

Diagnosis of atypical pneumonia caused by *Legionella longbeachae* after applying cell-free bacterial DNA technology to whole blood samples – an interesting case

M. Hegner¹ · A. Rieke² · S. Grumaz³ · C. Disqué³ · S.G. Sakka¹

► **Zitierweise:** Hegner M, Rieke A, Grumaz S, Disqué C, Sakka SG: Diagnose einer atypischen Lungentzündung durch *Legionella longbeachae* mit Hilfe der zellfreien bakteriellen DNA-Technologie aus Vollblut – Ein interessanter Fall. *Anästh Intensivmed* 2024;65:213–217. DOI: 10.19224/ai2024.213

Diagnose einer atypischen Lungentzündung durch *Legionella longbeachae* mit Hilfe der zellfreien bakteriellen DNA-Technologie aus Vollblut – Ein interessanter Fall

- 1 Klinik für Intensivmedizin, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Kemperhof Koblenz, Akademisches Lehrkrankenhaus der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Chefarzt: Prof. Dr. S.G. Sakka)
- 2 Klinik für Nephrologie und Infektiologie, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Kemperhof Koblenz, Akademisches Lehrkrankenhaus der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Chefarzt: Dr. A. Rieke)
- 3 Fa. Noscendo GmbH, Duisburg

Ethische Aspekte

Wir haben die schriftliche Zustimmung der Ehefrau des Patienten als gesetzlich definierte Person zur Veröffentlichung dieses Berichts nach Depersonalisierung der Daten erhalten. Für die Studie „Next Generation Sequencing als modernes Verfahren im Vergleich zur Blutkultur in der mikrobiologischen Diagnostik von Patienten mit einer Sepsis“ liegt ein positives Votum der Ethikkommission der Landesärztekammer Rheinland-Pfalz vor (Antragsnummer: 2022–16700).

Interessenkonflikt

Dr. Grumaz ist Mitbegründer, Mitarbeiter und Gesellschafter der Fa. Noscendo GmbH. Dr. Disqué ist ein Mitarbeiter der Fa. Noscendo GmbH. Die anderen Autorinnen und Autoren haben keine Interessenkonflikte.

Schlüsselwörter

Sepsis – Pneumonie –
Mikrobiologische Diagnostik –
Next-Generation-Sequencing
– Zellfreie DNA-Sequenzierung

Keywords

Sepsis – Pneumonia –
Microbiological Diagnostics
– Cell-free DNA Sequencing –
Next Generation Sequencing
– Metagenomics

Zusammenfassung

Die adäquate Behandlung von Infektionen bei kritisch kranken Patienten erfordert die Kenntnis des verursachenden Erregers. Die Diagnose und Behandlung von Infektionen stellen nach wie vor eine große Herausforderung dar, insbesondere auf der Intensivstation. Je schneller der Erreger identifiziert und adäquat behandelt wird, desto besser ist die Prognose für den Patienten. Moderne Methoden wie die zellfreie DNA-Sequenzierung (Next Generation Sequencing, NGS) aus Vollblutproben können in der frühen Erregerdiagnostik zusätzlich zum Goldstandard der Blutkulturdiagnostik eingesetzt werden. Wir berichten über einen 72-jährigen Patienten, bei dem durch das NGS-Verfahren aus Vollblut der Nachweis von *Legionella longbeachae* gelang, der klinisch für eine atypische Pneumonie verantwortlich gemacht wurde. Eine Urinuntersuchung, die nur *Legionella pneumophila* (Serogruppe 1) erfasst, blieb negativ. Die anhand des NGS-Ergebnisses eingeleitete antiinfektive Therapie mit Moxifloxacin führte zu einer raschen Verbesserung der respiratorischen Funktion und zu einem Rückgang der biochemischen Infektionsparameter. Der Fall zeigt, dass moderne Methoden bei negativer Blutkulturdiagnostik einen positiven Erregernachweis erbringen können, der bei der Entscheidungsfindung über chirurgische Maßnahmen oder Änderungen des antiinfektiven Therapieregimes hilfreich sein kann.

Summary

Adequate treatment of infections in the critically ill patient requires knowledge of the causative pathogen. However, the diagnosis and treatment of infections remains a major challenge, especially in the intensive care unit. The faster the pathogen is identified and adequately treated, the better the prognosis for the patient. Modern methods such as cell-free DNA sequencing from whole blood samples (Next Generation Sequencing, NGS) may be used in the early pathogen diagnosis in addition to blood culture diagnostics as a gold-standard. Here, we report of a 72-year-old male patient with a NGS-only finding of *Legionella longbeachae* which was clinically considered to be responsible for atypical pneumonia. As urine testing which is only able to verify *Legionella pneumophila* (Serogroup 1) remained negative, even suspected legionellosis would not have been detectable. Subsequently established anti-infective therapy with moxifloxacin was associated with a rapid improvement in respiratory function and a decrease in infection parameters. The case shows that despite negative blood culture diagnostics modern methods can enable a positive pathogen detection that helps to guide decision-making with respect to surgical measures or changes in the regime of anti-infective therapy.

Einleitung

Bis heute ist die Blutkultur der Goldstandard in der Diagnose von Patienten mit einer Sepsis [1–3]. In jüngster Vergangenheit wurden allerdings Alternativen entwickelt, die eine frühere Erregeridentifizierung mit wahrscheinlich höherer Empfindlichkeit und sogar für Mikroorganismen mit fehlender oder reduzierter Vitalität ermöglichen. Seit kurzem ist die zellfreie DNA-Sequenzierung (**Next Generation Sequencing**, NGS) aus Vollblutproben klinisch verfügbar. Erste klinische Daten zu diesem Verfahren lieferten vielversprechende Ergebnisse [4]. In unserem Fall wurde eine durch *Legionella longbeachae* verursachte Pneumonie nur mit dieser Technik diagnostiziert, während die klassischen mikrobiologischen Kulturen aus dem Vollblut und der bronchoalveolären Lavage (BAL) und der Urin-Antigentest auf *Legionella pneumophila* negativ blieben.

Fallbericht

Ein 72-jähriger Mann in leicht reduziertem Allgemeinzustand wurde aufgrund von Abgeschlagenheit, Fieber und einem seit sechs Tagen bestehenden Durchfall (Stuhlfrequenz 5–10/Tag) von seinem Hausarzt in unser Krankenhaus eingewiesen. Er war weder im Ausland gewesen noch hatte ein anderes Familienmitglied ähnliche Symptome.

Bei der Aufnahme war der Patient wach, orientiert und ohne neurologische Ausfälle. Die Auskultation der Lunge ergab keine Rasselgeräusche, es bestanden keine respiratorischen Symptome. Das Abdomen war weich, nicht gebläht und ohne Druckschmerz oder Abwehrspannung. Es lagen rege Darmgeräusche über allen vier Quadranten vor, die Nieren waren frei von Klopfeschmerz, die Extremitäten ohne Ödeme oder Hauteffloreszenzen. Die Vitalparameter waren stabil (RR 152/85 mmHg, Herzfrequenz 102/min, Atemfrequenz 14/min). Die pulsoxymetrisch gemessene Sauerstoffsättigung unter Raumluft betrug 96 %, die Körpertemperatur 38,5 °C. Es bestanden Zeichen einer Exsikkose im Sinne eines

reduzierten Hautturgors sowie trockener Schleimhäute. Die laborchemische Untersuchung erbrachte ein Kalium von 3,2 mmol/l, Natrium 130 mmol/l, Chlorid 96 mmol/l und eine Leukozytenzahl von 11,4/nl. C-reaktives Protein (31,2 mg/dl) und Procalcitonin (0,68 ng/ml) waren erhöht. Kreatinin (0,98 mg/dl) und Bilirubin (0,91 mg/dl) waren normal. Die Abdomensonographie und das 12-Kanal-EKG waren ohne Pathologie.

Nach Verabreichung von kristalliner Flüssigkeit und Paracetamol wurde der Patient auf der internistischen Normalstation aufgenommen. Das behandelnde Personal initiierte eine Therapie mit Ampicillin/Sulbactam bei Infekt mit noch unklarem Fokus. Die bei Aufnahme entnommenen Stuhlproben zeigten sich im Verlauf negativ auf *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Vibrio spp.* sowie auf *C. difficile* und Norovirus. Blut- und Urinkulturen, die vor Beginn der antiinfektiven Behandlung entnommen worden waren, blieben negativ. Da sich der respiratorische Zustand rasch verschlechterte, wurde eine Behandlung mit Sauerstoff und Bronchodilatoren eingeleitet. Am dritten Tag wurde in einem Röntgenbild und bei einer anschließend durchgeführten Computertomographie von Thorax und Abdomen eine Pneumonie des rechten Ober- und Mittellappens mit Beteiligung des apikalen Unterlappens mit teils netzartigen, teils konsolidierten Bereichen festgestellt. Außerdem wurden ein Pleuraerguss und vergrößerte

mediastinale Lymphknoten beschrieben (Abb. 1). Ein weiterer Infektfokus konnte im Rahmen der Computertomographie nicht detektiert werden. Da die laborchemischen Infektparameter unter den bisherigen Maßnahmen weiter anstiegen, wurde die Behandlung auf Piperacillin/Tazobactam eskaliert. Zusätzlich wurde die Therapie um die Gabe von Clarithromycin erweitert, um Erreger einer atypischen Pneumonie zu berücksichtigen. Der Nachweis des Legionella-Antigens im Urin (Roche Diagnostics) war negativ. Eine Untersuchung von (induziertem) Sputum oder eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) erfolgten zu diesem Zeitpunkt nicht.

Trotz Wechsel des antiinfektiven Regimes verschlechterte sich der klinische Zustand des Patienten zunehmend. Bei progredienter respiratorischer Insuffizienz musste der Patient an Tag sieben nach Krankenhausaufnahme auf die Intensivstation verlegt werden. Bei Übernahme erfolgte zunächst die Etablierung eines erweiterten hämodynamischen Monitorings, in diesem Rahmen erfolgte die erneute Entnahme von Blutkulturen (zwei Pärchen, Analytik im MVZ Labor Koblenz, Koblenz). Die respiratorische Insuffizienz erforderte den zügigen Einsatz einer nichtinvasiven Unterstützung in Form einer CPAP-Anwendung über Maske (**continuous positive airway pressure**). Bei fehlendem Ansprechen auf diese Therapie wurde im weiteren Verlauf rasch die endotracheale Intubation und kontrollierte Beatmung notwendig.

Abbildung 1



Computertomographie an Tag 3 nach Krankenhausaufnahme.

Nach Sicherung der Atemwege wurde eine Bronchoskopie mit BAL durchgeführt. Leider gelang weder die kulturelle Anzucht pathogener Erreger noch der molekularbiologische Nachweis von atypischen Pneumonieerregern mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Fa. Seegene, Düsseldorf; Allplex™ Respiratory Panel 4, Allplex™ Respiratory Panel 2). Wir wiederholten den Urintest auf Legionella-Antigen und untersuchten den Patienten auf eine erworbene Immunschwäche (HIV). Aufgrund des nun schweren akuten Atemnotsyndroms war die intermittierende Beatmung in Bauchlage notwendig. Eine hochdosierte Therapie mit Vasopressoren (Noradrenalin, Argipressin) sowie eine kontinuierliche Nierenersatztherapie waren erforderlich. Die Röntgenaufnahme des Thorax am 12. Tag zeigte fortschreitende rechtsseitige Lungeninfiltrate sowie neue infiltrative Veränderungen im linken Mittel- und Oberfeld ohne signifikante Lungenstauung (Abb. 2).

Aufgrund des ausbleibenden klinischen und laborchemischen Ansprechens entnahmen wir erneut mikrobiologische Proben (BAL, Urin, Vollblut) und erweiterten die kulturelle Diagnostik um die NGS-Testung aus Vollblut (Fa. Noscendo GmbH, Duisburg). Wir eskalierten die antiinfektive Therapie von Piperacillin/Tazobactam auf Meropenem (6 g i. v.

über 24 Stunden) und ergänzten Voriconazol. Meropenem wurde unter Nierenersatztherapie kontinuierlich unter täglichem therapeutischem Drug-Monitoring (TDM) verabreicht. Während des gesamten Behandlungszeitraums blieben alle konventionellen mikrobiologischen Proben negativ.

Wie zuvor erwähnt, wurden eine Blutkulturdiagnostik (2 Pärchen) und eine molekularbiologische Untersuchung (Vollblutprobe) mittels Next Generation Sequencing mit der CE-IVD-Plattform DISQVER® (Fa. Noscendo GmbH, Duisburg) durchgeführt. An Tag 7 nach der Aufnahme auf der Intensivstation wurde mittels NGS Legionella longbeachae nachgewiesen. Es erfolgte eine umgehende Umstellung der antiinfektiven Therapie mit einem Wechsel von Clarithromycin zu Moxifloxacin (400 mg/d i. v.). Passend zu diesem Befund berichteten die Angehörigen des Patienten, dass dieser einige Tage vor Krankenhausaufnahme im Garten gearbeitet habe. Hier habe er unter anderem in einer Regenwasserzisterne stehend diese mit einem Dampfstrahler gereinigt. Nach Wechsel des antiinfektiven Regimes verbesserte sich der Zustand des Patienten stetig. Die Invasivität der Beatmung konnte rasch reduziert werden, eine Beatmung in Bauchlage war nicht länger erforderlich. Für die Entwöhnung

von der Beatmung erfolgte die Durchführung einer Tracheotomie. Es gelang schließlich, den Patienten erfolgreich vom Beatmungsgerät zu entwöhnen. Die Vasopressor- und Nierenersatztherapie konnten ebenfalls beendet werden. Die Entzündungsparameter fielen und die Verabreichung des Fluorchinolons konnte nach 14 Tagen beendet werden (Abb. 3).

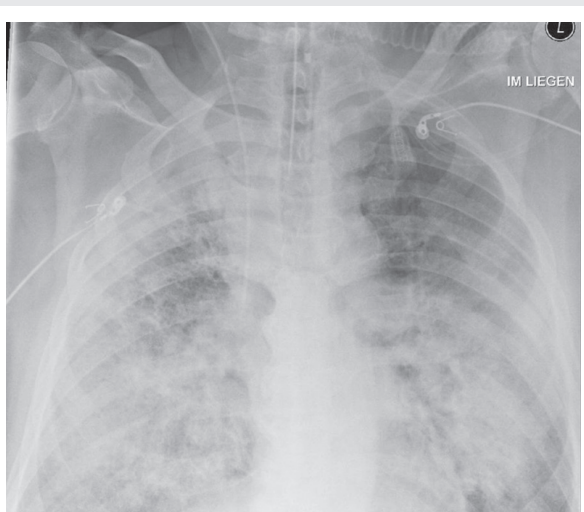
Der weitere Krankenhausaufenthalt zeigte sich leider prolongiert, da der Patient im Verlauf eine ventilatorassoziierte Pneumonie durch einen 4 MRGN *Pseudomonas aeruginosa* entwickelte. Trotz dieser Komplikation konnte der Patient an Tag 74 nach der Krankenseinweisung in eine Rehabilitationseinrichtung entlassen werden.

Diskussion

Infektionen sind ein anhaltendes Problem bei Patienten auf der Intensivstation und bekanntermaßen mit einer erhöhten Sterblichkeit verbunden [5]. Diese potenziell lebensbedrohliche Situation erfordert eine rasche mikrobiologische Diagnostik und gezielte Maßnahmen mit systemischer Antibiotikatherapie und chirurgische oder interventionelle Maßnahmen zur Fokussanierung [3]. Die schnelle Identifizierung des Infektionsherdes und des verursachenden Erregers ist von größter Bedeutung [6].

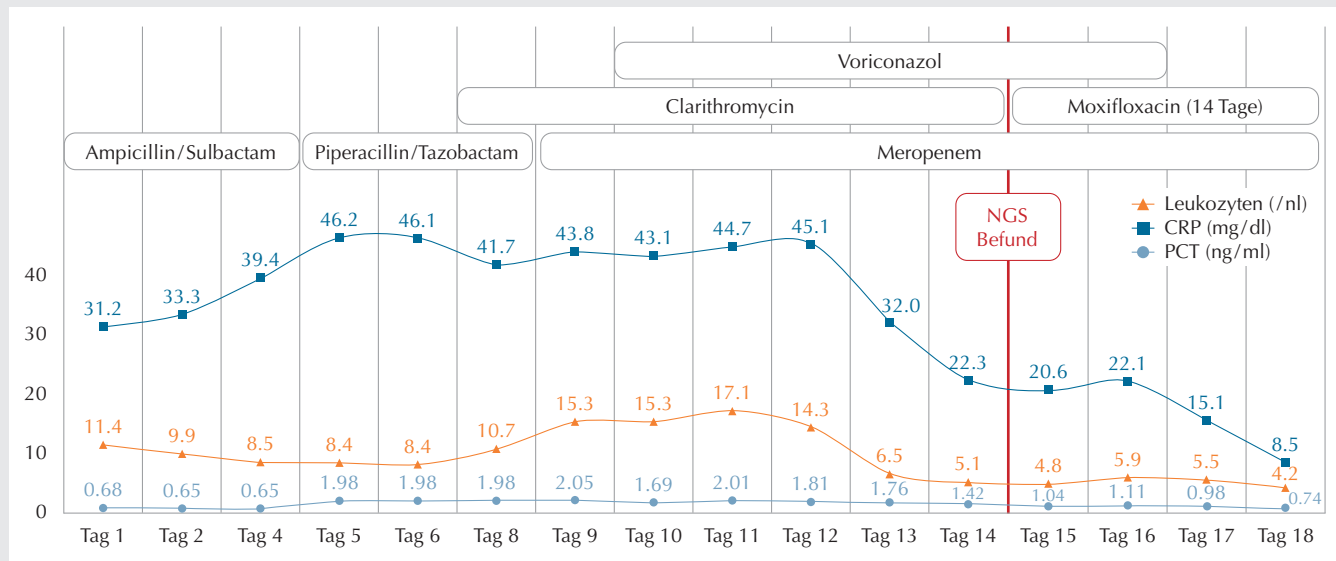
In unserem Fall wurde eine *Legionella longbeachae*-Spezies (Serogruppe 2) mit Hilfe der modernen molekularbiologischen Diagnosemethode des NGS im Vollblut nachgewiesen. Die Blutkulturen blieben negativ, ebenso wie die mehrfach durchgeführten Urinuntersuchungen auf Legionella-Antigen sowie diverse Multiplex-PCRs aus BALs. Vor allem *Legionella pneumophila* (Serogruppe 1) ist für ca. 70 % der Infektionen mit Legionellen spp. verantwortlich. Zum Nachweis einer Legionelleninfektion ist die Urinuntersuchung auf Legionella-Antigen im Urin in unserer Klinik derzeit Stand der Technik. Der Nachweis des Legionella-Antigen im Urin ist allerdings nur in der Lage, Infektionen mit *Legionella pneumophila* der Serogruppe 1 zu detektieren. Bei dem klinischen

Abbildung 2



Thorax-Röntgenaufnahme an Tag 12 nach Krankenhausaufnahme.

Abbildung 3



Antiinfektive Behandlung und Entzündungsparameter während des Verlaufs.

CRP: C-reaktives Protein; PCT: Procalcitonin; NGS: Next Generation Sequencing.

Verdacht auf eine Infektion mit *Legionella* spp. müssen aufgrund der oben genannten Einschränkungen neben dem Urin-Antigentest auch andere diagnostische Verfahren wie die oben genannte molekulardiagnostische Diagnostik aus respiratorischen Materialien zur Anwendung kommen.

Bei unserem Patienten konnte durch das NGS-Verfahren eine diagnostische Lücke geschlossen werden. Eine an die NGS-Befunde angepasste antiinfektive Behandlung führte zu einer raschen klinischen Besserung.

Bei dieser modernen Diagnosemethode handelt es sich um eine softwarebasierte Analyse von NGS-Daten, die auf der DNA-Sequenzierung von zellfreier DNA im Plasma, wofür eine Vollblutprobe (2–5 ml) erforderlich ist, basiert. Dabei werden die Sequenzierdaten durch Software-Analysen in Bezug auf mikrobielle Sequenzen überprüft und diese dann relevanzbewertet. DISQVER® von Noscendo umfasst eine bereinigte mikrobielle Genomdatenbank mit über 16.000 mikrobiellen Spezies, die mehr als 1.500 Krankheitserreger erfasst und Bakterien, DNA-Viren, Pilze und Parasiten hypothesenfrei in einem einzigen Assay nachweisen kann [4].

Obwohl die derzeitige Datenlage zu NGS keine eindeutigen Schlussfolgerungen zulässt, kann es aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze beispielsweise in Situationen eingesetzt werden, in denen die herkömmlichen Untersuchungen wie Blutkulturdiagnostik oder molekulargenetische Untersuchungen mit all ihren Einschränkungen negativ bleiben. Auch bei Patienten mit fehlenden klinischen Anzeichen einer systemischen Infektion (z. B. bei immundefizienten oder hämato-onkologischen Patienten) kann dieses Verfahren einen diagnostischen Vorteil bieten. Aktuelle Daten zu diesem Verfahren deuten darauf hin, dass neben der klassischen Blutkulturdiagnostik zusätzliche Ergebnisse gefunden werden können [1,7,8]. Ähnlich wie in unserem Fall konnte der Nutzen des NGS-Verfahrens unter anderem bei einem 11 Tage alten Neugeborenen mit einem Nachweis von *Legionella feeleii* aufgezeigt werden [9].

Ob der Einsatz des NGS-Verfahrens einen positiven Einfluss auf das Outcome der Patienten nimmt, konnte aufgrund der noch zu begrenzten Patientenzahl bislang nicht nachgewiesen werden. Im eigenen Fall wurde bei negativer Blutkulturdiagnostik aufgrund des Er-

gebnisses dieser modernen Methode ein Wechsel des antiinfektiven Regimes eingeleitet. Es muss erwähnt werden, dass neben den potenziellen Vorteilen des NGS-Verfahrens die niedrige Nachweisgrenze und Empfindlichkeit des Verfahrens eine gewisse Einschränkung mit sich bringen. So kann beispielsweise der Nachweis von viralen Sequenzen zu einer schwierigen Interpretation der Ergebnisse führen. Eine wesentliche Einschränkung von NGS ist das Fehlen eines Antibiotogramms. Hier gibt es allerdings erste Ansätze, die Diagnostik auch diesbezüglich zu erweitern. Generell sind größere prospektive klinische Interventionsstudien erforderlich, um den Stellenwert von NGS bei kritisch kranken Patienten zu bewerten.

Zusammenfassung

Eine schnelle mikrobiologische Diagnose und eine angemessene antiinfektive Therapie sind für die Prognose kritischkranker Patienten entscheidend. Moderne Techniken wie die Sequenzierung zellfreier DNA mittels Next Generation Sequencing können bei der Auswahl der Antiinfektiva-Strategie hilfreich sein.

Wissenschaftliche Präsentation

Der Inhalt dieses Fallberichtes wurde von Herrn Dr. Hegner als Poster auf dem European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases in Kopenhagen (15.–18.04.2023) präsentiert.

Danksagung

Wir danken Herrn Dirk Schmidt, MVZ Koblenz, für die Bereitstellung von Details zum Legionellen-Testkit.

Unser Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Klaus Schunk, Leiter des Instituts für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein, Kemperhof, für die Erlaubnis, die Röntgen- und CT-Bilder verwenden zu dürfen.

Literatur

1. Grumaz S, Grumaz C, Vainshtein Y, Stevens P, Glanz K, Decker SO, et al: Enhanced performance of next-generation sequencing diagnostics compared with standard of care microbiological diagnostics in patients suffering from septic shock. *Crit Care Med* 2019;47:e394–e402
2. Kharkavyi Y, Ziegler S, Grumaz S, Disqué C, Sakka SG: Microbiological diagnostics of sepsis based on cell-free bacterial DNA technology – clinical implications. *Anästh Intensivmed* 2022;63:434–438
3. Evans L, Rhodes A, Alhazzani W, Antonelli M, Coopersmith CM, French C, et al: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock 2021. *Intensive Care Med* 2021;47:1181–1247
4. Grumaz S, Stevens P, Grumaz C, Decker SO, Weigand MA, Hofer S, et al: Next-generation sequencing diagnostics of bacteremia in septic patients. *Genome Med* 2016;8:73
5. Vincent JL, Sakr Y, Singer M, Martin-Loeches I, Machado FR, Marshall JC, et al: Prevalence and Outcomes of Infection Among Patients in Intensive Care Units in 2017. The EPIC III Investigators. *JAMA* 2020;323:1478–1487
6. Kumar A, Roberts D, Wood KE, Light B, Parrillo JE, Sharma S, et al: Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit Care Med* 2006;34:1589–1596
7. Ren D, Ren C, Yao R, Zhang L, Liang X, Li G, et al: The microbiological diagnostic performance of metagenomic next-generation sequencing in patients with sepsis. *BMC Infect Dis* 2021;21:1257
8. Qin C, Zhang S, Zhao Y, Ding X, Yang F, Zhao Y: Diagnostic value of metagenomic next-generation sequencing in sepsis and bloodstream infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2023;13:1117987
9. West PT, Brooks EF, Costales C, Moreno A, Jensen TD, Budvytiene I, et al: Near-fatal Legionella pneumonia in a neonate linked to home humidifier by metagenomic next generation sequencing. *J Med* 2022;3:565–567.

Korrespondenz- adresse



Dr. med. Marius Hegner

Klinik für Intensivmedizin
Klinik für Anästhesie, Notfall- und
Schmerzmedizin
Gemeinschaftsklinikum Mittelrhein
Kemperhof Koblenz
Akademisches Lehrkrankenhaus der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz
Koblenzer Straße 115–155
56073 Koblenz, Deutschland
Tel.: 0261 499-1507
Fax: 0261 499-2200
E-Mail: marius.hegner@gk.de
ORCID-ID: 0009-0008-4324-0377