsbeginn.

17.2.6 Pilze

Aspergillus

Hierzu zählen u.a. *Aspergillus fumigatus* und *Aspergillus niger*.

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Antigennachweis, Kultur)
- Serum (► Antigennachweis)

Aspergillus species gehört zu den Schimmelpilzen. Die Erreger verursachen Pneumonien bei immunsupprimierten Patienten. Sputa, Bronchialsekrete und BAL-Flüssigkeiten sind zum Nachweis von *Aspergillus species* geeignet. Eine Schleimhautbesiedlung im Respirationstrakt ist deutlich häufiger als eine invasive Aspergillose. Die invasive Infektion kann durch eine Untersuchung von transbronchialen, transthorakalen oder offenen Lungenbiopsien (Nachweis von invasiven Pilzbestandteilen im Gewebe) diagnostiziert werden. Ein Antigennachweis zur Diagnose einer invasiven Aspergillose aus Serum ist möglich.

■ Untersuchungstechniken ■ ■ Mikroskopie

Aspergillus kann mit speziellen Färbungen (Calcofluor-Weiß, Grocott) dargestellt werden. *Aspergillus* bildet wie andere Schimmelpilze als morphologisches Merkmal septierte Hyphen aus.

■ ■ Antigennachweis

Ein häufig gebrauchter Test verwendet den Nachweis des Zellwandantigens Galaktomannan aus dem Serum der Patienten. Der Test soll insbesondere für den frühen Nachweis einer invasiven Aspergillose geeignet sein. Zirkulierendes Antigen konnte in mehreren Untersuchungen als erster Hinweis auf eine invasive Aspergillose nachgewiesen werden. Die Sensitivität des Tests schwankt je nach Studie zwischen 30% und 100%. Die Spezifität liegt bei 85%. Der Test ist inzwischen auch für die Antigendetektion direkt aus der BAL-Flüssigkeit zugelassen.

■ ■ Kultur

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie auf speziellen Pilznährböden ist unproblematisch und gelingt in der Regel nach 5–10 Tagen. Resistenztestungen sind möglich, bleiben aber Speziallaboratorien vorbehalten.

Candida

Hierzu gehören u.a. *Candida albicans*, *Candida glabrata* und *Candida krusei*.

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Sputum, Bronchialsekret (► Kultur)
- BAL-Flüssigkeit (► Mikroskopie, Kultur)
- Serum (► Antigennachweis)

Candida species gehört zu den Sprosspilzen. *Candida* sind Opportunisten und verursachen Pneumonien bei immunsupprimierten Patienten. Sputa, Bronchialsekrete und BAL-Flüssigkeiten eignen sich für den Nachweis von *Candida species*. Invasive *Candida*-Pneumonien sind selten und schwierig von Schleimhautbesiedlungen mit *Candida* abzugrenzen. Die invasive Infektion kann häufig erst durch die Untersuchung von transbronchialen, transthorakalen oder offenen Lungenbiopsaten (Nachweis von invasiven Pilzbestandteilen im Gewebe) eindeutig diagnostiziert werden.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Mikroskopie**

Candida kann mit Standardfärbungen und speziellen Färbungen (Calcofluor-Weiß) dargestellt werden. *Candida* bildet wie andere Sprosspilze als gemeinsames morphologisches Merkmal Sprossungen von »Tochterzellen« aus »Mutterzellen« aus.

- ■ **Antigennachweis**

Als Antigene werden zellwandständige Kohlenhydrate verwendet. Der Nachweis wird aus dem Serum geführt, mit dem Ziel eine invasive Candidiasis zu diagnostizieren. Sensitivitäten und Spezifitäten der Tests variieren.

- ■ **Kultur**

Der kulturelle Nachweis auf Standardnährböden sowie auf speziellen Pilznährböden ist unproblematisch und gelingt in der Regel nach 24–48 h. Auch die Resistenztestung wird heute von vielen Laboratorien als Standarddiagnostik angeboten.

Pneumocystis jirovecii

- **Untersuchungsmaterialien**
(► **Untersuchungstechniken**)

Es eignet sich:

- BAL-Flüssigkeit (► **Antigennachweis**)

Pneumocystis jirovecii-Pneumonien entwickeln sich bei Kindern mit T-Zell-Defizienzen, z.B. bei HIV-Infektionen oder nach Organtransplantationen. Das Material der Wahl ist eine BAL-Flüssigkeit, mit einer Sensitivität von fast 100%.

- **Untersuchungstechniken**
- ■ **Antigennachweis**

Zum Antigennachweis werden monoklonale Antikörper gegen Oberflächen-Glykoproteine verwendet. Die höchste Sensitivität haben Antikörper, die sowohl gegen Zysten als auch gegen Trophozoiten gerichtet sind. Material aus der BAL wird mit dem fluoreszierenden Antikörper überschichtet und kann direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet werden.

17.3 Virologie

17.3.1 Abstrichtechniken für virologische Untersuchungen

Nasenabstriche für kommerzielle Antigenschnelltestsysteme (Influenza, RSV) erfordern meist spezielle Abstrichsysteme (z.B. nylon flocked swabs), die oft mit den Testkits geliefert werden, ansonsten nach den Angaben des Testherstellers gewählt werden müssen. Diese Abstrichsysteme erleichtern es, das Flimmerepithel jenseits des Vestibulum nasi zu erreichen. In Nasenabstrichen lassen sich besonders gut Viren nachweisen, die einen Tropismus für das respiratorische Flimmerepithel haben (z.B. Influenzaviren). Für den Virusantigennachweis mittels direkten Immunfluoreszenztests sind konventionelle Abstrichtupfer (cotton swabs, Holzstäbchen mit Watte) oft besser geeignet, da damit mehr Zellen abgeschilfert werden (Transport in sterilen Röhrchen mit einem Tropfen 0,9% NaCl zur Befeuchtung). Das Erreichen des Flimmerepithels in der Nase erfordert aber einen erfahrenen Untersucher; oft werden deshalb auch kombinierte Nasen-/Rachenabstriche empfohlen. Beide Abstrichsysteme sind auch für molekulare Nachweismethoden geeignet.

Nicht geeignet für virologische Untersuchungen sind die für die Bakteriologie (»Wundabstriche«) entwickelten Abstrichsysteme, bei denen der Abstrichtupfer zum Transport in ein Agar- oder anderes Gel-Kulturmedium gesteckt wird, da in diesem die viralen Antigene verloren gehen.

17.3.2 Andere Materialien aus dem Respirationstrakt

Häufig werden Rachenspülwässer (mit isotonomischer Kochsalzlösung) untersucht; diese eignen sich wie die Abstriche sowohl zum Antigennachweis als auch zu molekularen Nachweisverfahren sowie zur Virusisolation auf Zellkulturen. Obwohl respiratorische Viren keinen besonderen Tropismus für das nicht verhornte Plattenepithel des Pharynx haben, replizieren einige dennoch dort oder es findet sich in diesen Spülwässern ausreichend Zellmaterial aus Nase und Bronchien.

Die am häufigsten verwendeten Materialien aus dem unteren Respirationstrakt sind Tracheal- und Bronchialsekret und die BAL-Flüssigkeit. Sputum wird nur selten für virologische Untersuchungen eingesandt, da der Husten bei viralen Infektionen nicht oder nur wenig produktiv ist. Die begrenzten Erfahrungen zeigen aber, dass dieses Material auch für Virusnachweise geeignet ist, sofern es sich nicht nur um Speichel handelt. Da es bei den meisten Virusinfektionen des unteren Respirationstrakts auch zu einer Virusreplikation im oberen Respirationstrakt kommt, ist oft eine Diagnose mit weniger invasiv zu gewinnenden Materialien aus dem oberen Respirationstrakt möglich. Die Untersuchung von Materialien aus dem unteren Respirationstrakt ist aber hilfreich um nachzuweisen, dass z.B. eine Pneumonie durch ein Virus verursacht wird, das in den meisten Fällen nur zu milden Erkrankungen des oberen Respirationstrakts führt. Insbesondere

re mit molekularen Nachweismethoden lässt sich in unklaren Fällen durch den (semi-)quantitativen Vergleich mit Material aus dem oberen Respirationstrakt die Virusinfektion im unteren Respirationstrakt belegen.

Die Materialien werden üblicherweise in sterile Röhrchen gefüllt und ohne weitere Zusätze bei Raumtemperatur zum Labor transportiert. Insbesondere für längere Transportzeiten empfehlen sich Röhrchen mit virologischen Transportmedien, die meist antibiotikahaltige Puffer enthalten, um eine bakterielle Überwucherung durch Bakterien der Normalflora zu unterdrücken. Sollte ein unmittelbarer Transport zum Labor nicht möglich sein, empfiehlt sich die Lagerung im Kühlschrank (2–8°C), um virale Strukturen zu konservieren und das Bakterienwachstum zu bremsen.

17.3.3 RNA-Viren

Influenzaviren

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Nasenabstriche, Bronchial-/Trachealsekrete, kombinierte Nasen- und Rachenabstriche, Rachenspülwasser mit 0,9% NaCl und »echtes« Sputum (nicht: Speichel)
(► Antigennachweismethoden)
- BAL-Flüssigkeit (► Antigennachweismethoden); für die Diagnosestellung genügt auch bei Influenza-Pneumonien aber meist die Untersuchung von Material aus dem oberen Respirationstrakt.

Influenzaviren der Typen A und B sind die Erreger der »echten« Grippe. Nur Influenzavirus A wird weiter subtypisiert anhand seiner Hämagglutinin- und Neuraminidase-Antigene (z.B. H1N1, H3N2), die durch Rekombination (antigenic shift) mit zoonotischen Influenzaviren ausgetauscht werden können. Außerdem werden Influenza-Stämme nach Ort und Jahr der ersten Isolation bezeichnet. Influenzaviren haben einen Tropismus für das respiratorische Flimmerepithel, das sie stark schädigen und in dem sie sich gut nachweisen lassen. Durch die Epithelschädigung begünstigen sie auch bakterielle Superinfektionen. Insbesondere die Erstinfektionen im Kindesalter verlaufen schwer, spätere Infektionen meist nur, wenn das Virus im Laufe der Jahre seine antigenen Eigenschaften verändert hat.

Anmerkung: Die Influenza-C-Diagnostik wird wegen ihrer geringen klinischen Relevanz oft weder angeboten noch nachgefragt.

■ Untersuchungstechniken ■ Antigennachweismethoden

Kommerzielle Antigen-Schnelltestsysteme (Zeitaufwand ca. 30 min) haben sich sowohl im Labor als auch »bedside« prinzipiell bewährt, allerdings kann es beim Auftreten neuer Subtypen auch zum Versagen dieser Testsysteme kommen, so wie es z.B. bei der H1N1-Pandemie der Jahre 2009/2010 beobachtet wurde. Eine Alternative zu den kommerziellen

Schnelltestsystemen ist der direkte Immunfluoreszenztest, mit dem im Labor virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden können. Je nach Auswahl der eingesetzten Antikörper lassen sich damit in Bezug auf Sensitivität und Spezifität etwas bessere Ergebnisse erzielen, sofern ausreichend zellhaltiges Material gewonnen wurde (Zeitaufwand ca. 1 h).

Antigennachweismethoden eignen sich zum schnellen Influenza-Nachweis, sind aber aufgrund ihrer begrenzten Sensitivität für eine Ausschlussdiagnostik ungeeignet. Positive Ergebnisse sollten insbesondere außerhalb der typischen Grippezeit auch durch eine der nachfolgenden Methoden bestätigt werden.

■ Molekulare Nachweismethoden

Influenza-PCRs haben eine sehr hohe Sensitivität, ohne dass auf eine hinreichende Spezifität verzichtet werden muss (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Bei der Real-time-PCR ist auch ein (semi-)quantitativer Befund möglich, der eine Verlaufsbzw. Therapiekontrolle ermöglicht. Es stehen sowohl generische PCRs für alle Influenza-A- und -B-Typen als auch typbzw. subtypspezifische PCRs zur Verfügung, die zumindest eine provisorische Typisierung ermöglichen.

■ Virusisolation

Die Virusisolation erfolgt auf MDCK-Zellkulturen, primären Affennierenzellen oder (heute nur noch in Speziallabors) auf Bruteiern (Hühnerembryonen). Sie gilt als Referenzmethode und ist Voraussetzung für die antigenetische Differenzierung des Isolats im Hämagglutinations- und Neutralisationstest. Aufgrund des großen Zeitaufwandes (2 Tage bis 2 Wochen) wird die Virusisolation nicht mehr zur Primärdiagnostik, sondern nur noch zur Bestätigung eingesetzt. Insbesondere bei beginnenden Epidemien, Einzelfällen vor der typischen Grippezeit und bei klinisch besonders schweren Fällen ist sie aber zu fordern.

■ Serologische Nachweismethoden

Aufgrund der kurzen Inkubationszeit sind Antikörperrnachweise bei Krankheitsbeginn nicht möglich und deshalb auch diagnostisch nicht empfehlenswert.

Respiratory Syncytial Virus

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenspülwasser, nasopharyngeale Sekrete und Abstriche (► Antigennachweismethoden)
- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (nur bei Bronchiolitis und Pneumonitis/Pneumonie) (► Antigennachweismethoden)

Respiratory Syncytial Virus (RSV) verursacht häufig schwere Atemwegsinfektionen bei Säuglingen und jungen Kleinkindern. Auch nosokomial erworbene Infektionen sind auf pädiatrischen Stationen nicht selten. RSV ist ein Paramyxovirus, das fast nur epidemisch im Winter (November bis März) auftritt. Es besteht nur ein partieller Nestschutz durch mater-

nale Antikörper, weshalb auch Neugeborene gefährdet sind, insbesondere aber Patienten <2 Jahren mit angeborenen Herzfehlern oder Immunsuppression (z.B. nach Knochenmarktransplantation). Multiple Infektionen in der Kindheit sind typisch, da mehrere RSV-Stämme zirkulieren, von denen die meisten der virulenteren Subgruppe A (RSV-A) und einige der Subgruppe B (RSV-B) zuzuordnen sind. Innerhalb der Subgruppen führen Infektionen zu einer kurzzeitigen Immunität (1–2 Jahre); Infektionen bei älteren Kindern (und Erwachsenen) verlaufen deshalb meist milder, oft nur mit Symptomen von Seiten des oberen Respirationstrakts und zum Teil auch mit Konjunktivitis.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Mehrere kommerzielle RSV-Antigen-Schnelltestsysteme, auch »bedside«-Tests, sind verfügbar. Dafür geeignete Materialien sind Sekrete und Spülflüssigkeiten aus Nase und/oder Pharynx, zum Teil werden auch mit speziellen Abstrichtupfern (nylon flocked swabs) gewonnene Abstriche empfohlen. Bronchoalveoläre Sekrete und Spülflüssigkeiten sind ebenfalls geeignete Materialien. Eine Alternative zu den kommerziellen Schnelltestsystemen ist der direkte (oder indirekte) Immunfluoreszenztest, mit dem virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden (Zeitaufwand ca. 1 h).

Antigennachweismethoden eignen sich zum schnellen RSV-Nachweis, sind aber aufgrund ihrer begrenzten Sensitivität für eine Ausschlussdiagnostik ungeeignet. Positive Ergebnisse sollten durch eine der nachfolgenden Methoden bestätigt werden.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-basierte Nachweisverfahren für RSV haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität und werden zum Teil als Multiplex-PCRs zusammen mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Sie können sowohl für die Primärdiagnostik als auch zur Bestätigung von RSV-Antigennachweisen zum Einsatz kommen. Ihr Einsatz empfiehlt sich besonders, wenn bei RSV-typischer Symptomatik der Antigennachweis negativ war. Bei der Real-time-PCR ist auch ein (semi-)quantitativer Befund möglich, der eine Verlaufskontrolle ermöglicht.

■ ■ Virusisolation

Die Virusisolation erfolgt auf humanen Zelllinien (bevorzugt Hep2) und gilt als Goldstandard der RSV-Diagnostik. Typischerweise lassen sich nach 3–7 Tagen vielkernige Synzytien mit eosinophilen Einschlusskörperchen nachweisen. Aufgrund des großen Zeitaufwandes sollte die Virusisolation heute nicht mehr zur Primärdiagnostik, sondern nur noch zur Bestätigung von positiven Antigennachweisen eingesetzt werden.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Die Serologie ist für die Diagnostik akuter Infektionen nicht zu empfehlen, da aufgrund der kurzen Inkubationszeit eine serologische Diagnosestellung bei Krankheitsbeginn nicht möglich ist. Serologische Studien zeigen aber, dass nahezu alle

Kinder >2 Jahren zumindest eine RSV-Infektion durchgemacht haben.

Humanes Metapneumovirus

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenspülwasser, nasopharyngeale Sekrete und Abstriche (► Antigennachweismethoden, molekulare Nachweismethoden)
- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (letztere nur bei Bronchiolitis und Pneumonie) (► Antigennachweismethoden, molekulare Nachweismethoden)

Humanes Metapneumovirus (MPV) (mit 2 Subtypen A und B) löst eine der RSV-Infektion ähnliche Symptomatik aus (Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie) und hat auch eine ähnliche Epidemiologie wie RSV (s. oben). MPV wird aber seltener nachgewiesen als RSV und die Symptomatik ist in der Regel milder, insbesondere bei Reinfektionen. MPV-bedingte Todesfälle sind sehr selten und auf Patienten mit schweren Vorerkrankungen beschränkt. An MPV ist bei negativer RSV-Testung differenzialdiagnostisch zu denken, es kommen aber auch RSV/MPV-Koinfektionen vor.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Kommerzielle MPV-Antigen-Schnelltestsysteme sind nicht verfügbar. Direkte Immunfluoreszenztests, mit denen im Labor virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden können, sind für den MPV-Antigennachweis in Nasen- und/oder Rachenabstrichen sowie in Rachenspülwasser einsetzbar, außerdem für bronchoalveoläre Sekrete und BAL-Flüssigkeiten (Zeitaufwand ca. 1 h). Die Sensitivität ist deutlich geringer als bei molekularen Nachweismethoden, deshalb sollten alle negativen Proben bei klinischer Relevanz auch mit molekularen Methoden untersucht werden.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-basierte Nachweisverfahren für MPV haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität und werden oft auch als Multiplex-PCRs zusammen mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Sie können sowohl für die Primärdiagnostik als auch zur Bestätigung von positiven MPV-Antigennachweisen zum Einsatz kommen. Ihr Einsatz empfiehlt sich auch besonders, wenn bei RSV-typischer Symptomatik kein RSV nachgewiesen werden konnte und somit MPV differenzialdiagnostisch zu berücksichtigen ist.

■ ■ Virusisolation

Die Virusisolation ist sehr zeitaufwendig (mehrere Wochen) und für die MPV-Diagnostik deshalb nicht zu empfehlen.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Die zum Teil angebotenen ELISA-Tests sind nicht für die Diagnostik akuter MPV-Infektionen zu empfehlen.

Parainfluenzaviren (Typ 1–4)

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenspülwasser, nasopharyngeale Sekrete und Abstriche (► Antigennachweismethoden)
- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (nur bei Bronchiolitis und Pneumonie; Nachweis aber auch in Materialien aus dem oberen Respirationstrakt möglich) (► Antigennachweismethoden)

Nach Infektion des Nasen- und Rachenraums kommt es zu einer absteigenden Ausbreitung der Parainfluenzaviren im Respirationstrakt. Leitsymptom der Parainfluenza Typ-2- und Typ-3-Infektionen bei Kleinkindern ist der »Pseudo-Krupp« (Differenzialdiagnose: Coronavirus NL63), bei Typ-1-Infektionen werden öfter eine Bronchiolitis und gelegentlich auch Pneumonien beobachtet. Infektionen mit Parainfluenza Typ 4 (Subtypen A und B) verlaufen meist mild. Epidemiologisch kommt es zu gehäuften Parainfluenzavirus-Infektionen im Spätherbst und frühen Winter, die Durchseuchung der Kinder bis zum 5. Lebensjahr ist nahezu 100%, wobei Typ-3-Infektionen am häufigsten sind. Alle Parainfluenzavirus-Infektionen hinterlassen nur eine sehr kurz anhaltende Immunität (wenige Monate), Reinfektionen bei älteren Kindern verlaufen aber milder, statt Pseudo-Krupp wird z.B. nur Heiserkeit und mäßiger Husten beobachtet.

■ Untersuchungstechniken: ■ Antigennachweismethoden

Direkte Immunfluoreszenztests, mit dem virusinfizierte Zellen nachgewiesen werden können, sind die bevorzugte Schnelldiagnostik (Zeitaufwand ca. 1 h). In manchen Labors werden alternativ ELISA-Tests zum Antigennachweis durchgeführt. Die Sensitivität ist ausreichend, aber deutlich geringer als bei molekularen Nachweismethoden. Negative Proben sollten bei typischer Symptomatik wiederholt oder auch mit molekularen Methoden untersucht werden.

■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-basierte Nachweisverfahren für Parainfluenzaviren haben eine sehr hohe Sensitivität und Spezifität und werden oft auch als Multiplex-PCRs zusammen mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Zum Teil wird Typ 4 nicht erfasst. Sie können sowohl für die Primärdiagnostik als auch zur Bestätigung von positiven Immunfluoreszenztests zum Einsatz kommen.

■ Virusisolation

Die Virusisolation auf Affenrinenzellkulturen (z.B. Vero) ist zeitaufwendig (>1 Woche) und deshalb nicht als primäre Diagnostik, sondern nur zur Bestätigung von Antigennachweismethoden zu empfehlen. Die für die Parainfluenzaviren typische Synzytienbildung tritt manchmal nicht auf, sodass Hämadsorptionstests mit Hühner- oder Meerschweinchenerythrozyten bzw. Immunfluoreszenztests durchgeführt werden müssen.

■ Serologische Nachweismethoden

Aufgrund der hohen Durchseuchung und der sich daraus ergebenden geringen Sensitivität und Spezifität sind die angebotenen ELISA-Tests (Antikörperrnachweise) nicht für die Diagnostik akuter Infektionen zu empfehlen.

Rhinoviren und Enteroviren (Picornaviren)

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Nasen- und Rachenabstriche und Spülwasser (► molekulare Nachweismethoden, wird aber bei »Schnupfen« aus Kostengründen kaum durchgeführt)
- Bronchial-/Trachealsekrete und BAL-Flüssigkeit sind besonders geeignet für die Abklärung einer Rhinovirus-Pneumonie (► molekulare Nachweismethoden)
- Stuhlproben: Enteroviren lassen sich auch noch in der Rekonvaleszenz gut nachweisen (► molekulare Nachweismethoden)

Rhinoviren sind neben den Coronaviren die häufigsten Erreger des Schnupfens (common cold, Erkältung, grippaler Infekt). Die Manifestation einer Rhinovirusinfektion als Pneumonie ist zwar sehr selten, dennoch sind Rhinoviren (wie auch RSV) aufgrund der Vielzahl der Infektionen die häufigsten viralen Pneumonieerreger, insbesondere bei Säuglingen und immunkompromittierten Kindern (z.B. durch Leukämien, nach Transplantationen). In diesen Fällen ist eine Labor Diagnostik sinnvoll.

Rhinoviren werden in drei verschiedene Spezies (Rhino A, B, und C) eingeteilt und zum Genus der Enteroviren gerechnet. Die erst vor wenigen Jahren entdeckten Rhinoviren der Spezies C sollen häufiger mit Pneumonien assoziiert sein. Auch die nah verwandten Viren der vier Enteroviruspezies (A bis D) konnten in Einzelfällen bei Pneumonien nachgewiesen werden, treten aber meist im Sommer auf (»Sommergrippe«), wohingegen Rhinoviren meist im Herbst und Frühling epidemisch auftreten. Da es mehr als 100 Rhinovirustypen und mehr als 100 Enterovirustypen (zum Teil auch Coxsackie und Echo genannt) gibt und sich nach durchgemachter Infektion nur eine typspezifische Immunität entwickelt (IgA-Antikörper), sind multiple, oft jährliche (saisonale) Infektionen die Regel.

■ Untersuchungstechniken ■ Antigen-Nachweismethoden

Kommerzielle Rhinovirusantigen-Schnelltestsysteme werden wegen der geringen Nachfrage nicht angeboten. Das Gleiche gilt für direkte Immunfluoreszenztests zum Nachweis virusinfizierter Zellen in Abstrichen bzw. Spülflüssigkeiten.

■ Molekulare Nachweismethoden

Diese werden oft nur für Material aus dem unteren Respirationstrakt verwendet, um klinisch relevante Rhinoviruspneumonien zu diagnostizieren. PCR-basierte Nachweisverfahren für Rhinoviren und Enteroviren haben eine sehr hohe Sensitivität und werden zum Teil als Multiplex-PCRs zusammen

mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Bei den meisten PCRs gibt es partielle Kreuzreaktionen zwischen Rhino- und Enteroviren. Wenn der Nachweis nur in Materialien aus dem oberen Respirationstrakt erfolgt, sollte daran gedacht werden, dass eine Koinfektion vorliegen kann (z.B. Rhinovirus-Schnupfen plus Pneumonie anderer Ätiologie). Die Differenzierung Entero- vs. Rhinovirus und die Zuordnung zu einer Rhinovirus-Spezies sind durch Sequenzierung der PCR-Produkte möglich.

■ ■ Virusisolation

Die Virusisolation erfolgt auf humanen Zelllinien (Wi38, MRC5, Hep2). Aufgrund des großen Zeitaufwandes (2 Tage bis 2 Wochen) wird die Virusisolation heute nicht mehr zur Primärdiagnostik, sondern nur noch zur Bestätigung bei schweren Fällen eingesetzt.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Aufgrund der kurzen Inkubationszeit ist eine serologische Diagnosestellung (Antikörpernachweis) bei Krankheitsbeginn nicht möglich. Außerdem erschwert die Vielzahl von Rhinovirustypen eine solche Diagnostik, sodass von ihr abzuraten ist.

Coronaviren

■ Untersuchungsmaterialien (▶ Untersuchungstechniken)

Es eignen sich:

- Rachenspülwasser, nasopharyngeale Sekrete und Abstriche (meist keine Labordiagnostik durchgeführt) (▶ molekulare Nachweismethoden)
- Bronchialsekrete und BAL-Flüssigkeit (nur bei Bronchitis, Bronchiolitis und Pneumonie) (▶ molekulare Nachweismethoden)

Coronaviren der Gruppen 1B (229E, NL63) und 2a (OC43, HKU1) gehören (neben den Rhinoviren) im Winter zu den häufigsten Erregern von »Erkältungen« (5–30% der Fälle), werden aber auch bei ca. 8% der stationär behandelten tiefen Atemwegsinfektionen (Pneumonie, Bronchiolitis, Bronchitis) gefunden. Die Erstinfektionen erfolgen meist im Alter <3 Jahren. Erstinfektionen mit NL63 führen oft zu Pseudokrapp (Differenzialdiagnose: Parainfluenza 2). Coronavirusinfektionen hinterlassen nur kurzzeitige typspezifische Immunität, sodass es schon innerhalb eines Jahres zu Reinfektionen kommen kann. Das SARS-Coronavirus stammte aus einem zoonotischen Reservoir und ist nach dem Eindämmen der primär epidemischen Ausbreitung beim Menschen nicht endemisch geworden. Deshalb soll hier nicht weiter auf diesen Erreger eingegangen werden.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Antigennachweismethoden (direkte Immunfluoreszenz, ELISA) sind prinzipiell möglich, werden aber nur selten angefordert und auch nur von wenigen Labors angeboten.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-basierte Nachweisverfahren für Coronaviren werden oft als Multiplex-PCRs zusammen mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Es stehen kommerziell angebotene Testsysteme zur Verfügung. Aus Kostengründen wird diese Diagnostik fast nur bei Erkrankungen des unteren Respirationstrakts angewandt, zum Teil auch bei Pseudokrapp.

■ ■ Virusisolation

Da die Virusisolation nicht bei allen Coronaviren möglich ist, wird sie nicht als Routinediagnostik empfohlen. Einige Coronaviren (229E) lassen sich auf humanen embryonalen Lungengastroblasten (WI-38, MRC-5) oder (NL-63 Coronaviren) auf Vero- und LLC-MK2 Zellen isolieren.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Diese werden fast ausschließlich für epidemiologische Studien verwendet.

17.3.4 DNA-Viren

Adenoviren

■ Untersuchungsmaterialien (▶ Untersuchungstechniken)

Bei Infektionen des oberen Respirationstrakts:

- Rachenspülwasser, nasopharyngeale Sekrete und Abstriche (▶ Antigennachweismethoden, es wird aber meist keine Labordiagnostik durchgeführt)

Bei Pneumonien und Bronchiolitis:

- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit zu empfehlen, um den Anteil falsch positiver Ergebnisse zu verringern (▶ molekulare Nachweismethoden)

Pneumonien und ARDS werden meist durch Adenoviren der Spezies B (Typen 3, 7, 14 und 21) und E (Typ 4) verursacht, epidemisch im Kindesalter oder im Rahmen von Kleinerepidemien bei jungen Erwachsenen (z.B. Rekruten). Die gleichen Adenovirustypen lassen sich allerdings auch bei mildereren Infektionen des oberen Respirationstrakts nachweisen. Humane Adenoviren der Spezies C (Typen 1, 2, 5 und 6) sind häufige Erreger von Tonsillitis, Pharyngitis und Rhinitis im Kleinkindalter, als Pneumonieerreger werden sie aber nur bei Immunsuppression beobachtet. Nach den häufigen, meist harmlosen Infektionen mit Adenoviren der Spezies C kommt es zur Viruspersistenz und sporadischen (asymptomatischen) Virusausscheidung für mehrere Monate bis Jahre. Diese kann diagnostisch verwirrend sein, wenn es zu einer anderen respiratorischen Infektion kommt, bei der dann aber auch Adenoviren nachgewiesen werden.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Antigennachweismethoden (direkte Immunfluoreszenztests) sind für die Diagnostik bei Infektionen des oberen Respirati-

onstrakts geeignet. Die relativ geringe Sensitivität ist vorteilhaft, da nur bei akuten Infektionen positive Ergebnisse zu erwarten sind, aber nicht bei Adenoviruspersistenz. Kommerzielle Adenovirusantigen-Schnelltests wurden für die Adenovirus-Gastroenteritis durch die Typen 40 und 41 entwickelt. Sie sind nicht für respiratorische Materialien validiert.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-basierte Nachweisverfahren für Adenoviren sollten alle Typen erfassen. Sie werden heute meist entweder als quantitative Real-time-PCR oder als Multiplex-PCRs zusammen mit dem Nachweis anderer respiratorischer Viren durchgeführt (Zeitaufwand mindestens 3–7 h). Aufgrund der hohen Sensitivität werden oft auch Adenovirus-Persistenzen erfasst, die aber nicht die Ätiologie einer akuten respiratorischen Erkrankung sind. Dies lässt sich durch (Semi-)Quantifizierung differenzieren. Für die Untersuchung bronchoalveolärer Sekrete und Lavage-Flüssigkeiten empfiehlt sich ein Vergleich mit einem parallel entnommenen Rachenspülwasser. Eine deutlich höhere Adenovirus-DNA-Konzentration im unteren Respirationstrakt spricht für die Adenovirus-Ätiologie einer Pneumonie. Eine Typisierung ist durch Sequenzierung der PCR-Produkte möglich.

■ ■ Virusisolation

Die Isolation von Adenoviren wird bevorzugt auf der A549-Zelllinie durchgeführt. Je nach Adenovirustyp und Viruskonzentration sind dafür wenige Tage bis 2 Wochen erforderlich. Die Virusisolation ist die Voraussetzung für das klassische Typisierungsverfahren der Neutralisation, das aber heute kaum noch durchgeführt wird. Die Virusisolation dient meist nur zur Bestätigung anderer diagnostischer Methoden, insbesondere bei ARDS- und Pneumonie-Fällen.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Diese werden fast ausschließlich für epidemiologische Studien verwendet; von Bedeutung ist hier insbesondere der typspezifische Neutralisationstest. IgA- und IgM-ELISAs, die zwischen Adenovirustypen kreuzneutralisierende Antikörper nachweisen, sind kommerziell erhältlich, die Bedeutung positiver Ergebnisse für eine akute respiratorische Infektion aber wegen multipler Adenovirusinfektionen im Kindesalter anzuzweifeln.

Humanes Bocavirus

■ ■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Bei Pneumonien:

- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (► molekulare Nachweismethoden); humanes Bocavirus lässt sich häufig auch im oberen Respirationstrakt und Stuhl nachweisen, die ätiologische Bedeutung dieser Nachweise für die Pneumonie-Diagnostik ist aber nicht gesichert.

Das humane Bocavirus wurde erst 2005 als Erreger von Pneumonien und Gastroenteritiden beschrieben. Es gehört zur Familie der Parvoviridae, deren DNA nach der Primärinfek-

tion für viele Jahre, wahrscheinlich lebenslang in Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisbar bleibt. Sicher ist nicht jeder Bocavirus-DNA-Nachweis bei einer akuten respiratorischen Erkrankung als Ätiologie dieser Erkrankung zu interpretieren, umgekehrt gibt es aber auch plausible Hinweise, dass die akute Bocavirusinfektion sich klinisch als Pneumonie manifestieren kann.

■ ■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Diese sind für humanes Bocavirus diagnostisch nicht verfügbar.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-Nachweismethoden, insbesondere auch Real-time-PCR-Verfahren, die eine (Semi-) Quantifizierung der Bocavirus-DNA ermöglichen, sind diagnostisch Mittel der Wahl. Die Bewertung eines positiven Ergebnisses ist aber schwierig. Insbesondere der Nachweis hoher Bocavirus-DNA-Konzentrationen (Grenzwerte sind aber noch nicht festgelegt) bei Abschluss anderer respiratorischer Erreger spricht für eine ätiologische Bedeutung.

■ ■ Virusisolation

Nicht verfügbar.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Nicht verfügbar.

Polyomaviren (KI, WU und MC)

■ ■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Bei Pneumonien:

- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (► molekulare Nachweismethoden); Polyomavirus-DNA lässt sich häufig auch im oberen Respirationstrakt und Stuhl nachweisen, die ätiologische Bedeutung dieser Nachweise für die Pneumonie-Diagnostik ist aber nicht gesichert.

Die humanen Polyomaviren KI und WU wurden 2007 erstmals bei respiratorischen Erkrankungen in 1–3% der Materialien aus dem oberen Respirationstrakt nachgewiesen. Die Durchseuchung findet im Kleinkindalter statt, danach ist von einer Virus-DNA-Persistenz auszugehen, da auch Gesunde KI- bzw. WU-DNA positiv sein können. Es wird diskutiert, ob die Primärinfektion (oder auch eine Reaktivierung bei Immunsuppression) mit respiratorischer Symptomatik einhergeht. MC-Polyomavirus wird in ähnlicher Häufigkeit wie KI und WU in respiratorischen Proben gefunden, ist aber auch die Ätiologie eines seltenen Hauttumors (Merkel-Zell-Karzinom).

■ ■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Nicht verfügbar.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

PCR-Nachweismethoden, insbesondere auch Real-time-PCR-Verfahren, die eine (Semi-)Quantifizierung der Ki- bzw.

Wu-DNA ermöglichen, sind diagnostisch verfügbar. Die Bedeutung eines Ki- bzw. Wu-Polyomavirus-DNA-Nachweises für die Ätiologie einer Pneumonie ist noch unklar; möglicherweise sind nur hohe Polyomavirus-DNA-Konzentrationen diagnostisch zu werten, Grenzwerte sind aber nicht etabliert.

■ ■ Virusisolation

Nicht verfügbar.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Nicht verfügbar.

Humanes Cytomegalievirus

■ Untersuchungsmaterialien

(► Untersuchungstechniken)

Bei Pneumonien:

- Bronchialsekret und BAL-Flüssigkeit (► molekulare Nachweismethoden)
Nur bei immunsupprimierten Patienten:
- EDTA-Blut (oder EDTA-Plasma) zum quantitativen Viruslastnachweis (► Antigennachweismethoden, ► molekulare Nachweismethoden)

Zum Nachweis der Erstinfektion bei Säuglingen und Neugeborenen:

- Urin (► molekulare Nachweismethoden).

Humanes Cytomegalievirus (CMV) hat fast ausschließlich nur bei immunsupprimierten Patienten eine Bedeutung als Erreger atypischer Pneumonien, die sowohl bei der Primärinfektion als auch bei endogener Reaktivierung auftreten können. CMV-Infektionen verlaufen bei immunkompetenten Kindern und Jugendlichen meist asymptomatisch, manchmal unter dem klinischen Bild eines Pfeiffer'schen Drüsenfiebers. Die Durchseuchung ist bis zum Erwachsenenalter ca. 60%. Nach der Primärinfektion etabliert CMV eine lebenslängliche latente (asymptomatische) Infektion, von der ausgehend es bei Immunsuppression zu Reaktivierungen kommen kann. Klinisch bedeutend ist auch die CMV-Primärinfektion bei unreifen Neugeborenen, bei der eine Pneumonie aber nur selten im Vordergrund steht.

■ Untersuchungstechniken:

■ ■ Antigennachweismethoden

Die pp65-Antigenfärbung in Granulozyten ist ein älteres Verfahren zur Quantifizierung der CMV-Viruslast im peripheren Blut. Sie dient zum Nachweis von CMV-Reaktivierungen bei immunsupprimierten Patienten (mit geringerer Sensitivität als die quantitative PCR).

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

Real-time-PCR-Verfahren (und andere quantitative PCR-Verfahren) wurden primär entwickelt für die Diagnostik (und Therapiekontrolle) von CMV-Reaktivierungen bei immunsupprimierten Patienten durch Viruslastbestimmung in EDTA-Blutproben. Real-time-PCRs lassen sich aber auch für den Nachweis von CMV-DNA in BAL-Flüssigkeiten von immun-

supprimierten Patienten einsetzen. CMV ist bei Lungentransplantierten in höheren Konzentrationen in der BAL-Flüssigkeit nachweisbar als im Blut. Allerdings konnte noch kein Grenzwert für CMV-DNA-Konzentrationen in BAL-Flüssigkeit etabliert werden, der prädiktiv für eine CMV-Pneumonie ist. Der CMV-DNA-Nachweis im Urin dient nur zur Diagnose einer prä- bzw. perinatalen Infektion.

■ ■ Virusisolation

Eine Virusisolation ist nur auf MRC-5-Zellen möglich, ist allerdings sehr zeitaufwendig (1–4 Wochen) und deshalb als primäre Diagnostik nicht geeignet.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Die CMV-IgG-Bestimmung im ELISA bei Organspendern und -empfängern dient der Serostatusbestimmung und somit zur Vorhersage des CMV-Reaktivierungsrisikos. Die CMV-IgM-Bestimmung ist bei immunsupprimierten Patienten diagnostisch nicht hilfreich (mangelnde Sensitivität und Spezifität), allerdings für die Diagnose der (klinisch meist nicht relevanten) CMV-Erstinfektion geeignet.

Epstein-Barr-Virus

■ Untersuchungsmaterialien

(► Untersuchungstechniken)

Bei der Primärinfektion mit Beteiligung des oberen Respirationstrakts (Enanthem, Pharyngitis, Tonsillitis mit Belägen):

- Serum (► Serologie)
Nur bei immunsupprimierten Patienten:
- EDTA-Blut (oder EDTA-Plasma) zum quantitativen Viruslastnachweis (► molekulare Methoden)

Bei atypischen Pneumonien bei immunsupprimierten Patienten:

- BAL-Flüssigkeit (► molekulare Methoden)

Epstein-Barr-Virus-Infektionen (EBV-Infektionen) verlaufen im Kindesalter oft asymptomatisch, im Jugendalter und jungen Erwachsenenalter unter dem typischen Bild einer infektiösen Mononukleose (Pfeiffer'sches Drüsenfieber) mit der sehr seltenen Komplikation einer viralen Pneumonie. Die Durchseuchung ist bis zum Erwachsenenalter >95%. Nach der Primärinfektion etabliert EBV eine lebenslange latente (asymptomatische) Infektion von Lymphozyten, von der ausgehend es bei Immunsuppression zu Reaktivierungen (selten als Pneumonie) oder zur Tumorentstehung (Nasopharynxkarzinom, Burkitt- und andere Lymphome) kommen kann.

■ Untersuchungstechniken

■ ■ Antigennachweismethoden

Diese werden nur für die Untersuchung von Tumorbiopsien genutzt.

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

Real-time-PCR-Verfahren dienen der Diagnostik von EBV-Reaktivierungen und EBV-assoziierten lymphoproliferativen Erkrankungen bei immunsupprimierten Patienten durch

Viruslastbestimmung in EDTA-Blutproben. Real-time-PCRs lassen sich aber auch für den Nachweis von EBV-DNA in BAL-Flüssigkeit bei Pneumonien von immunsupprimierten Patienten einsetzen. Allerdings ist für diesen Zweck noch kein Grenzwert für eine EBV-DNA-Konzentration etabliert worden, der prädiktiv für eine EBV-Pneumonie ist. Der Nachweis geringer EBV-DNA-Konzentrationen ist meist nicht als Ätiologie einer respiratorischen Erkrankung zu bewerten, sondern durch latent EBV-infizierte Lymphozyten bedingt.

■ ■ Virusisolation

Die Virusisolation ist als diagnostisches Verfahren nicht verfügbar.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Die EBV-VCA-IgM-Bestimmung (ELISA) ist für die Diagnose der EBV-Erstinfektion bei Kindern und Jugendlichen gut geeignet, ggf. auch zur Diagnose der seltenen, eine Mononukleose komplizierende Pneumonie. Ergänzend oder alternativ dazu kann der EBV-EA-D-IgG-Nachweis im ELISA dienen. Der (veraltete) Nachweis »heterophiler« Antikörper (Paul-Bunnell-Reaktion) hat zu diesem Zweck eine geringere Sensitivität. Der Nachweis von EBV-VCA-IgA (ELISA oder indirekter IFT) ist bei Nasopharynx-Karzinom hoch positiv. Die EBV-VCA-IgG-Bestimmung bei Organspendern und -empfängern dient der Serostatusbestimmung und somit zur Vorhersage des EBV-Reaktivierungsrisikos. Die EBV-VCA-IgM-Testung ist aber bei immunsupprimierten Patienten diagnostisch nicht hilfreich (mangelnde Sensitivität und Spezifität).

Herpes-simplex-Virus (HSV)

■ Untersuchungsmaterialien (► Untersuchungstechniken)

Bei Pneumonien:

- Bronchialsekret oder BAL-Flüssigkeit (► Antigennachweismethoden, Virusisolation, molekulare Nachweismethoden). Eine Kontamination mit Materialien aus dem Oropharynx ist zu vermeiden, da diese oft HSV enthalten (durch asymptomatische Reaktivierungen, Lippenbläschen etc.) und so zu falsch positiven Ergebnissen führen.
- Pneumonie im Rahmen eines Herpes neonatorum:
- Auch EDTA-Blut (oder EDTA-Plasma) sind zum quantitativen Viruslastnachweis (► molekulare Methoden) gut geeignet.

Der lebensbedrohliche Herpes neonatorum (disseminierte, sepsisartige HSV-Infektion, meist mit Enzephalitis, Pneumonie und Hepatitis) tritt meist bei Neugeborenen ohne Nestschutz (HSV-IgG-negative Mütter) auf, allerdings gibt es auch Einzelfälle bei HSV-IgG-positiven Neugeborenen. Infektionsquelle ist meist eine frische Infektion der Mutter (genital oder oral) oder auch nur ein Lippenbläschen (HSV-Reaktivierung) beim Vater oder anderen Kontaktpersonen (Pflegepersonal, Besucher). Außerdem kann HSV die Ätiologie von blutiger Tracheobronchitis und von atypischen Pneumonien bei immunsupprimierten Patienten sein.

■ Untersuchungstechniken ■ ■ Antigennachweismethoden

Direkte Immunfluoreszenztests haben eine ausreichende Sensitivität für den HSV-Nachweis in Bläschensekreten und -abstrichen und in BAL-Flüssigkeit, in letzterer sollten sie jedoch durch eine andere Methode ergänzt bzw. bestätigt werden (Virusisolation, PCR).

■ ■ Molekulare Nachweismethoden

Der HSV-DNA-Nachweis mittels PCR ist in Materialien aus dem oberen Respirationstrakt wegen asymptomatischer Reaktivierungen gelegentlich auch bei Gesunden positiv; deshalb ist diese Vorgehensweise für die Diagnose einer HSV-Pneumonie bzw. -Tracheobronchitis ungeeignet. Da BAL-Flüssigkeit (und andere Materialien aus dem unteren Respirationstrakt) oft durch den oberen Respirationstrakt verunreinigt sind, sind auch diese HSV-DNA-Nachweise schwierig zu bewerten. Der Nachweis von höheren HSV-DNA-Konzentrationen in einer BAL-Flüssigkeit als in einem parallel abgenommenen Rachenspülwasser kann für die Diagnose einer HSV-Pneumonie wegweisend sein (semi-quantitative real time PCR). Bei Herpes neonatorum können hohe HSV-DNA-Konzentrationen im peripheren Blut nachgewiesen werden.

■ ■ Virusisolation

Die HSV-Isolation ist auf vielen Zelllinien möglich (u.a. humane diploide Fibroblasten) und gelingt relativ schnell (2–3 Tage). Trotzdem wird sie heute meist nur als Ergänzung oder Bestätigung des Antigennachweises bzw. HSV-DNA-Nachweises eingesetzt. BAL-Flüssigkeit kann durch HSV aus dem Oropharynx kontaminiert sein.

■ ■ Serologische Nachweismethoden

Der Nachweis einer HSV-Serokonversion (IgM und IgG im ELISA) kann für die Diagnostik der HSV-Erstinfektion genutzt werden. Der Nachweis von HSV-IgG dient dem Nachweis der durchgemachten Erstinfektion (Gefahr von Reaktivierungen, ggf. Nestschutz durch Leihütter der Mutter).

Literatur

- Neumeister B, Geiss HK, Braun R, Kimmig P (Hrsg). Mikrobiologische Diagnostik, 2. Aufl. Thieme-Verlag, Stuttgart 2009
- Versalovic J et al. (ed). Manual of Clinical Microbiology, 10. Aufl. American Society for Microbiology 2011
- Suerbaum S, Hahn H, Burchhard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF (Hrsg) Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie, 6. Aufl. Springer Verlag, Heidelberg 2012
- Doerr HW, Gerlich WH (Hrsg) Medizinische Virologie, 2. Aufl. Thieme Verlag, Stuttgart 2010