

Technische Universität München
Fakultät für Medizin

**Bedeutung der Aciclovir-Therapie bei Patient*innen
mit beatmungs-assoziiertes Pneumonie und
respiratorischem HSV-1/-2 Nachweis**

Lukas Raphael Schuierer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Medizin**
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Lars Mägdefessel

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Reinhard Hoffmann
2. Prof. Dr. Andreas Pichlmair, Ph.D.

Die Dissertation wurde am 03.08.2021 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät für Medizin am 04.01.2022 angenommen.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Schuieler, L., Gebhard, M., Ruf, H. G., Jaschinski, U., Berghaus, T. M., Wittmann, M., Braun, G., Busch, D. H., & Hoffmann, R. (2020). Impact of acyclovir use on survival of patients with ventilator-associated pneumonia and high load herpes simplex virus replication. *Crit Care*, 24(1), 12. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-019-2701-5>

Hagel, S., Scherag, A., Schuieler, L., Hoffmann, R., Luyt, C. E., Pletz, M. W., Kesselmeier, M., & Weis, S. (2020). Effect of antiviral therapy on the outcomes of mechanically ventilated patients with herpes simplex virus detected in the respiratory tract: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 24(1), 584. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-020-03296-5>

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	6
Abkürzungsverzeichnis.....	7
1 Einleitung	8
1.1 Prävalenz und klinische Bedeutung von Herpes-Simplex-Virus 1 und 2	8
1.2 Nachweise von Herpes-Simplex-Virus 1 und 2 postmortal und in vivo.....	10
1.3 Virusreaktivierung aus dem Latenz-Stadium	13
1.4 Invasive Beatmung als Auslöser einer Virusreaktivierung und Pneumonie.....	14
1.5 Antivirale Therapie mit Aciclovir	17
1.6 Forschungsfrage	17
2 Methoden.....	19
2.1 Studiendesign	19
2.2 Ethikvotum	19
2.3 Studienpopulation	19
2.3.1 Erfassung aller HSV-1/-2-Testungen bei Intensivpatient*innen.....	19
2.3.2 Einschlusskriterien	19
2.3.3 Ausschlusskriterien	19
2.4 Interventionen	20
2.4.1 Erregersuche und molekularbiologische Testung auf HSV-1 und HSV-2.....	20
2.4.2 Intravenöse Aciclovir-Therapie.....	22
2.5 Definition Tag 0 und der Analysezeitpunkte	23
2.6 Erfasste klinische Parameter	24
2.6.1 Baseline-Parameter	24
2.6.2 Labor-Parameter.....	25
2.6.3 Täglich erhobene Parameter Tag -4 bis +14	25
2.7 Berechnung klinischer Scores	27
2.7.1 Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score.....	28
2.7.2 Lung Injury Score	29
2.7.3 Simplified Clinical Pulmonary Infection Score.....	29
2.7.4 Sequential Organ Failure Assessment Score	30
2.8 Analyse der radiologischen Lungenaufnahmen.....	30
2.8.1 Radiologischer Lungenstatus zum Zeitpunkt des HSV-Nachweises	30
2.8.2 Radiologische Aufnahmen im Verlauf bei hoher Viruslast.....	30
2.9 Klinische Endpunkte	31
2.10 Statistische Auswertung.....	31
2.10.1 Statistiksoftware R	31

2.10.2	<i>Einteilung in Subgruppen</i>	32
2.10.3	<i>Deskriptive Statistik</i>	32
2.10.4	<i>Überlebenszeitanalyse</i>	32
2.10.5	<i>Subgruppenanalyse mit Viruslast-Grenzwerten bei 10^4, 10^5 und 10^6 HSV-Kopien</i>	33
2.10.6	<i>Klinische Parameter im longitudinalen Verlauf</i>	33
2.10.7	<i>Auswertung der radiologischen Veränderungen</i>	33
3	Ergebnisse	34
3.1	Patientenauswahl und Erregersuche	34
3.2	Quantitative HSV-1/-2-Nachweise	35
3.2.1	<i>HSV-Viruslast im Zeitverlauf</i>	35
3.2.2	<i>HSV-Viruslast nach Materialart</i>	38
3.2.3	<i>HSV-Viruslast in zeitlicher Relation zum Infiltratnachweis</i>	38
3.3	Demographische und klinische Patientencharakteristika	39
3.4	Aciclovir-Therapie und Intensivstations-Sterblichkeit	45
3.4.1	<i>Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier</i>	45
3.4.2	<i>Multivariable Cox-Regressionsanalyse</i>	47
3.4.3	<i>Weitere Cox-Regressionsmodelle mit Einbeziehung eines Propensity Scores</i>	49
3.5	Überlebenszeitanalysen mit Grenzwerten bei 10^4 , 10^5 und 10^6 HSV-Kopien	51
3.6	Klinische Parameter im Verlauf	54
3.7	Radiologische Befunde im Verlauf	56
3.8	Einfluss einer zusätzlichen CMV-Reaktivierung auf die Intensivstations-Sterblichkeit	57
4	Diskussion	59
4.1	Inzidenz einer HSV-1/-2-Reaktivierung	59
4.2	Algorithmus einer Aciclovir-Therapie bei HSV-1/-2-Reaktivierung	60
4.3	Rolle von Aciclovir bei einer HSV-1/-2-Reaktivierung und Pneumonie	62
4.4	Effekt einer Aciclovir-Therapie auf das Überleben	63
4.5	Limitationen	64
4.1	Stärken der Forschungsarbeit	68
4.2	Zusammenfassung der Hauptergebnisse	70
	Zusammenfassung	71
	Ausblick	72
	Anhang	74
	Literaturverzeichnis	75
	Danksagung	88

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Definition des Tag 0 (d0) und der Erhebungszeitpunkte der Studie	23
Abbildung 2 Handschriftliche Dokumentation exemplarisch zu einem Studienzeitpunkt.....	25
Abbildung 3 Programmierte Eingabemaske zur tageweisen Werteingabe.....	26
Abbildung 4 Scoreberechnung APACHE II.....	28
Abbildung 5 Scoreberechnung LIS	29
Abbildung 6 Scoreberechnung simplyfied CPIS	29
Abbildung 7 Scoreberechnung SOFA.....	30
Abbildung 8 Diagramm zum Ein- & Ausschluss von Studienpatient*innen, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	34
Abbildung 9 Chronologische Darstellung der HSV-Viruslast vom 1.1.2013 bis 1.4.2018.....	36
Abbildung 10 Entwicklung der HSV-1 Viruslast in Verlaufsuntersuchungen	37
Abbildung 11 Einfluss der Materialart auf die HSV-Viruslast, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	38
Abbildung 12 Viruslast in zeitlicher Relation zum Infiltratnachweis, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020).....	39
Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurven der Intensivstations-Überlebenszeit, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	46
Abbildung 14 Cox-Regressionsmodelle der Intensivstations-Sterblichkeit, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	48
Abbildung 15 Variation der Kaplan-Meier Kurven in Abhängigkeit vom Viruslast-Grenzwert.....	51
Abbildung 16 Verschiedene Cox-Regressionsanalysen in Abhängigkeit vom Viruslast-Grenzwert.....	53
Abbildung 17 Klinische Parameter der Subgruppen im 7-Tages-Verlauf, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020).....	55
Abbildung 18 Radiologischer Verlauf bei hoher Viruslast, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	56
Abbildung 19 Radiologischer Komponente des LIS Scores im Zeitverlauf, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	57
Abbildung 20 Intensivstation-Überleben bei paralleler CMV-Reaktivierung, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020):...	58
Abbildung 21 Therapeutisches Vorgehen bei CMV- bzw. HSV-Reaktivierung, nach (Forel <i>et al.</i> 2014)	60
Abbildung 22 Therapeutisches Vorgehen bei pulmonaler HSV-Reaktivierung, nach (Wang & He 2020).....	61

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Auswahl der Baseline-Parameter.....	24
Tabelle 2 Auswahl der Labor-Parameter	25
Tabelle 3 Auswahl der klinischen Verlaufs-Parameter	26
Tabelle 4 Demographische und klinische Parameter zum Baseline-Zeitpunkt (d0)	41
Tabelle 5 Diverse Cox-Regressionen für einen Tod auf Intensivstation, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020).....	50
Tabelle 6 Bakteriologische Ergebnisse aus respiratorischem Material, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)	74
Tabelle 7 Antibiotika Klassen während des Aufenthaltes auf Intensivstation, nach (Schuierer <i>et al.</i> 2020)...	74

Abkürzungsverzeichnis

95%-KI.....	95%-Konfidenzintervall
AaDO ₂	Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz
AID.....	Firma Autoimmun Diagnostika
APACHE II.....	Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score
ARDS.....	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL.....	Bronchoalveoläre Lavage
CMV.....	Zytomegalie-Virus
COVID-19	Coronavirus-Krankheit-2019
CRP	C-reaktives Protein
d0.....	Tag 0
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECMO.....	Extrakorporale Membranoxygenierung
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
HHV-6.....	Humanes Herpesvirus 6
hMPV.....	humanes Metapneumovirus
HR	Hazard Ratio
HSV-1	Herpes-Simplex-Virus Typ 1
HSV-2.....	Herpes-Simplex-Virus Typ 2
i.v.	intravenös
IMC.....	Intermediate Care - Station
LAT	Latency Associated Transcript
LIS	Lung Injury Score
MAP.....	Mean Arterial Pressure/ Mittlerer Arterieller Druck
NaCl.....	Natriumchlorid
NGS.....	Next Generation Sequencing
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxid-Partialdruck
PaO ₂	Arterieller Sauerstoff-Partialdruck
PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
RSV	Respiratorisches Syncytial Virus
s. Abb.	siehe Abbildung
sCPIS	simplified Clinical Pulmonary Infection Score
SOFA.....	Sequential Organ Failure Assessment Score
TBS.....	Tracheobronchialsekret
TNAI	Total Nucleic Acid Isolation Kit
TTV.....	Torque-Teno-Virus
VBA	Visual Basic for Applications
vs.....	versus
VZV.....	Varizella-Zoster-Virus
WHO.....	Weltgesundheitsorganisation

1 Einleitung

1.1 Prävalenz und klinische Bedeutung von Herpes-Simplex-Virus 1 und 2

Vertreter der humanen Alpha-Herpesviren

Das Herpes-Simplex-DNA-Virus Typ 1 (HSV-1) und 2 (HSV-2) gehört zusammen mit dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) zu den humanen Alpha-Herpesviren. Klinisch manifestiert sich eine HSV-1 Infektion insbesondere an der Mundschleimhaut als Herpes labialis, am Auge als Herpes corneae, eine HSV-2-Infektion meist an den Geschlechtsorganen als Herpes genitalis. (Banerjee *et al.* 2020)

Ko-Infektionen von HSV-1 und HSV-2 führten zu Interspezies-Rekombination der evolutionär unabhängig entstandenen Viren mit einer geringen gesamtgenomischen Variabilität (maximale Abweichung 1,1 bzw. 0,4 Prozent) und bedürfen beim klinischen Auftreten besonderer Aufmerksamkeit (Burrell *et al.* 2017).

Krankheitsmanifestationen

Anhand der Haupt-Manifestationen (labial bzw. genital) wird ein unterschiedlicher Gewebetropismus von HSV-1 bzw. HSV-2 deutlich. Beschrieben wurde auch ein zellulärer Tropismus: Aufgrund multipler Invasionsmechanismen infiziert HSV neben Lymphozyten, Epithelzellen, Fibroblasten auch Neuronen und kann zu schwerwiegenden Krankheitsbildern wie einer Enzephalitis, Meningitis oder Erblindung führen (Connolly *et al.* 2011).

Seroprävalenz von Herpes Simplex Virus 1 und 2

Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) waren im Jahr 2016 67 Prozent der Weltbevölkerung unter 50 Jahren mit HSV-1 sowie 13 Prozent im Alter zwischen 15 und 49 Jahren mit HSV-2 infiziert. In Afrika entwickelten die Hälfte aller Frauen zwischen 25 und 34 eine genitale HSV-2-Infektion, die selbst ein Risikofaktor für eine HIV-Ansteckung (Looker *et al.* 2017a) und in der Schwangerschaft ein erhebliches Risiko für das Kind darstellt. (James *et al.* 2020)

Die HSV-1 Seroprävalenz bei Erwachsenen in Deutschland nahm von 82,1 (1997-1999) auf 78,4 Prozent (2008-2011) ab. Auch sank die HSV-2 Seroprävalenz von 13,3 (1997-1999) auf 9,6 Prozent (2008-2011). Aufgrund der abnehmenden Auseinandersetzung mit HSV wurden junge und sexuell aktive Erwachsene für genitale HSV-1/-2-Primärinfektion empfänglicher. Bei Schwangeren stieg dadurch gleichzeitig das Risiko für komplikationsreiche neonatale HSV-Infektionen. (Korr *et al.* 2017)

Während in Europa die mittlere HSV-1 Seroprävalenz von 67 Prozent (Kinder: 33; Erwachsene: 74) jährlich um einen Prozentpunkt abnimmt, verzeichnet die genitale HSV-1 Primärinfektion einen jährlichen Zuwachs um einen Prozentpunkt, wobei HSV-1 bereits für die Hälfte aller genitalen Primärinfektionen verantwortlich ist. (Yousuf *et al.* 2020).

Aufgrund der risikobehafteten neonatalen HSV-Infektionen (Looker *et al.* 2017b) und der globalen Krankheitslast gab es Bestrebungen der WHO, die Impfstoffentwicklung zur Verbesserung der globalen sexuellen und reproduktiven Gesundheit weiter voranzubringen (Gottlieb *et al.* 2019).

Unterschiede in der genetischen Prädisposition

Während die global höheren Prävalenzzahlen bei Frauen eine geschlechtsabhängige Prädisposition vermuten lassen, ist eine geschlechtsunabhängige genetische Prädisposition jedes Einzelnen denkbar. Eine Region auf dem Chromosom 21 wurde mit einem vermehrten Auftreten von labialen HSV-1 Effloreszenzen assoziiert (Hobbs *et al.* 2008; Kriesel *et al.* 2014).

HSV-Pneumonie bei immunsupprimierten Personen

Erstmals wurde das Herpes Simplex Virus im Jahr 1949 aus Lungengewebe eines Verstorbenen mit atypischer Pneumonie mittels Tierversuch nachgewiesen (Morgan & Finland 1949). Die Erstbeschreibung des Krankheitsbildes einer „HSV-Pneumonie“ folgte 1982 anhand von 20 Autopsie-Nachweisen und wurde mit einer Immunsuppression (z.B. bei Verbrennungsoptionen oder Transplantierten) in Verbindung gebracht (Ramsey *et al.* 1982).

HSV-Pneumonien wurden primär im Zusammenhang mit einer Immunsuppression gefunden und mittels PCR, zytopathologischem Effekt und/oder Immunhistochemie nachgewiesen (Luzzati *et al.* 2019): In der bronchoalveolären Lavage (BAL) organtransplantierte Personen ohne künstliche Beatmung war bei 42 Prozent eine HSV-1 Viruslast zwischen 10^3 und 10^7 Kopien/ml und bei insgesamt 24 Prozent eine HSV-1 Pneumonie nachweisbar.

Prävalenz bei immunkompetenten Personen

Ohne vorliegende Immunsuppression konnte HSV-1 bei 22 Prozent der größtenteils intubierten Intensivpatient*innen im Rachenabstrichen und bei 16 Prozent im tiefen respiratorischen Material nachgewiesen werden (Bruynseels *et al.* 2003).

Bei Personen, die mindestens fünf Tage invasiv beatmet wurden, war HSV-1 im Material des unteren Respirationstraktes sogar bei 64 Prozent nachweisbar (Luyt *et al.* 2007).

Im Vergleich zu immunsupprimierten war bei immunkompetenten Personen eine pulmonale HSV-Infektion mit schwereren Grunderkrankungen (signifikant höherer Anteil an invasiver Beatmung und Rauchen) und einem um ca. 20 Jahre höheren Alter (67 Jahre) assoziiert. Zusätzlich gab es schwerere Krankheitsmanifestationen (Bronchospasmus, Leukozytose, erschwertes Weaning) in Verbindung mit längeren Beatmungszeiten, Intensivstations- und Krankenhaus-Verweildauern und einer höheren Letalität. (Schuller *et al.* 1993). Die paradox schwereren HSV-1 Krankheitsmanifestationen bei Immungesunden gegenüber Immunkompromittierten wurden damit erklärt, dass das lokale Immunsystem die Lunge durch eine überschießende Immunantwort selbst schädige. Zudem wurde hinterfragt, ob eine HSV-Tracheobronchitis per se schlechtere klinische Verläufe bedinge oder als Epiphänomen ein Anzeichen einer kränkeren Studienpopulation sei (Schuller 1994).

1.2 Nachweise von Herpes-Simplex-Virus 1 und 2 postmortal und in vivo

Post-mortem-Nachweis von Herpes-Simplex-Virus 1 und 2

Post mortem wurde HSV erstmalig 1949 aus menschlichem Lungengewebe unter Verwendung eines Tiermodells nachgewiesen: Eine intrazerebrale und intraperitoneale Inokulation des suspendierten Lungengewebes führte bei Mäusen zum Tod. In den Hirnzellen dieser Mäuse gelang der Nachweis von nukleären Einschlusskörperchen als Anhalt für Herpesviren. Bestätigt wurde der HSV-Nachweis mittels eines Neutralisationstestes unter Verwendung von Tier- und Humanseren. Aufgrund der hohen Viruslast reichte eine 1:100-Verdünnung einer Suspension des homogenisierten humanen Lungengewebes aus, um bei Mäusen eine Infektion zu induzieren. (Morgan & Finland 1949) Post mortem wurde 1984 bei 20 Verstorbenen HSV mittels folgender Methoden nachgewiesen: Zellkultur (zytopathischer Effekt und Bestätigung mittels Neutralisationstest), Histologie (direkte Immunfloreszenz), Isolation von DNA-Fragmenten (Restriktionsendonuklease, Elektrophorese, Hybridisierung mit spezifischen Sonden und Autoradiographie) (Ramsey *et al.* 1982). Im Zusammenhang mit einer HSV-Pneumonie wurde die PCR erstmals 1990 als Nachweis-Methode von HSV-DNA aufgeführt (Geradts *et al.* 1990). Auch noch knapp 30 Jahre später trug die PCR maßgeblich zur Bestätigung einer pulmonalen HSV-Infektion post mortem bei (Odani *et al.* 2019).

Pathologisch zeigten sich bei der HSV-Pneumonie makroskopisch eine Lungenstauung, ein erhöhtes Lungengewicht und gelbbraune Nekrosen, während mikroskopisch häufig parenchymale Nekrosen, eine interstitielle Pneumonie und eine diffuse Alveolarschädigung nachweisbar waren. Mit großer Ähnlichkeit zu VZV wiesen infizierte Zellen nukleäre Einschlusskörperchen besonders an Nekroserändern auf. Zellkerne der vereinzelt

mehrkernigen Riesenzellen waren typisch geformt und zeigten marginalisiertes Chromatin. Zur Bestätigung wurde ein Anfärben mittels Immunhistochemie oder eine in-situ Hybridisierung empfohlen. (Pritt & Aubry 2017)

Klinische Herpes-Simplex-Virus-1/-2-Nachweise

Im Blut konnten spezifische IgG-Antikörper gegen das Strukturprotein Glykoprotein gG1 von HSV-1 bzw. gG2 von HSV-2 serologisch im Zusammenhang mit einer Herpes genitalis Infektion nachgewiesen und dem jeweiligen Virus-Subtyp HSV-1 oder HSV-2 zugeordnet werden (Ashley *et al.* 1988; Wald & Ashley-Morrow 2002). Aufgrund der hohen Prävalenz und der lebenslangen Persistenz spielen serologische Untersuchungen bei HSV-1 und HSV-2 bei der Diagnostik von Reaktivierungen eine untergeordnete Rolle.

In speziellen Situationen ist HSV-DNA sogar im Blut mittels PCR nachweisbar: Bei Personen mit septischen Schock war in 26 bzw. vier Prozent eine HSV-1 bzw. HSV-2-Virämie molekularbiologisch identifizierbar (Ong *et al.* 2017).

Aus respiratorischem Material – insbesondere des unteren Respirationstraktes in Form einer BAL oder eines Tracheobronchialsekretes (TBS) – ist ein HSV-Nachweis folgendermaßen möglich:

1) Als erste, jedoch zeitaufwendige Methode stand die Viruskultur zur Verfügung, wofür HSV in einer Zellkultur gezüchtet und diese mittels Zytopathologie und Immunfluoreszenz untersucht wurde (van den Brink *et al.* 2004). Diese Methode benötigt 48 Stunden, bis das Untersuchungsergebnis vorliegt. Schnellere Methoden (Shell-Vial-Assays, multiple Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISAs) oder gentechnisch veränderte Zelllinien) liefern ein Ergebnis bereits nach 24 Stunden bei gleicher Sensitivität (Espy *et al.* 2000).

2) Mit der Entwicklung der PCR war ein Virusnachweis aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze auch bei asymptomatisch Infizierten und über einen längeren Zeitraum als mit einer Viruskultur möglich (Cone *et al.* 1991; Kimura *et al.* 1991). Die PCR zeichnete sich durch eine höhere Sensitivität und Nachweisgeschwindigkeit aus (Coyle *et al.* 1999; Ustacelebi 2001). Mittels qualitativer PCR gelang die Differenzierung zwischen HSV-1 DNA und HSV-2 DNA unter Verwendung beschriebener Primer-Sequenzen (Aurelius *et al.* 1991; Aurelius *et al.* 1993; Gooskens *et al.* 2007).

Die real-time-PCR ermöglichte einen quantitativen (De Vos *et al.* 2009; Tachikawa *et al.* 2014) oder semiquantitativen (Frobert *et al.* 2013) Virusnachweis. Der Nachweis einer Viruslast größer 10^5 HSV-Kopien pro ml respiratorischer Flüssigkeit, die mittels BAL aus dem unteren Respirationstrakt gewonnen worden war, wurde wiederholt mit einer signifikant

höheren Sterblichkeit assoziiert: Bei vorwiegend immunkompromittierten Personen wurde diese Quantifizierung bei Verdacht auf eine pulmonale Infektion durchgeführt und war oberhalb der genannten Viruslast mit einer erhöhten 28-Tages-Krankenhaus-Sterblichkeit assoziiert (Gooskens *et al.* 2007).

Bei immunkompetenten Intensivpatient*innen mit klinischem Verdacht einer beatmungsassoziierten Pneumonie war eine Viruslast größer 10^5 HSV-Kopien mit einer erhöhten 14-Tages-Intensivstationssterblichkeit verbunden (Linssen *et al.* 2008).

Die Quantifizierung der Viruslast bot somit einen Anhaltspunkt, therapiebedürftige und krankheitsrelevante Reaktivierungen mit hoher HSV-Viruslast von einer pulmonalen Reaktivierung ohne klinische Signifikanz, die lediglich als Marker einer Immunsuppression zu interpretieren wären, zu unterscheiden (Textoris & Mallet 2017).

3) Mittels des Next Generation Sequencing (NGS) konnte eine Vielzahl respiratorischer Erreger zeitgleich charakterisiert werden. Herpesviren, die beispielhaft bei einer primären Erregersuche nicht erfasst worden waren, waren in zwölf Prozent der analysierten Proben mittels NGS identifizierbar (Prachayangprecha *et al.* 2014).

4) Eine weitere Diagnostikmöglichkeit bietet die Zytopathologie von respiratorischen Spülflüssigkeiten (Cunha *et al.* 2010). Die Zytologie führte bei einer Infektion der unteren Atemwege zu einem schnellen HSV-Nachweis und war zudem kostengünstig, spezifisch und in Kombination mit der – allerdings zeitaufwendigen - Virusisolation sehr sensitiv (Martinez-Giron & Pantanowitz 2017; Baldassarri *et al.* 2019).

5) Die bronchoskopische Gewinnung einer Lungenbiopsie zum histologischen HSV-Nachweis war zwar wesentlich invasiver, doch deutlich weniger anfällig gegenüber einer Kontamination durch Viren, die aus einer Reaktivierung in den oberen Atemwegen stammen (Luyt *et al.* 2007).

6) Mittels der noch weitaus invasiveren offenen Lungenbiopsie gelang nach negativer BAL bei 78 von 100 Personen mit akutem Lungenversagen/ Acute Respiratory Distress Syndrom (ARDS) ein Erregernachweis; hier war histologisch und kulturell in drei Fällen HSV als Pneumonie-Erreger nachweisbar (Papazian *et al.* 2007).

Wenn kein Material aus dem tiefen Respirationstrakt zur Verfügung steht, kann HSV auch im Sputum nachgewiesen werden, allerdings ist dann keine Aussage darüber möglich, ob HSV nur im oberen oder auch im unteren Respirationstrakt reaktivierte (Yoshimi *et al.* 2018). In einer aktuellen Fallbeschreibung führte die charakteristische Zytologie des Sputums zur

Differentialdiagnose einer HSV-Pneumonie, die im zweiten Schritt in der BAL mittels Immunperoxidase-Färbung und PCR bestätigt werden konnte (Baba *et al.* 2020).

1.3 Virusreaktivierung aus dem Latenz-Stadium

Reaktivierung von Herpes Simplex Virus

Die Erkenntnis, dass eine HSV-Reaktivierung auch trotz eines nachweisbaren Antikörpertiters im Blut möglich war, prägte bereits zwischen 1920 und 1960 die Erforschung der Pathogenese von HSV (Nahmias & Roizman 1973).

Nach Eindringen in die Zelle führt HSV entweder direkt zum Zelluntergang oder entzieht sich alternativ intrazellulär in sensorischen Neuronen im Latenzstadium der Immunantwort des Wirtes (Whitley & Roizman 2001). Als obligat intrazellulärer Erreger, der zur Replikation auf eine Wirtszelle angewiesen ist, manipuliert HSV das Zytoskelett sowie die Membranen verschiedener Zellorganellen (Zellmembran, endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien und Zellkern) und schützt sich hierdurch vor zelleigenen Abwehrmechanismen (Autophagie, Apoptose, ER-Stress) (Banerjee *et al.* 2020).

Als Primärinfektion infiziert HSV-1 zuerst Epithelzellen insbesondere der Atemwegs- und Genitalschleimhaut. In weniger als einem Tag bildet HSV-1 pro infizierte Zelle mehrere Hundert bis Tausend Viruskopien und geht auf das periphere Nervensystem über: Dort infiziert HSV unter anderem sensorische Nerven sowie die Spinalganglien, das Ganglion trigeminale und autonome sympathische Ganglien. Unter Nutzung des zelleigenen axonalen Transports der bis zu einem Meter langen peripheren Nervenzellen gelangen replizierte Viruspartikel zu den in Ganglien lokalisierten Zellkernen. Erklärt wurde die lebenslange Viruspersistenz damit, dass Nervenzellen nicht erneuert werden und dass das zelluläre Immunsystem aufgrund der verminderten Virusreplikation im Latenzstadium nicht ausreichend stimuliert werde. (Koyuncu *et al.* 2018)

Im Latenzstadium wird die HSV-Virusreplikation in Nervenzellen durch die Expression eines sog. „latency associated transcript (LAT)“ supprimiert. Mit teilweise jahrelanger Latenz können bestimmte Trigger (UV-Licht, Stress, Immunsuppression) diese Expression reduzieren und damit zu einer jetzt aktiven Virus-Replikation führen; dieser Prozess wird als Reaktivierung bezeichnet (Jones 2013). Auch eine Hypoxie begünstigt eine HSV-Reaktivierung durch Veränderungen im axonalen mTOR-Signalweg (Kobayashi *et al.* 2012). Aufgrund symptomloser und zeitgleicher Reaktivierung in verschiedenen Geweben im Körper wird aktuell diskutiert, ob HSV im Latenzstadium mehr Virusaktivität zeigt als bisher angenommen und stetig – aber meist erfolglos – versucht, in die lytische Phase überzutreten (N. Singh & Tschärke 2020).

Virusausbreitung bei beatmeten Intensivpatient*innen

Bei 81 Prozent aller Personen, die im unteren Respirationstrakt positiv auf HSV getestet worden waren, konnte HSV zuvor mittels Rachenabstrich im oberen Respirationstrakt nachgewiesen werden (Bruynseels *et al.* 2003).

Für die Virusausbreitung vom Rachenraum in die Lunge wurde hypothetisch eine Aspiration des Virus verantwortlich gemacht, was später auch in einer Studie (Assink-de Jong *et al.* 2013) und von zwei Fallberichten aufgegriffen wurde (Astuto *et al.* 2014; Odani *et al.* 2019). Demgegenüber steht ein autochthone Reaktivierung im unteren Respirationstrakt: Ein Nachweis von HSV gelang bei Verstorbenen in autonomen Nervenganglien des Nervus Vagus (Warren *et al.* 1978). Diese direkte HSV-Transmission von sensorischen Nerven des Vagus auf das Lungengewebe wurde von Tuxen *et al.* in Arbeiten zur pulmonalen HSV-Reaktivierung bei Personen mit ARDS neben der Verschleppung einer oropharyngealen HSV-Reaktivierung mehrfach erwogen. (Tuxen *et al.* 1982; Tuxen *et al.* 1987; Tuxen 1994)

1.4 Invasive Beatmung als Auslöser einer Virusreaktivierung und Pneumonie

Die maschinelle Beatmung nach Intubation gehört auch heute noch zu den invasivsten intensivmedizinischen Maßnahmen. Sogar ohne begleitende Lungenerkrankung sind bei beatmeten Personen erhöhte Entzündungsmarker und Veränderungen im Surfactant nachweisbar (Tsangaris *et al.* 2003); daher überrascht es nicht, dass diese Therapie mit erheblichen Komplikationsraten einhergeht. Eine der bedeutsamsten Komplikationen ist sicherlich die beatmungs-assoziierte Pneumonie.

Krankheitswert/Prävalenz einer beatmungs-assoziierten Pneumonie

Eine beatmungs-assoziierte Pneumonie zählt mit einer Inzidenz zwischen fünf und 40 Prozent zu den häufigsten Komplikationen, die während eines Intensivstation-Aufenthalts auftreten. Sie wurde mit längeren Beatmungsdauern und einer Letalität von circa zehn Prozent assoziiert. (Papazian *et al.* 2020)

Eine Meta-Analyse schätzte die eigenständige Letalität einer beatmungs-assoziierten Pneumonie auf 13 Prozent, da diese mit längeren Intensivaufenthaltsdauern einhergeht und damit das Risiko für weiterer Komplikationen (nosokomiale Infektionen, invasive Eingriffe) steigt (Melsen *et al.* 2013).

Herpes Simplex Virus Reaktivierung unter Beatmung

In seriellen Viruskulturen war HSV innerhalb der ersten Woche nach Intubation bei der Hälfte der beatmeten Personen nachweisbar, jedoch war wiederum nur die Hälfte von Hautmanifestationen im Gesicht oder der Mundschleimhaut betroffen (Hanley *et al.* 1993).

Nach fünf Tagen künstlicher Beatmung lag der Anteil derjenigen mit einem positiven HSV-Nachweis (PCR und/oder Kultur und Zytologie) aus dem unteren Respirationstrakt (BAL, Tracheobronchialsekret, Lungenbiopsie) bereits bei 64 Prozent (Luyt *et al.* 2007).

Herpes Simplex Virus Reaktivierung mit beatmungs-assoziiertes Pneumonie

Bereits 1992 wurden bei 309 Intensivpatient*innen mit schwerwiegenden Infektionen des Respirationstraktes eine Erregersuche mittels Bronchoskopie veranlasst: Ein kultureller HSV-Nachweis gelang bei 26% (34/132) der beatmeten Personen mit Pneumonie und war signifikant ($p < 0,001$) mit einer Beatmung sowie einer respiratorischen Insuffizienz assoziiert. Besonders bei einem Inhalationstrauma war HSV in 47% der Fälle (7/15) und bei Immunsupprimierten in 12% (12/49) nachweisbar. Lediglich fünf Personen mit HSV-Nachweis hatten weder eine chronische Grunderkrankung noch erhielten diese eine Immunsuppression (Prellner *et al.* 1992).

In einer weiteren Beobachtungsstudie entwickelten 28% (39/139) der mindestens für 48 Stunden beatmeten Intensivpatient*innen eine beatmungs-assoziierte-Pneumonie während ihres Intensivaufenthaltes. Im Tracheobronchialsekret gelang in 74 Prozent dieser Fälle der kulturelle Nachweis eines bakteriellen Erregers sowie in damit zum Teil überschneidenden 31 Prozent (12/39) der Nachweis von HSV-1 (mittels Kultur, Immunhistochemie, oder PCR) (Daubin *et al.* 2005).

Herpes Simplex Virus als schädigender Erreger oder Epiphänomen?

Bereits 1943 wurde Labormäusen intranasal Herpes Simplex Virus appliziert, was zu einer fokalen interstitiellen Pneumonie führte. Die artifizielle Virus-Aspiration wurde kausal mit der Pneumonie verknüpft, da eine Lungenschädigung nach intraperitonealer Virusinjektion ausblieb (Slavin & Berry 1943).

Im menschlichen Lungengewebe gelang ein HSV-Nachweis 1949 nicht kausal, sondern in Assoziation mit einer atypischen Pneumonie (Morgan & Finland 1949). Bei einer Auswertung von 3000 Autopsien war HSV histologisch im Lungengewebe von sechs Erkrankten nachweisbar, was mit dem zeitgleichen Auftreten einer interstitiellen Pneumonie und nekrotischen Lungenarealen assoziiert war (Herout *et al.* 1966).

Während eine HSV-Tracheobronchitis besonders im Zusammenhang einer Immunsuppression (Chemotherapie, Verbrennungen oder Alkoholismus) nachgewiesen wurde, gelang in Japan 1978 die Erstbeschreibung einer HSV-Pneumonie bei einem immungesunden 50-Jährigen (Ishiguro *et al.* 1978).

In einer Übersichtsarbeit mit sechs Fallberichten zeigten Graham *et al.*, dass HSV im tiefen respiratorischen Material (BAL oder im TBS) ante-mortem sowohl zytologisch als auch

mittels Viruskultur zu detektieren war. Das gehäufte Vorkommen bei Verbrennungsopfern und nach Intubation wurde damit erklärt, dass dies zu einer Plattenepithelmetaplasie führe und damit eine Virusinfektion mittels Aspiration oder hämatogener Streuung begünstige. Der klinische Verlauf sei im Wesentlichen vom Zustand der zellulären Immunabwehr, dem Auftreten von Superinfektionen und nicht zuletzt von der zugrundeliegenden Erkrankung abhängig. Während eine HSV-Pneumonie bis 1977 ausschließlich post-mortem anhand von Autopsien beschrieben worden war, erfolgten danach HSV-Nachweise bei Lebenden mit zum Teil guten klinischen Verläufen auch ohne Therapie. (Graham & Snell 1983)

Auch 40 Jahre später waren die Standpunkte über die Bedeutung einer HSV-Reaktivierung in der Intensivmedizin sehr unterschiedlich:

- Die künstliche Beatmung und das geschwächte Immunsystem bei septischen Intensivpatient*innen begünstige eine HSV-Reaktivierung mit Läsionen der Lungenschleimhaut. HSV beeinträchtige die Funktionsweise der Schleimhaut-Barriere und ermögliche bakterielle Superinfektionen. Eine hohe Viruslast sei mit einer erhöhten Letalität assoziiert worden und zusammen mit entsprechender Klinik als aktive Virusinfektion zu deuten, die antiviral behandelt werden sollte. (Forel *et al.* 2014)
- Die Evidenzlage für eine antivirale Behandlung von immunkompetenten Intensivpatient*innen mit HSV-1 Reaktivierung sei nicht ausreichend noch kausal nachgewiesen worden, sondern basiere auf Assoziationen. Ohne klare Organmanifestation sei eine Virusreaktivierung als Marker der Krankheitsschwere und Immunschwäche einzuordnen, weshalb Intensivpatient*innen häufiger „mit“ als „an“ einer Virusreaktivierung versterben. Nicht vernachlässigbar seien die Entwicklung von Resistenzen und unerwünschte Nebenwirkungen unter antiviraler Therapie und die Gefahr einer Unter- bzw. Überdosierung bei Intensivpatient*innen mit oftmals eingeschränkter Nierenfunktion. Dies mache eine Nutzen-Risiko Abwägung und ein strenges Monitoring von Nebenwirkungen erforderlich. Bei Reaktivierungen mit hoher Viruslast sei sorgfältig nach Organmanifestationen oder Fieber unklarer Genese zu suchen und ausschließlich dann eine antivirale Therapie zu erwägen. (Chanques & Jaber 2014)

Ausgehend von diesem Forschungsstand blieb die Frage nach der Bedeutung einer HSV-Reaktivierung bei Intensivpatient*innen und der Rolle einer antiviralen Therapie weiterhin zu klären.

1.5 Antivirale Therapie mit Aciclovir

Wirkmechanismus von Aciclovir

Das azyklische Nukleosid-Analogon Aciclovir – 9-(2-Hydroxyethoxymethyl)-guanin – ist ein Prodrug: Aktiviert wird Aciclovir mittels Phosphorylierung nur in HSV-infizierten Zellen durch die viruseigene Thymidinkinase und führt als kompetierendes Substrat der viralen DNA-Polymerase aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe zu einem DNA-Kettenabbruch (Elion *et al.* 1977). Durch diese selektive Blockade der HSV-DNA-Vervielfältigung wird eine weitere Virusvermehrung effizient unterbunden.

Anwendungsgebiete einer intravenösen Aciclovir-Therapie

Anfang der 80er-Jahre konnte gezeigt werden, dass intravenös verabreichtes Aciclovir eine wirksame und komplikationsarme Therapie von HSV-Manifestationen wie peri-oralen Läsionen, einer Blepharokonjunktivitis oder Pneumonitis bei Personen mit Tumorerkrankungen (Selby *et al.* 1979) sowie mukokutanen Infektionen bei immunkompromittierten Personen (Mitchell *et al.* 1981) ist.

In randomisierten Studien führte intravenöses Aciclovir bei Menschen mit schweren genitalen Primärinfektionen zu einem kürzeren und milderem Krankheitsverlauf (Mindel *et al.* 1982) und bei Menschen mit HSV-Enzephalitis zu einer Reduktion der Letalität und der Langzeitfolgen nach sechs Monaten (Skoldenberg *et al.* 1984).

Diese spezifische antivirale Therapie gehört auch heute noch zum medizinischen Standard – insbesondere bei disseminierten oder schweren viszeralen HSV-Manifestationen mit einer Ösophagitis, Hepatitis oder Pneumonie nach Organtransplantation (Lee *et al.* 2019) und Enzephalitiden (Bodilsen *et al.* 2019).

Allerdings zeigte intravenöses Aciclovir bei pulmonaler HSV-Reaktivierung weder in der Studie von Tuxen *et al.* (hier aufgrund zu geringer Power) noch in einer weiteren randomisierten Studie einen signifikanten Behandlungserfolg (Tuxen *et al.* 1987; Luyt *et al.* 2020b) – lediglich in zwei retrospektiven Beobachtungsstudien (Traen *et al.* 2014; Heimes *et al.* 2020) war dies der Fall.

1.6 Forschungsfrage

Zu Beginn vorliegender Forschungsarbeit existierte wenig Evidenz für eine intravenöse Aciclovir-Therapie bei immunkompetenten Personen mit einer beatmungs-assoziierten Pneumonie, deren Ursache auf eine pulmonale HSV-Reaktivierung zurückzuführen war:

Lediglich Daten einer retrospektive Beobachtungsstudie (Traen *et al.* 2014) zeigten einen nachhaltigen Überlebensvorteil dieser antiviralen Therapie. Einzeln publizierte Fallberichte deuteten ebenfalls auf einen positiven Therapieeffekt bei nachgewiesener HSV-Pneumonie

oder HSV-Tracheobronchitis hin (Martinez *et al.* 1994; Alvarez-Uria *et al.* 2008; Reyes & Bolden 2009; Hunt *et al.* 2013; Mills *et al.* 2014; Ishihara *et al.* 2018; Baba *et al.* 2020). Ähnlich zu diesen Fallberichten unterstützten die regelmäßig durchgeführten mikrobiologischen Intensivstations-Visiten am Universitätsklinikum Augsburg die Hypothese eines vorteilhaften Therapieeffekts: Bei einem HSV-PCR-Nachweis aus tiefem respiratorischem Material von bronchoskopierten Intensivpatient*innen mit beatmungs-assoziiertes Pneumonie und teilweise prolongiertem Weaning schien intravenöses Aciclovir zu besseren klinischen Verläufen zu führen.

Das Ziel des Forschungsprojektes war es, retrospektiv mit klinischen Daten der insbesondere in Augsburg sehr großen Intensivmedizin den Therapieeffekt einer intravenösen Aciclovir-Therapie zu evaluieren.

Bei der Analyse der bisherigen Studien fiel auf, dass die Studienpopulation nicht ausreichend stratifiziert wurden. Daraus ergab sich die Hypothese, dass eine genauere Definition des Studienkollektivs die Wahrscheinlichkeit auf einen antiviralen Therapie-Effekt erhöhe, wenn die nachgewiesene HSV-Reaktivierung ursächlich für die pulmonale Erkrankung der Betroffenen ist. Daher untersuchten wir gezielt Personen, die aus klinischer Sicht unzweifelhaft eine Pneumonie hatten und bei denen andere Ursachen weitestgehend ausgeschlossen waren. Das Versagen einer antibiotischen Therapie, auch wenn diese adäquat war, rückte die Bedeutung eines HSV-Nachweises im unteren Respirationstrakt am pulmonalen Infektionsgeschehen in den Vordergrund. Hieraus ergab sich die Fragestellung der vorliegenden Dissertation: Kann eine intravenöse Aciclovir-Therapie das Überleben von Intensivpatient*innen mit beatmungs-assoziiertes Pneumonie verbessern, wenn mittels PCR in tiefem respiratorischen Material HSV-1 bzw. -2-DNA nachweisbar ist und die Pneumonie nicht auf eine (empirische oder gezielte) Antibiose anspricht?

2 Methoden

2.1 Studiendesign

Es handelt sich um eine retrospektive Analyse respiratorischer HSV-1/-2-Nachweise zwischen 1. Januar 2013 und 1. April 2018 von beatmeten Intensivpatient*innen des Universitätsklinikums Augsburg, die entweder nach einem klinischen Algorithmus mit Aciclovir behandelt wurden oder unbehandelt blieben. Therapieentscheidungen wurden aufgrund des retrospektiven Studiendesigns nicht beeinflusst.

2.2 Ethikvotum

Am 03. Mai 2017 wurde der Beratungskommission für klinische Forschung des ehemaligen Klinikums Augsburg – des seit 1. Januar 2019 bestehenden Universitätsklinikums – ein Ethikantrag mit einem Prüfplan für die geplante retrospektive klinische Beobachtungsstudie vorgelegt. Mit Bescheid vom 14. Juni 2017 wurden keine Einwände erhoben (Studie 2017-16).

2.3 Studienpopulation

2.3.1 Erfassung aller HSV-1/-2-Testungen bei Intensivpatient*innen

Aus dem Laborinformationssystem SWISSLAB wurden alle HSV-1/-2-Nachweise vom 1. Januar 2013 bis 1. April 2018 mittels SQL-Pass-Through-Abfrage extrahiert. Lagen zu einer Person mehrere sequenzielle HSV-Testungen vor, wurde der erste PCR-Nachweis gewertet, an dem eine hohe Viruslast von mehr als 10^5 HSV-Kopien/ml erreicht wurde. Wenn für eine Person kein Nachweis mit hoher Viruslast existierte, fand die erste niedrige Viruslast über 10^3 HSV-Kopien/ml Berücksichtigung.

2.3.2 Einschlusskriterien

- Molekularbiologischer HSV-1/-2 DNA-Nachweis ($>10^3$ Kopien/ml) in respiratorischem Material (BAL, Tracheobronchialsekret) aus dem unteren Respirationstrakt
- Beatmung auf einer Intensivstation oder Intermediate Care - Station (IMC)
- Klinische Zeichen einer beatmungs-assoziierten Pneumonie (Pulmonale Infiltrate, erhöhtes C-reaktives Protein (CRP), Leukozytose, eitriges Tracheobronchialsekret, pneumonietypische Befunde in der Bronchoskopie)
- Retrospektiv keine klinische Besserung auf eine empirische Antibiose

2.3.3 Ausschlusskriterien

- HSV-1/-2 Virus-Nachweis in Abstrichmaterial der oberen Atemwege (Lippenabstrich, Rachenabstrich)

- Beginn einer antiviralen Aciclovir-Therapie nach Entlassung von Intensivstation/ IMC
- Neutropenie (neutrophile Granulozyten unter 1500/ μ l)
- Fehlende klinische Zeichen einer beatmungs-assoziierten Pneumonie
- Retrospektiv klinische Besserung durch antibiotische Therapie

2.4 Interventionen

2.4.1 Erregersuche und molekularbiologische Testung auf HSV-1 und HSV-2

Probenanforderung:

Die quantitative Bestimmung von HSV-1/-2 sowie des Zytomegalie-Virus (CMV) aus dem eingesandten respiratorischen Material musste vom intensivmedizinischen Fachpersonal differentialdiagnostisch berücksichtigt und explizit in digitaler oder handschriftlicher Form angefordert werden.

Zum zeitnahen Ausschluss der häufigsten Pneumonie-Erreger war neben der klassischen kulturellen Mikrobiologie sowohl ein respiratorisches Viren- als auch ein Bakterien-Panel der Firma Autoimmun Diagnostika (AID) anforderbar. Folgende Erreger wurden von der entsprechenden Paneluntersuchung mittels qualitativer Multiplex-PCR erfasst:

Viren ('CAP Vir', AID)

- Influenzaviren A/B
- Parainfluenza Virus 1-3
- Respiratorisches Syncytial Virus (RSV)
- Adenovirus
- Humanes Metapneumovirus (hMPV)

Bakterien ('CAP Bac', AID)

- Streptococcus pneumoniae
- Haemophilus influenzae
- Haemophilus influenzae Typ b
- Moraxella catarrhalis
- Chlamydomphila pneumoniae
- Mycoplasma pneumoniae
- Legionella pneumophila
- Bordetella pertussis
- Bordetella parapertussis

Probenentnahme:

Für den molekularbiologischen HSV-Nachweis wurde größtenteils BAL im Rahmen einer Bronchoskopie gewonnen oder alternativ Tracheobronchialsekret beim Absaugvorgang von intubierten Personen.

Probenversand und Lagerung:

Es folgte ein zeitnaher Probenversand ins hausinterne diagnostische Labor, in dem die Proben werktags von der molekularbiologischen Abteilung bearbeitet bzw. bei 2 - 8°C zuvor zwischengelagert wurden.

Probenverarbeitung:

- Probenverdünnung mit Natriumchlorid (NaCl) bei zäher Konsistenz (BAL: bis 1:3; TBS: bis 1:10), Homogenisieren, Zentrifugieren und Aliquotieren
- Anschließend wurde automatisiert eine DNA-Isolierung am COBAS AmpliPrep (Roche) unter Verwendung des herstellereigenen Kits „Total Nucleic Acid Isolation“ (TNAI) durchgeführt.
- Räumlich separat davon wurde ein Mastermix mit dem Altona RealStar HSV-PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics 2017) vorbereitet, was die interne Kontrolle und vier Quantifizierungsstandards (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 Kopien/ml) beinhaltet.
- Im S3-Labor wurde dieser Mastermix mit der isolierten DNA gemischt, zusätzlich wurde eine Positiv- und Negativ-Kontrolle angesetzt.
- Die Amplifikation und Detektion erfolgte basierend auf der Technologie einer Real-Time-PCR mit Nachweis spezifischer Amplifikation durch fluoreszierende Hybridisierungs-Sonden im Thermozykler Rotor Gene Q MDx (Firma Qiagen). Die gleichzeitige Bestimmung von HSV-1- und HSV-2-DNA sowie einer internen Kontrolle war aufgrund unterschiedlich fluoreszierender Sonden auf verschiedenen Detektions-Wellenlängen möglich.
- In regelmäßigen Abständen wurden mittels Quantifizierungsstandards (10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 Kopien/ml) Standardkurven für HSV 1 und HSV 2 in der Rotor-Gene Software abgespeichert.
Nach Eingabe des aktuell gemessenen Quantifizierungsstandards 10^6 Kopien/ml wurde der Lauf automatisch kalibriert und die personenbezogenen Ergebnisse konnten quantifiziert werden.
- Bei Verdünnungen des Materials aufgrund von zu zäher Proben-Konsistenz erfolgte eine nachträgliche Korrektur der quantitativen Messergebnisse um den jeweiligen Verdünnungsfaktor.

Von der Herstellfirma wurde ein linearer Messbereich von 10^3 bis 10^{10} Kopien/ml für HSV-1 bzw. von 10^3 bis 10^9 Kopien/ml für HSV-2 angegeben. Das Testsystem wurde herstellerseitig auf Kreuzreaktionen überprüft (u.a. BK-Virus, CMV, Epstein-Barr-Virus

(EBV), Hepatitis-B-Virus, Hepatitis-C-Virus, Humanes Herpesvirus 6 (HHV-6) A und B, HIV, JC-Virus und VZV). Falsch negative Ergebnisse können jedoch methodeninhärent aufgrund von Mutationen im Primerbereich der Zielregion von HSV-1 und HSV-2 nicht ausgeschlossen werden. (Altona Diagnostics 2017)

Meist wurde dasselbe respiratorische Material – sofern explizit angefordert – auch auf CMV-DNA getestet. Die Nukleinsäuren wurden ebenfalls unter Verwendung eines TNAI Kits am COBAS AmpliPrep (Roche) extrahiert. Die Durchführung der Real-Time PCR erfolgte nach Standardverfahren auf TaqMan (Roche) gemäß Herstellerangaben mit einem linearen Messbereich zwischen $1,5 \times 10^2$ bis 1×10^7 CMV Kopien/ml. Ein nicht mehr sicher quantifizierbarer Wert <150 Kopien/ml („schwach positiv“) wurde in den am niedrigsten messbaren Wert von 61 Kopien/ml zur besseren statistischen Auswertbarkeit umgewandelt.

Ergebnis-Validation:

Für alle quantifizierten HSV- und CMV-Viruslast Messwerte sowie für die qualitativen PCR-Panel-Untersuchungen erfolgte sowohl eine technische (durch MTLA) als auch medizinische (durch ärztliches Laborpersonal) Validation. Für die Messverfahren wurden nach Vorgaben der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen (Bundesärztekammer 2019) sowohl interne (Positiv-, Negativ- und interne Kontrolle) als auch externe Qualitätskontrollen (quartalsweise Teilnahme an Ringversuchen) durchgeführt.

2.4.2 Intravenöse Aciclovir-Therapie

Der klinische Algorithmus auf den operativen und internistischen Intensivstationen lautete:
Bei Personen,

- die intubiert und beatmet werden,
- mit klinischen und/oder radiologischem Nachweis einer Pneumonie,
- die auf eine Antibiotikatherapie nicht ansprechen,

soll eine Testung auf HSV-1 und HSV-2 im respiratorischen Material durchgeführt und bei mehr als 10^5 HSV-Kopien pro ml eine antivirale Behandlung mit Aciclovir erwogen werden. Die Entscheidung zur intravenösen Aciclovir-Therapie oblag dem behandelnden ärztlichen Fachpersonal der Intensivstationen. Eine Zieldosis von 10 mg pro kg Körpergewicht alle acht Stunden mit einer Behandlungsdauer von zehn Tagen, wie sie für eine HSV-1 Enzephalitis den Therapiestandard darstellt (Bodilsen *et al.* 2019), wurde vom betreuenden ärztlichen Fachpersonal auf die individuelle Nierenfunktion angepasst.

2.5 Definition Tag 0 und der Analysezeitpunkte

Der Baseline Tag 0 (d0) wurde für Personen, die keine Aciclovir-Therapie erhielten, durch das Abnahmedatum des ersten HSV-Viruslast Wertes definiert, der über 10^5 HSV-Kopien pro ml oder – falls unerreicht – über 10^3 HSV-Kopien pro ml lag. Für folgende Analysezeitpunkte wurden klinische und intensivmedizinische Daten erhoben: die ersten 24 Stunden auf Intensivstation, vier Tage vor bis 14 Tage nach d0 (s. Abb. 1).

Um den Effekt einer Therapie besser abbilden zu können, wurde bei der Auswertung für alle Aciclovir-behandelten Personen d0 als derjenige Tag definiert, an dem die intravenöse (i.v.) Therapie mit Aciclovir begonnen wurde. Hierdurch verkürzte sich bei Aciclovir-behandelten Personen der 14-tägige Analyse-Zeitraum nach d0, da die Datenerhebung zum Zeitpunkt dieser Anpassung bereits abgeschlossen war.

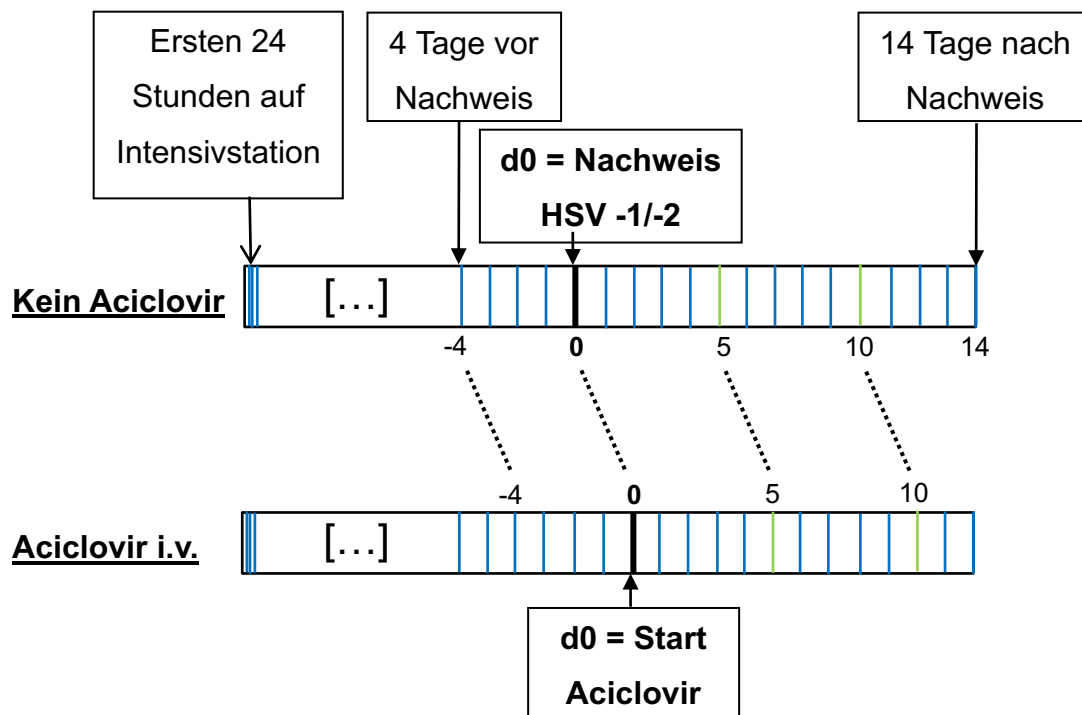


Abbildung 1 Definition des Tag 0 (d0) und der Erhebungszeitpunkte der Studie

2.6 Erfasste klinische Parameter

2.6.1 Baseline-Parameter

Aus größtenteils handschriftlich geführten Krankenakten und Intensivkurven sowie Arztbriefen, die in eingescannter Form über die Krankenhausinformationssysteme ORBIS und HYDMEDIA G5 digital abrufbar waren, wurden folgende Parameter erfasst:

Tabelle 1 Auswahl der Baseline-Parameter

Alter (Jahre)	Geschlecht	
Body-Mass-Index	Größe	Gewicht
Begleiterkrankungen	Charlson-Komorbiditätsindex	
Lungenerkrankung	COPD	Lebererkrankung
Kardiologische Erkrankung	NYHA-Stadium IV	Diabetes
Nierenversagen	Dialyse	
Erkrankungen:	Neurologische	Rheumatologische
	Maligne	Infektionen (HIV, Hepatitis)
Drogenkonsum	Alkoholabusus	Nikotinabusus
Immunsuppression	Steroidtherapie	Chemotherapie
	Radiotherapie	Immunsuppressiva
Zustand nach	Operation (Elektiv / Notfall)	Organtransplantation
Intensivstation	internistisch/chirurgisch	Intermediate Care (IMC)
Aufnahmegrund	Respiratorische Insuffizienz	Leberversagen
	Sepsis	Nierenversagen
	Trauma	Neurologische Erkrankung
	Pankreatitis	Zustand nach Reanimation
	Gastrointestinale Blutung	Andere Gründe
Aciclovir	Gesamtdauer (Tage)	Zeitgleiche Antibiose
Antibiose	Gesamtdauer (Tage)	Wirkstoffgruppe
Katecholamine	Gesamtdauer (Tage)	
Hydrokortison	Stoß-/Dauertherapie	Start vor HSV-Test (Tage)
Prednisolon	Stoß-/Dauertherapie	Start vor HSV-Test (Tage)
Beatmung	Invasiv/nicht invasiv	Dauer seit Beginn (Tage)
Beatmungsmodus	Bauchlagerung	ECMO
Intubation	Gesamtdauer (Tage)	Tracheotomie
Beatmungsgrund	Atemversagen postoperativ	COPD Exazerbation
	Sepsis	Neuromuskulär
	Pneumonie ambulant	Pneumonie nosokomial
	Aspirationspneumonie	Koma
	Herzversagen	Trauma
	Andere Gründe	
Tod Intensivstation	Tage bis Tod/Entlassung	
Tod Krankenhaus	Tage bis Tod/Entlassung	
Gesamt- Aufenthaltsdauer	auf Intensivstation/IMC	Im Krankenhaus
30-Tages Sterblichkeit		

2.6.2 Labor-Parameter

Ausgewählte Labordaten wurden am 27. Juli 2018 mittels SQL-Pass-Through-Abfrage aus der SQL-Labordatenbank SWISSLAB (Nexus) in eine Access-Datenbank und nach weiterer Aufbereitung in eine Excel-Tabelle übertragen.

Tabelle 2 Auswahl der Labor-Parameter

HSV1-/2-Kopienzahl	CMV-Kopienzahl	
Blutbild	Leukozytenzahl	Erythrozytenzahl
	Thrombozytenzahl	
	Hämoglobin	Hämatokrit
Elektrolyte	Natrium	Kalium
Entzündungsparameter	C-reaktives Protein	Procalcitonin
	Interleukin-6	
Nierenfunktion	Kreatinin (Jaffé-Methode)	Geschätzte GFR (CKD-EPI)
		Geschätzte GFR (MDRD)
	Cystatin	Cystatin-GFR
Leberwerte	Harnstoff	
	GPT(ALAT)	GGT
	Albumin	Bilirubin gesamt
	Cholesterin	TPZ-internat. Ratio

2.6.3 Täglich erhobene Parameter Tag -4 bis +14

Es existierten keine digitalen Intensivkurven, sondern gescannte Papier-Intensivkurven mit handschriftlicher Dokumentation (s. Abb. 2) im digitalen Archiv Hydmedia G5 (Agfa).

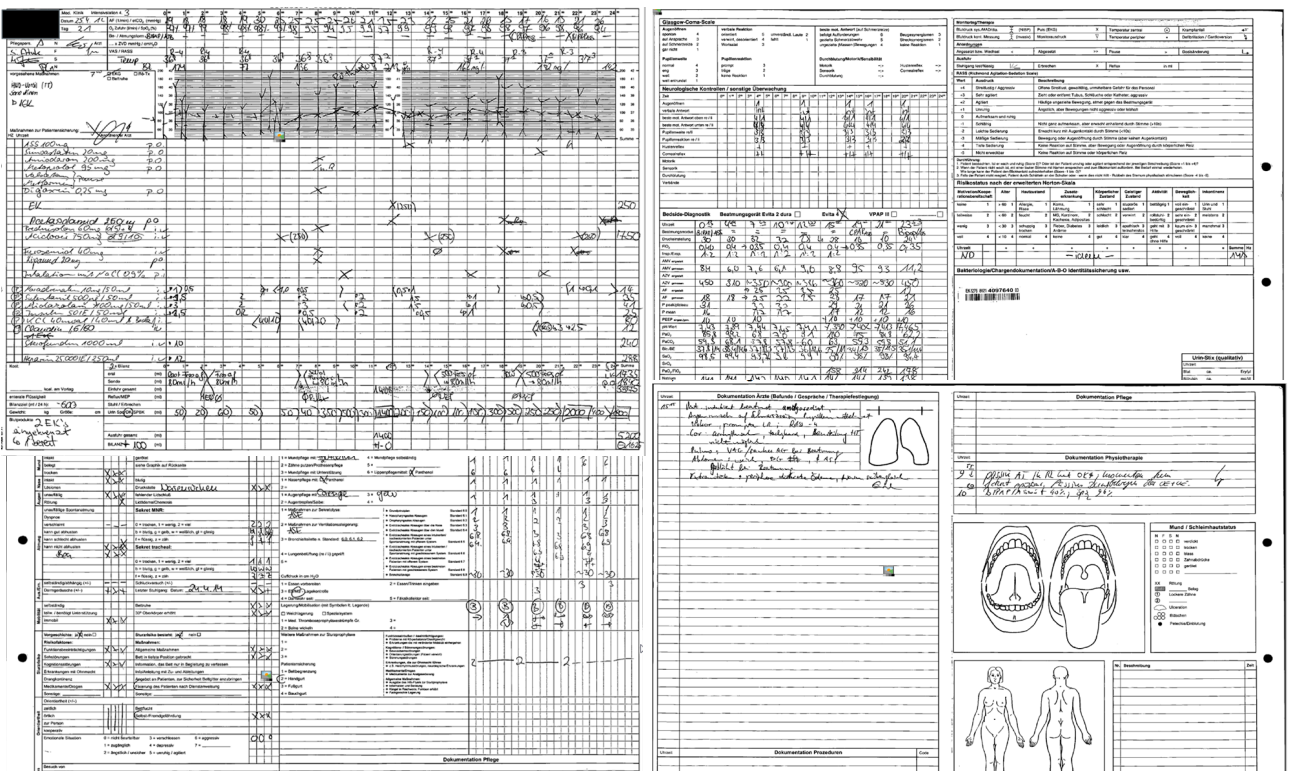


Abbildung 2 Handschriftliche Dokumentation exemplarisch zu einem Studienzeitpunkt

Für die manuelle Dateneingabe wurde eine mit Visual Basic for Applications (VBA) programmierte Eingabemaske (s. Abb. 3) genutzt, die eine tagesweise Dateneingabe pro Fall und Übertragung der Werte in das entsprechende Excel-Arbeitsblatt ermöglichte.

In der Eingabemaske war eine Berechnung der Tagesdifferenz (aus Start- und End-Datum) und des täglichen Katecholaminbedarfs in μg pro kg Körpergewicht pro Minute möglich (aus Körpergewicht, infundierter Tagesmenge in ml, Dosismenge in mg pro 50 ml).

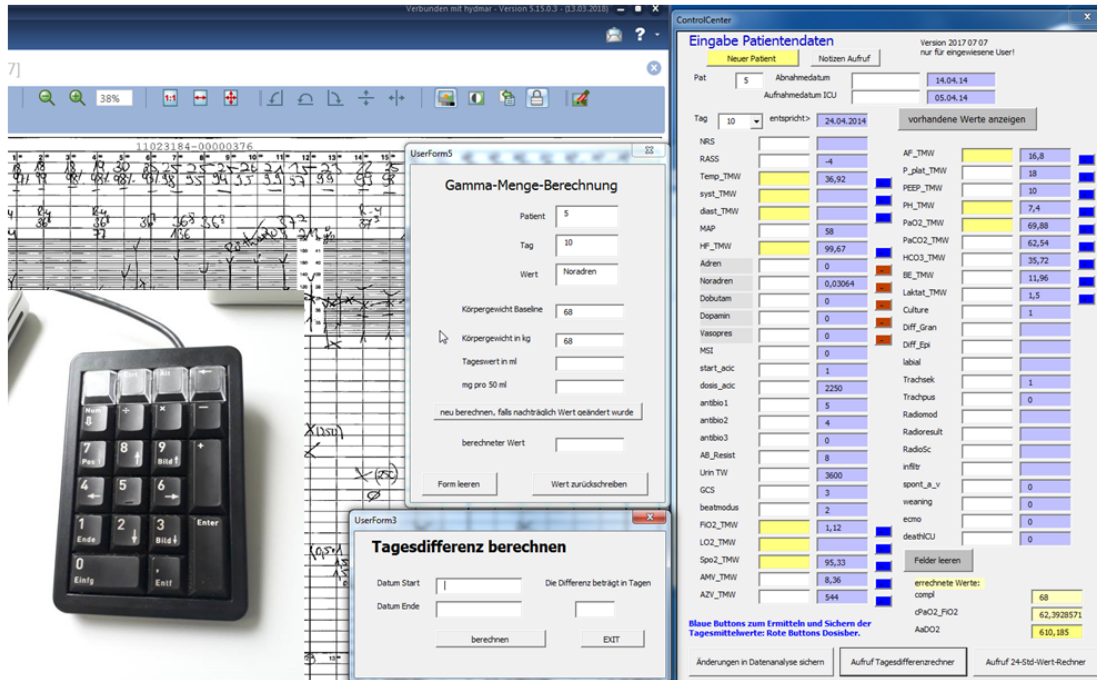


Abbildung 3 Programmierte Eingabemaske zur tageweisen Werteingabe

Folgende Parameter der Tabelle 3 wurden tageweise für bis zu 20 Zeitpunkte erhoben.

Tabelle 3 Auswahl der klinischen Verlaufs-Parameter

Intensiv-Scores	Glasgow Coma Scale	Richmond Agitation Sedation
Vitalparameter	Temperatur	Herzfrequenz
	Atemfrequenz	
	Blutdruck	Mean arterial pressure (MAP)
Medikamente	Antibiotika (Anzahl, Klasse)	Steroidtherapie
	Aciclovir-Tagesdosis	Morphinmenge
	Katecholamin-Bedarf	in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht/min
Niere	Tages-Urinmenge	
Lunge	Spontanatmungsversuche	Weaning
	ECMO	Invasivster Beatmungsmodus
Ventilationsparameter	Beatmungsfrequenz	Tidalvolumen
	Atemminutenvolumen	Venöse Sauerstoffsättigung
	Inspirator. Sauerstofffraktion	Plateaudruck
	positiver endexpiratorischer Druck (PEEP)	
Blutgasanalyse	arterieller Sauerstoff (PaO_2)	Kohlenstoffdioxid (PaCO_2)
	Bikarbonat	pH-Wert
	Basenüberschuss	Laktat
Radiologische Infiltrate	Labiale Herpes Effloreszenz	Trachealsekret (Menge, Eiter)

Weitere Werte wurden in Excel unter Verwendung nachfolgender Formeln berechnet:

1) Oxygenierungsindex ("paO₂/FiO₂-ratio"):

$$\text{"paO}_2/\text{FiO}_2 - \text{ratio"} = \frac{\text{PaO}_2}{\text{FiO}_2}$$

PaO₂ = Arterieller Sauerstoff-Partialdruck

FiO₂ = Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion

2) Alveolo-arterielle Sauerstoffdruckdifferenz (Le Huu Thien & Huynh Quang 2014):

$$\text{AaDO}_2 = \left(\left((677 \times \text{FiO}_2) - \frac{\text{PaCO}_2}{0,8} \right) - \text{PaO}_2 \right)$$

PaO₂ = Arterieller Sauerstoff-Partialdruck

PaCO₂ = Arterieller Kohlendioxid-Partialdruck

FiO₂ = Inspiratorische Sauerstoff-Fraktion

3) Lungencompliance (Guttman 1999):

$$\text{Compliance} = \frac{\text{Tidalvolumen}}{(\text{Plateaudruck} - \text{PEEP})}$$

PEEP = Positiver EndExpiratorischer Druck/ Pressure

2.7 Berechnung klinischer Scores

Auf Basis von Arztbriefen wurde zur standardisierten Erfassung von Grunderkrankungen der Charlson-Komorbiditätsindex als Summenscore erhoben, der definierte Krankheitsbilder mit unterschiedlichen Punktwerten bewertet (Charlson *et al.* 1987).

Für weitere standardisierte Scores wurden Tabellen in Excel mit den definierten Punktwerten erstellt (s. Abb. 4–7). Die Excel Funktion SVERWEIS vergab bei Patientenwerten „größer gleich“ der definierten Score-Grenzwerten den entsprechenden Score-Punktwert. Aufgrund des „größer gleich“- Abgleiches kamen neben fest definierten Wertebereichsgrenzen in Excel zusätzlich fiktive untere Grenzwerte (z.B. 1; 0,1; 0,001) zum Einsatz. Die Summe aus den einzelnen Punktwerten ergab den jeweiligen Score.

2.7.1 Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II Score

Der Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II (APACHE II) Score wurde als etablierter Score der Intensivmedizin ausgewählt, da er eine prognostische Abschätzung der Überlebenschancen von Intensivpatient*innen ermöglicht (Knaus et al. 1985).

Mit dem auffälligsten Wert der ersten 24 Stunden seit Intensivstationsaufnahme wird der Score berechnet. Folgende Parameter finden hierbei Berücksichtigung:

Körpertemperatur, Herzfrequenz, Atemfrequenz, Mean Arterial Pressure/ Mittlerer Arterieller Druck (MAP), Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂), PaO₂, pH-Wert, Serum-Natrium sowie -Kalium und -Kreatinin, Hämatokrit, Leukozytenzahl, Glasgow Coma Scale.

Der APACHE II Score wird aus den Punktwerten der genannten klinischen Parameter, des Alters und der zugrundeliegenden Vorerkrankungen (u.a. bei Herzinsuffizienz Grad 4, Leberzirrhose, COPD, künstliche Beatmung, chronisches Nierenversagen) summiert (s. Abb. 4).

Von der eigentlichen Definition des Scores (Berechnung für die ersten 24 Stunden seit Intensivstationsaufnahme) abweichend, wurde der APACHE II Score zusätzlich für den Zeitpunkt d0 kalkuliert, um zu Therapiebeginn von Aciclovir eine Einschätzung der Krankheitsschwere treffen zu können.

Temp Punkte 1 4 30 3 32 2 34 1 36 0 38,5 1 39 3 41 4	MAP Punkte 1 4 50 2 70 0 110 2 130 3 180 4	HF Punkte 1 4 40 3 55 2 70 0 110 2 140 3 180 4	AF Punkte 1 4 6 2 10 1 12 0 25 1 35 3 50 4	Je nach FIO2 FIO2 >=0,5 AaDo2 Punkte 1 0 200 2 350 3 500 4 FIO2 <0,5 Pao2 Punkte 1 4 55 3 61 1 70,000001 0	Aus Order "Daten": alle Einzelwerte mit Max./Min 1) Temp 2) HF 3) AF 4) PaO2 5) HCO3
Ph Punkte 1 4 7,15 3 7,25 2 7,33 0 7,5 1 7,6 3 7,7 4	Na Punkte 1 4 111 3 120 2 130 0 150 1 155 2 160 3 180 4	K Punkte 1,00 4 2,50 2 3,00 1 3,50 0 5,50 1 6,00 3 7,00 4	Krea Punkte 0,01 2 0,60 0 1,50 2 2,00 3 3,50 4	Aus Exceldatei "Baseline" 1) Alter	Aus Exceldatei "Datenanalyse" 1) MAP 2) AaDO2 3) GCS
Hk Punkte 0,001 4 0,2 2 0,3 0 0,46 1 0,5 2 0,6 4	Leukos Punkte 0,001 4 1 2 3 0 15 1 20 2 40 4	GCS Punkte 3 12 4 11 5 10 6 9 7 8 8 7 9 6 10 5 11 4 12 3 13 2 14 1 15 0	Alter Punkte 1 0 45 2 55 3 65 5 75 8	Aus Exceldatei "Laborwerte" 1) Na 2) K 3) Krea 4) Hk 5) Leukos	
HCO3 Punkte 1 4 15 3 18 2 22 0 32 1 41 3 52 4					

Abbildung 4 Scoreberechnung APACHE II

2.7.2 Lung Injury Score

Murray et al. entwickelten 1988 den Lung Injury Score (LIS) für das Akute Lungenversagen, das ab einem Punktwert über 2,5 als ARDS definiert wurde (Murray et al. 1988). Als Korrelat eines interstitiellen Lungenödems und einer damit einhergehenden Störung des Gasaustausches wird der Oxygenierungsindex berücksichtigt. Der oft zur Kompensation einer Gasaustauschstörung erhöhte positive endexpiratorische Druck (PEEP) findet ebenfalls Berücksichtigung im Punktesystem. Die Schwere des Lungenparenchym-Schadens wird von der Lungendehnbarkeit (Compliance) erfasst (Lamy et al. 1976). Zusätzlich fließen radiologische Lungenkonsolidierungen ein (s. Abb. 5).

PaO ₂ /FiO ₂	PEEP	Compliance	Radiolog. Score
1	1	1	0
100	6	20	1
175	9	40	2
225	12	60	3
300	15	80	4

Abbildung 5 Scoreberechnung LIS

2.7.3 Simplified Clinical Pulmonary Infection Score

Anstelle des Originalscores (Pugin *et al.* 1991) wurde ein von Luna et al. vereinfachter/simplified Clinical Pulmonary Infection Score (sCPIS) ohne Bewertung der bakteriologischen Kultur angewandt (Luna *et al.* 2003). Ebenfalls kürzten Luna et al. die Bewertung des respiratorischen Sekrets (wenig, moderat, viel, eitrig) und reduzierte den ursprünglichen Score um die Kategorie der Leukozyten-Beurteilung (> fünf Prozent Bandformen). Als Parameter berücksichtigt wurden die Körpertemperatur, die Leukozytenzahl, die Bewertung des Tracheobronchialsekretes, die Oxygenierungsfunktion der Lunge mit dem Oxygenierungsindex, das Vorliegen eines ARDS und eine Beurteilung des radiologischen Befundes (s. Abb. 6).

Temperatur	Leukos	Trachsek	Trachpus
30	1	0	0
36,1	4,01	1	1
38,5	11,01	2	2
39			

PaO ₂ /FiO ₂	ARDS	Radiol
1	0	1
241	1	2

Abbildung 6 Scoreberechnung simplified CPIS

2.7.4 Sequential Organ Failure Assessment Score

Der Sequential Organ Failure Assessment Score (SOFA) ist der am weitesten verbreitete Score, der die Ausprägung von Organdysfunktionen bewertet (Vincent *et al.* 1998). Ein Organversagen stärker berücksichtigend, wurde dieser Score zum Zentrum der neuen Sepsis-Definition gemäß Sepsis-3 (Singer *et al.* 2016). Die Oxygenierungsfunktion der Lunge wird mittels des Oxygenierungsindex, eine Störung des Gerinnungssystems mittels der Thrombozytenzahl beurteilt. Die Leberfunktion wird anhand von Bilirubin und die Kreislagsituation anhand des mittleren arteriellen Drucks (MAP) sowie des Bedarfs an Noradrenalin eingeschätzt. Störungen des zentralen Nervensystems werden durch die Glasgow Coma Scale und die Nierenfunktion über das Serum-Kreatinin bzw. die Urin-Tagesmenge abgebildet.

Im Summenscore zählt der schlechteste Wert innerhalb von 24 Stunden (s. Abb. 7).

PaO₂/FiO₂ 1 4 101 3 201 2 301 1 401 0	Thrombos 1 4 21 3 51 2 101 1 151 0	Bilirubin 0,001 0 1,2 1 2,6 2 6 3 12 4	MAP 1 1 70 0
NOA 0,00001 3 0,10001 4	GCS Punkte 3 4 6 3 10 2 13 1 15 0	Krea 0,01 0 1,2 1 2 2 3,5 3 5 4	Urin 1 4 200 3 500 0

Abbildung 7 Scoreberechnung SOFA

2.8 Analyse der radiologischen Lungenaufnahmen

2.8.1 Radiologischer Lungenstatus zum Zeitpunkt des HSV-Nachweises

Retrospektiv wurde anhand digital archivierter Befundberichte aus der Radiologie beurteilt, ob pulmonale Infiltrate zeitnah zur Baseline (d0) beschrieben worden waren. Als festes Definitionskriterium einer Pneumonie-Diagnose wurde bei fehlendem Infiltrat alternativ der schriftliche Befund der Bronchoskopie herangezogen.

2.8.2 Radiologische Aufnahmen im Verlauf bei hoher Viruslast

Für die Subpopulation mit hoher Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) wurden vorhandene Röntgen Thorax-Bildgebungen bzw. Computertomographien der Lunge im Verlauf fachärztlich nach dem standardisierten Schema des LIS- und CPIS-Score und einem selbst entwickelten Score bewertet:

1) **Radiologische Komponente des CPIS** (Clinical Pulmonary Infection Score):

- 1 Punkt = keine Infiltrate
- 2 Punkte = lückenhafte oder diffuse Infiltrate
- 3 Punkte = lokalisierte Infiltrate

2) **Radiologische Komponente des LIS** (Lung Injury Score):

- 0 Punkte = keine alveoläre Verschattung
- 1 Punkt = alveoläre Verschattung in einem Quadranten
- 2 Punkte = alveoläre Verschattung in zwei Quadranten
- 3 Punkte = alveoläre Verschattung in drei Quadranten
- 4 Punkte = alveoläre Verschattung in vier Quadranten

3) Der **selbst entwickelte Score** unterteilte die Lunge nicht in vier Quadranten, sondern in sechs Lungenfelder und bewertete diese folgendermaßen:

- 1 Punkt = keine Infiltrate
- 2 Punkte = diskrete/fragliche Infiltrate
- 3 Punkte = deutliche Infiltrate

Das Ergebnis bildete die Summe der Punktwerte der sechs Lungenfelder:

(z.B. bei Infiltraten in lediglich zwei Lungenfeldern: $2 \times 3 \text{ Punkte} + 4 \times 1 \text{ Punkt} = 10$)

2.9 Klinische Endpunkte

Primärer Endpunkt

Als primärer Endpunkt wurde die Sterblichkeit auf Intensivstation von Personen mit einer HSV- Pneumonie in Abhängigkeit von einer Aciclovir-Therapie untersucht.

Sekundäre Endpunkte

Ausgewählte klinische Parameter (Katecholaminbedarf, Leukozyten, Oxygenierungsindex) wurden als sekundäre Endpunkte im klinischen Verlauf unter bzw. ohne Aciclovir-Therapie für beide Subgruppen bewertet. Eine Auswertung der verfügbaren radiologischen Lungenaufnahmen erfolgte ausschließlich für die Subgruppe mit hoher Viruslast.

2.10 Statistische Auswertung

2.10.1 Statistiksoftware R

Nach der Aufbereitung der in Excel-Tabellen vorhandenen Daten wurden diese mit neuen Fallnummern anonymisiert, in eine CSV-Datei umgewandelt und in das Open Source Statistikprogramm R (Version 3.5.0) importiert (R Core Team). Die ebenfalls frei verfügbare

graphische Benutzeroberfläche *RStudio* (Version 1.1.447) wurde bei der Anwendung der Programmiersprache *R* verwendet (RStudio Team). Für statistische Berechnungen und die Erstellung von Graphiken kamen folgende R-Zusatzpakete (sog. „packages“) zum Einsatz: „*survival*“ (Therneau T 2015), „*survminer*“ (Kassambara & Kosinski 2018), „*ggplot2*“ (Wickham 2016), „*exactRankTests*“ (Hothorn & Hornik 2017), „*PMCMRplus*“ (Pohlert 2018).

2.10.2 Einteilung in Subgruppen

Für die Unterteilung in zwei Subgruppen wurde der von Linssen et al. 2008 publizierte Grenzwert von 10^5 Kopien/ml HSV-1 herangezogen (Linssen et al. 2008).

Als **Subgruppe mit hoher Viruslast** wurde definiert: PCR $>10^5$ HSV-Kopien/ml.

Als **Subgruppe mit niedriger Viruslast** war definiert: PCR = $10^3 - 10^5$ HSV-Kopien/ml.

Die gleichen statistischen Methoden wurden zuerst für die gesamte Studienpopulation und nachfolgend für die beiden Subgruppen angewandt. Dabei wurden jeweils Personen ohne Aciclovir mit denjenigen mit Aciclovir verglichen.

2.10.3 Deskriptive Statistik

Mittels graphischer Darstellung der Daten als Streudiagramme und Boxplots wurden Ausreißer identifiziert und einer Plausibilitätskontrolle unterzogen. Manuelle Eingabefehler wurden im Abgleich mit den Rohdaten korrigiert.

Zur Erstellung der Baseline-Tabelle wurden Tests auf Normalverteilung der Daten durchgeführt und diese graphisch mit Histogrammen überprüft. Eine Normalverteilung war nur in wenigen Fällen gewährleistet und machte die Anwendung des Mann-Whitney-U Test notwendig, der als nichtparametrischer Test anstelle von Mittelwerten Mediane verwendet. Für den Vergleich dichotomer Variablen wurde der Fischer's Exact Test gewählt.

2.10.4 Überlebenszeitanalyse

Im nächsten Schritt wurde eine Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse für das Überleben auf Intensivstation in Abhängigkeit vom Aciclovir-Therapiestatus angewandt. Bei Verlegung von Intensivstation auf Normalstation endete der Nachbeobachtungszeitraum, so dass dieser Datenpunkt als zensiert gewertet wurde. Mittels des Log-Rank-Tests wurden die Überlebenskurven vergleichend bewertet.

Mögliche Störfaktoren wie Alter, Geschlecht und der SOFA Score wurde im anschließenden multivariablen Cox-Regressionsmodell berücksichtigt. Die Einhaltung der für die Cox-Regression obligaten Proportionalitätsannahme, der sog. „proportional hazard ratio assumption“ wurde mit dem Schönfeld-Residuen-Test überprüft.

In weiteren Cox-Regressionsmodellen wurden Kovariablen wie APACHE II Score, COPD, HSV-Viruslast und ein Propensity Score mit einbezogen. Der Propensity Score wurde

mittels logistischer Regression berechnet und als „inverse probability of treatment weighting“ Schätzung (Kuss *et al.* 2016) in das Cox-Modell integriert.

2.10.5 Subgruppenanalyse mit Viruslast-Grenzwerten bei 10^4 , 10^5 und 10^6 HSV-Kopien

Zur Evaluation des von Linssen *et al.* 2008 publizierten Grenzwertes von 10^5 HSV-1 Kopien/ml (Linssen *et al.* 2008) wurden zwei zusätzliche Subgruppenanalysen mit einer davon abweichenden Viruslast-Grenzwerten bei 10^4 und 10^6 Kopien/ml durchgeführt. Analog zur Subgruppen-Unterteilung bei 10^5 Kopien/ml wurden für diese neuen Subgruppen weitere Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen und multivariable Cox-Regressionsmodelle unter Einbezug des Alters, des Geschlechts und des SOFA Score berechnet.

2.10.6 Klinische Parameter im longitudinalen Verlauf

Die Auswertung klinischer Verlaufsparemeter für die Subgruppen machte eine Umwandlung in ein longitudinales Datenformat notwendig. Bei der Dateneingabe waren alle Zeitpunkte (d-4 bis d14) durch den Tag des HSV-Nachweises definiert. Für die longitudinale Auswertung wurden nachträglich die Zeitpunkte aller Aciclovir-Behandelten – mit Tag 0 (d0) als Tag des Therapiestarts – entsprechend um die Tage zwischen Therapiebeginn mit Aciclovir und HSV-Nachweis verschoben (vgl. Abb. 1).

Aufgrund fehlender Normalverteilung kam der gepaarte nichtparametrische Friedman-Test ausschließlich für Personen zur Anwendung, für die an allen acht Tagen (d0 – d7) ein Verlaufswert existierte. Ein signifikantes Testergebnis weist auf einen signifikanten Unterschied zwischen zumindest zwei Messzeitpunkten hin. Zwischen welchen diese Signifikanz bestand, konnte mittels des Friedman-Conover-Post-hoc-Tests im zweiten Schritt herausgefunden werden. Aufgrund multipler Vergleiche von verschiedenen Kombinationen kam eine p-Wert Adjustierung (sog. „false discovery rate“) zum Einsatz.

2.10.7 Auswertung der radiologischen Veränderungen

Die Subgruppe mit einer hohen Viruslast erhielt eine Auswertung des neu entwickelten radiologischen Scores im Verlauf. Aufgrund der sehr heterogenen und teilweise nicht vorhandenen radiologischen Verlaufsuntersuchungen wurde ein gepaarter nichtparametrischer Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test durchgeführt:

Verglichen wurde ein vor dem Tag 0 vorhandener Wert mit dem am meisten veränderten Wert im Zeitraum von drei bis zu 15 Tagen danach.

Um den selbst entwickelten Score mit dem LIS Score zu validieren, wurde für die gleichen Zeitpunkte zusätzlich die radiologische Komponente des LIS Scores erhoben und in einer separaten Analyse ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Patientenauswahl und Erregersuche

Im Analysezeitraum vom 1. Januar 2013 bis zum 1. April 2018 erhielten auf Augsburger Intensivstationen 29,6 Prozent der auf HSV-1/-2 getesteten Personen (126 von 425) ein positives PCR-Ergebnis ($>10^3$ Kopien/ml). Wie Abbildung 8 zeigt, lag eine hohe Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) bei 69 Betroffenen für HSV-1 sowie einmal für HSV-2 vor. Von initial 126 Patienten wurden 37 hauptsächlich wegen klinischem Ansprechen auf eine antibiotische Therapie oder fehlender Immunkompetenz von der retrospektiven Analyse ausgeschlossen. Das endgültige Studienkollektiv umfasste 89 Personen, davon 59 mit hoher und 30 mit niedriger Viruslast.

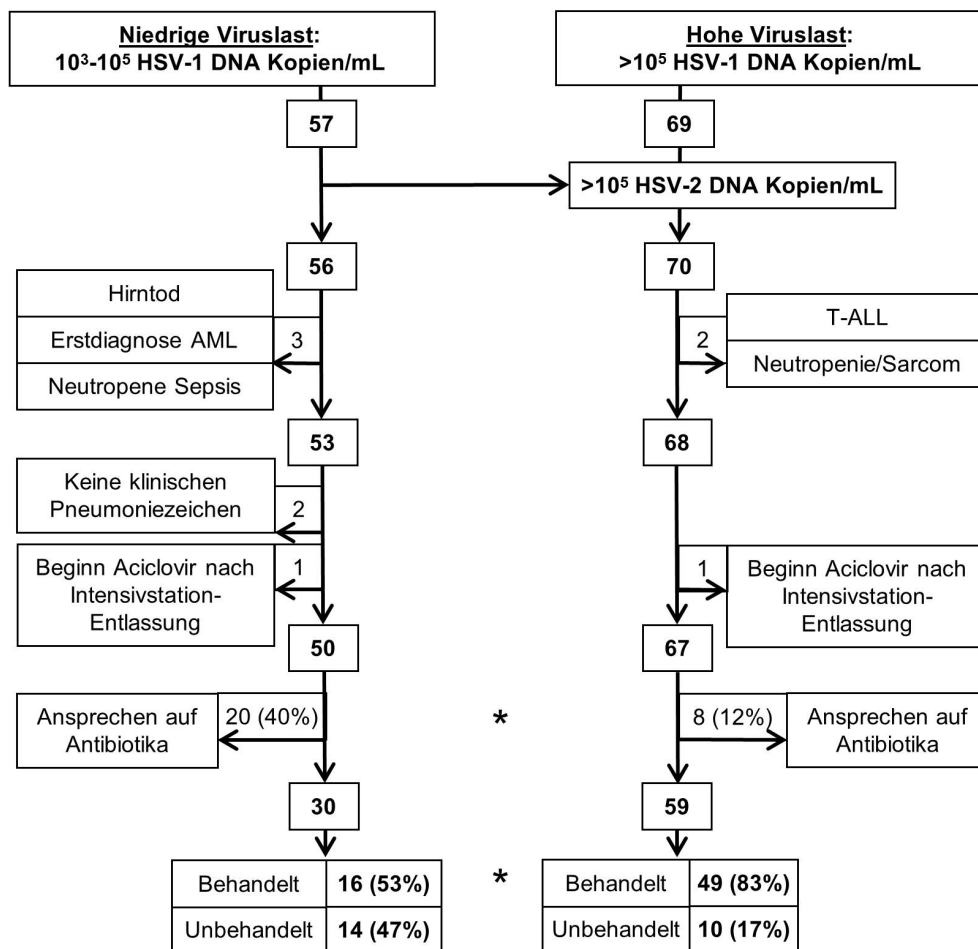


Abbildung 8 Diagramm zum Ein- & Ausschluss von Studienpatient*innen, nach (Schuierer *et al.* 2020)

HSV-1/-2 wurde aus respiratorischem Material von Intensivpatient*innen mittels Real-Time-PCR quantifiziert. Angabe der Personenzahl in Kästchen und statistischer Signifikanz ($p < 0,05$) als *.

Signifikant mehr Betroffene mit niedriger Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml) sprachen auf eine antibiotische Therapie an (40 vs 12 Prozent; $p=0,001$). Diese wurden von den weiteren Analysen ausgeschlossen, da von einer bakteriellen Pneumonie-Ursache auszugehen war. Betroffene mit niedriger Viruslast erhielten zu 53 Prozent (16/30) signifikant seltener Aciclovir als Personen mit hoher Viruslast zu 83 Prozent (49/59).

Im selben respiratorischen Material des HSV-Nachweises waren bei 22 Betroffenen bakterielle Erreger mikrobiologisch identifizierbar (s. Anhang Tabelle 6), die in allen Fällen adäquat antibiotisch therapiert wurden (s. Anhang Tabelle 7). Die bei 61 Personen zusätzlich durchgeführten Multiplex-PCR-Testungen ergab in der Mehrzahl der Fälle keinen Hinweis auf weitere Pneumonie-Erreger. Bei 11 Prozent (7 von 61) der Getesteten war Influenza A und bei jeweils drei Prozent (2 von 61) war Influenza B bzw. Pneumokokken mittels PCR nachweisbar (s. Tabelle 4), was jedoch nicht zum Studien-Ausschluss führte.

3.2 Quantitative HSV-1/-2-Nachweise

3.2.1 HSV-Viruslast im Zeitverlauf

Alle HSV-Nachweise ab dem Jahr 2013 sind in Abbildung 9 chronologisch entlang der x-Achse dargestellt. Die HSV-Viruslast wurde als dekadischer Logarithmus auf der y-Achse aufgetragen. Bei homogener Verteilung der Viruslast ist eine saisonale Häufung der HSV-Nachweise in der kühleren Jahreshälfte um den Jahreswechsel (± 90 Tage) und eine insgesamt hohe Intensivstations-Sterblichkeit (rot) erkennbar.

Auffallend ist eine erhöhte Behandlungsrate mit Aciclovir (Dreiecke) bei den Erkrankten, bei denen eine Viruslast von mehr als 10^5 Kopien pro ml nachweisbar war. Dies spiegelt die Umsetzung des hausinternen Therapie-Algorithmus wider.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, waren für einen Teil der Betroffenen Verlaufsmessungen der Viruslast vorhanden. Bei niedriger Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml, s. Abb. 10a) waren deutlich weniger Verlaufsmessungen verfügbar.

Bei hoher Viruslast (s. Abb. 10b) gab es für Unbehandelte keine Verlaufsmessungen, jedoch existierten einige Verlaufsmessungen für Aciclovir-Behandelte. Trotz der sehr variabel durchgeführten Verlaufsmessungen zeigt sich eine deutliche Abnahme der Viruslast unter Aciclovir-Therapie und eine Tendenz zu langsamerem Abfall der Viruslast bei Personen, die auf Intensivstation verstarben.

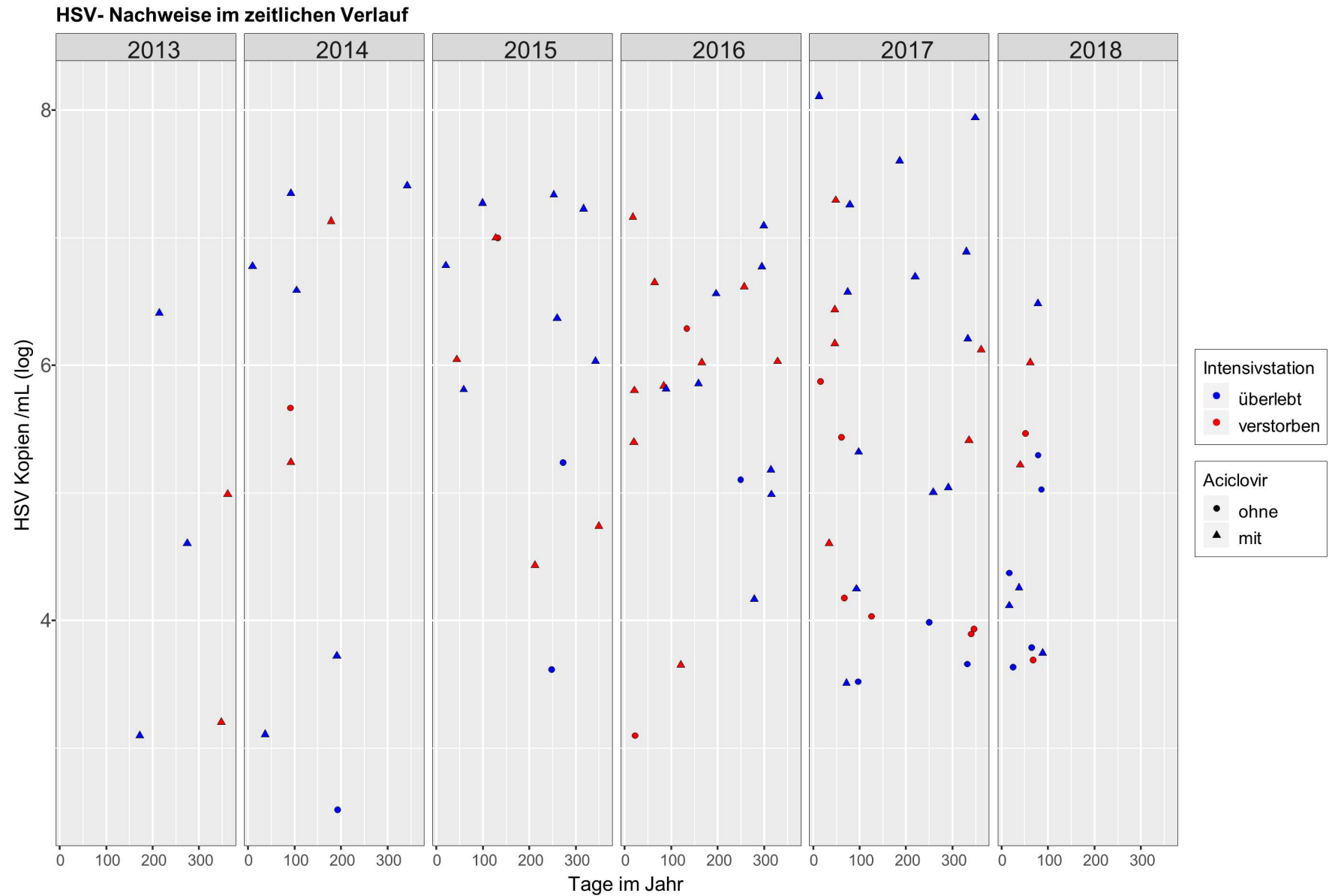
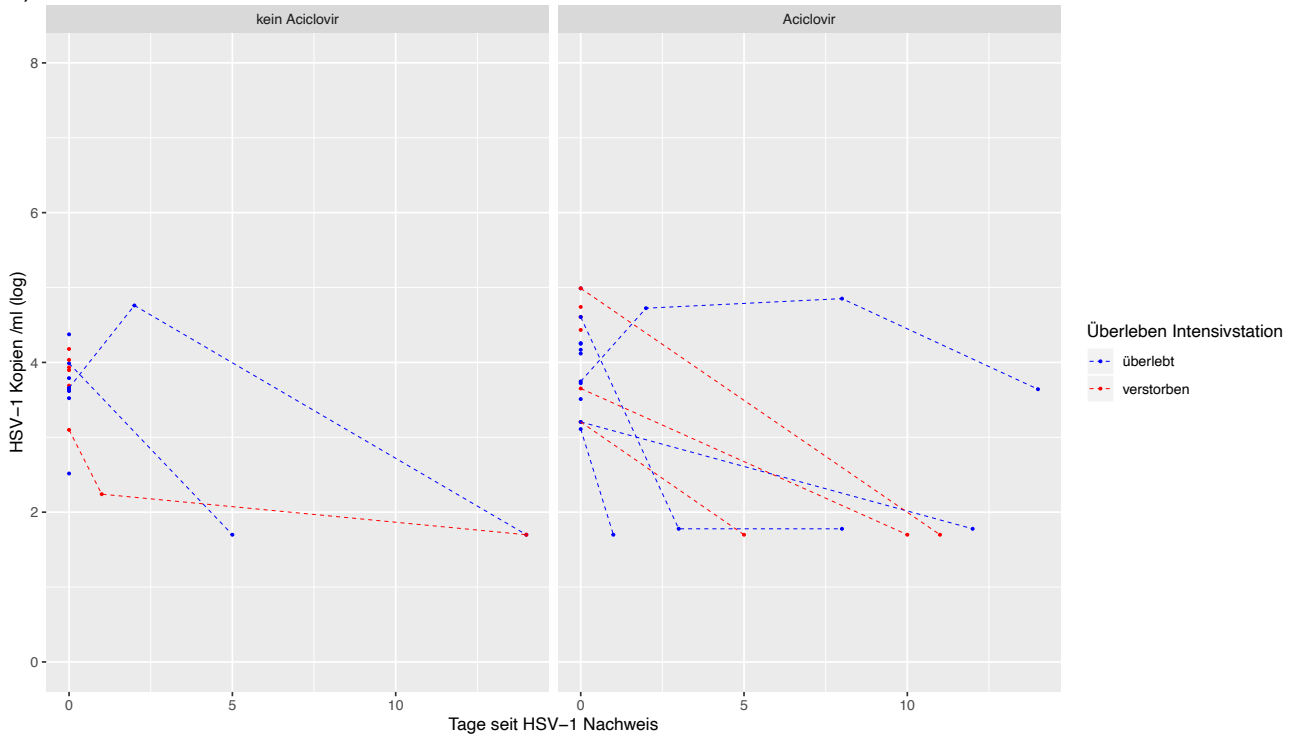


Abbildung 9 Chronologische Darstellung der HSV-Viruslast vom 1.1.2013 bis 1.4.2018 nach Überleben/Versterben auf Intensivstation und Aciclovir-Therapie.

a) Niedrige Viruslast



b) Hohe Viruslast

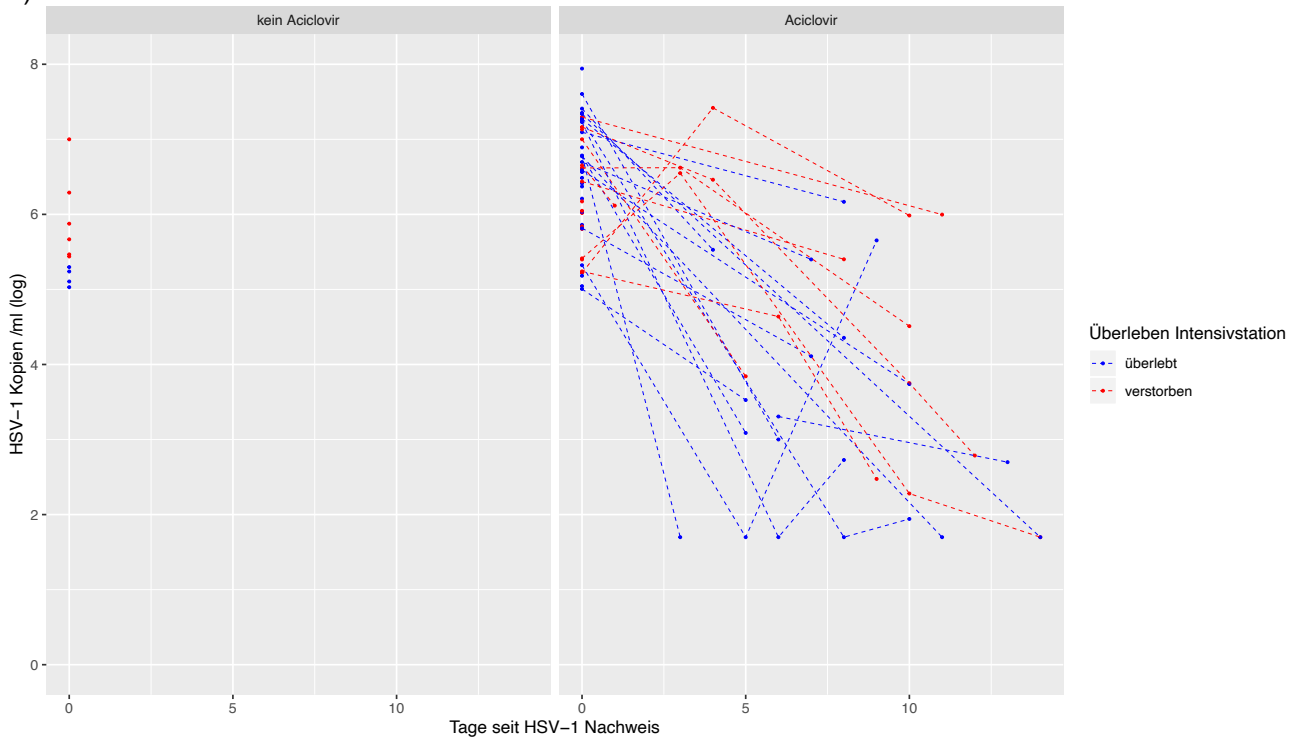


Abbildung 10 Entwicklung der HSV-1 Viruslast in Verlaufsuntersuchungen

a) Subgruppe mit niedriger respiratorischer Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml)

b) Subgruppe mit hoher respiratorische Viruslast ($>10^5$ Kopien HSV/ml)

3.2.2 HSV-Viruslast nach Materialart

Wie bereits in Tabelle 4 aufgeführt, erbrachte in den meisten Fällen eine bronchoskopisch gewonnene BAL den HSV-Nachweis:

- in 71 Prozent der gesamten Studienpopulation
- in 83 Prozent der Subgruppe mit niedriger Viruslast
- in 64 Prozent der Subgruppe mit hoher Viruslast

Als alternatives Material kam Tracheobronchialsekret zum Einsatz. In der gesamten Studienpopulation wurden im Tracheobronchialsekret eher höhere Viruslasten gemessen als in der BAL (s. Abb. 11a); in den Subgruppen war dieser Unterschied jedoch wesentlich schwächer und nicht signifikant (s. Abb. 11b-c).

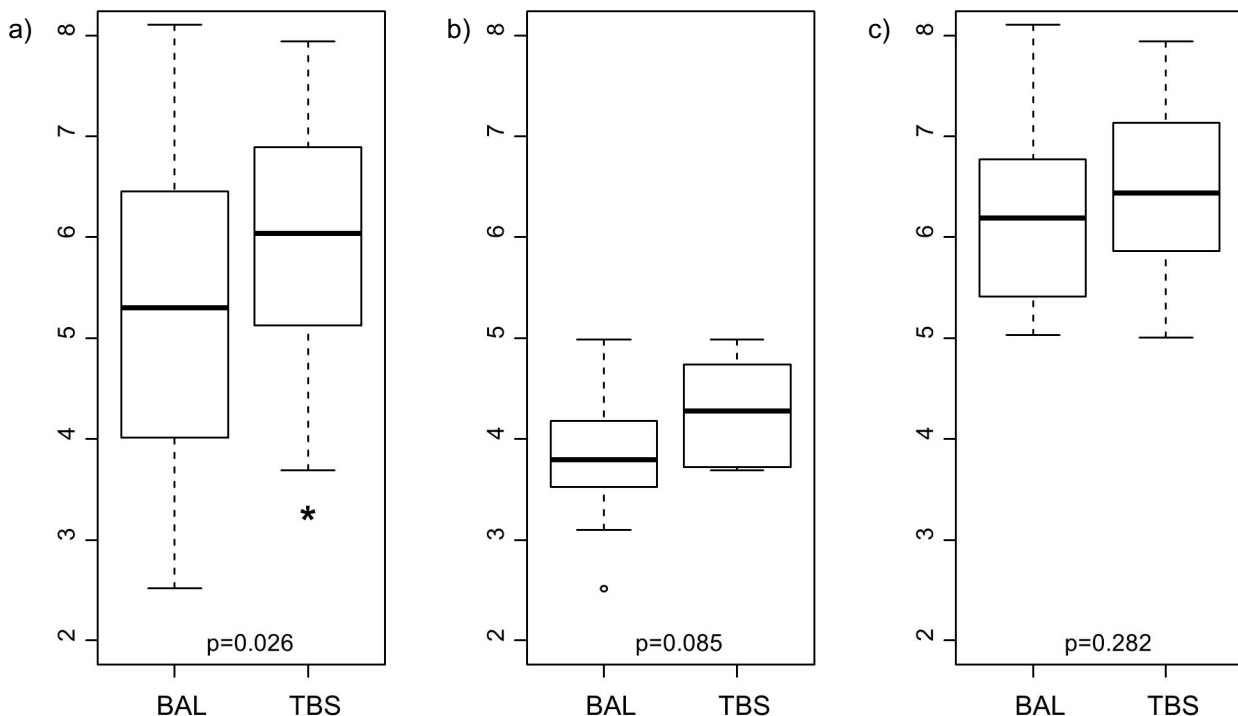


Abbildung 11 Einfluss der Materialart auf die HSV-Viruslast, nach (Schuierer *et al.* 2020)

a) Gesamte Studienpopulation

b) Subgruppe mit niedriger respiratorischer Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml)

c) Subgruppe mit hoher respiratorischer Viruslast ($>10^5$ Kopien HSV/ml)

BAL= bronchoalveoläre Lavage, TBS= Tracheobronchialsekret

*: Statistisch signifikant mit $p < 0,05$.

3.2.3 HSV-Viruslast in zeitlicher Relation zum Infiltratnachweis

Die Abbildung 12 zeigt die Viruslast in Abhängigkeit vom Zeitraum zwischen radiologischem Nachweis pulmonaler Infiltrate und erstmaligem HSV-Nachweis. Eine lineare Regression zeigte keinen statistisch signifikanten Zusammenhang ($p=0,13$).

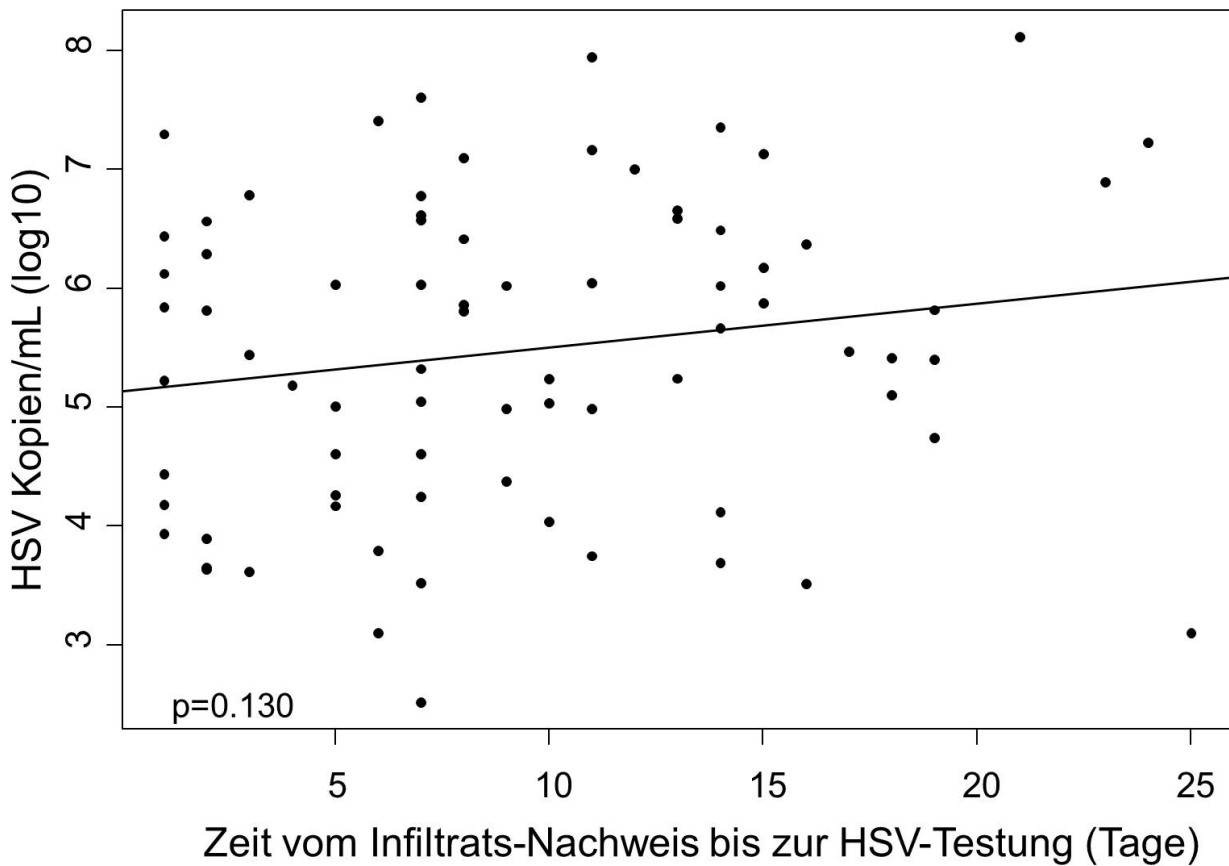


Abbildung 12 Viruslast in zeitlicher Relation zum Infiltratnachweis, nach (Schuierer *et al.* 2020)

Nach Ausschluss einer Person, bei der erst 52 Tage nach Infiltratnachweis eine hohe Viruslast nachgewiesen wurde, wurden alle 78 Personen mit nachgewiesenen Infiltraten berücksichtigt.

3.3 Demographische und klinische Patientencharakteristika

Alle erhobenen Patientencharakteristika wurden zum Zeitpunkt der gewerteten HSV-Nachweise in Tabelle 4 aufgeführt. Innerhalb der gesamten Studienpopulation und der beiden Subgruppen (mit niedriger bzw. hoher Viruslast) wurden jeweils unbehandelte Personen den Aciclovir-Behandelten gegenübergestellt.

Die meisten signifikanten Unterschiede (fettgedruckte p-Werte in Tabelle 4) waren bei der Gesamtbetrachtung der Studienpopulation festzustellen: Unbehandelte hatten im Median niedrigere HSV-Nachweise ($0,13$ vs $10,78 \times 10^5$ Kopien/ml; $p < 0,001$) und waren häufiger an COPD erkrankt (50 vs 20 Prozent; $p = 0,008$). Zusätzlich wurden sie seltener tracheotomiert (12 vs 38 Prozent; $p = 0,022$), hatten kürzere Intubationszeiten (9 vs 13 Tage; $p = 0,017$) und verblieben kürzere Zeit auf Intensivstation (16 vs 26 Tage; $p = 0,010$) sowie im Krankenhaus (26 vs 41 Tage; $p = 0,004$). Ein signifikanter Unterschied bestand auch bei der Anzahl an verwendeten Antibiotika-Klassen (3,5 vs 5; $p = 0,025$), der antibiotischen Behandlungsdauer (15 vs 18 Tage; $p = 0,046$) und der Verwendung einer Ceftazidim-Antibiose zum Zeitpunkt des Virusnachweises (0 vs 18 Prozent; $p = 0,031$). Die deskriptive Statistik erwies keine

weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen der Gesamtkohorte, auch nicht hinsichtlich der absoluten Krankenhaussterblichkeit (54 vs 45 Prozent; $p=0,634$).

Bei der Subgruppe mit niedriger respiratorischer Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml) bestanden – mit Ausnahme des höheren Anteils an COPD-Erkrankten bei Unbehandelten (50 vs 13 Prozent; $p=0,046$) – keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und Therapiegruppe.

In der Subgruppe mit hoher respiratorischer Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) unterschieden sich Unbehandelte von Aciclovir-Behandelten um den Faktor 10 in der nachgewiesenen Viruslast ($2,84 \times 10^5$ vs $3,06 \times 10^6$ Kopien/ml; $p<0,001$). Signifikante Unterschiede zeigten sich in einem niedrigeren Anteil an eindeutigen radiologischen Infiltraten (50 vs 84 Prozent; $p=0,033$) sowie einer kürzeren Antibiotika- Therapiedauer (12 vs 17 Tage; $p=0,045$) bei unbehandelten Personen. Auch wiesen Unbehandelte signifikant kürzere Intensivstations- (15 vs 26 Tage; $p=0,006$) bzw. Krankenhausverweildauern (24 vs 41 Tage; $p=0,008$) auf.

Tabelle 4 Demographische und klinische Parameter zum Baseline-Zeitpunkt (d0)

	Gesamte Studienpopulation			Niedrige Viruslast ($<10^5$ HSV-Kopien/ml)			Hohe Viruslast ($>10^5$ HSV-Kopien/ml)		
	- Aciclovir n=24	+ Aciclovir n=65	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=14	+ Aciclovir n=16	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=10	+ Aciclovir n=49	p-Wert [95%-KI]
Alter	72 [67–76]	69 [59–76]	0,2739 [-3–9]	69 [61–77]	65 [46–75]	0,3082 [-6–21]	73 [71–76]	71 [60–76]	0,1866 [-3–12]
BMI	27,9 [26,1–29,4]	26,1 [22,5–30,9]	0,2927 [-1,48–4,39]	28,0 [23,2–29,3]	25,8 [22,6–30,5]	0,7901 [-3,6–4,9]	27,9 [27,3–30,9]	26,7 [22,0–31,0]	0,2440 [-1,80–6,66]
Frauenanteil	12 (50%)	23 (35%)	0,2304 [0,63–5,24]	9 (64%)	4 (25%)	0,0634 [0,90–35,08]	3 (30%)	19 (39%)	0,7293 [0,10–3,46]
Charlson-Score	4 [3–6]	4 [2–6]	0,2814 [-1–2]	4 [3–6]	3 [3–5]	0,1793 [-1–3]	4 [3–6]	4 [2–6]	0,7434 [-2–3]
Begleiterkrankungen	10,5 [8,5–14,0]	10 [8–12]	0,4702 [-2–3]	11 [9–15]	10 [8–12]	0,3469 [-2–5]	11 [8–13]	10 [8–13]	0,9084 [-3–3]
Lungen-Erkrankung	15 (62%)	31 (48%)	0,2407 [0,18–1,57]	9 (64%)	10 (63%)	1 [0,16–5,20]	6 (60%)	21 (43%)	0,4881 [0,09–2,45]
COPD	12 (50%)	13 (20%)	0,0079 [0,08–0,77]	7 (50%)	2 (13%)	0,0457 [0,01–1,09]	5 (50%)	11 (22%)	0,1156 [0,06–1,54]
Aktivraucher	6 (25%)	18 (28%)	1 [0,36–4,11]	4 (29%)	5 (31%)	1 [0,18–7,47]	2 (20%)	13 (27%)	1 [0,24–15,62]
Herz-erkrankung	16 (67%)	41 (63%)	0,8082 [0,27–2,51]	8 (57%)	8 (50%)	0,73 [0,14–3,95]	8 (80%)	33 (67%)	0,708 [0,04–3,05]
Leber-erkrankung	5 (21%)	14 (22%)	1 [0,30–4,21]	4 (29%)	3 (19%)	0,6746 [0,07–4,38]	1 (10%)	11 (22%)	0,6697 [0,3–124,4]
Diabetes mellitus	6 (25%)	13 (20%)	0,7712 [0,22–2,79]	4 (29%)	3 (19%)	0,6746 [0,07–4,38]	2 (20%)	10 (20%)	1 [0,16–11,40]
Maligne Erkrankung	3 (12%)	10 (15%)	1 [0,24–6,73]	2 (14%)	2 (13%)	1 [0,05–11,56]	1 (10%)	8 (16%)	1 [0,15–72,67]
Neurolog. Erkrankung	6 (25%)	16 (25%)	1 [0,30–3,54]	3 (21%)	7 (44%)	0,2602 [0,46–21,44]	3 (30%)	9 (18%)	0,4094 [0,10–3,80]
Rheuma-Erkrankung	4 (17%)	9 (14%)	0,7423 [0,20–3,99]	2 (14%)	5 (31%)	0,3992 [0,34–33,17]	2 (20%)	4 (8%)	0,2664 [0,04–4,65]
Nieren-versagen	15 (62%)	29 (45%)	0,1572 [0,16–1,39]	10 (71%)	6 (38%)	0,0813 [0,04–1,39]	5 (50%)	23 (47%)	1 [0,18–4,39]
Dialyse	7 (29%)	19 (29%)	1 [0,33–3,34]	5 (36%)	7 (44%)	0,722 [0,26–7,92]	2 (20%)	12 (24%)	1 [0,21–14,13]
Z.n. großer OP	5 (21%)	9 (14%)	0,5134 [0,16–2,63]	2 (14%)	0	0,2092 [0,00–4,58]	3 (30%)	9 (18%)	0,4094 [0,10–3,80]
Z.n. Notfall OP	4 (17%)	8 (12%)	0,7274 [0,17–3,55]	1 (7%)	2 (13%)	1 [0,09–117,8]	3 (30%)	6 (12%)	0,17 [0,05–2,53]
Aufnahmegrund Intensivstation									
Sepsis	14 (58%)	26 (40%)	0,1526 [0,16–1,36]	9 (64%)	9 (56%)	0,722 [0,13–3,90]	5 (50%)	17 (35%)	0,477 [0,11–2,69]
Respirator. Insuffizienz	22 (92%)	58 (89%)	1 [0,07–4,40]	14 (100%)	14 (88%)	0,4851 [0,00–6,05]	8 (80%)	44 (90%)	0,3383 [0,18–16,46]
Z.n. Reanimation	2 (8%)	4 (6%)	0,6589 [0,10–8,53]	1 (7%)	1 (6%)	1 [0,01–73,16]	1 (10%)	3 (6%)	0,5345 [0,04–34,20]
Beatmungssituation an Tag des HSV-Nachweises									
Invasive Beatmung	13 (54%)	39 (60%)	0,6362 [0,44–3,61]	8 (57%)	10 (63%)	1 [0,23–6,85]	5 (50%)	29 (59%)	0,7292 [0,29–7,18]
Horowitz Index	180,3 [117–212]	186,9 [147–224]	0,2095 [-55,5–15,8]	159,9 [111–211]	180,4 [145–222]	0,2701 [-84,5–28,9]	180,3 [159–199]	187,2 [151–225]	0,7219 [-63,1–43,6]
PEEP in cmH ₂ O	8,3 [8–11]	10 [8–12]	0,2618 [-2,38–0,50]	10,0 [8–11]	10,8 [8–12]	0,2759 [-3,47–0,98]	8 [8–8]	10 [8–12]	0,2795 [-4,00–0,75]
Trachealsekret eitrig	11 (46%)	28 (43%)	1 [0,35–3,70]	5 (36%)	7 (44%)	0,4136 [0,35–18,17]	6 (60%)	21 (43%)	0,4452 [0,04–2,94]

	Gesamte Studienpopulation			Niedrige Viruslast ($<10^5$ HSV-Kopien/ml)			Hohe Viruslast ($>10^5$ HSV-Kopien/ml)		
	- Aciclovir n=24	+ Aciclovir n=65	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=14	+ Aciclovir n=16	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=10	+ Aciclovir n=49	p-Wert [95%-KI]
Läsionen im Mundbereich dokumentiert	9 (38%)	18 (28%)	0,6039 [0,24–2,26]	6 (43%)	6 (38%)	1 [0,15–4,39]	3 (30%)	12 (24%)	1 [0,15–6,00]
Beatmung während des Intensivaufenthaltes									
Intubations-tage gesamt	9 [6–12]	13 [8–17]	0,0174 [-8–0]	9 [6–12]	12 [7–18]	0,3238 [-10–4]	10 [7–11]	14 [9–17]	0,1094 [-9–2]
Bauch-lagerung	3 (12%)	20 (31%)	0,1044 [0,78–17,94]	2 (14%)	7 (44%)	0,1184 [0,63–53,75]	1 (10%)	13 (27%)	0,4208 [0,4–150,3]
Tracheo-tomie	3 (12%)	25 (38%)	0,0215 [1,14–25,54]	2 (14%)	7 (44%)	0,1086 [0,70–60,92]	1 (10%)	18 (37%)	0,1446 [0,6–241,3]
ECMO	0	4 (6%)	0,5706 [0,24–∞]	0	2 (13%)	0,4851 [0,17–∞]	0	2 (4%)	1 [0,04–∞]
Antivirale Behandlung während des Intensivaufenthaltes									
Aciclovir	–	63 (97%)	–	–	14 (88%)	–	–	49 (100%)	–
Gangciclovir	–	3 (5%)	–	–	2 (13%)	–	–	1 (2%)	–
Stunden von Test positiv bis Therapie	–	46 [30–68]	–	–	48 [31–95]	–	–	44 [30–67]	–
Aciclovir + Antibiotika	–	44 (68%)	–	–	11 (69%)	–	–	33 (67%)	–
Erfasste Steroid- und Antibiotika-Therapie									
Steroid Vortherapie	4 (17%)	13 (20%)	1 [0,33–5,89]	2 (14%)	6 (38%)	0,2255 [0,47–42,37]	2 (20%)	7 (14%)	0,6411 [0,10–7,78]
Steroid Stoßtherapie	14 (58%)	30 (46%)	0,3467 [0,57–4,75]	8 (57%)	5 (31%)	0,2685 [0,53–16,99]	6 (60%)	25 (51%)	0,7342 [0,30–7,80]
Meropenem (an Tag 0)	12 (50%)	23 (35%)	0,2304 [0,19–1,58]	8 (57%)	6 (38%)	0,4642 [0,08–2,42]	4 (40%)	17 (35%)	0,7328 [0,17–4,40]
Ciprofloxacin (an Tag 0)	0	5 (8%)	0,3181 [0,33–∞]	0	2 (13%)	0,4851 [0,17–∞]	0	3 (6%)	1 [0,08–∞]
Linezolid (an Tag 0)	2 (8%)	14 (22%)	0,2171 [0,60–28,32]	1 (7%)	1 (6%)	1 [0,01–73,16]	1 (10%)	13 (27%)	0,4249 [0,37–153,1]
Ceftazidim (an Tag 0)	0	12 (18%)	0,0314 [1,11–∞]	0	2 (13%)	0,4851 [0,17–∞]	0	10 (20%)	0,1859 [0,47–∞]
Pip/Taz (an Tag 0)	7 (29%)	10 (15%)	0,2221 [0,13–1,60]	5 (36%)	3 (19%)	0,6776 [0,06–3,45]	2 (20%)	7 (14%)	0,6411 [0,10–7,78]
Moxifloxacin (an Tag 0)	2 (8%)	9 (14%)	0,7203 [0,33–18,00]	1 (7%)	4 (25%)	0,3359 [0,34–229,2]	1 (10%)	5 (10%)	1 [0,10–53,68]
Imipenem (an Tag 0)	0	6 (9%)	0,1852 [0,43–∞]	0	2 (13%)	0,4851 [0,17–∞]	0	4 (8%)	1 [0,13–∞]
Tage gesamt Antibiotika	14,5 [9,3–23,3]	18 [14–28]	0,0464 [-11–0]	20,0 [6,8–26,3]	26 [18–37]	0,0942 [-20–3]	11,5 [10,0–17,3]	17 [13–25]	0,0445 [-11–0]
Antibiotika-Klassen	3,5 [2–5]	5 [3–6]	0,0254 [-3–0]	3,5 [2,0–5,5]	6 [4–6]	0,0507 [-4–0]	3,5 [2,0–4,8]	5 [3–6]	0,1243 [-3–1]
Kreislaufunterstützung durch Katecholamine									
Noradrenalin	23 (96%)	63 (95%)	1 [0,02–27,39]	13 (93%)	15 (94%)	1 [0,01–96,56]	10 (100%)	48 (98%)	1 [0,00–190,5]
Tage gesamt Noradrenalin	10 [5–13]	10 [7–19]	0,523 [-6–3]	11 [4–12]	8 [6–20]	0,8469 [-9–6]	8 [6–14]	11 [8–18]	0,5048 [-7–4]

	Gesamte Studienpopulation			Niedrige Viruslast ($<10^5$ HSV-Kopien/ml)			Hohe Viruslast ($>10^5$ HSV-Kopien/ml)		
	- Aciclovir n=24	+ Aciclovir n=65	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=14	+ Aciclovir n=16	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=10	+ Aciclovir n=49	p-Wert [95%-KI]
Molekularbiologische PCR-Testung									
BAL durchgeführt	18 (75%)	45 (69%)	0,7934 [0,42–4,72]	12 (86%)	13 (81%)	1 [0,13–19,09]	6 (60%)	32 (65%)	0,7328 [0,16–4,40]
HSV-Kopien pro ml ($\times 10^5$)	0,13 [0,05–2,18]	10,78 [1,01–60,15]	<0,001 [-3'058'170– -164'843]	0,06 [0,04–0,09]	0,16 [0,04–0,4]	0,0845 [-29'670– 900]	2,84 [1,80–6,80]	30,69 [7,26–124,20]	<0,001 [-5'901'600– -451'000]
HSV-Kopien pro ml ($\times 10^5$) in BAL	0,09 [0,04–2,18]	10,50 [0,41–41,55]	<0,001 [102'020– 3'060'420]	0,05 [0,04–0,09]	0,13 [0,03–0,27]	0,2051 [-2'535– 22'572]	2,37 [1,45–2,89]	28,30 [6,77–83,50]	0,0046 [345'900– 9'706'901]
HSV-Kopien pro ml ($\times 10^5$) in TBS	3,19 [0,61–15,79]	19,29 [6,50–143,9]	0,1082 [-363'600– 13'526'300]	0,14 [0,10–0,19]	0,55 [0,34–0,76]	0,40 [-8'940– 92'745]	12,08 [3,92–39,63]	44,85 [10,5–169,2]	0,2373 [-1'848'600– 17'715'000]
CMV positiv	4/18 (22%)	10/49 (20%)	1 [0,21–4,57]	2/10 (20%)	2/14 (14%)	1 [0,04–11,17]	2/8 (25%)	8/35 (23%)	1 [0,12–10,71]
CMV-Kopien pro ml ($\times 10^3$)	3,18 [0,2–12,3]	33,15 [2,4–106,5]	0,1968 [-961'710– 5'857]	15,63 [7,8–23,4]	45,08 [22,6–67,6]	1 [-90,039– -31,139]	3,18 [1,73–4,62]	33,15 [6,33–324,5]	0,2267 [-4,239,710– 5,857]
Influenza A positiv	1/18 (6%)	6/43 (14%)	0,6624 [0,29–134,1]	1/11 (9%)	0/10	1 [0,00–42,90]	0/7	6/33 (18%)	0,5671 [0,24– ∞]
Influenza B positiv	2/18 (11%)	0/43	0,0836 [0,00–2,18]	1/11 (9%)	0/10	1 [0,0–42,90]	1/7 (14%)	0/33	0,175 [0,00–8,27]
Pneumokokken	2/17 (12%)	0/43	0,0768 [0,00–2,05]	1/12 (8%)	0/10	1 [0,0–42,55]	1/5 (20%)	0/32	0,1351 [0,00–6,09]
Körpertemperatur und Laborparameter am Tag des HSV-Nachweises									
Temperatur in °C	37,5 [37,1–38,1]	37,3 [36,7–37,9]	0,2243 [-0,16–0,65]	37,5 [37,3–38,0]	37,5 [36,9–38,2]	0,5665 [-0,51–0,82]	37,0 [36,7–38,1]	37,2 [36,7–37,8]	0,8323 [-0,53–0,73]
CRP mg/dl	10,4 [6,1–17,0]	10,9 [6,7–19,3]	0,8871 [-3,90–3,75]	10,0 [8,8–22,3]	12,3 [8,8–19,1]	1 [-7,03–7,86]	10,8 [5,5–15,6]	9,5 [6,7–19,5]	0,6999 [-5,92–5,27]
Leukozytenzahl /nl	11,8 [9,5–18,5]	12,9 [8,6–18,5]	0,7089 [-2,85–4,20]	13,8 [9,3–24,6]	15,2 [9,2–17,4]	0,7319 [-5,36–9,78]	11,5 [9,5–17,4]	12,6 [8,6–18,7]	0,9762 [-4,02–4,08]
GFR <60 in ml/min/1,73m ²	38,70 [31–45]	45,5 [23–55]	0,2841 [-13,9–6,5]	38,1 [29–47]	48,4 [47–50]	0,149 [-25,6–3,0]	39,3 [31,6–44,4]	43,2 [17,8–55,2]	0,6718 [-15,1–14,9]
Laktat in mmol/l	1,3 [1,1–2,5]	1,3 [1,0–1,6]	0,2713 [-0,13–0,55]	1,3 [1,1–3,3]	1,2 [1,0–1,6]	0,1297 [-0,14–1,79]	1,1 [1,0–1,8]	1,3 [1,0–1,6]	0,9955 [-0,42–0,50]
Klinischer Score in den ersten 24h nach Intensivstationsaufnahme									
APACHE II	36 [23–39]	30 [23–37]	0,282 [-3–8]	35 [23–39]	30 [26–31]	0,3073 [-5–11]	38 [25–39]	30 [22–38]	0,5005 [-6–10]
Klinische Scores am Tag des HSV-Nachweises									
Glasgow	4 [3–8]	7 [3–12]	0,4275 [-4–1]	4 [3–9]	4 [3–14]	0,7438 [-4–1]	6 [3–7]	8 [3–12]	0,5853 [-6–2]
Coma Scale	-3 [-4–-1]	-3 [-4–-1]	0,4777 [-2–1]	-3 [-5–-1]	-3 [-4–0]	0,3717 [-3–1]	-3 [-4–1,25]	-2,5 [-4–1]	0,98 [-2–2]
APACHE II	31 [25–37]	27 [22–33]	0,0815 [-1–8]	31 [25–37]	26 [21–34]	0,2192 [-4–11]	31 [28–36]	27 [22–33]	0,2227 [-3–8]
SOFA	11 [7–13]	10 [6–11]	0,0907 [-1–4]	11 [8–14]	10 [6–11]	0,3246 [-3–5]	10 [8–13]	9 [6–11]	0,2942 [-2–5]
LIS	2,0 [1,4–2,8]	2,3 [1,9–3,0]	0,0497 [-0,83–0,00]	2,0 [1,5–2,8]	2,2 [2,0–3,0]	0,1336 [-1,0–0,25]	1,8 [1,1–2,6]	2,3 [1,8–3,0]	0,1229 [-1,3–0,25]
CPIS	5 [3–6]	5 [3–6]	0,4549 [-1–2]	5 [4–5]	4 [3–5]	0,5191 [-1–2]	6 [3–7]	5 [3–6]	0,4015 [-1–3]

	Gesamte Studienpopulation			Niedrige Viruslast ($<10^5$ HSV-Kopien/ml)			Hohe Viruslast ($>10^5$ HSV-Kopien/ml)		
	- Aciclovir n=24	+ Aciclovir n=65	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=14	+ Aciclovir n=16	p-Wert [95%-KI]	- Aciclovir n=10	+ Aciclovir n=49	p-Wert [95%-KI]
Klinische Scores zum Therapiebeginn mit Aciclovir bzw. HSV-Nachweis (bei Unbehandelten)									
APACHE II	31 [25–37]	28 [23–32]	0,1327 [-1–7]	31 [25–37]	25 [21–33]	0,1623 [-3–12]	31 [28–36]	29 [23–32]	0,3342 [-3–8]
SOFA	11 [7–13]	8 [5–12]	0,0903 [-1–5]	11 [8–14]	10 [5–11]	0,2252 [-2–6]	10 [8–13]	8 [5–12]	0,2991 [-2–5]
Radiologische Infiltratnachweise									
Eindeutiges Infiltrat	16 (66%)	54 (83%)	0,1427 [0,12–1,39]	11 (79%)	13 (81%)	1 [0,09–7,71]	5 (50%)	41 (84%)	0,0330 [0,04–1,10]
Infiltrat fragl., aber pathol. bronchoskop. Befunde	4 (17%)	5 (8%)	0,2441 [0,43–12,26]	1 (7%)	1 (6%)	1 [0,01–96,46]	3 (30%)	4 (8%)	0,0868 [0,56–34,66]
Kein Infiltrat, aber pathol. bronchoskop. Befunde	4 (17%)	6 (9%)	0,4489 [0,37–9,23]	2 (14%)	2 (13%)	1 [0,07–18,32]	2 (20%)	4 (8%)	0,2664 [0,22–23,32]
Tage von Infiltrat bis HSV-Testung	7 [3–11]	8 [5–14]	0,3183 [-1–5]	6 [2–8]	8 [5–13]	0,1258 [-9–1]	12 [8–16]	8 [5–14]	0,4417 [-5–8]
Röntg.-Aufn. 4 vor bis 14 Tage nach HSV-Testung	4 [3–6]	4 [3–6]	0,3716 [-2–1]	4 [3–6]	5 [3–6]	0,7099 [-3–2]	3 [3–5]	4 [3–6]	0,2862 [-3–1]
Personen mit CT-Thorax	6 (25%)	13 (20%)	0,7712 [0,36–4,47]	5 (36%)	1 (6%)	0,0725 [0,71–418,6]	1 (10%)	12 (24%)	0,4324 [0,01–3,00]
Personen mit HR-CT	3 (13%)	11 (17%)	0,7508 [0,11–3,04]	3 (27%)	4 (25%)	1 [0,10–6,14]	0	7 (14%)	0,5901 [0,00–3,49]
Intensivstationsaufenthalt und Krankenhausverweildauer									
Chirurgische Intensiv	4 (17%)	7 (11%)	0,4787 [0,14–3,13]	1 (7%)	1 (6%)	1 [0,01–73,16]	3 (30%)	6 (12%)	0,17 [0,05–2,53]
Internistische Intensiv	20 (83%)	58 (89%)	0,4787 [0,14–3,13]	13 (93%)	15 (94%)	1 [0,01–73,16]	7 (70%)	43 (88%)	0,17 [0,05–2,53]
Tage gesamt auf Intensiv	16 [10–28]	26 [17–32]	0,0098 [-15– -1]	17 [6–31]	25 [16–31]	0,3279 [-17–6]	15 [12–17]	26 [17–32]	0,0057 [-19– -2]
Tage gesamt Krankenhaus	26 [17–38]	41 [26–56]	0,0042 [-15– -1]	31 [19–43]	38 [27–51]	0,1759 [-26–6]	24 [16–34]	42 [26–56]	0,0075 [-32– -4]
Intensivstations- und Krankenhaus-Sterblichkeit									
Intensiv-Sterblichkeit	12 (50%)	26 (40%)	0,4718 [0,23–1,91]	6 (43%)	6 (38%)	1 [0,15–4,39]	6 (60%)	20 (41%)	0,3112 [0,09–2,26]
Krankenhaus-Sterblichkeit	13 (54%)	30 (46%)	0,6335 [0,25–2,06]	7 (50%)	7 (44%)	1 [0,15–4,10]	6 (60%)	23 (47%)	0,5062 [0,11–2,88]
30-Tages-Sterblichkeit	14 (58%)	27 (42%)	0,2307 [0,17–1,45]	6 (43%)	6 (38%)	1 [0,15–4,39]	8 (80%)	21 (43%)	0,0419 [0,02–1,10]
HSV: Herpes Simplex Virus, COPD: Chronisch obstruktive Lungenkrankheit, Z.n.: Zustand nach, ECMO: Extrakorporale Membranoxygenierung, BAL: bronchoalveoläre Lavage, TBS: Tracheobronchialsekret, CMV: Zytomegalie-Virus, RASS: Richmond Agitation Sedation Scale APACHE II: "Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II", SOFA: "Sequential Organ Failure Assessment", LIS: "Lung Injury Score", CPIS: "Clinical Pulmonary Infection Score", pathol. bronchoskop. Befunde: pathologische bronchoskopische Befunde, Röntg.-Aufn.: Röntgen Aufnahmen, CT: Computertomographie, HR-CT: Hochauflösende Computertomographie									
Mediane mit [Interquartilsabstand], ∞=Unendlichkeit, signifikante p-Werte <0,05 wurden in Fettschrift hervorgehoben.									

3.4 Aciclovir-Therapie und Intensivstations-Sterblichkeit

Als primärer Studienendpunkt wurde die Sterblichkeit auf Intensivstation in Abhängigkeit von einer Aciclovir-Therapie untersucht. Statistisch gesehen gab es keinen signifikanten Unterschied in der absoluten Intensivstations-Sterblichkeit zwischen behandelten und unbehandelten Personen (40 vs 50 Prozent, $p=0,472$).

Wurde der Nachbeobachtungs-Zeitraum allerdings auf 30 Tage begrenzt, so wiesen Aciclovir-Behandelte gegenüber Unbehandelten in der Subgruppe mit hoher Viruslast eine signifikant geringere 30-Tages-Sterblichkeit (43% vs 80%; $p=0,042$) auf (s. Tabelle 4).

Aufgrund der hohen Heterogenität von Intensivpatient*innen und der unterschiedlich langen Intensivstations- und Krankenhaus-Verweildauern wurden weitere Überlebenszeitanalysen durchgeführt, die unter anderem die Entlassung von Intensivstation und das Überleben beeinflussende Kovariablen wie das Alter und Geschlecht sowie standardisierte intensivmedizinische Scores mitberücksichtigten.

3.4.1 Überlebenszeitanalysen nach Kaplan-Meier

In Abbildung 13 werden die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der Gesamtpopulation (Abb. 13a), der Niedrigviruslast- (Abb. 13b) und der Hochviruslast-Subgruppe (Abb. 13c) dargestellt. Ein Datenpunkt wurde als zensiert gewertet (mit Kreuz markiert), wenn mit einer Verlegung von Intensivstation auf Normalstation der Nachbeobachtungszeitraum endete.

Bei Analyse der Gesamtpopulation (Abb. 13a) zeigt die Kaplan-Meier-Kurve der Personen mit Aciclovir-Therapie zwar zu frühen Zeitpunkten ($<d20$) eine Tendenz zum besseren Überleben auf Intensivstation, allerdings war dies nicht statistisch signifikant ($p=0,26$).

Während bei der Gesamtbetrachtung nicht zwischen niedriger und hoher Viruslast differenziert wurde, zeigt Abbildung 13b die Subgruppenanalyse der Intensivpatient*innen mit niedriger Viruslast (10^3 bis 10^5 Kopien/ml): Bei unbehandelten- und Aciclovir-behandelten Personen verliefen die Intensivstations-Überlebenskurven ebenfalls nicht signifikant verschieden voneinander ($p=0,74$). Die Kontrollgruppe erreichte mit 31 Tagen gegenüber der Aciclovir-Therapiegruppe mit 26 Tagen nominell sogar eine längere mediane Überlebenszeit. Diese beschreibt den Zeitpunkt, zu dem die Hälfte der Intensivpatient*innen ohne Zensur bzw. Entlassung von Intensivstation noch am Leben war. Ein Vorteil durch eine antivirale Therapie ergab sich für die Subgruppe mit niedriger Viruslast folglich nicht.

Anders verhielt es sich in der Subgruppe von Personen mit einer Viruslast größer 10^5 Kopien/ml (Abb. 13c): Das mediane Überleben auf Intensivstation war bei Unbehandelten deutlich kürzer als bei Aciclovir-Behandelten (8 vs 22 Tage). Dies zeigte sich auch in einer frühen Auftrennung der Kaplan-Meier-Kurven und in einem statistisch signifikanten Unterschied des Intensivstations-Überlebens im Log-Rank-Test ($p=0,014$).

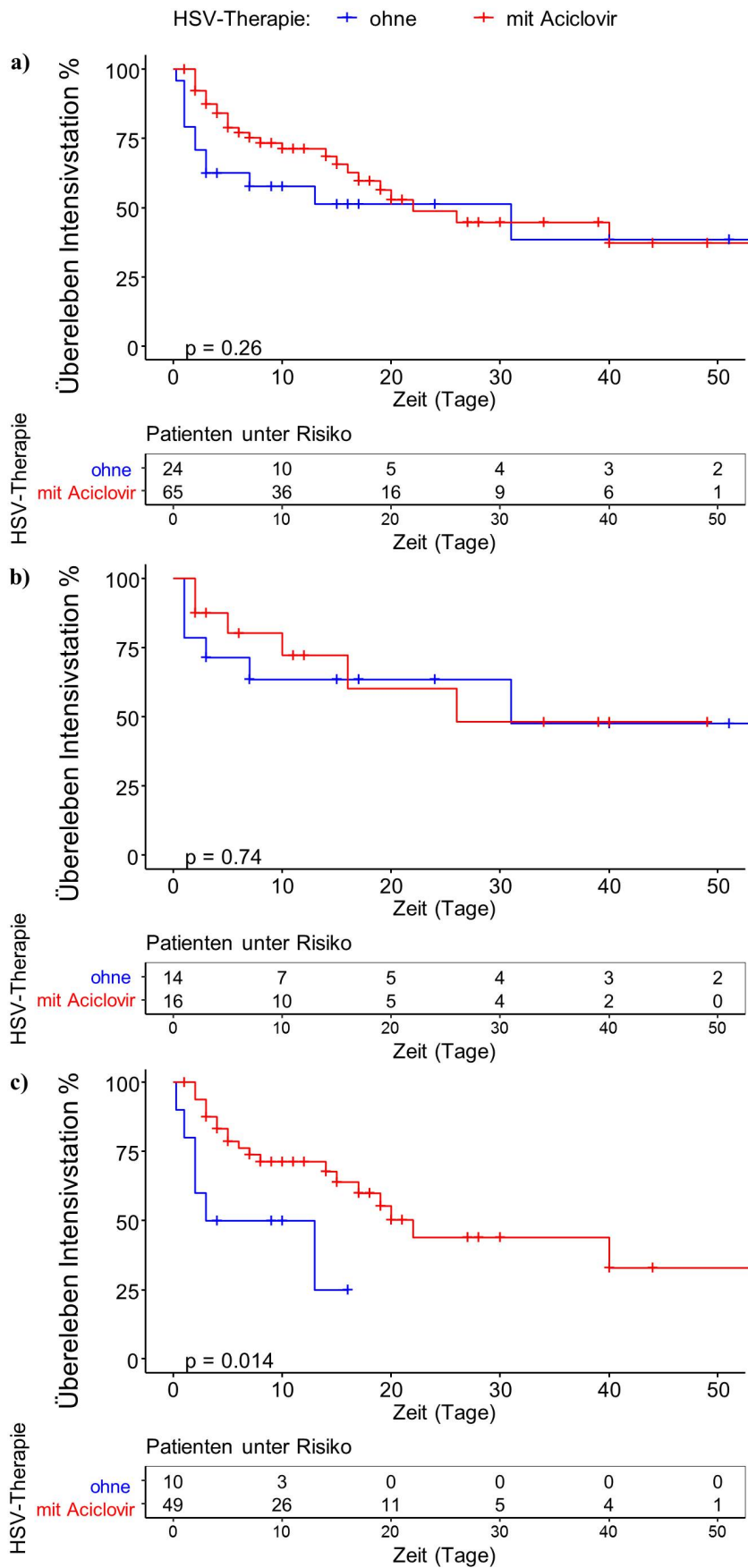


Abbildung 13 Kaplan-Meier-Kurven der Intensivstations-Überlebenszeit, nach (Schuierer *et al.* 2020)

a) Gesamtkollektiv; b) niedrige respiratorische HSV-Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml),

c) hohe respiratorische HSV-Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml)

p-Wert mittels Log-Rank-Test. + bedeutet Zensur bei Intensivstationsentlassung

3.4.2 Multivariable Cox-Regressionsanalyse

Während die Kaplan-Meier-Überlebensanalyse keine Störgrößen (engl. *Confounder*) berücksichtigte, erfolgte im Cox-Regressionsmodell eine Adjustierung nach den Kovariablen Alter, Geschlecht und SOFA Score. Bei der Testung der zugrundeliegenden Proportionalitätsannahme wurden die erforderlichen statistischen Voraussetzungen erfüllt. Der Quotient der momentanen Sterberate der Aciclovir-Behandelten gegenüber der Sterberate der Unbehandelten bildete die Hazard Ratio (HR). Werte kleiner 1 bedeuteten dabei ein geringeres, Werte größer 1 ein höheres Sterberisiko.

Analog zum bisherigen Vorgehen erfolgte zuerst für die gesamte Studienpopulation die Berechnung der HR für einen Tod auf Intensivstation (s. Abb. 14a). Dabei stellten unbehandelte Frauen die Referenzgruppe dar (HR= 1). Eine Aciclovir-Behandlung erreichte zwar eine HR von 0,73, beinhaltete jedoch im 95%-Konfidenzintervall (95%-KI: 0,37-1,5) eine HR von 1 und war damit nicht signifikant von der Referenzgruppe verschieden ($p=0,381$). Während der APACHE II Intensivscore, das Alter und Geschlecht im Modell keine signifikanten Effekte auf das Überleben zeigten, war ein höherer SOFA-Score ein signifikanter Risikofaktor für das Versterben auf Intensivstation (HR 1,22; 95%-KI: 1,09-1,4; $p < 0,001$).

Im Cox-Regressionsmodell der Subgruppe mit einer Viruslast kleiner 10^5 Kopien/ml hatte der SOFA-Score ebenfalls als einziger Risikofaktor einen signifikanten Effekt auf das Überleben auf Intensivstation (s. Abb. 14b).

Abbildung 14c zeigt die Cox-Regression für die Subgruppe mit hoher respiratorischer Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml): Das Risiko auf Intensivstation zu versterben, nahm mit ansteigendem SOFA Score wie bei der Gesamtkohorte und der Subgruppen mit niedriger respiratorischer Viruslast signifikant zu. Gleichzeitig gab es in der Subgruppe mit hoher Viruslast ein signifikant geringeres Sterberisiko unter Aciclovir im Vergleich zu Personen ohne Aciclovir (HR 0,31; 95%-KI: 0,11-0,92; $p=0,014$).

Trotz Adjustierung auf möglichen Störgrößen wie Alter, Geschlecht und SOFA Intensivscore bestätigte sich die geringere Sterblichkeit unter Aciclovir aus den Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalysen auch im multivariablen Regressionsmodell.

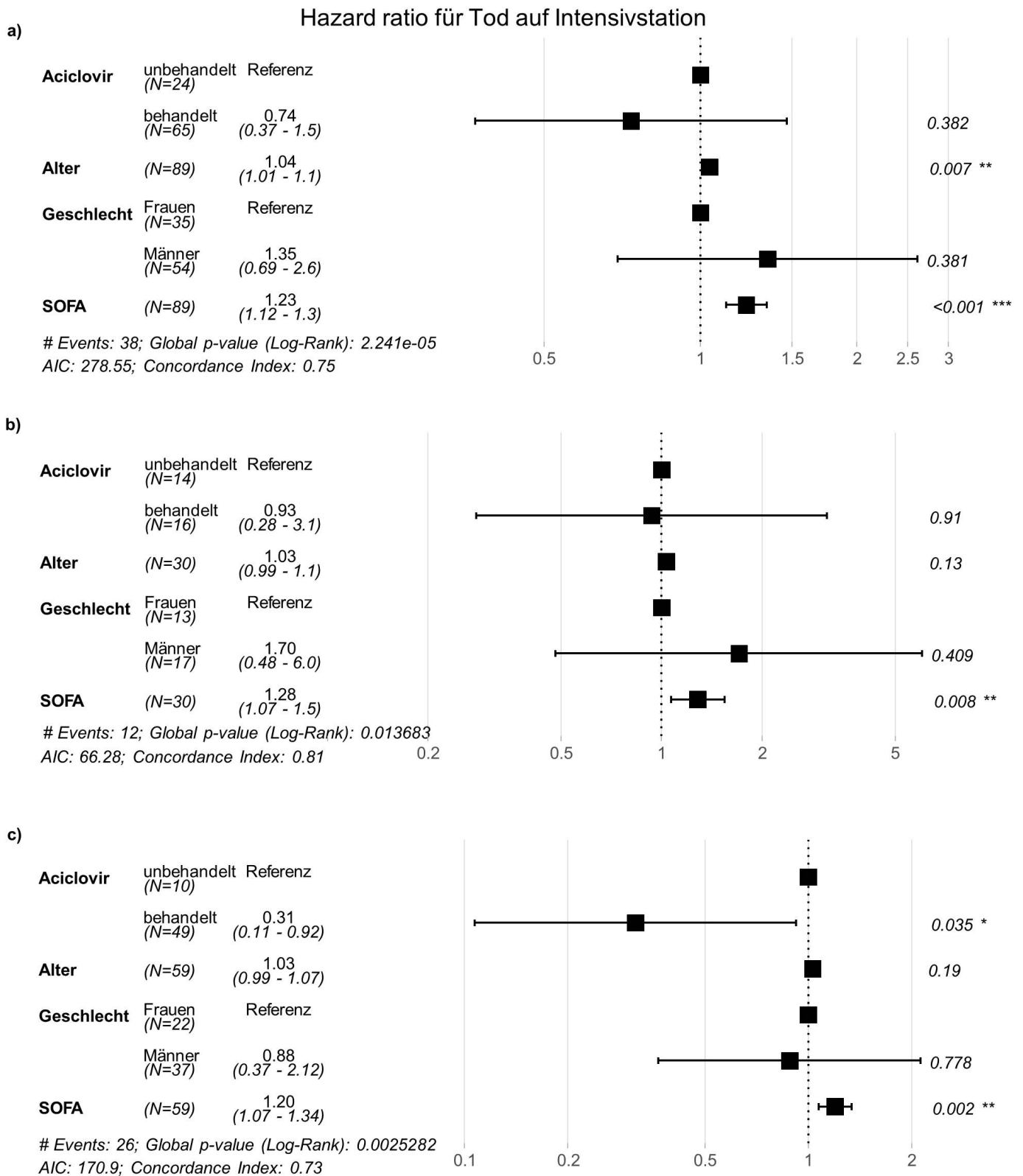


Abbildung 14 Cox-Regressionsmodelle der Intensivstations-Sterblichkeit, nach (Schuierer *et al.* 2020)

a) Gesamtkollektiv; b) niedrige respiratorische HSV-Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml),

c) hohe respiratorische HSV-Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml)

Statistische Signifikanz ist angegeben als * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$)

3.4.3 Weitere Cox-Regressionsmodelle mit Einbeziehung eines Propensity Scores

Zusätzliche Regressionsmodelle wurden berechnet, um weitere prognostisch relevante Variablen miteinzubeziehen, ohne dabei eine Überanpassung (engl. *overfitting*) des Regressionsmodells mit zu vielen Variablen zu riskieren. Zwischen den beiden Intensivscores SOFA und APACHE II bestand eine starke Korrelation (ca. 80%). Daher wurden diese Scores zur Vermeidung einer Multikollinearität separat berücksichtigt. Da die Entscheidung zur antiviralen Therapie komplett bei dem behandelnden ärztlichen Fachpersonal der Intensivstationen lag, wurde ein zusätzliches Cox-Regressionsmodell mit einem Propensity Score zur Reduktion selektionsbedingter Verzerrungen (engl. *selection bias*) berechnet.

In diesen weiterführenden Cox-Regressionsmodellen der Tabelle 5 bestätigte sich das zuvor beschriebene Cox-Regression-Hauptmodell, dessen Ergebnis wiederum im Einklang mit der Kaplan-Meier-Überlebenszeitanalyse stand:

Während Aciclovir in der Gesamtkohorte und in der Subgruppe mit niedriger respiratorischer Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml) zu keiner Verbesserung der Überlebenschancen auf Intensivstation führte, reduzierte eine Aciclovir-Therapie in der Subgruppe mit hoher respiratorischer Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml) die HR – das Risiko auf Intensivstation zu versterben – in allen berechneten Cox-Modellen.

Tabelle 5 Diverse Cox-Regressionen für einen Tod auf Intensivstation, nach (Schuierer *et al.* 2020)

	Aciclovir +		
	HR	95% CI	p
Gesamte Studienpopulation (n=89; 38 Ereignisse)			
Alter, Geschlecht, SOFA	0.74	0.37-1.47	0.38
Alter, Geschlecht, APACHE II	0.69	0.35-1.38	0.30
Alter, Geschlecht, SOFA + IPTW-Schätzung (Propensity Score)	0.69	0.39-1.20	0.18
Alter, Geschlecht, SOFA, COPD	0.57	0.27-1.22	0.14
Alter, Geschlecht, SOFA, HSV Viruslast	0.86	0.43-1.73	0.66
Subgruppe: Niedrige Viruslast ($\leq 10^5$ Kopien HSV/ml) (n=30, 12 Ereignisse)			
Alter, Geschlecht, SOFA	0.93	0.28-3.13	0.91
Alter, Geschlecht, APACHE II	0.93	0.29-2.95	0.89
Alter, Geschlecht, SOFA + IPTW-Schätzung (Propensity Score)	0.89	0.34-2.31	0.81
Alter, Geschlecht, SOFA, COPD	0.87	0.26-2.89	0.81
Alter, Geschlecht, SOFA, HSV Viruslast	0.51	0.11-2.33	0.38
Subgruppe: Hohe Viruslast ($>10^5$ Kopien HSV/ml) (n=59; 26 Ereignisse)			
Alter, Geschlecht, SOFA	0.31	0.11-0.92	0.03
Alter, Geschlecht, APACHE II	0.28	0.10-0.80	0.01
Alter, Geschlecht, SOFA + IPTW-Schätzung (Propensity Score)	0.29	0.12-0.70	0.00
Alter, Geschlecht, SOFA, COPD	0.17	0.05-0.61	0.00
Alter, Geschlecht, SOFA, HSV Viruslast	0.33	0.11-0.97	0.04

Die Hazard Ratios (HR) für einen Tod auf Intensivstation entstammen den aufgeführten Cox-Regressionsmodellen. Der im Hauptmodell neben Alter und Geschlecht verwendete SOFA Score wies eine hohe Korrelation zum APACHE II Score auf, weshalb diese Intensiv-Scores in separaten Modellen berücksichtigt wurden. Der mittels logistischer Regression erhobene Propensity Score wurde einem weiteren Regressionsmodell in Form einer speziellen Gewichtung "inverse probability of treatment weighting" (IPTW) hinzugefügt. Die letzten beiden Cox-Regressionsmodelle berücksichtigten das Vorliegen einer COPD und die quantitativ bestimmte Viruslast, da diese Charakteristika zur Baseline heterogen verteilt waren. Signifikante p-Werte **<0,05** wurden in Fettschrift hervorgehoben.

3.5 Überlebenszeitanalysen mit Grenzwerten bei 10^4 , 10^5 und 10^6 HSV-Kopien

Bei einer Variation der Viruslast-Grenzwerte (10^4 , 10^5 und 10^6 HSV-Kopien/ml, Abb. 15 a-c) war das Intensivstations-Überleben unter Aciclovir in den Kaplan-Meier-Kurven der Subgruppe mit einer Viruslast größer 10^4 Kopien/ml am eindeutigsten signifikant.

Der Vorteil dieses Grenzwertes bei 10^4 Kopien/ml gegenüber dem vorbeschriebenen Grenzwert bei 10^5 Kopien/ml (Linssen *et al.* 2008) relativierte sich in den Cox-Regressionen: Aciclovir reduzierte das Sterberisiko ähnlich signifikant (s. Abb. 16a vs 16b).

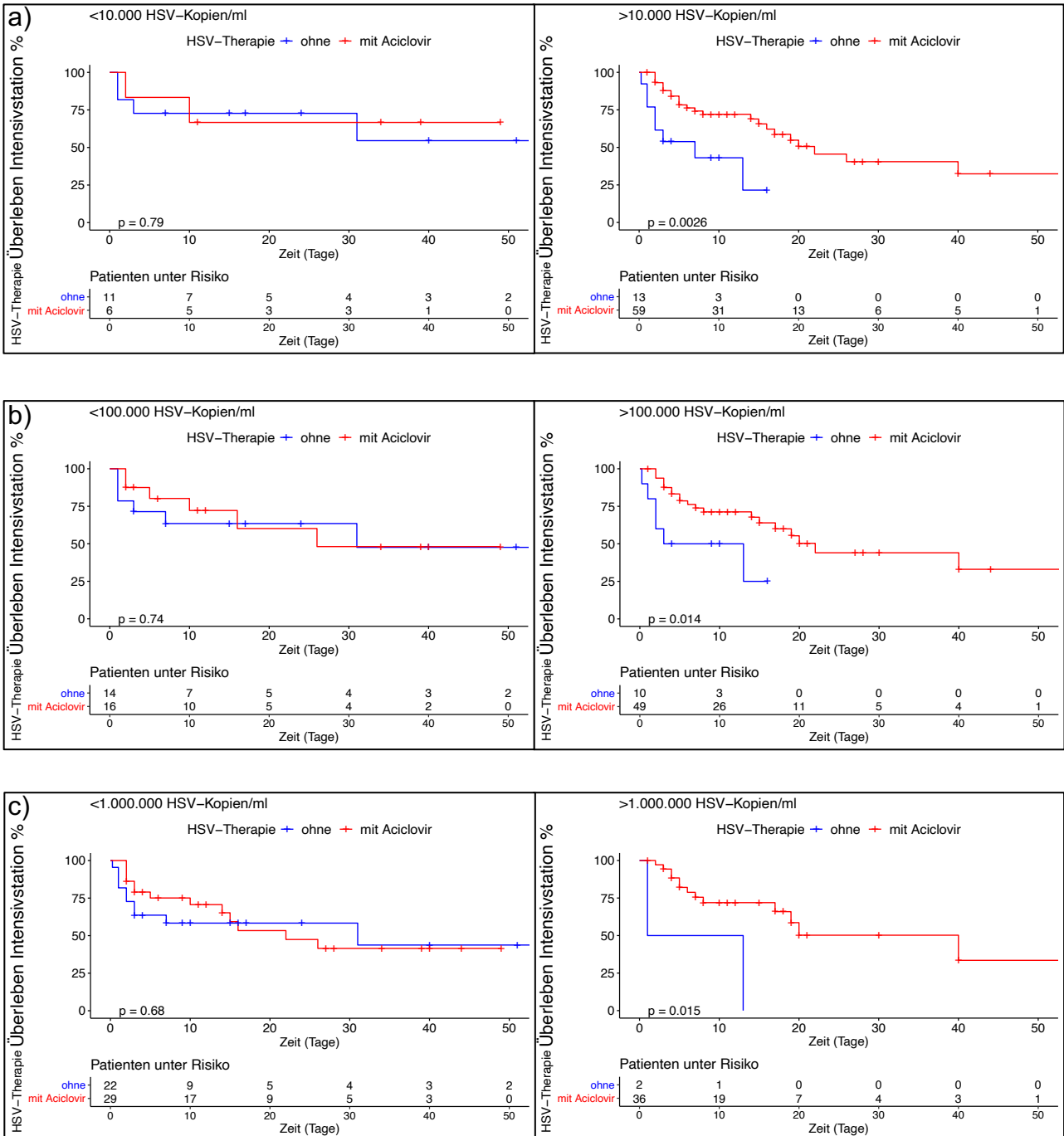
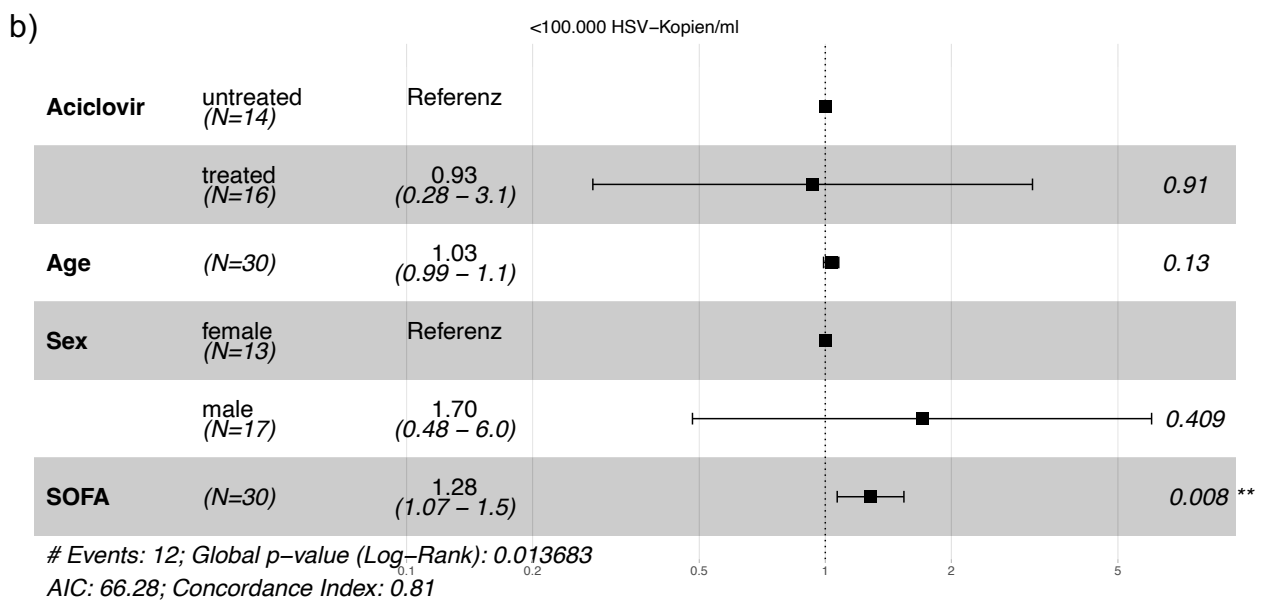
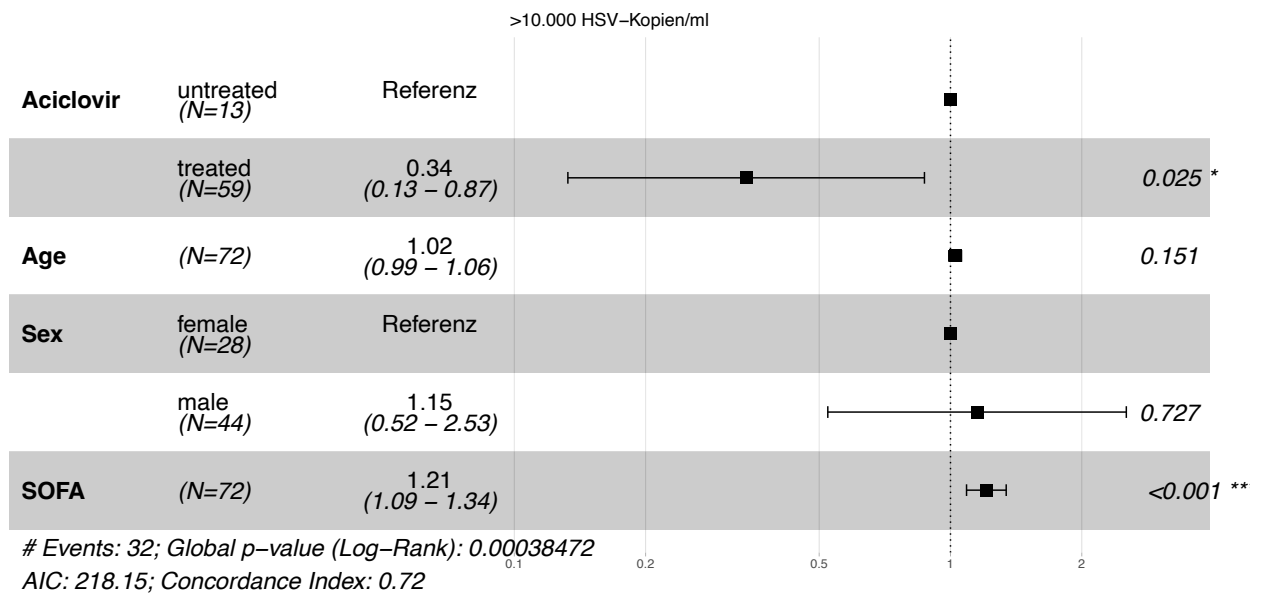
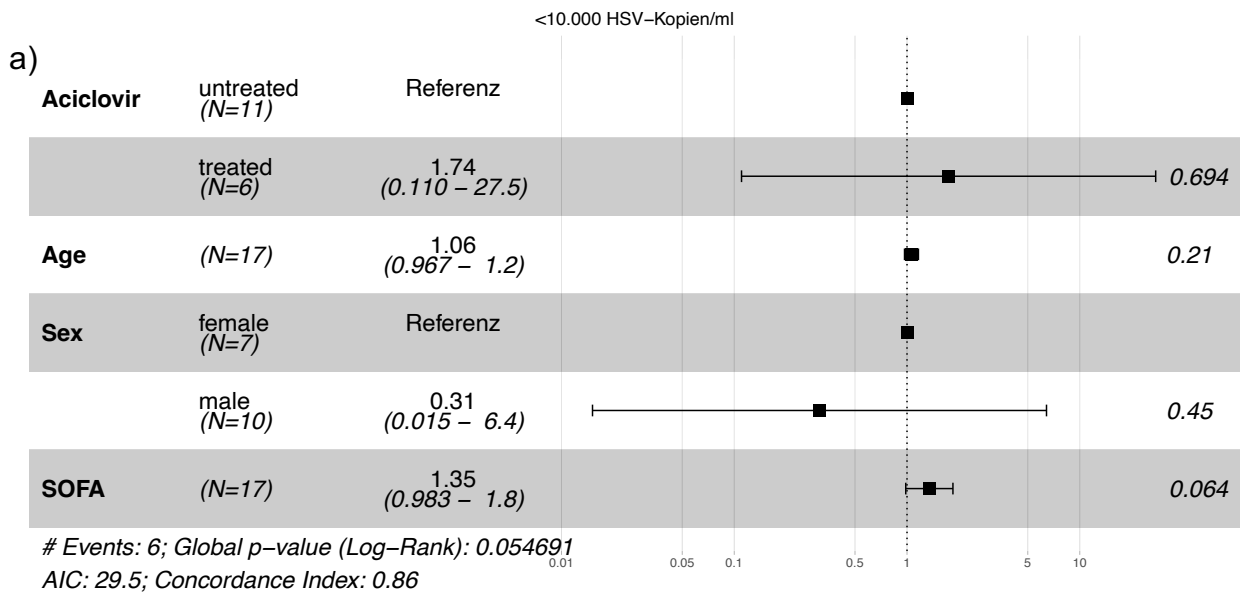


Abbildung 15 Variation der Kaplan-Meier Kurven in Abhängigkeit vom Viruslast-Grenzwert
 Subgruppen-Unterteilung a) bei 10^4 b) bei 10^5 c) bei 10^6 Kopien/ml
 p-Wert mittels Log-Rank-Test. + bedeutet Zensur bei Intensivstation-Entlassung



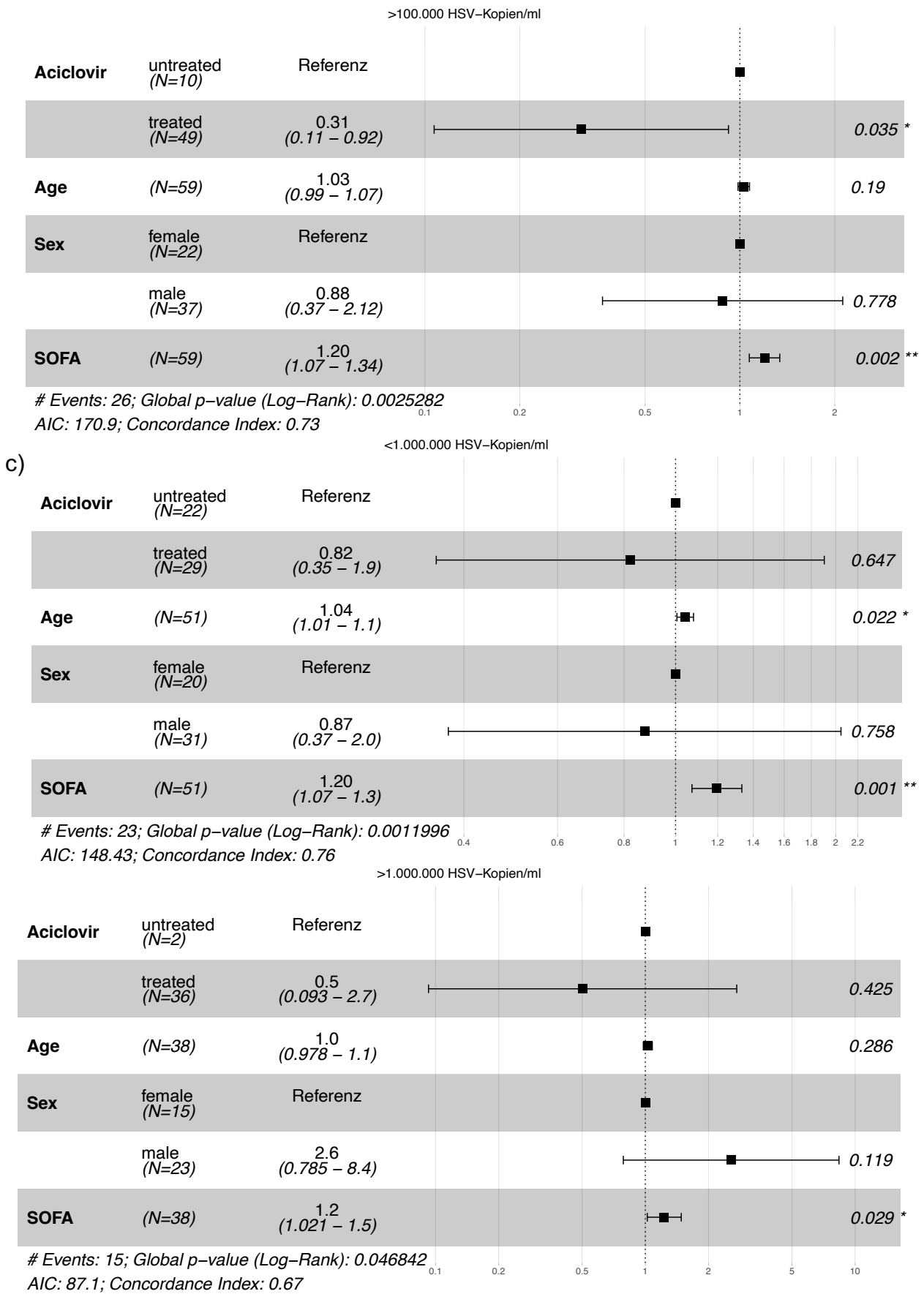


Abbildung 16 Verschiedene Cox-Regressionsanalysen in Abhängigkeit vom Viruslast-Grenzwert Subgruppen-Unterteilung a) bei 10^4 b) bei 10^5 c) bei 10^6 HSV-Kopien/ml
Statistische Signifikanz ist angegeben als * ($p < 0,05$) bzw. ** ($p < 0,01$.)

3.6 Klinische Parameter im Verlauf

In den Subgruppen mit niedriger und hoher Viruslast wurde zusätzlich der Einfluss einer Aciclovir-Therapie auf klinische Verlaufsparemeter ausgewertet (s. Abb. 17). Allerdings konnten dabei nur diejenigen Personen berücksichtigt werden, für die Werte zu allen acht erhobenen Zeitpunkten (Tage 0 – 7) vorlagen.

Der Katecholaminbedarf – ein schnell reagierender Marker der Kreislaufdysfunktion – wurde als über den Tag gemittelte Dosis in $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht/min im Verlauf dargestellt (s. Abb. 17a): Analysiert man die Subgruppe mit niedriger respiratorischer Viruslast (in Abb. 17 links) zeigt sich bei den Unbehandelten gegenüber den Aciclovir Behandelten ein höherer Ausgangswert und Gesamtbedarf. Eine statistisch signifikante Reduktion des medianen Noradrenalinbedarfs wurde innerhalb der Subgruppe mit niedriger Viruslast nur bei den Unbehandelten von Tag 1 auf Tag 6 bzw. 7 erreicht. Dazu konträr brauchten in der Subgruppe mit hoher respiratorischen Viruslast besonders Aciclovir-Behandelte höhere Katecholamin-Mengen: Statistisch signifikant verbesserte sich der Katecholaminbedarf ausschließlich in der Therapiegruppe (Tag 0 bis 1 auf Tag 5 bis 7).

In Abbildung 17b ist als weiterer klinischer Verlaufsparemeter und Entzündungsparemeter die Leukozytenzahl im Verlauf dargestellt: In der Subgruppe mit niedriger Viruslast findet man in Übereinstimmung zum erhöhten Katecholaminbedarf eine hohe Spannweite an Leukozytosen bei Unbehandelten. Eine statistisch signifikante Besserung der medianen Leukozytenzahl war nur bei den Aciclovir-Behandelten mit niedriger Viruslast feststellbar: Die Leukozytenzahl sank bei den Aciclovir-Therapierten vom Tag 1 bzw. 2 auf Tag 5.

In Abbildung 17c wird der Oxygenierungsindex im Verlauf dargestellt, der eine Aussage über die Oxygenierungsfunktion der Lunge zulässt: In Übereinstimmung zu den anderen Verlaufsparemetern weisen in der Subgruppe mit niedriger Viruslast die wenigen Unbehandelten besonders schlechte Ausgangswerte und eine geringere Besserungstendenz gegenüber Behandelten auf. Ausschließlich in der Subgruppe mit hoher Viruslast gab es eine statistisch signifikante Verbesserung des medianen Oxygenierungsindex von Tag 3 auf Tag 7. Aufgrund der nur für eine geringe Fallzahl komplett zur Verfügung stehenden Verlaufsparemeter ist eine Bewertung nur unter Vorbehalt möglich.

Jedoch sind die Ergebnisse bezüglich der Besserung des Katecholaminbedarfs und des Oxygenierungsindex in sich konsistent und decken sich mit den Ergebnissen aus den Überlebenszeitanalysen, die insbesondere für die Subgruppe mit hoher Viruslast einen Vorteil durch Aciclovir zeigten.

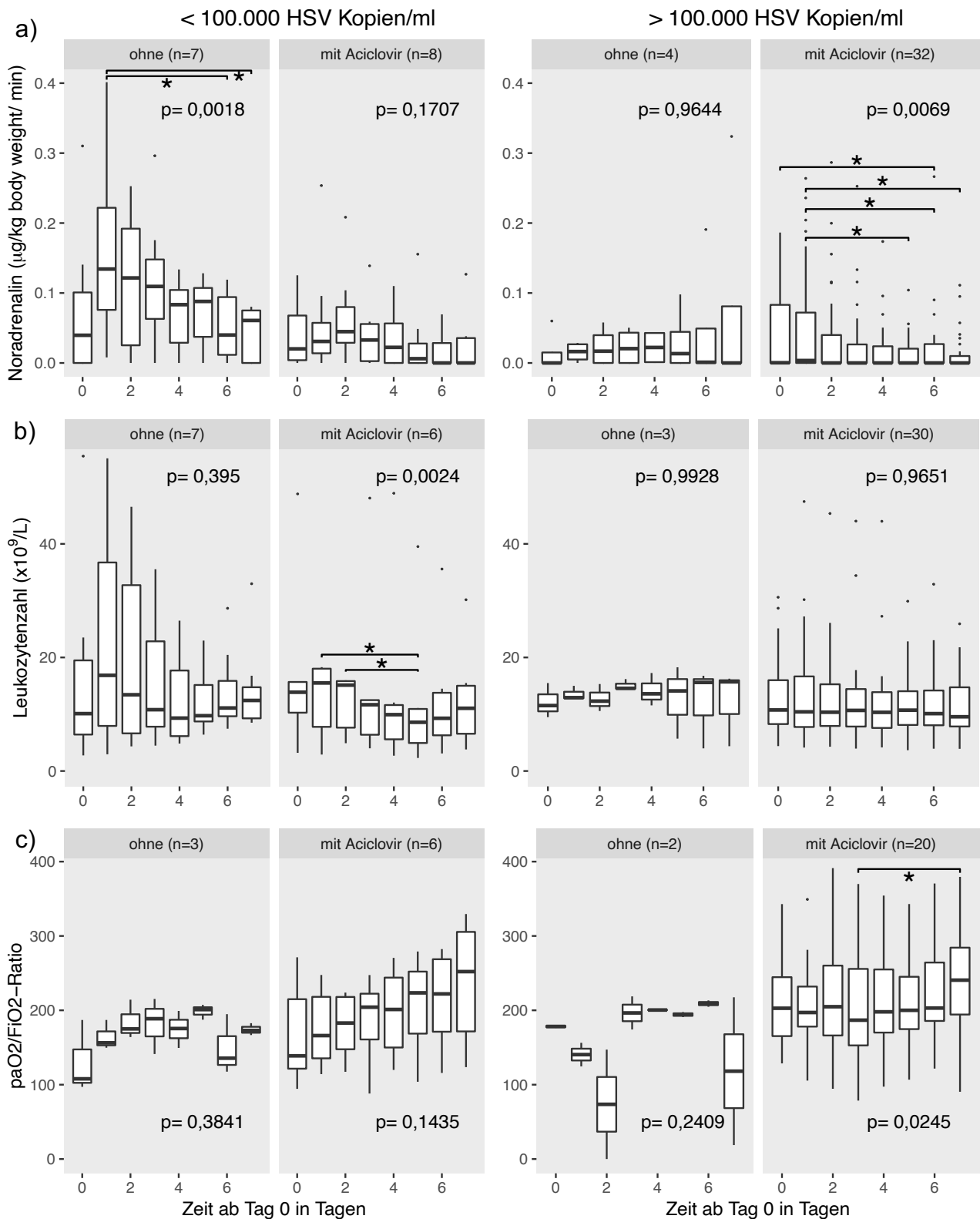


Abbildung 17 Klinische Parameter der Subgruppen im 7-Tages-Verlauf, nach (Schuierer *et al.* 2020)

Unterteilt in Spalten nach niedriger (10^3 - 10^5 Kopien/ml) und hoher Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml)

a) Noradrenalin-Bedarf als gamma-Menge ($\mu\text{g/kg/min}$)

b) Leukozytenzahl ($\times 10^9/\text{l}$)

c) Oxygenierungsindex (PaO₂/FiO₂-Ratio)

3.7 Radiologische Befunde im Verlauf

Sofern mindestens zwei Verlaufs-Bildgebungen (Röntgen Thorax oder CT Thorax) mit einem Mindestabstand von 3 Tagen vorhanden waren, erfolgte für Personen mit einer hohen Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) eine Analyse des Infiltratmusters anhand des selbst entwickelten radiologischen Summenscores. Wie Abbildung 18 veranschaulicht, war der radiologische Score an Tag 0 zwischen unbehandelten und mit Aciclovir therapierten Personen nicht signifikant verschieden (Median 8 vs 11 Punkte; $p=0,097$).

Ausgehend von diesem Punktwert verbesserten sich ausschließlich Aciclovir-Behandelte (11 vs 10 Punkte, $p<0,001$), während Unbehandelte mit verfügbaren Verlaufs-Bildgebungen keine Veränderung ihres radiologischen Scores erfuhren.

Für Personen mit hoher Viruslast wurde zudem fachärztlich die radiologische Komponente des LIS Score erfasst. Die Punktwerte dieses Scores sind in Abbildung 19 abgebildet und unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Aussage nicht vom selbst entwickelten radiologischen Score.

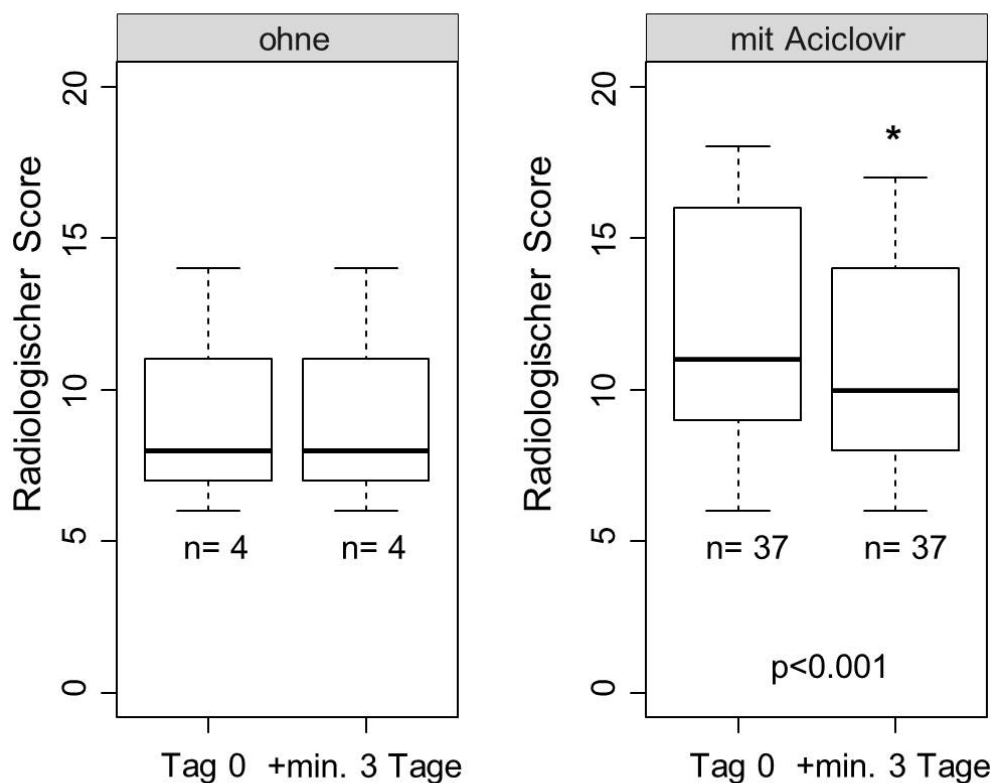


Abbildung 18 Radiologischer Verlauf bei hoher Viruslast, nach (Schuierer *et al.* 2020)

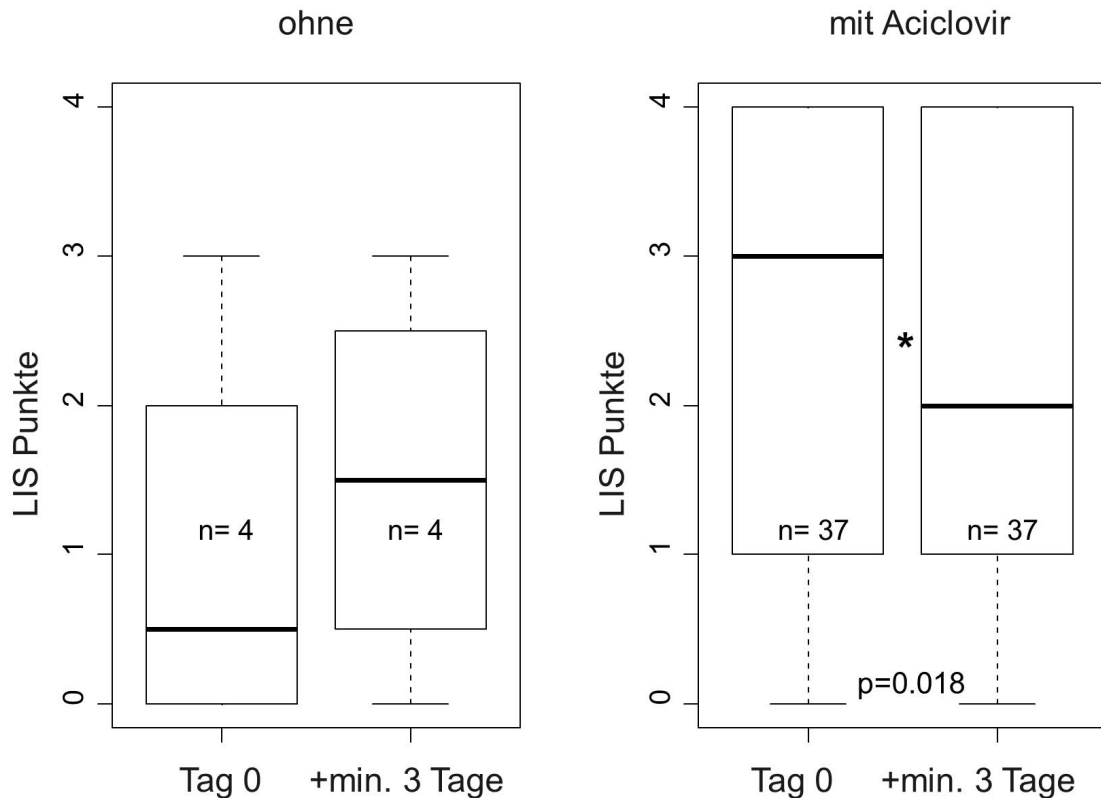


Abbildung 19 Radiologischer Komponente des LIS Scores im Zeitverlauf, nach (Schuierer *et al.* 2020)

3.8 Einfluss einer zusätzlichen CMV-Reaktivierung auf die Intensivstations-Sterblichkeit

Bei der Mehrheit der Personen (75 Prozent, 67 von 89) erfolgte eine molekularbiologische Testung desselben respiratorischen Materials mittels PCR auch auf das Zytomegalie-Virus (CMV) wobei 21 Prozent (14 von 67) positiv getestet wurden (s. Tabelle 4). Der Frage nach dem Einfluss einer zusätzlichen CMV-Reaktivierung auf das Überleben auf Intensivstation, wurde mittels Kaplan-Meier- Überlebenszeitanalyse nachgegangen:

Analog zum Vorgehen bei HSV (vgl. Abb. 13) wurde eine Entlassung von Intensivstation als Zensur behandelt (mit Kreuz markiert) und nur diejenigen Personen weiter berücksichtigt, die noch das Risiko hatten, auf Intensivstation zu versterben: Sowohl in der Gesamtpopulation als auch in den beiden Subgruppen mit niedriger und hoher HSV-Viruslast hatte ein zusätzlicher CMV-Nachweis keinen signifikanten Effekt auf das Überleben auf Intensivstation (s. Abb. 20).

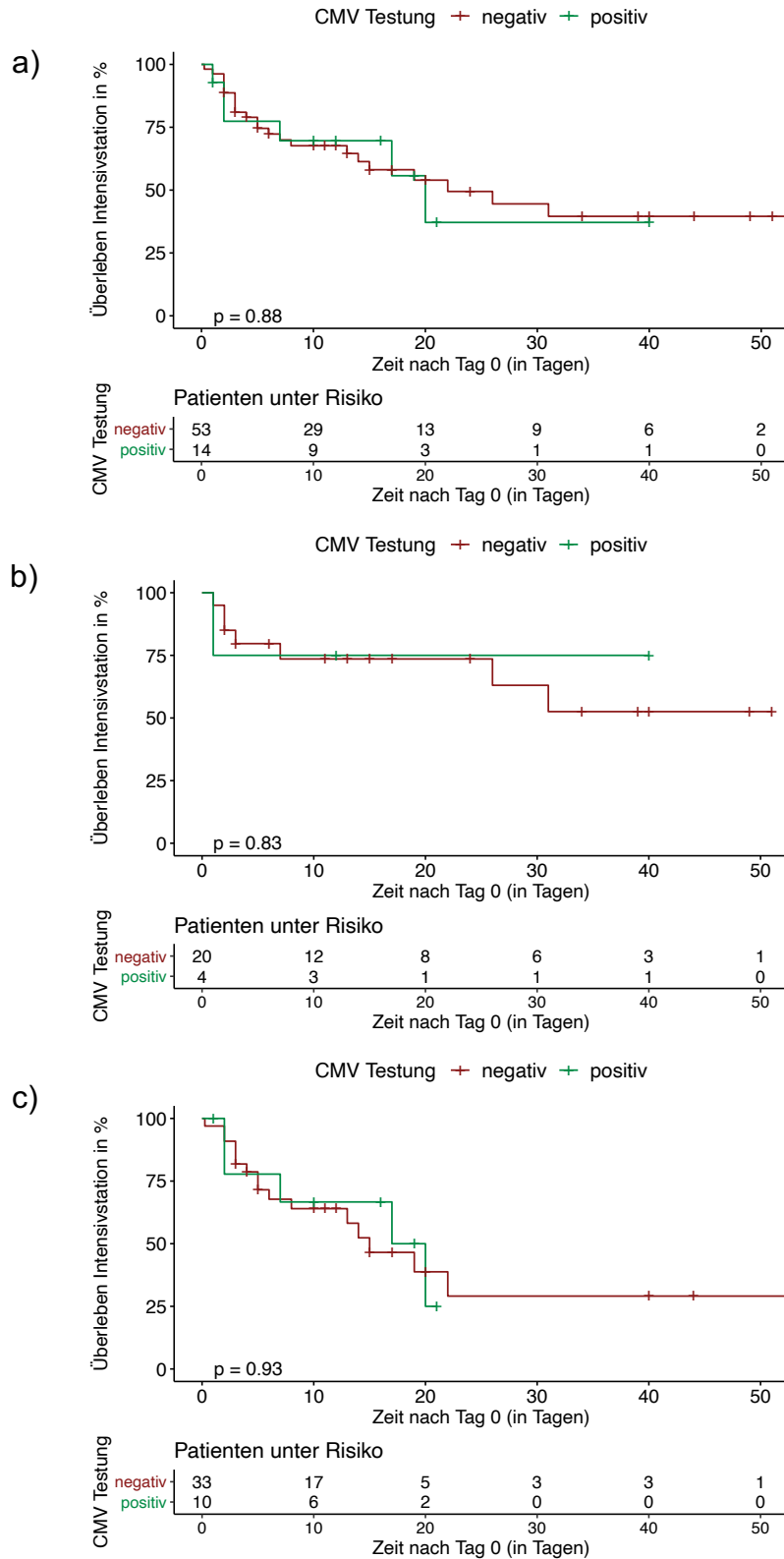


Abbildung 20 Intensivstation-Überleben bei paralleler CMV-Reaktivierung, nach (Schuierer *et al.* 2020):

a) Gesamtkollektiv; b) niedrige respiratorische HSV-Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml),

c) hohe respiratorische HSV-Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml)

4 Diskussion

4.1 Inzidenz einer HSV-1/-2-Reaktivierung

Ob eine HSV-Reaktivierung eine klinisch bedeutsame Lungenentzündung bei Intensivpatient*innen verursachen kann, ist nach wie vor Gegenstand wissenschaftlicher Kontroverse (Chanques & Jaber 2014; Forel *et al.* 2014). Dass eine HSV-Reaktivierung aber kein seltener Zufallsbefund ist, zeigt die fallbereinigte HSV-Nachweis-Rate von 30 Prozent (126/425 der getesteten Augsburger Intensivpatient*innen) über einen 5-Jahreszeitraum (von 01/2013 bis 03/2018). Bei 21 Prozent (89 Personen) konnte ein Nachweis in Zusammenhang mit einer beatmungs-assoziierten Pneumonie gebracht werden, die klinisch nicht auf Antibiotika ansprach. Die tatsächliche Inzidenz bleibt unklar, da eine PCR-Testung auf HSV nicht generell, sondern nur bei aktiver Anforderung durch das ärztliche Fachpersonal der Intensivmedizin erfolgte.

In der Literatur wurden ähnlich hohe HSV-Nachweisraten berichtet: bei 26 Prozent aller Intensivpatient*innen mit septischen Schock (Ong *et al.* 2017) und bei 21 Prozent aller Beatmeten unter klinischer Verschlechterung (Luyt *et al.* 2007) war HSV nachweisbar.

Dass diese Reaktivierungen in vielen Fällen eine klinische Bedeutung haben können, zeigen nicht nur die Daten dieser Studie, sondern auch weitere aktuelle Erfahrungen: In der Pandemie der Coronavirus-Krankheit-2019 (COVID-19) wurde eine HSV-Reaktivierung zusätzlich zu einer Infektion mit SARS-CoV-2 bei 24 Prozent von Personen mit ARDS beschrieben und erneut mit längeren Beatmungs- und Aufenthaltsdauern assoziiert (Le Balc'h *et al.* 2020). Ähnliche Daten ließen sich auch am UKA erheben: Von März 2020 bis Februar 2021 wurde bei 8,2 Prozent aller Augsburger COVID-19 Intensivpatient*innen (13/159) zusätzlich HSV-1 in hoher Viruslast (Median: $1,7 \times 10^8$ Kopien/ml) nachgewiesen, was 34,2 Prozent (13/38) aller HSV-Nachweise mit hoher Virusnachlast in diesem Zeitraum entsprach. HSV-DNA wurde im unteren Respirationstrakt im Median 17 Tage nach Beginn der maschinellen Beatmung bzw. 19 Tage nach der COVID-19 Diagnose bei den betroffenen 13 COVID-19- Intensivpatient*innen nachgewiesen – alle mit einer Pneumonie und in einem medianen Alter von 64 Jahren. Obwohl 85 Prozent der Betroffenen mit Aciclovir behandelt wurden, verstarben 38,5 Prozent (5/13) dieser Intensivpatient*innen im Median 28 Tage nach dem SARS-CoV2- bzw. 10 Tage nach dem HSV-1-Nachweis. Die hohe Sterblichkeit dieser SARS-CoV2 sowie HSV-assoziierten Pneumonien legt nahe, dass eine HSV-Reaktivierung einen eigenen Krankheitswert haben kann und dann entsprechende therapeutische Konsequenzen erfordert.

4.2 Algorithmus einer Aciclovir-Therapie bei HSV-1/-2-Reaktivierung

Die Differentialdiagnose einer HSV-Reaktivierung sowie die Entscheidung zur molekularbiologischen Testung bleibt eine Herausforderung für das ärztliche Fachpersonal der Intensivmedizin. Forel et al. veröffentlichten ein Flussdiagramm, das bei fehlender Organmanifestation eine HSV-Quantifizierung empfiehlt und eine antivirale Therapie von der gemessenen Viruslast abhängig macht (s. Abb. 21).

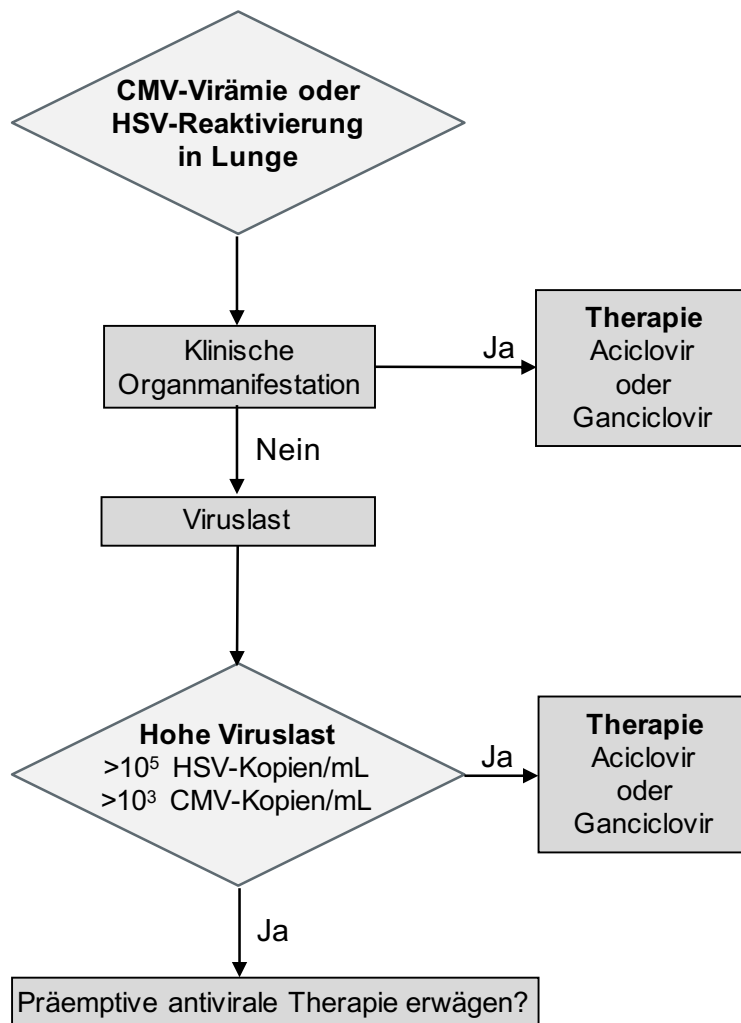


Abbildung 21 Therapeutisches Vorgehen bei CMV- bzw. HSV-Reaktivierung, nach (Forel et al. 2014)

Der in Abbildung 22 dargestellte, auf Basis der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse modifizierte Therapie-Algorithmus grenzt sich vom vorherigen (vgl. Abb. 21) folgendermaßen ab: Als zentrale Voraussetzung gilt hier die Klinik einer beatmungsassoziierten Lungenentzündung, für die kein alternativer Erreger identifiziert werden kann und die nicht auf Antibiotika anspricht.

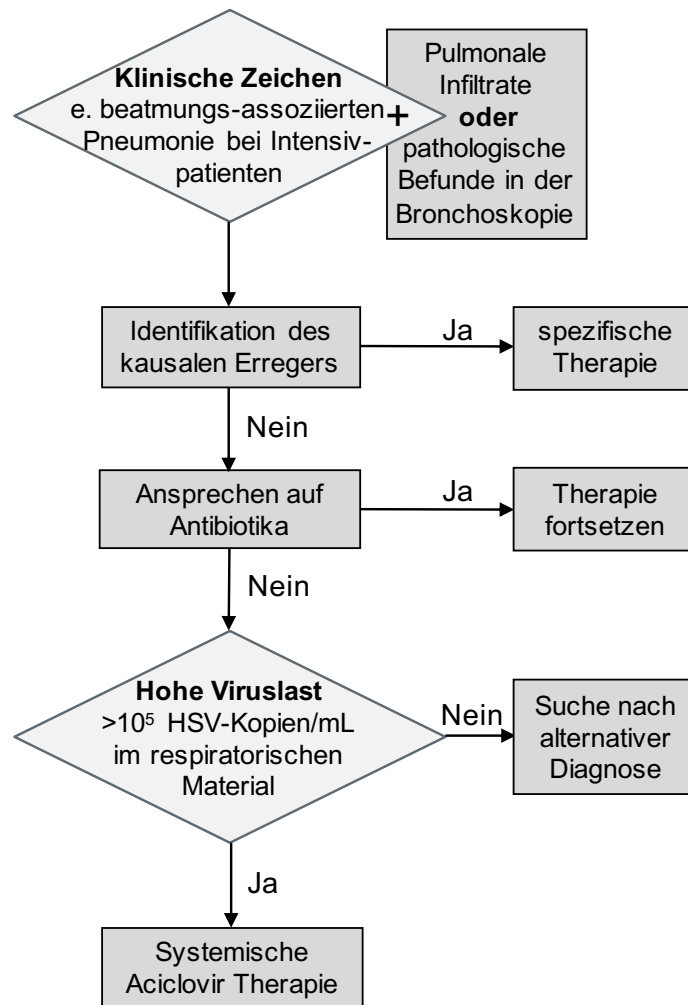


Abbildung 22 Therapeutisches Vorgehen bei pulmonaler HSV-Reaktivierung, nach (Wang & He 2020)

Dies sollte den Anteil bakterieller Lungenentzündungen reduzieren und eine zielgerichtete HSV-PCR mit hoher Vortestwahrscheinlichkeit ermöglichen. Die ermittelte Viruslast diene ebenfalls als weitere Entscheidungshilfe für eine Aciclovir-Therapie. Erst bei Überschreitung des von Linssen et al. definierten Grenzwertes von 10^5 HSV-DNA-Kopien pro ml (Linssen et al. 2008) war bei derart selektierten Personen eine Aciclovir-Therapie von klinischer Relevanz.

Die Trennschärfe dieses Grenzwertes spiegelte sich in den dargestellten Daten zum einen darin wider, dass signifikant mehr Personen mit niedriger Viruslast auf Antibiotika ansprachen als Personen mit einer höheren Viruslast (40 vs 12 Prozent; vgl. Abb. 8). Da eine klinische Besserung unter Antibiotika mehr auf bakterielle als auf virale Pneumonie-Erreger hindeutete, wurden die Betroffenen von den Analysen ausgeschlossen. Zum anderen trennte die angewandte Viruslastgrenze auch im Vergleich zu weiteren Grenzwerten (10^4 , 10^5 , 10^6 Kopien/ml; vgl. Abb. 15) in der uni- und multivariablen Analyse (vgl. Abb. 13-14) am besten zwischen Betroffenen, die klinisch auf die Therapie ansprachen

und solchen, die das nicht taten. Besonders bei Intensivpatient*innen mit hoher pulmonaler Virusreplikation war ein Zusammenhang zwischen der Viruslast, der Lungenentzündung unklarer Genese und dem Ansprechen auf Aciclovir zu vermuten.

In der Literatur existiert eine Studie, die ähnlich strenge Auswahlkriterien voraussetzte und über den Effekt einer Aciclovir-Therapie berichtete. In dieser prospektiven Studie analysierten Luyt et al. 201 Intensivpatient*innen, die mindestens fünf Tage künstlich beatmet wurden und aufgrund klinischer Verschlechterung eine Bronchoskopie erhielten. Der Virusnachweis erfolgte mittels PCR oder Kultur sowie zusätzlich mikroskopisch anhand von Lungenbiospien oder BAL bzw. TBS. Der histologische Nachweis von spezifischen nukleären Einschlusskörperchen war mit einer höheren PCR-Viruslast assoziiert und als „HSV-Bronchopneumonitis“ bewertet worden. Allerdings zeigte Aciclovir trotz der ähnlich strengen Auswahlkriterien keinen signifikanten klinischen Effekt. (Luyt *et al.* 2007)

4.3 Rolle von Aciclovir bei einer HSV-1/-2-Reaktivierung und Pneumonie

Ob es einen kausalen Zusammenhang zwischen einer HSV-Reaktivierung und einer Pneumonie gibt, bleibt wie die Frage nach der Indikation und Wirksamkeit einer antiviralen Therapie aufgrund fehlender Evidenz offen. In einer kontrollierten randomisierten Studie konnte zwar gezeigt werden, dass eine prophylaktische Gabe von Aciclovir bei Personen mit ARDS das Auftreten von HSV-Reaktivierungen verringerte, jedoch nicht das Überleben verbesserte (Tuxen et al. 1987). In einer zweiten randomisierten Studie zeigte eine Aciclovir-Therapie zwar hinsichtlich der beatmungsfreien Tage keinen Vorteil, allerdings ergab sich ein grenzwertig signifikant niedrigeres 60-Tage-Sterberisiko (HR 0,61; 95%-KI: 0,37-0,99; $p=0,047$) (Luyt *et al.* 2020b).

Für eine aktive Virusreplikation spricht, dass bei 560 primär immunkompetenten Sepsis-Kranken sogar im Blut zu 14,1 Prozent HSV (neben 24,2% CMV, 53,2% EBV, 77,5% Torque-Teno-Virus (TTV) und 10,4% HHV-6) nachweisbar und in 42,7 Prozent der Fälle eine Kombination aus mindestens zwei Viren zu finden war (Walton *et al.* 2014): Eine HSV-Virämie wurde signifikant mit dem Auftreten opportunistischer Infektionen (*Stenotrophomonas spp.*, *Acinetobacter spp.*, *Enterococcus spp.*) und mit deutlich längeren Intensivaufenthaltsdauern assoziiert. Während die beiden letzteren Assoziationen bei primär immunkompetenten Intensivpatient*innen auf virusvermittelte Effekte durch HSV zurückgeführt werden könnten, spricht die hohe Virämie-Rate auch mit anderen Viren ohne primär vorliegende Immunsuppression für eine erhebliche Störung der immunologischen Abwehrreaktionen in Folge der Sepsis. Während einer Sepsis soll ein Funktionsverlust der T-Zellen aufgrund chronischer Antigen-Stimulation zu einer Immunsuppression führen, die

eine Reaktivierung von HSV und CMV ermöglicht und immunfördernde therapeutische Ansätze erfordert (Hotchkiss *et al.* 2013).

Weiterhin begünstigen Änderungen des Lungenmikrobioms sowie der lokalen und systemischen Immunreaktion sowohl bakterielle Erreger als auch die Reaktivierung latenter Erreger wie HSV und CMV, deren eigener Krankheitswert noch nicht abschließend geklärt wurde (Luyt *et al.* 2020a). Damit wäre selbst ohne eigenen Krankheitswert die antivirale Behandlung einer HSV-Reaktivierung sinnvoll, da HSV in der Lunge entsprechende Voraussetzungen für opportunistische Erreger und bakterielle Superinfektionen schaffen kann.

Bei der Konstellation einer gleichzeitigen HSV-1 und HSV-2 Reaktivierung – wie sie im Augsburger Studienkollektiv einmal auftrat – sollte unabhängig vom individuellen Nutzen der Einsatz einer antiviralen Therapie erwogen werden, da eine Ko-Infektion mit HSV-1 und HSV-2 Virus epidemiologisch relevant ist: das komplette HSV-2-Virus-Genom besteht aus HSV-1-Genom-Fragmenten und es könnte theoretisch zu einer Rekombination und Austausch genetischen Materials zwischen den beiden Genomen kommen (Burrel *et al.* 2017).

4.4 Effekt einer Aciclovir-Therapie auf das Überleben

Eine Therapie mit Aciclovir führte in verschiedenen Beobachtungsstudien zu pulmonalen HSV-Reaktivierungen zu keiner signifikanten Verbesserung des Überlebens (Luyt *et al.* 2007; Scheithauer *et al.* 2010; Saugel *et al.* 2016).

Erstmals konnten Traen *et al.* einen absoluten Überlebensvorteil durch eine Aciclovir-Therapie bei 212 Erkrankten mit positiver HSV-1 Viruskultur zeigen, von denen 106 mit Aciclovir therapiert wurden und 106 ohne Therapie blieben. Neben der Kaplan-Meier- und multivariablen Überlebenszeit-Analyse war auch die absolute 90-Tage-Intensivstation- bzw. Krankenhaus-Sterblichkeit signifikant geringer. Es erfolgte zwar keine Quantifizierung der Viruslast, doch selbst nach einem sog. „Propensity Score Matching“ bzw. statistischem Gegenüberstellen von Personen mit ähnlicher Chance einer Therapiezuweisung, blieb der Überlebensvorteil bestehen. (Traen *et al.* 2014)

Bei den Augsburger Intensivpatient*innen konnte selbst in der Subgruppe mit hoher Viruslast die absolute Intensivstations-Sterblichkeit durch eine Aciclovir-Behandlung nicht signifikant verringert werden (60 vs 41 Prozent; $p=0,3112$). Neben der geringen Fallzahl verzerrte die Heterogenität der etwa zur Hälfte septischen Intensivpatient*innen möglicherweise die absoluten Überlebenszahlen. Aciclovir-Behandelte mit hoher Viruslast waren deutlich länger auf Intensivstation (26 vs 15 Tage; $p=0,0057$), was deren Risiko für

weitere überlebensbeeinträchtigende Komplikationen steigerte. Im Gegensatz zur absoluten Intensiv- bzw. Krankenhaus-Sterblichkeit konnte jedoch die 30-Tages-Sterblichkeit durch eine Aciclovir-Therapie bei hoher Viruslast signifikant gesenkt werden (43 vs 80 Prozent; $p=0,0419$).

Die individuelle Krankheitsschwere wurde in multivariablen Regressionsanalysen in Form von standardisierten Intensiv-Scores miteinbezogen; selbst bei Berücksichtigung dieser Confounder reduzierte eine Aciclovir-Therapie nur bei hoher Viruslast das Intensivstations-Sterberisiko.

Die aktuell größte Studie von Heimes et al. erzielte ähnliche Ergebnisse bei mittels BAL nachgewiesener pulmonaler HSV-Reaktivierungen: Die absolute Sterblichkeit war bei 177 Intensivpatient*innen unter Aciclovir-Therapie gegenüber 129 unbehandelten Kontrollpersonen nicht signifikant verschieden. Erst in der multivariablen Cox-Regression zeigte eine Aciclovir-Therapie bezogen auf das 30-Tages-Überleben einen signifikanten protektiven Effekt. In Übereinstimmung zu den eigenen Studienergebnissen war die Intensiv- und Krankenhausverweildauer in der Aciclovir-Therapiegruppe signifikant länger. (Heimes *et al.* 2020)

Für eine systematische Übersichtsarbeit und Metaanalyse mit 1069 beatmeten Personen mit HSV-Nachweis aus insgesamt neun Studien wurde die 30-Tages-Sterblichkeit für das Augsburger Studienkollektiv nachbestimmt (Hagel *et al.* 2020): Trotz der niedrigeren Evidenz der acht retrospektiven Single-Center-Studien gegenüber einer randomisiert kontrollierten Studie konnte eine antivirale Aciclovir-Therapie einheitlich mit einer geringeren Krankenhaus- und 30-Tages- Sterblichkeit assoziiert werden. Bei klinisch wie radiologisch sehr unspezifischen Zeichen einer HSV-Infektion sind randomisierte Studien dringlich erforderlich, um die Personen zu identifizieren, die am meisten von einer antiviralen Therapie profitieren. Als Ersatz für die als Routineuntersuchung schwer zu rechtfertigende Lungenbiopsie wurde vorgeschlagen, auf Material aus dem unteren Respirationstrakt, eine hohe Viruslast und klinische Hinweise einer viralen Lungenentzündung zu achten.

4.5 Limitationen

Das retrospektive Studiendesign mit eingeschränkter Fallzahl konnte die Hypothese einer eigenständigen pathogenetischen Rolle des Herpes Simplex Virus in der Lunge nicht kausal bestätigen, sondern lediglich aufgrund eines geringeren Intensivstations-Sterberisikos und einer geringeren absoluten 30-Tages-Sterblichkeit und klinischen Besserung unter Aciclovir-Therapie unterstützen. Für den Nachweis einer Kausalität zwischen einem HSV-

Nachweis und dem klinischen Ansprechen auf eine antivirale Therapie bedarf es einer randomisiert- kontrollierten Studie.

Eine multizentrische Studie von 2019 konnte bei oropharyngealer HSV-Reaktivierung 238 beatmeter Intensivpatient*innen keinen Vorteil einer präemptiven Aciclovir-Therapie gegenüber Placebo zeigen: Im primären Studienendpunkt der beatmungsfreien Tage am Tag 60 bestand kein Unterschied (Luyt *et al.* 2020b). Laut dem Kommentar von Ong *et al.* waren die verglichenen Gruppen nicht homogen, da sich in der Behandlungsgruppe mehr Personen mit ARDS oder einer ECMO befanden. Zudem hatten lediglich ein Prozent der Aciclovir- und drei Prozent der Placebo-Gruppe eine HSV-Bronchopneumonitis entwickelt. (Ong *et al.* 2020).

Auch in der vorliegenden Studie ist eine Heterogenität der Intensivpatient*innen trotz strenger Selektion anzunehmen, da die Therapieentscheidung für Aciclovir das behandelnde ärztliche Fachpersonal der Intensivstationen traf. Aufgrund dieses Selektionsbias könnten trotz strenger Einschlusskriterien prinzipiell vermehrt diejenigen eine antivirale Therapie erhalten haben, die nach Einschätzung des intensivmedizinischen Fachpersonals eine bessere Prognose bzw. kurative Therapiechancen hatten. Zur Kontrolle dieser Art von Bias wurde ein Propensity Score berechnet, der in einem eigenen Cox-Modell Berücksichtigung fand und die Ergebnisse bestätigte.

Eine weitere Limitation ist die begrenzte Aussagekraft des PCR-Ergebnisses für den Nachweis replikationsfähiger Viren. Denn auch nach länger zurückliegender Reaktivierung wäre ein Nachweis von verbliebener HSV-DNA denkbar, ohne dass eine aktive Virusreplikation stattfindet. Der Nachweis eines zytopathischen Effekts in der Zellkultur ließe im Gegensatz zur PCR eine Aussage darüber zu, ob eine aktive Virusreplikation stattfindet (S. Singh & Shah 2014). Alternativ wäre eine Zytologie der BAL oder histologische Untersuchung von Lungenbiopsien eine Möglichkeit gewesen, um analog zu Luyt *et al.* replikationsfähige Viruspartikel nachzuweisen, was dann mit einer hohen HSV-Viruslast in Zusammenhang gebracht werden kann (Luyt *et al.* 2007).

Die molekularbiologische quantitative Viruslastbestimmung wiederum ist nur begrenzt auf Nachweissysteme anderer Labore übertragbar, da kein international gültiger Standard existiert, mit dem die gemessenen Ct-Werte auf Genom-Kopienzahl/Genom-Äquivalente zurückgerechnet werden könnten. Bereits bei der Gewinnung einer BAL könnte es zu Verdünnungseffekten je nach Menge der zugegebenen Spülflüssigkeit gekommen sein. Folgende Einfluss- und Störfaktoren wurden für die BAL beschrieben: Die Grunderkrankung, die Höhe des Unterdrucks bei Materialgewinnung, die Menge und Art der Spülflüssigkeit, die Anzahl von Teilportionen, die Spritzengröße, die Verweildauer der

Aspirationsflüssigkeit in der Lunge und zuletzt die Handhabung sowie Lagerung der gewonnenen BAL (Dua *et al.* 2017).

Das könnte die Trennschärfe des Grenzwertes von 10^5 Kopien/ml beeinträchtigt haben. Der Grenzwert war jedoch von Linssen *et al.* auf Basis von 521 klinischen BAL Proben ermittelt worden (Linssen *et al.* 2008) und dürfte eine gewisse Schwankungsbreite von Verdünnungseffekten bereits berücksichtigen. Zudem lagen die meisten quantitativen Werte der Augsburger Intensiv*innen mindestens um den Faktor 10 über oder unter dem Grenzwert (s. Abb. 9). Eine artifizielle Verdünnung oder Aufkonzentration um den Faktor 10 oder höher durch zuvor beschriebene Störfaktoren der BAL scheint schwer vorstellbar. Um die quantitativen HSV-PCR-Ergebnisse besser vergleichen zu können, müsste die Viruslast bezogen auf Zellzahl angegeben werden (Luyt 2006).

Eine weitere Limitation betrifft den Probenentnahmezeitpunkt, da dieser eine maßgebliche Rolle auf die Höhe der nachgewiesenen Viruslast hat: De Vos *et al.* beobachteten eine exponentielle Zunahme der Viruslast, die typischerweise am dritten bis fünften Beatmungstag erstmals nachweisbar war und am achten Tag Höchstwerte von bis zu 10^8 Kopien/ml erreichte (De Vos *et al.* 2009). Damit übereinstimmend beschrieb von Dryander in ihrer Dissertationsschrift die Kinetik der HSV-Viruslast anhand von 218 HSV-Nachweisen von insgesamt 122 positiv getesteten Intensivpatient*innen: Hier erreichte die Viruslast ein Maximum von im Median 10^7 Kopien/ml an Tagen 14 und 15 nach Intubation (von Dryander 2013). In der vorliegenden Studie wurde der Zeitpunkt der Probenentnahme durch das behandelnde ärztliche Fachpersonal bestimmt und nach klinischen Erfordernissen durchgeführt. Insofern hätte die Subgruppe mit einer niedrigen Viruslast zu einem späteren Zeitpunkt möglicherweise eine hohe Viruslast gehabt. Da bei vorhandenen Verlaufsmessungen jedoch jeweils die erste Viruslast über 10^5 Kopien/ml einbezogen wurde, ist es jedoch unwahrscheinlich, dass eine möglicherweise relevante Verlaufsmessung nicht einbezogen wurde. Zudem lagen bei all den Betroffenen zum Abnahmezeitpunkt klinische Zeichen einer Pneumonie vor, wodurch die Wahl des Abnahmezeitpunktes als klinisch adäquat erschien. Bei klinischer Verschlechterung wäre eine erneute Probengewinnung erfolgt, die dann auch Eingang in unsere Analysen gefunden hätte.

Eine mögliche Aciclovir-Resistenz ist als weitere Limitation aufzuführen: Bei höheren Virusreplikationsraten insbesondere bei immunsupprimierten Personen steigt das Mutationsrisiko hinsichtlich Aciclovir-resistenter Stämme, die bereits im Jahr 1990 in der Lunge von drei verstorbenen Stammzell-Transplantierten mit eindeutiger Pneumonie identifiziert wurden (Ljungman *et al.* 1990). Gegenüber Aciclovir-sensiblen Stämmen

wurden Thymidinkinase-defekte Stämme jedoch sowohl bei Menschen als auch im Mausmodell mit einer geringere Virulenz assoziiert (Sibrack *et al.* 1982).

Während Aciclovir-Resistenzen bei 0,5 Prozent der immunkompetenten Personen auftrat, nahmen Resistenzen bei immunsupprimierten Personen von vier (2002-2006) auf 16 Prozent (2007-2011) zu (Frobert *et al.* 2014).

Bei 95 Prozent der Aciclovir-Resistenzen existiert eine Funktionsverlustmutation des viralen Thymidinkinase-Gens (UL23): Aciclovir muss zuerst von der viralen Thymidinkinase phosphoryliert werden, bevor es durch zelluläre Enzymkinasen aktiviert werden kann und die Virusreplikation inhibiert (Piret & Boivin 2016).

Eine solche Resistenz ist mit einer Häufigkeit von weniger als ein Prozent bei Immunkompetenten und von 2,5 - 11 Prozent bei Immungeschwächten beschrieben. Eine über die letzten Jahre zunehmende Aciclovir-Resistenz von bis zu 47 Prozent wurde bei Menschen nach humaner Stammzelltransplantation gefunden. (Sauerbrei *et al.* 2016)

Bei einem Nichtansprechen auf hochdosiertes intravenöses Aciclovir (10 mg/kg alle 8h) schlagen Piret *et al.* folgenden klinischen Algorithmus vor: Umstellung auf i.v. Foscavir und genotypische Resistenzbestimmung, in Abhängigkeit deren zu i.v. Aciclovir-Therapie zurückgekehrt werden kann oder bei entsprechender Resistenz Foscavir benötigt wird. Führt auch das nach 7-10 Tagen zu keinem Erfolg, soll auf Cidofovir oder auf eine kontinuierliche Aciclovir-Infusion (1.5–2.0 mg/kg/h) umgestellt werden. (Piret & Boivin 2014) Auch ein aktueller Fallbericht wies auf den möglichen Vorteil einer kontinuierlichen intravenösen Aciclovir-Gabe bei vorliegender Aciclovir-Resistenz hin (Ikawa *et al.* 2019).

Da Aciclovir-Resistenzen vorwiegend bei immunsuppressiver Therapie beschrieben sind, ist im primär immunkompetenten Augsburgener Studienkollektiv nicht von Resistenzen in hohem Ausmaß und damit von einer grundsätzlichen Wirksamkeit der Aciclovir-Therapie auszugehen.

Bei der Auswertung des radiologischen Materials wurden Personen nicht berücksichtigt, für die keine Lungen-Aufnahmen im Verlauf zur Verfügung standen. Möglicherweise wurden diese aufgrund einer klinischen Besserung nicht weiter veranlasst. Dies könnte neben Aciclovir-Resistenzen zu einer Unterschätzung des Therapieeffektes auf die radiologischen Befunde geführt haben. Die direkt auf den Intensivstationen gefertigten radiologischen Liegend-Aufnahmen der Lunge standen den wenigen CT-Aufnahmen hinsichtlich der Qualität und Eignung zur Verlaufsbeurteilung des Infiltratmusters um Einiges nach.

4.1 Stärken der Forschungsarbeit

In Abgrenzung zu bisherigen Studien erfolgte eine strengere Selektion des Studienkollektivs (Klinik einer beatmungs-assoziierten Pneumonie, ohne Besserung auf Antibiotika, hohe Viruslast) in Kombination mit einer umfangreichen Erregersuche (quantitative Realtime-PCR: HSV-1, HSV-2, CMV bzw. qualitative Multiplex-PCR: respiratorisches Viren- und Bakterienpanel; bakteriologische Kultur). Erstmals konnte gezeigt werden, dass eine Risikostratifizierung (s. Algorithmus der Abb. 22) zur Identifikation derjenigen Intensivpatient*innen nötig ist, die am meisten von einer Aciclovir-Therapie profitieren – sogar mit Auswirkung auf ein besseres Überleben.

Nach Modellierung mit unterschiedlichen Viruslast-Grenzwerten (10^4 , 10^5 , 10^6 Kopien/ml) in der Überlebenszeitanalyse konnte der von Linssen et al. vorgeschriebene Wert von 10^5 Kopien/ml als geeigneter Grenzwert bestätigt werden: Personen mit einer Viruslast über diesem Grenzwert sprechen weniger auf eine Antibiotika-Therapie, aber besser auf eine Aciclovir-Therapie an als Personen mit niedrigerer Viruslast. Neben der obligaten klinischen Manifestation einer Pneumonie, die weder auf Antibiotika anspricht noch trotz differenzierter Erregersuche auf ein anderes Pathogen zurückgeführt werden kann, scheint dieser Viruslast-Grenzwert der vermeintliche Schlüssel dafür zu sein, einen Therapieerfolg durch eine antivirale Therapie mit Aciclovir zu erzielen.

Als Alleinstellungsmerkmal gegenüber anderen Studien sind zudem die Verlaufsuntersuchungen von klinisch aussagekräftigen und zeitnah reagierenden Parametern zu nennen: Der Katecholaminbedarf diente zur Beurteilung der Kreislaufsituation, der Oxygenierungsindex zur Einschätzung der Lungenfunktion und die Leukozytenzahl als unspezifischer Entzündungsmarker. Während sich die Leukozyten durch Aciclovir nicht signifikant veränderten, sprachen Intensivpatient*innen mit einer hohen Viruslast zeitnah auf Aciclovir an: Sowohl der Katecholaminbedarf als auch der Oxygenierungsindex besserten sich. Dies unterstützten die Daten der radiologischen Verlaufsuntersuchungen, die fachärztlich sowohl mit einem standardisierten als auch mit einem selbst entwickelten Score bewertet wurden. Die positiven Effekte von Aciclovir auf klinische Verlaufparameter stehen im Einklang zum niedrigeren Sterberisiko von behandelten Intensivpatient*innen mit hoher Viruslast.

Absolut war eine signifikante Verbesserung der 30-Tages-Sterblichkeit unter Aciclovir bei hoher Viruslast erkennbar, was in eine aktuelle Metaanalyse eingebracht wurde (Hagel et al. 2020). Die vielversprechenden Ergebnisse einer Aciclovir-Therapie bei einer HSV-Reaktivierung konnten durch diese Metaanalyse objektiviert und zu anderen Studien in Kontext gesetzt werden.

Als weitere Stärke des zwar retrospektiven Studiendesigns ist die Berücksichtigung eines Propensity Scores anzuführen. Die Testung auf HSV und die Behandlung mit Aciclovir wurde gänzlich durch das behandelnde ärztliche Fachpersonal der Intensivmedizin auf Basis der klinischen Einschätzung veranlasst. Daher war es wichtig, auf Basis von prognostisch relevanten Größen die Wahrscheinlichkeit für eine antivirale Therapie in Form eines Propensity Scores zu berechnen. Personen mit ähnlichem Propensity Score – also einer ähnlichen Chance auf eine antivirale Therapie – wurden ähnlich gewichtet und in einem zusätzlichen Regressionsmodell spezifisch berücksichtigt. In Übereinstimmung zu weiteren Analysen zeigten Personen mit hoher Viruslast und einer Aciclovir-Therapie in diesem Regressionsmodell ebenfalls ein niedrigeres Risiko auf Intensivstation zu versterben.

Vor der Herausforderung der Heterogenität der Intensivpatient*innen fand die individuelle Krankheitssituation in den Regressionsanalysen Berücksichtigung, indem auf standardisierte und etablierte Scores (SOFA, APACHE II) mit hoher prognostischer Aussagekraft zurückgegriffen wurde.

Bezogen auf die gesamte Studienpopulation war der Gesundheitszustand der unbehandelten Intensivpatient*innen dennoch besser: Es gab unter Unbehandelten eine niedrigere Rate an Tracheotomien (12 vs 38 Prozent, $p=0,021$), kürzere Intubationsdauern (9 vs 13 Tage; $p=0,017$) und kürzere Verweildauern auf Intensivstation (16 vs 26 Tage; $p=0,010$) und im Krankenhaus (26 vs 41 Tage; $p=0,004$). Zudem wurden weniger Antibiotika-Klassen (3,5 vs 5; $p=0,025$) und kein Ceftazidim (0 vs 18 Prozent; $p=0,031$) eingesetzt. Trotz des besseren Gesundheitszustandes der Kontrollgruppe gegenüber der Therapiegruppe war ein Überlebensvorteil durch eine antivirale Therapie identifizierbar.

Aufgrund der weltweiten SARS-CoV2-Pandemie sind HSV-Reaktivierungen bei beatmeten COVID-19- Intensivpatient*innen hochaktuell und von Bedeutung (Le Balc'h *et al.* 2020). Auch einige Augsburger COVID-19-Intensivpatient*innen reaktivierten in der Lunge HSV und wurden weitestgehend mit Aciclovir behandelt. Aufgrund der lebenslangen Persistenz und hohen Reaktivierungs-Rate unter künstlicher Beatmung bleibt HSV auch in Zukunft eine Herausforderung für die Intensivmedizin.

4.2 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Retrospektiv erzielte Aciclovir insbesondere bei pulmonalen HSV-Reaktivierungen mit hoher Viruslast einen bemerkenswerten Therapie-Effekt, wenn die beatmeten Intensivpatient*innen eine Pneumonie aufwiesen, die weder auf einen alternativen Erreger zurückgeführt werden konnte noch auf eine antibiotische Therapie ansprach: Aciclovir senkte die Sterblichkeit auf Intensivstation und verbesserte den Katecholaminbedarf sowie die pulmonale Oxygenierungsfunktion und das radiologische Infiltratmuster.

Bei strenger Indikationsstellung in lebensbedrohlichen Krankheitskonstellationen lässt sich der Einsatz von Aciclovir bei der Behandlung beatmungs-assoziiertes Pneumonien mit hoher HSV-Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) ohne Ansprechen auf Antibiotika zur Therapieeskalation einer anders nicht beherrschbaren Lungenentzündung rechtfertigen. Für eine Therapieempfehlung fehlen jedoch Daten aus randomisiert-kontrollierten Studien, deren Durchführung aufgrund der zum großen Teil septischen und nicht einwilligungsfähigen beatmeten Intensivpatient*innen eine große Herausforderung darstellt.

Zusammenfassung

Eine HSV-Reaktivierung ist bei beatmeten Intensivpatient*innen keine Seltenheit, jedoch wird HSV bei beatmungs-assoziierten Pneumonie sowohl als Epiphänomen als auch als kausaler Krankheitserreger diskutiert. Die klinische Bedeutung einer pulmonalen HSV-Replikation ist bislang unklar. Anhand von respiratorischen HSV-DNA-Nachweisen bei Intensivpatient*innen mit beatmungs-assoziierten Pneumonie ohne Ansprechen auf Antibiotika oder alternativen Erregernachweisen wurde untersucht, ob Aciclovir einen Einfluss auf das Überleben und den klinischen Verlauf hat.

Im Zeitraum 01/2013 bis 04/2018 ergab eine quantitative Realtime-PCR bei 126 der 425 (29,6 Prozent) getesteten Augsburger Intensivpatient*innen ein Ergebnis von mindestens 1000 HSV-1 bzw. HSV-2 Kopien pro ml Probe (ca. 2/3 BAL bzw. 1/3 TBS). Um in der retrospektiven Studie berücksichtigt zu werden, galt das klinische Vorliegen einer beatmungs-assoziierten Pneumonie mit einem Nichtansprechen auf Antibiotika als Voraussetzung. Geeignete Patient*innen wurden nach Höhe ihrer quantitativen Viruslast in eine Subgruppe mit hoher Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) und Subgruppe mit niedriger Viruslast (10^3 - 10^5 Kopien/ml) unterteilt und bezüglich ihres Ansprechens auf Aciclovir untersucht.

Insgesamt konnten 57 Intensivpatient*innen mit niedriger und 69 Personen mit hoher Viruslast identifiziert werden. Die Subgruppe mit niedriger Viruslast verzeichneten eine höhere Ansprechrate auf Antibiotika (40 vs 12 Prozent; $p=0,001$), jedoch eine schlechtere auf intravenöses Aciclovir. Ausschließlich bei hoher Viruslast verbesserte Aciclovir signifikant die mediane Überlebenszeit auf Intensivstation (22 vs 8 Tage; $p=0,014$) und führte zu einer niedrigeren Hazard Ratio für einen Tod auf Intensivstation (HR 0,31; 95%-KI: 0,11-0,92; $p=0,035$). Eine Aciclovir-Therapie verringerte selektiv in der Subgruppe mit hoher Viruslast die absolute 30-Tages-Sterblichkeit (43 vs 80 Prozent; $p=0,042$). Unter Aciclovir besserte sich in dieser Subgruppe zudem der Katecholaminbedarf, der Oxygenierungsindex und die Ausprägung der radiologischen Infiltrate.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass HSV bei einer beatmungs-assoziierten Pneumonie ohne Ansprechen auf Antibiotika mit Nachweis einer hohen Viruslast ($>10^5$ Kopien/ml) bei der Pathogenese der Lungeninfektion eine Rolle spielen und eine rechtzeitige intravenöse Aciclovir-Therapie die Lungenschädigung begrenzen könnte. Eine strenge Patientenselektion ohne alternativen Erregernachweis könnte ein wichtiger Schlüssel zur Identifikation derjenigen Intensivpatient*innen sein, die am meisten von einer antiviralen Therapie profitieren. Für eine Therapieempfehlung fehlen allerdings Daten aus randomisiert kontrollierten Studien, die den klinischen Nutzen von Aciclovir für Patient*innen mit beatmungs-assoziierten Pneumonie und HSV-Reaktivierung erforschen.

Ausblick

Aufgrund der hohen Sterblichkeit einer HSV-Pneumonie und fehlender randomisierter Studien zur Evidenz einer antiviralen Therapie sollte der Fokus neben einer strengeren Patientenselektion und Indikationsstellung für eine antivirale Therapie auch auf die Krankheitsprävention gelegt werden. Aufgrund der möglichen Ausbreitung vom oberen in den unteren Atemtrakt ist die diagnostische Identifikation und Behandlung labialer Herpes Läsionen bei Intensivpatient*innen essenziell. Zum diesem Schluss kam ein Fallbericht, in dem die HSV-1 Pneumonie durch eine Aspiration erklärt wurde (Odani *et al.* 2019).

Ein interessanter Ansatzpunkt böte auch ein Therapiemonitoring, um z.B. mittels HPLC den Aciclovir-Spiegel bei Intensivpatient*innen zu überwachen. Bei Nichtansprechen wäre auch eine Aciclovir-Resistenz-Bestimmung oder die Umstellung der antiviralen Therapie auf ein Präparat mit einem anderen Wirkmechanismus überlegenswert.

Fest steht, dass bei primär immunkompetenten Intensivpatient*innen HSV unter künstlicher Beatmung in der Lunge mit hoher Viruslast im Sinne einer aktiven Replikation nachgewiesen werden kann. Ist bei einer solchen Reaktivierung HSV auch im Blut nachweisbar? In einer Studie wurde bei immerhin 14 Prozent der an einer Sepsis-Erkrankten eine HSV-Virämie beschrieben (Walton *et al.* 2014). Während die Lunge früher als steriles Kompartiment betrachtet wurde, wird ihr inzwischen ein eigenes Mikrobiom zugeschrieben, dessen Biomasse sich unter künstlicher Beatmung vergrößert, dessen Diversität bei Entwicklung einer Pneumonie jedoch abnimmt (Roquilly *et al.* 2019).

Auf der Wirtseite wäre zu klären, wie sich das Gleichgewicht zwischen mukosalem Immunsystem und dem Lungen-Mikrobiom verschiebt und wiederhergestellt werden kann. Sowohl die zelluläre (Durchflusszytometrie und Funktionstest analog zu CMV (Caston *et al.* 2016) als auch humorale Immunantwort (Zytokine, Komplementsystem, Antikörpertiter) wären hier erste Ansatzpunkte.

Gibt es Biomarker für eine überschießende lokale Immunantwort (z.B. KL-6 (d'Alessandro *et al.* 2020), Lymphozyten/Neutrophilen-Ratio (Song *et al.* 2020), Alpha-Antitrypsin) und spielen Neutrophile sowohl bei der Gewebe-Schädigung als auch Reparatur eine Rolle (Grudzinska & Sapey 2018)?

Auch folgenden Frage könnte genauer nachgegangen werden: Warum, wo und in welchem Ausmaß reaktiviert HSV? Findet gegebenenfalls eine Verschleppung aus dem oberen Respirationstrakt statt?

Auf Erregerseite wäre mittels Virusanzucht zu untersuchen, ob es unterschiedliche Stämme mit unterschiedlicher Virulenz gibt, die eine Reaktivierung mit niedriger bzw. hoher Viruslast erklären. Mittels Sequenzierung könnte darüber hinaus untersucht werden, ob eine nosokomiale Verbreitung (Engelmann *et al.* 2007) stattfindet und wie heterogen HSV ist. Zudem könnten weitere Erreger mittels NGS identifiziert werden und nach einer Assoziation mit opportunistischen Infektionen – wie sie für die HSV-Virämie beschrieben wurde (Walton *et al.* 2014) – gesucht werden. Interessant wären es auch, viruseigenen Mechanismen der Reaktivierung (Unterschied niedrige vs hohe Viruslast) aus dem Latenzstadium in Nervenzellen (Roizman & Zhou 2015) genauer nachzugehen. Aufgrund zeitgleicher Nachweise von CMV und SARS-CoV2 auch bei Augsburger Intensivpatient*innen wäre ein weiterer Anknüpfungspunkt an die vorliegende Arbeit, das Wechselspiel mit anderen Viren und das Lungen-Virioms bei Menschen mit und ohne beatmungs-assoziierte Pneumonie (Nazareth *et al.* 2020) zu erforschen.

Anhang

Tabelle 6 Bakteriologische Ergebnisse aus respiratorischem Material, nach (Schuierer *et al.* 2020)

Erreger	Betroffene Personen
Staphylococcus aureus	8
Escherichia coli	4
Proteus mirabilis	3
Klebsiella oxytoca	2
Klebsiella pneumoniae	1
Klebsiella aerogenes	1
Haemophilus influenzae	1
Pseudomonas aeruginosa	1
Citrobacter freundii	1
Enterobacter cloacae	1
Streptococcus agalactiae	1
Morganella morganii	1
Serratia marcescens	1
*Mycobacterium tuberculosis	1

Neben der HSV-Testung erhielten 82 von 89 Personen eine mikrobiologische Testung des respiratorischen Materials, wovon 22 positive Kulturen mit den gelisteten Bakterien auftraten (5 Personen hatten zwei Erreger). *Zufallsbefund vier Wochen post mortem. Während der initialen Intensivtherapie zeigten sich keine Hinweise für eine Tuberkulose

Tabelle 7 Antibiotika Klassen während des Aufenthaltes auf Intensivstation, nach (Schuierer *et al.* 2020)

Antibiotika Klasse	Anzahl der Personen	Wirkstoffe
Penicilline	6	Penicillin, Flucloxacillin
Penicilline + Beta-Lactamase-Inhibitoren	92	Piperacillin/Tazobactam, Ampicillin/Sulbactam, Amoxicillin/Clavulansäure
Cephalosporine	47	Cefazolin, Cefuroxim, Ceftazidim, Ceftriaxon, Cefepim
Carbapeneme	83	Meropenem, Imipenem
Makrolide	40	Azithromycin, Clarithromycin, Erythromycin, Roxithromicin
Aminoglycoside	5	Gentamicin, Amikacin
Quinolone	42	Ciprofloxacin, Moxifloxacin, Levofloxacin
Sulfonamide	15	Trimethoprim-Sulfamethoxazole
Lincosamide	6	Clindamycin
Gegen multiresistente grampositive Bakterien	50	Vancomycin, Linezolid, Daptomycin, Rifampicin
Andere	8	Metronidazol, Doxycyclin, Colistin

Folgende Antibiotika-Klassen kamen zur Leitlinien-gerechten Therapie der beatmungs-assoziierten Pneumonie zum Einsatz, worunter retrospektiv mindestens ein Antibiotikum gegenüber den mikrobiologisch nachgewiesenen Erreger als potentiell wirksam eingestuft wurde. Größtenteils erhielten die Personen mehrere antibiotische Substanzen im Verlauf.

Literaturverzeichnis

- Altona Diagnostics. (2017). Instructions for Use. RealStar HSV PCR Kit 1.0. Retrieved from https://altona-diagnostics.com/files/public/Content%20Homepage/-%2002%20RealStar/MAN%20-%20CE%20-%20EN/RealStar%20HSV%20PCR%20Kit%201.0_WEB_CE_EN-S02.pdf on 06.07.2021
- Alvarez-Uria, G., Surinach, J. M., Ventura, A., de la Rosa, D., de Gracia, J., & Fernandez-Sevilla, T. (2008). Herpetic tracheitis and polybacterial pneumonia in an immunocompetent young man is herpes tracheitis involved in the pathogenesis of bacterial pneumonia? *J Clin Virol*, *41*(2), 164-165. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.014>
- Ashley, R. L., Militoni, J., Lee, F., Nahmias, A., & Corey, L. (1988). Comparison of Western blot (immunoblot) and glycoprotein G-specific immunodot enzyme assay for detecting antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 in human sera. *J Clin Microbiol*, *26*(4), 662-667. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.26.4.662-667.1988>
- Assink-de Jong, E., Groeneveld, A. B., Pettersson, A. M., Koek, A., Vandenbroucke-Grauls, C. M., Beishuizen, A., & Simoons-Smit, A. M. (2013). Clinical correlates of herpes simplex virus type 1 loads in the lower respiratory tract of critically ill patients. *J Clin Virol*, *58*(1), 79-83. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.05.007>
- Astuto, M., Palermo, C. I., Costanzo, C. M., Ettore, G. C., Palmucci, S., Franchina, C., Russo, R., Valastro, P., Timpanaro, V., & Scalia, G. (2014). Fatal pulmonary disease and encephalic complication in a man with HSV-1 Infection: a case report. *J Clin Virol*, *59*(1), 59-62. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.11.006>
- Aurelius, E., Johansson, B., Skoldenberg, B., & Forsgren, M. (1993). Encephalitis in immunocompetent patients due to herpes simplex virus type 1 or 2 as determined by type-specific polymerase chain reaction and antibody assays of cerebrospinal fluid. *J Med Virol*, *39*(3), 179-186. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/jmv.1890390302>
- Aurelius, E., Johansson, B., Skoldenberg, B., Staland, A., & Forsgren, M. (1991). Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. *Lancet*, *337*(8735), 189-192. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)92155-u](https://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(91)92155-u)
- Baba, Y., Ishiguro, T., Gochi, M., Shimizu, Y., & Takayanagi, N. (2020). A 72-Year-Old Woman With Respiratory Failure and Bilateral Ground-Glass Opacities. *Chest*, *158*(1), e41-e45. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2019.11.054>
- Baldassarri, R. J., Kumar, D., Baldassarri, S., & Cai, G. (2019). Diagnosis of Infectious Diseases in the Lower Respiratory Tract: A Cytopathologist's Perspective. *Arch Pathol Lab Med*, *143*(6), 683-694. doi: <https://dx.doi.org/10.5858/arpa.2017-0573-RA>
- Banerjee, A., Kulkarni, S., & Mukherjee, A. (2020). Herpes Simplex Virus: The Hostile Guest That Takes Over Your Home. *Front Microbiol*, *11*, 733. doi: <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.00733>

- Bodilsen, J., Nielsen, H., & Whitley, R. J. (2019). Valaciclovir therapy for herpes encephalitis: caution advised. *J Antimicrob Chemother*, 74(6), 1467-1468. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dky568>
- Bruynseels, P., Jorens, P. G., Demey, H. E., Goossens, H., Pattyn, S. R., Elseviers, M. M., Weyler, J., Bossaert, L. L., Mentens, Y., & Ieven, M. (2003). Herpes simplex virus in the respiratory tract of critical care patients: a prospective study. *Lancet*, 362(9395), 1536-1541. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14740-X](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14740-X)
- Bundesärztekammer. (2019). Neufassung der Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen – Rili-BÄK. *Dtsch Arztebl International*, 116(51-52), 2422. doi: https://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2019.rili_baek_QS_Labor20192312
- Burrell, S., Boutolleau, D., Ryu, D., Agut, H., Merkel, K., Leendertz, F. H., & Calvignac-Spencer, S. (2017). Ancient Recombination Events between Human Herpes Simplex Viruses. *Mol Biol Evol*, 34(7), 1713-1721. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/molbev/msx113>
- Caston, J. J., Cantisan, S., Gonzalez-Gasca, F., Paez-Vega, A., Abdel-Hadi, H., Illescas, S., Alonso, G., & Torre-Cisneros, J. (2016). Interferon-gamma production by CMV-specific CD8+ T lymphocytes provides protection against cytomegalovirus reactivation in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 42(1), 46-53. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-015-4077-6>
- Chanques, G., & Jaber, S. (2014). Treating HSV and CMV reactivations in critically ill patients who are not immunocompromised: con. *Intensive Care Med*, 40(12), 1950-1953. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-014-3521-3>
- Charlson, M. E., Pompei, P., Ales, K. L., & MacKenzie, C. R. (1987). A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*, 40(5), 373-383. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0021-9681\(87\)90171-8](https://dx.doi.org/10.1016/0021-9681(87)90171-8)
- Cone, R. W., Hobson, A. C., Palmer, J., Remington, M., & Corey, L. (1991). Extended duration of herpes simplex virus DNA in genital lesions detected by the polymerase chain reaction. *J Infect Dis*, 164(4), 757-760. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/164.4.757>
- Connolly, S. A., Jackson, J. O., Jardetzky, T. S., & Longnecker, R. (2011). Fusing structure and function: a structural view of the herpesvirus entry machinery. *Nat Rev Microbiol*, 9(5), 369-381. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2548>
- Coyle, P. V., Desai, A., Wyatt, D., McCaughey, C., & O'Neill, H. J. (1999). A comparison of virus isolation, indirect immunofluorescence and nested multiplex polymerase chain reaction for the diagnosis of primary and recurrent herpes simplex type 1 and type 2 infections. *J Virol Methods*, 83(1-2), 75-82. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934\(99\)00108-1](https://dx.doi.org/10.1016/S0166-0934(99)00108-1)
- Cunha, B. A., Chak, A., & Durie, N. (2010). Herpes simplex virus-1 late-onset ventilator-associated pneumonia: the importance of cytopathologic diagnosis. *Am J Infect Control*, 38(3), 249-250. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.ajic.2009.08.013>

- d'Alessandro, M., Cameli, P., Refini, R. M., Bergantini, L., Alonzi, V., Lanzarone, N., Bennett, D., Rana, G. D., Montagnani, F., Scolletta, S., Franchi, F., Frediani, B., Valente, S., Mazzei, M. A., Bonella, F., & Bargagli, E. (2020). Serum KL-6 concentrations as a novel biomarker of severe COVID-19. *J Med Virol*, *92*(10), 2216-2220. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/jmv.26087>
- Daubin, C., Vincent, S., Vabret, A., du Cheyron, D., Parienti, J. J., Ramakers, M., Freymuth, F., & Charbonneau, P. (2005). Nosocomial viral ventilator-associated pneumonia in the intensive care unit: a prospective cohort study. *Intensive Care Med*, *31*(8), 1116-1122. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-005-2706-1>
- De Vos, N., Van Hoovels, L., Vankeerberghen, A., Van Vaerenbergh, K., Boel, A., Demeyer, I., Creemers, L., & De Beenhouwer, H. (2009). Monitoring of herpes simplex virus in the lower respiratory tract of critically ill patients using real-time PCR: a prospective study. *Clin Microbiol Infect*, *15*(4), 358-363. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02704.x>
- Dua, K., Shukla, S. D., & Hansbro, P. M. (2017). Aspiration techniques for bronchoalveolar lavage in translational respiratory research: Paving the way to develop novel therapeutic moieties. *J Biol Methods*, *4*(3), e73. doi: <https://dx.doi.org/10.14440/jbm.2017.174>
- Elion, G. B., Furman, P. A., Fyfe, J. A., de Miranda, P., Beauchamp, L., & Schaeffer, H. J. (1977). Selectivity of action of an antiherpetic agent, 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5716-5720. doi: <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.74.12.5716>
- Engelmann, I., Gottlieb, J., Meier, A., Sohr, D., Ruhparwar, A., Henke-Gendo, C., Gastmeier, P., Welte, T., Schulz, T. F., & Mattner, F. (2007). Clinical relevance of and risk factors for HSV-related tracheobronchitis or pneumonia: results of an outbreak investigation. *Crit Care*, *11*(6), R119. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/cc6175>
- Espy, M. J., Uhl, J. R., Mitchell, P. S., Thorvilson, J. N., Svien, K. A., Wold, A. D., & Smith, T. F. (2000). Diagnosis of herpes simplex virus infections in the clinical laboratory by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*, *38*(2), 795-799. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.38.2.795-799.2000>
- Forel, J. M., Martin-Loeches, I., & Luyt, C. E. (2014). Treating HSV and CMV reactivations in critically ill patients who are not immunocompromised: pro. *Intensive Care Med*, *40*(12), 1945-1949. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-014-3445-y>
- Frobert, E., Billaud, G., Casalegno, J. S., Eibach, D., Goncalves, D., Robert, J. M., Lina, B., & Morfin, F. (2013). The clinical interest of HSV1 semi-quantification in bronchoalveolar lavage. *J Clin Virol*, *58*(1), 265-268. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2013.04.019>
- Frobert, E., Burrel, S., Ducastelle-Lepretre, S., Billaud, G., Ader, F., Casalegno, J. S., Nave, V., Boutolleau, D., Michallet, M., Lina, B., & Morfin, F. (2014). Resistance of herpes simplex viruses to acyclovir: an update from a ten-year survey in France. *Antiviral Res*, *111*, 36-41. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.08.013>

- Geradts, J., Warnock, M., & Benedict Yen, T. S. (1990). Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of unsuspected herpes simplex viral pneumonia: Report of a case. *Human Pathology*, 21(1), 118-121. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0046-8177\(90\)90084-i](https://dx.doi.org/10.1016/0046-8177(90)90084-i)
- Gooskens, J., Templeton, K. E., Claas, E. C., van Bussel, M. J., Smit, V. T., & Kroes, A. C. (2007). Quantitative detection of herpes simplex virus DNA in the lower respiratory tract. *J Med Virol*, 79(5), 597-604. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/jmv.20861>
- Gottlieb, S. L., Giersing, B., Boily, M. C., Chesson, H., Looker, K. J., Schiffer, J., Spicknall, I., Hutubessy, R., Broutet, N., & WHO HSV Vaccine Impact Modelling Meeting Working Group. (2019). Modelling efforts needed to advance herpes simplex virus (HSV) vaccine development: Key findings from the World Health Organization Consultation on HSV Vaccine Impact Modelling. *Vaccine*, 37(50), 7336-7345. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.074>
- Graham, B. S., & Snell, J. D., Jr. (1983). Herpes simplex virus infection of the adult lower respiratory tract. *Medicine (Baltimore)*, 62(6), 384-393. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/00005792-198311000-00004>
- Grudzinska, F. S., & Sapey, E. (2018). Friend or foe? The dual role of neutrophils in lung injury and repair. *Thorax*, 73(4), 305-307. doi: <https://dx.doi.org/10.1136/thoraxjnl-2017-211253>
- Guttman, J. (1999). Grundlagen der Lungenmechanik unter Beatmung. *Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 36(S1), S001-S008. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/pl00014600>
- Hagel, S., Scherag, A., Schuierer, L., Hoffmann, R., Luyt, C. E., Pletz, M. W., Kesselmeier, M., & Weis, S. (2020). Effect of antiviral therapy on the outcomes of mechanically ventilated patients with herpes simplex virus detected in the respiratory tract: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care*, 24(1), 584. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-020-03296-5>
- Hanley, P. J., Conaway, M. M., Halstead, D. C., Rhodes, L. V., 3rd, & Reed, J., 3rd. (1993). Nosocomial herpes simplex virus infection associated with oral endotracheal intubation. *Am J Infect Control*, 21(6), 310-316. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0196-6553\(93\)90388-k](https://dx.doi.org/10.1016/0196-6553(93)90388-k)
- Heimes, E., Baier, M., Forstner, C., Weis, S., Bauer, M., Fritzenwanger, M., Scherag, A., Pletz, M. W., Kesselmeier, M., & Hagel, S. (2020). Effect of Antiviral Therapy on the Outcome of Mechanically Ventilated Patients With Herpes Simplex Virus Type 1 in BAL Fluid: A Retrospective Cohort Study. *Chest*, 158(5), 1867-1875. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.chest.2020.06.056>
- Herout, V., Vortel, V., & Vondrackova, A. (1966). Herpes simplex involvement of the lower respiratory tract. *Am J Clin Pathol*, 46(4), 411-419. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/ajcp/46.4.411>
- Hobbs, M. R., Jones, B. B., Otterud, B. E., Leppert, M., & Kriesel, J. D. (2008). Identification of a herpes simplex labialis susceptibility region on human chromosome 21. *J Infect Dis*, 197(3), 340-346. doi: <https://dx.doi.org/10.1086/525540>

- Hotchkiss, R. S., Monneret, G., & Payen, D. (2013). Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *Lancet Infect Dis*, 13(3), 260-268. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70001-X](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70001-X)
- Hothorn, T., & Hornik, K. [2017]. exactRankTests: Exact Distributions for Rank and Permutation Tests (Version 0.8-29) [Computer software]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=exactRankTests>
- Hunt, D. P., Muse, V. V., & Pitman, M. B. (2013). Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 12-2013. An 18-year-old woman with pulmonary infiltrates and respiratory failure. *N Engl J Med*, 368(16), 1537-1545. doi: <https://dx.doi.org/10.1056/NEJMcpc1209608>
- Ikawa, Y., Fujiki, T., Nishimura, R., Noguchi, K., Koshino, E., Fujiki, A., Fukuda, M., Kuroda, R., Mase, S., Araki, R., Maeba, H., Shiraki, K., & Yachie, A. (2019). Improvement of refractory acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 infection by continuous acyclovir administration. *J Infect Chemother*, 25(1), 65-67. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jiac.2018.07.004>
- Ishiguro, T., Matsunami, M., Funakoshi, S., Yasuda, M., Ozaki, Y., & Kotani, S. (1978). Cytologic and virologic studies of herpetic pneumonia. *J Am Med Womens Assoc (1972)*, 33(3), 124-128. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/204673>
- Ishihara, T., Yanagi, H., Ozawa, H., & Takagi, A. (2018). Severe herpes simplex virus pneumonia in an elderly, immunocompetent patient. *BMJ Case Rep*, 2018. doi: <https://dx.doi.org/10.1136/bcr-2017-224022>
- James, C., Harfouche, M., Welton, N. J., Turner, K. M., Abu-Raddad, L. J., Gottlieb, S. L., & Looker, K. J. (2020). Herpes simplex virus: global infection prevalence and incidence estimates, 2016. *Bull World Health Organ*, 98(5), 315-329. doi: <https://dx.doi.org/10.2471/BLT.19.237149>
- Jones, C. (2013). Bovine Herpes Virus 1 (BHV-1) and Herpes Simplex Virus Type 1 (HSV-1) Promote Survival of Latently Infected Sensory Neurons, in Part by Inhibiting Apoptosis. *J Cell Death*, 6, 1-16. doi: <https://dx.doi.org/10.4137/JCD.S10803>
- Kassambara, A., & Kosinski, M. [2018]. survminer: Drawing Survival Curves using 'ggplot2' (Version 0.4.3) [Computer software]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=survminer>
- Kimura, H., Futamura, M., Kito, H., Ando, T., Goto, M., Kuzushima, K., Shibata, M., & Morishima, T. (1991). Detection of viral DNA in neonatal herpes simplex virus infections: frequent and prolonged presence in serum and cerebrospinal fluid. *J Infect Dis*, 164(2), 289-293. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/164.2.289>
- Knaus, W. A., Draper, E. A., Wagner, D. P., & Zimmerman, J. E. (1985). APACHE II: a severity of disease classification system. *Crit Care Med*, 13(10), 818-829. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3928249>

- Kobayashi, M., Wilson, A. C., Chao, M. V., & Mohr, I. (2012). Control of viral latency in neurons by axonal mTOR signaling and the 4E-BP translation repressor. *Genes Dev*, 26(14), 1527-1532. doi: <https://dx.doi.org/10.1101/gad.190157.112>
- Korr, G., Thamm, M., Czogiel, I., Poethko-Mueller, C., Bremer, V., & Jansen, K. (2017). Decreasing seroprevalence of herpes simplex virus type 1 and type 2 in Germany leaves many people susceptible to genital infection: time to raise awareness and enhance control. *BMC Infect Dis*, 17(1), 471. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s12879-017-2527-1>
- Koyuncu, O. O., MacGibeny, M. A., & Enquist, L. W. (2018). Latent versus productive infection: the alpha herpesvirus switch. *Future Virol*, 13(6), 431-443. doi: <https://dx.doi.org/10.2217/fvl-2018-0023>
- Kriesel, J. D., Bhatia, A., & Thomas, A. (2014). Cold sore susceptibility gene-1 genotypes affect the expression of herpes labialis in unrelated human subjects. *Hum Genome Var*, 1, 14024. doi: <https://dx.doi.org/10.1038/hgv.2014.24>
- Kuss, O., Blettner, M., & Borgermann, J. (2016). Propensity Score: an Alternative Method of Analyzing Treatment Effects. *Dtsch Arztebl Int*, 113(35-36), 597-603. doi: <https://dx.doi.org/10.3238/arztebl.2016.0597>
- Lamy, M., Fallat, R. J., Koeniger, E., Dietrich, H. P., Ratliff, J. L., Eberhart, R. C., Tucker, H. J., & Hill, J. D. (1976). Pathologic features and mechanisms of hypoxemia in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 114(2), 267-284. doi: <https://dx.doi.org/10.1164/arrd.1976.114.2.267>
- Le Balc'h, P., Pinceaux, K., Pronier, C., Seguin, P., Tadie, J. M., & Reizine, F. (2020). Herpes simplex virus and cytomegalovirus reactivations among severe COVID-19 patients. *Crit Care*, 24(1), 530. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-020-03252-3>
- Le Huu Thien, B., & Huynh Quang, D. (2014). Alveolar gas equation and alveolo-arterial difference in oxygen. *Journal of Functional Ventilation and Pulmonology*, 5(14), 4-10. doi: <https://dx.doi.org/10.12699/jfvp.5.14.2014.5>
- Lee, D. H., Zuckerman, R. A., & Practice, A. S. T. I. D. C. o. (2019). Herpes simplex virus infections in solid organ transplantation: Guidelines from the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice. *Clin Transplant*, 33(9), e13526. doi: <https://dx.doi.org/10.1111/ctr.13526>
- Linssen, C. F., Jacobs, J. A., Stelma, F. F., van Mook, W. N., Terporten, P., Vink, C., Drent, M., Bruggeman, C. A., & Smismans, A. (2008). Herpes simplex virus load in bronchoalveolar lavage fluid is related to poor outcome in critically ill patients. *Intensive Care Med*, 34(12), 2202-2209. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-008-1231-4>
- Ljungman, P., Ellis, M. N., Hackman, R. C., Shepp, D. H., & Meyers, J. D. (1990). Acyclovir-resistant herpes simplex virus causing pneumonia after marrow transplantation. *J Infect Dis*, 162(1), 244-248. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/162.1.244>

- Looker, K. J., Elmes, J. A. R., Gottlieb, S. L., Schiffer, J. T., Vickerman, P., Turner, K. M. E., & Boily, M. C. (2017a). Effect of HSV-2 infection on subsequent HIV acquisition: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, *17*(12), 1303-1316. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30405-X](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30405-X)
- Looker, K. J., Magaret, A. S., May, M. T., Turner, K. M. E., Vickerman, P., Newman, L. M., & Gottlieb, S. L. (2017b). First estimates of the global and regional incidence of neonatal herpes infection. *Lancet Glob Health*, *5*(3), e300-e309. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X\(16\)30362-X](https://dx.doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30362-X)
- Luna, C. M., Blanzaco, D., Niederman, M. S., Matarucco, W., Baredes, N. C., Desmery, P., Palizas, F., Menga, G., Rios, F., & Apezteguia, C. (2003). Resolution of ventilator-associated pneumonia: prospective evaluation of the clinical pulmonary infection score as an early clinical predictor of outcome. *Crit Care Med*, *31*(3), 676-682. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000055380.86458.1E>
- Luyt, C. E. (2006). Virus diseases in ICU patients: a long time underestimated; but be aware of overestimation. *Intensive Care Med*, *32*(7), 968-970. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-006-0203-9>
- Luyt, C. E., Bouadma, L., Morris, A. C., Dhanani, J. A., Kollef, M., Lipman, J., Martin-Loeches, I., Nseir, S., Ranzani, O. T., Roquilly, A., Schmidt, M., Torres, A., & Timsit, J. F. (2020a). Pulmonary infections complicating ARDS. *Intensive Care Med*, *46*(12), 2168-2183. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-020-06292-z>
- Luyt, C. E., Combes, A., Deback, C., Aubriot-Lorton, M. H., Nieszkowska, A., Trouillet, J. L., Capron, F., Agut, H., Gibert, C., & Chastre, J. (2007). Herpes simplex virus lung infection in patients undergoing prolonged mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*, *175*(9), 935-942. doi: <https://dx.doi.org/10.1164/rccm.200609-1322OC>
- Luyt, C. E., Forel, J. M., Hajage, D., Jaber, S., Cayot-Constantin, S., Rimmelé, T., Coupez, E., Lu, Q., Diallo, M. H., Penot-Ragon, C., Clavel, M., Schwebel, C., Timsit, J. F., Bedos, J. P., Hauw-Berlemont, C., Bourenne, J., Mayaux, J., Lefrant, J. Y., Mira, J. P., Combes, A., Wolff, M., Chastre, J., Papazian, L., & Preemptive Treatment for Herpesviridae Study Group, Réseau Européen de recherche en Ventilation Artificielle Network. (2020b). Acyclovir for Mechanically Ventilated Patients With Herpes Simplex Virus Oropharyngeal Reactivation: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*, *180*(2), 263-272. doi: <https://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.5713>
- Luzzati, R., D'Agaro, P., Busca, A., Maurel, C., Martellani, F., Rosin, C., Segat, L., Gatti, G., Mascarello, M., & Confalonieri, M. (2019). Herpes simplex virus (HSV) pneumonia in the non-ventilated immunocompromised host: Burden and predictors. *J Infect*, *78*(2), 127-133. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2018.09.010>

- Martinez, E., de Diego, A., Paradis, A., Perpina, M., & Hernandez, M. (1994). Herpes simplex pneumonia in a young immunocompetent man. *The European respiratory journal*, 7(6), 1185-1188. doi: <https://dx.doi.org/10.1183/09031936.94.07061185>
- Martinez-Giron, R., & Pantanowitz, L. (2017). Lower respiratory tract viral infections: Diagnostic role of exfoliative cytology. *Diagn Cytopathol*, 45(7), 614-620. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/dc.23697>
- Melsen, W. G., Rovers, M. M., Groenwold, R. H., Bergmans, D. C., Camus, C., Bauer, T. T., Hanisch, E. W., Klarin, B., Koeman, M., Krueger, W. A., Lacherade, J. C., Lorente, L., Memish, Z. A., Morrow, L. E., Nardi, G., van Nieuwenhoven, C. A., O'Keefe, G. E., Nakos, G., Scannapieco, F. A., Seguin, P., Staudinger, T., Topeli, A., Ferrer, M., & Bonten, M. J. (2013). Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a meta-analysis of individual patient data from randomised prevention studies. *Lancet Infect Dis*, 13(8), 665-671. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70081-1](https://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70081-1)
- Mills, B., Ratra, A., El-Bakush, A., Kambali, S., & Nugent, K. (2014). Herpes Simplex Pneumonia in an Immunocompetent Patient With Progression to Organizing Pneumonia. *J Investig Med High Impact Case Rep*, 2(2), 2324709614530560. doi: <https://dx.doi.org/10.1177/2324709614530560>
- Mindel, A., Adler, M. W., Sutherland, S., & Fiddian, A. P. (1982). Intravenous acyclovir treatment for primary genital herpes. *Lancet*, 1(8274), 697-700. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(82\)92618-6](https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(82)92618-6)
- Mitchell, C. D., Bean, B., Gentry, S. R., Groth, K. E., Boen, J. R., & Balfour, H. H., Jr. (1981). Acyclovir therapy for mucocutaneous herpes simplex infections in immunocompromised patients. *Lancet*, 1(8235), 1389-1392. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(81\)92569-1](https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(81)92569-1)
- Morgan, H. R., & Finland, M. (1949). Isolation of herpes virus from a case of atypical pneumonia and erythema multiforme exudativum with studies of four additional cases. *Am J Med Sci*, 217(1), 92-95. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/00000441-194901000-00011>
- Murray, J. F., Matthay, M. A., Luce, J. M., & Flick, M. R. (1988). An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 138(3), 720-723. doi: <https://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/138.3.720>
- Nahmias, A. J., & Roizman, B. (1973). Infection with herpes-simplex viruses 1 and 2. 1. *N Engl J Med*, 289(13), 667-674. doi: <https://dx.doi.org/10.1056/NEJM197309272891305>
- Nazareth, R., Chasqueira, M. J., Rodrigues, M. L., Paulino, C., Conceicao, C., Ledo, L., Segura, U., Santos, M., Messias, A., Pova, P., & Paixao, P. (2020). Respiratory viruses in mechanically ventilated patients: a pilot study. *BMC Pulm Med*, 20(1), 39. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s12890-020-1082-5>
- Odani, K., Tachibana, M., Tamashima, R., & Tsutsumi, Y. (2019). Herpes Simplex Virus Pneumonia: Importance of Aspiration Etiology. *Case Rep Pathol*, 2019, 7623576. doi: <https://dx.doi.org/10.1155/2019/7623576>

- Ong, D. S. Y., Bonten, M. J. M., Spitoni, C., Verduyn Lunel, F. M., Frencken, J. F., Horn, J., Schultz, M. J., van der Poll, T., Klein Klouwenberg, P. M. C., Cremer, O. L., Molecular, D., & Risk Stratification of Sepsis, C. (2017). Epidemiology of Multiple Herpes Viremia in Previously Immunocompetent Patients With Septic Shock. *Clin Infect Dis*, 64(9), 1204-1210. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/cid/cix120>
- Ong, D. S. Y., Cremer, O. L., & Bonten, M. J. M. (2020). Preemptive Treatment of Herpes Simplex Virus Reactivation in Critically Ill Patients?—Not Based on Current Data. *JAMA Intern Med*, 180(2), 272-273. doi: <https://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2019.6423>
- Papazian, L., Doddoli, C., Chetaille, B., Gernez, Y., Thirion, X., Roch, A., Donati, Y., Bonnety, M., Zandotti, C., & Thomas, P. (2007). A contributive result of open-lung biopsy improves survival in acute respiratory distress syndrome patients. *Crit Care Med*, 35(3), 755-762. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/01.CCM.0000257325.88144.30>
- Papazian, L., Klompas, M., & Luyt, C. E. (2020). Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med*, 46(5), 888-906. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>
- Piret, J., & Boivin, G. (2014). Antiviral drug resistance in herpesviruses other than cytomegalovirus. *Rev Med Virol*, 24(3), 186-218. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/rmv.1787>
- Piret, J., & Boivin, G. (2016). Antiviral resistance in herpes simplex virus and varicella-zoster virus infections: diagnosis and management. *Curr Opin Infect Dis*, 29(6), 654-662. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/QCO.0000000000000288>
- Pohlert, T. [2018]. PMCMRplus: Calculate Pairwise Multiple Comparisons of Mean Rank Sums Extended (Version 1.4.0) [Computer software]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMRplus>
- Prachayangprecha, S., Schapendonk, C. M., Koopmans, M. P., Osterhaus, A. D., Schurch, A. C., Pas, S. D., van der Eijk, A. A., Poovorawan, Y., Haagmans, B. L., & Smits, S. L. (2014). Exploring the potential of next-generation sequencing in detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol*, 52(10), 3722-3730. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JCM.01641-14>
- Prellner, T., Flamholz, L., Haidl, S., Lindholm, K., & Widell, A. (1992). Herpes simplex virus—the most frequently isolated pathogen in the lungs of patients with severe respiratory distress. *Scand J Infect Dis*, 24(3), 283-292. doi: <https://dx.doi.org/10.3109/00365549209061333>
- Pritt, B. S., & Aubry, M. C. (2017). Histopathology of viral infections of the lung. *Semin Diagn Pathol*, 34(6), 510-517. doi: <https://dx.doi.org/10.1053/j.semmp.2017.06.005>
- Pugin, J., Auckenthaler, R., Mili, N., Janssens, J. P., Lew, P. D., & Suter, P. M. (1991). Diagnosis of ventilator-associated pneumonia by bacteriologic analysis of bronchoscopic and nonbronchoscopic "blind" bronchoalveolar lavage fluid. *Am Rev Respir Dis*, 143(5 Pt 1), 1121-1129. doi: https://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/143.5_Pt_1.1121
- R Core Team (Version 3.5.0) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.R-project.org/>

- Ramsey, P. G., Fife, K. H., Hackman, R. C., Meyers, J. D., & Corey, L. (1982). Herpes simplex virus pneumonia: clinical, virologic, and pathologic features in 20 patients. *Ann Intern Med*, 97(6), 813-820. doi: <https://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-97-6-813>
- Reyes, C. V., & Bolden, J. R. (2009). Herpes simplex virus type-1 pneumonitis in immunocompetent young woman. *Heart Lung*, 38(6), 526-529. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.hrtlng.2009.05.002>
- Roizman, B., & Zhou, G. (2015). The 3 facets of regulation of herpes simplex virus gene expression: A critical inquiry. *Virology*, 479-480, 562-567. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.036>
- Roquilly, A., Torres, A., Villadangos, J. A., Netea, M. G., Dickson, R., Becher, B., & Asehnoune, K. (2019). Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *Lancet Respir Med*, 7(8), 710-720. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600\(19\)30140-7](https://dx.doi.org/10.1016/S2213-2600(19)30140-7)
- RStudio Team (Version 1.1.447) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.rstudio.com/>
- Sauerbrei, A., Bohn-Wippert, K., Kaspar, M., Krumbholz, A., Karrasch, M., & Zell, R. (2016). Database on natural polymorphisms and resistance-related non-synonymous mutations in thymidine kinase and DNA polymerase genes of herpes simplex virus types 1 and 2. *J Antimicrob Chemother*, 71(1), 6-16. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/jac/dkv285>
- Saugel, B., Jakobus, J., Huber, W., Hoffmann, D., Holzapfel, K., Protzer, U., Schmid, R. M., & Umgelter, A. (2016). Herpes simplex virus in bronchoalveolar lavage fluid of medical intensive care unit patients: Association with lung injury and outcome. *J Crit Care*, 32, 138-144. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2015.11.019>
- Scheithauer, S., Manemann, A. K., Kruger, S., Hausler, M., Kruttgen, A., Lemmen, S. W., Ritter, K., & Kleines, M. (2010). Impact of herpes simplex virus detection in respiratory specimens of patients with suspected viral pneumonia. *Infection*, 38(5), 401-405. doi: <https://dx.doi.org/10.1007/s15010-010-0036-x>
- Schuieler, L., Gebhard, M., Ruf, H. G., Jaschinski, U., Berghaus, T. M., Wittmann, M., Braun, G., Busch, D. H., & Hoffmann, R. (2020). Impact of acyclovir use on survival of patients with ventilator-associated pneumonia and high load herpes simplex virus replication. *Crit Care*, 24(1), 12. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-019-2701-5>
- Schuller, D. (1994). Lower respiratory tract reactivation of herpes simplex virus. Comparison of immunocompromised and immunocompetent hosts. *Chest*, 106(1 Suppl), 3S-7S; discussion 34S-35S. doi: https://dx.doi.org/10.1378/chest.106.1_supplement.3s
- Schuller, D., Spessert, C., Fraser, V. J., & Goodenberger, D. M. (1993). Herpes simplex virus from respiratory tract secretions: epidemiology, clinical characteristics, and outcome in immunocompromised and nonimmunocompromised hosts. *Am J Med*, 94(1), 29-33. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/0002-9343\(93\)90116-7](https://dx.doi.org/10.1016/0002-9343(93)90116-7)
- Selby, P. J., Powles, R. L., Janeson, B., Kay, H. E., Watson, J. G., Thornton, R., Morgenstern, G., Clink, H. M., McElwain, T. J., Prentice, H. G., Corringham, R., Ross, M. G., Hoffbrand, A. V.,

- & Brigden, D. (1979). Parenteral acyclovir therapy for herpesvirus infections in man. *Lancet*, 2(8155), 1267-1270. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(79\)92281-5](https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(79)92281-5)
- Sibrack, C. D., Gutman, L. T., Wilfert, C. M., McLaren, C., St Clair, M. H., Keller, P. M., & Barry, D. W. (1982). Pathogenicity of acyclovir-resistant herpes simplex virus type 1 from an immunodeficient child. *J Infect Dis*, 146(5), 673-682. doi: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/146.5.673>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C. W., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., van der Poll, T., Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*, 315(8), 801-810. doi: <https://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, N., & Tschärke, D. C. (2020). Herpes Simplex Virus Latency Is Noisier the Closer We Look. *J Virol*, 94(4), e01701-01719. doi: <https://dx.doi.org/10.1128/JVI.01701-19>
- Singh, S., & Shah, P. L. (2014). Viral pneumonia in severe respiratory failure. *Respiration*, 87(4), 267-269. doi: <https://dx.doi.org/10.1159/000358444>
- Skoldenberg, B., Forsgren, M., Alestig, K., Bergstrom, T., Burman, L., Dahlqvist, E., Forkman, A., Fryden, A., Lovgren, K., Norlin, K., & et al. (1984). Acyclovir versus vidarabine in herpes simplex encephalitis. Randomised multicentre study in consecutive Swedish patients. *Lancet*, 2(8405), 707-711. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(84\)92623-0](https://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(84)92623-0)
- Slavin, H. B., & Berry, G. P. (1943). Studies on Herpetic Infection in Mice : Iii. The Visceral Lesions in Suckling Mice. *J Exp Med*, 78(4), 321-326. doi: <https://dx.doi.org/10.1084/jem.78.4.321>
- Song, M., Liu, Y., Lu, Z., Luo, H., Peng, H., & Chen, P. (2020). Prognostic factors for ARDS: clinical, physiological and atypical immunodeficiency. *BMC Pulm Med*, 20(1), 102. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s12890-020-1131-0>
- Tachikawa, R., Tomii, K., Seo, R., Nagata, K., Otsuka, K., Nakagawa, A., Otsuka, K., Hashimoto, H., Watanabe, K., & Shimizu, N. (2014). Detection of herpes viruses by multiplex and real-time polymerase chain reaction in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome. *Respiration*, 87(4), 279-286. doi: <https://dx.doi.org/10.1159/000355200>
- Textoris, J., & Mallet, F. (2017). Immunosuppression and herpes viral reactivation in intensive care unit patients: one size does not fit all. *Crit Care*, 21(1), 230. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-017-1803-1>
- Therneau T [2015]. A Package for Survival Analysis in R (Version 2.38) [Computer software]. Retrieved from <https://CRAN.R-project.org/package=survival>
- Traen, S., Bochanen, N., Ieven, M., Schepens, T., Bruynseels, P., Verbrugghe, W., & Jorens, P. G. (2014). Is acyclovir effective among critically ill patients with herpes simplex in the respiratory tract? *J Clin Virol*, 60(3), 215-221. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.04.010>

- Tsangaris, I., Lekka, M. E., Kitsioui, E., Constantopoulos, S., & Nakos, G. (2003). Bronchoalveolar lavage alterations during prolonged ventilation of patients without acute lung injury. *The European respiratory journal*, 21(3), 495-501. doi: <https://dx.doi.org/10.1183/09031936.03.00037902>
- Tuxen, D. V. (1994). Prevention of lower respiratory herpes simplex virus infection with acyclovir in patients with adult respiratory distress syndrome. *Chest*, 106(1 Suppl), 28S-33S. doi: https://dx.doi.org/10.1378/chest.106.1_supplement.28s
- Tuxen, D. V., Cade, J. F., McDonald, M. I., Buchanan, M. R., Clark, R. J., & Pain, M. C. (1982). Herpes simplex virus from the lower respiratory tract in adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 126(3), 416-419. doi: <https://dx.doi.org/10.1164/arrd.1982.126.3.416>
- Tuxen, D. V., Wilson, J. W., & Cade, J. F. (1987). Prevention of lower respiratory herpes simplex virus infection with acyclovir in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 136(2), 402-405. doi: <https://dx.doi.org/10.1164/ajrccm/136.2.402>
- Ustacebi, S. (2001). Diagnosis of herpes simplex virus infections. *J Clin Virol*, 21(3), 255-259. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532\(00\)00168-2](https://dx.doi.org/10.1016/s1386-6532(00)00168-2)
- van den Brink, J. W., Simoons-Smit, A. M., Beishuizen, A., Girbes, A. R., Strack van Schijndel, R. J., & Groeneveld, A. B. (2004). Respiratory herpes simplex virus type 1 infection/colonisation in the critically ill: marker or mediator? *J Clin Virol*, 30(1), 68-72. doi: <https://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2003.09.003>
- Vincent, J. L., de Mendonca, A., Cantraine, F., Moreno, R., Takala, J., Suter, P. M., Sprung, C. L., Colardyn, F., & Blecher, S. (1998). Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med*, 26(11), 1793-1800. doi: <https://dx.doi.org/10.1097/00003246-199811000-00016>
- von Dryander, F. E. (2013). *Herpes Simplex Virus: Prävalenz, Kinetik und Relevanz bei intensivpflichtigen Patienten*. (Dissertation). Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen. Retrieved from <https://publications.rwth-aachen.de/record/229329/files/4822.pdf>
- Wald, A., & Ashley-Morrow, R. (2002). Serological testing for herpes simplex virus (HSV)-1 and HSV-2 infection. *Clin Infect Dis*, 35(Suppl 2), S173-182. doi: <https://dx.doi.org/10.1086/342104>
- Walton, A. H., Muenzer, J. T., Rasche, D., Boomer, J. S., Sato, B., Brownstein, B. H., Pachot, A., Brooks, T. L., Deych, E., Shannon, W. D., Green, J. M., Storch, G. A., & Hotchkiss, R. S. (2014). Reactivation of multiple viruses in patients with sepsis. *PLoS One*, 9(2), e98819. doi: <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0098819>
- Wang, H., & He, H. (2020). The role of high load herpes simplex virus in patients with mechanical ventilation: a real hospital acquired viral lung infection needs antiviral therapy? *Crit Care*, 24(1), 140. doi: <https://dx.doi.org/10.1186/s13054-020-2815-9>

- Warren, K. G., Brown, S. M., Wroblewska, Z., Gilden, D., Koprowski, H., & Subak-Sharpe, J. (1978). Isolation of latent herpes simplex virus from the superior cervical and vagus ganglions of human beings. *N Engl J Med*, 298(19), 1068-1069. doi: <https://dx.doi.org/10.1056/nejm197805112981907>
- Whitley, R. J., & Roizman, B. (2001). Herpes simplex virus infections. *Lancet*, 357(9267), 1513-1518. doi: [https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04638-9](https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04638-9)
- Wickham, H. [2016]. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [Computer software]: Springer-Verlag New York. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Yoshimi, M., Satou, Y., & Mori, M. (2018). A case of herpes simplex virus pneumonia detected by sputum cytodiagnosis. *Clin Case Rep*, 6(1), 165-169. doi: <https://dx.doi.org/10.1002/ccr3.1309>
- Yousuf, W., Ibrahim, H., Harfouche, M., Abu Hijleh, F., & Abu-Raddad, L. (2020). Herpes simplex virus type 1 in Europe: systematic review, meta-analyses and meta-regressions. *BMJ Glob Health*, 5(7). doi: <https://dx.doi.org/10.1136/bmjgh-2020-002388>

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Professor Reinhard Hoffmann für das Anvertrauen des ausgeklügelten und spannenden Promotionsthemas und die großartige Betreuung meiner wissenschaftlichen Arbeit bedanken! Die stets motivierende und konstruktive Unterstützung machten „Meilensteine“ wie eine Anschubfinanzierung über die neue medizinische Fakultät der Universität Augsburg, die gemeinsamen Veröffentlichungen in Critical Care und die Verleihung eines Wissenschaftspreises erst möglich.

Professor Dirk Busch bin ich für seine äußerst engagierte Unterstützung als Mentor an der Technischen Universität München sehr dankbar.

Besonders danke ich Dennis Freuer für seine großartige Hilfe bei statistischen Fragestellungen, dem Facharzt für Radiologie Michael Gebhardt für die radiologischen Analysen und dem Wirtschaftsmathematiker Dr. Hans-Georg Ruf für seine umfassenden Datenbankabfragen.

Meiner Facharzt-Weiterbildnerin Elisabeth Kling möchte ich sehr für ihr enormes Engagement in meiner Weiterbildung zum Facharzt der Laboratoriumsmedizin und für die stetige Unterstützung meines Promotionsvorhabens danken.

Zusätzlich gebührt allen Ko-Autoren und Unterstützenden im Publikationsprozess sowie dem Lektorat-Service der TUM Graduate School meine wertschätzende Dankbarkeit.

Großen Dank spreche ich auch der Fakultät für Medizin der Universität Augsburg aus, die mich für ein Jahr als wissenschaftlicher Mitarbeiter im Rahmen einer Anschubfinanzierung anstellte und damit maßgeblich zum Gelingen meiner Forschungsarbeit beitrug.

Von ganzem Herzen und in großer Verbundenheit danke ich meiner wundervollen Familie. Meinem Vater danke ich für seine große Hilfe bei der Programmierung einer VBA-Eingabemaske, die die manuelle Dateneingabe aus den handschriftlichen Intensivkurven in Excel sehr erleichterte.