

Kvantitativa odlingar från nedre luftvägarna och hur de ska tolkas

Infektion måste skiljas från kolonisation



JOHAN PETERSSON, med dr, överläkare, centrala intensivvårdsavdelningen, anesthesi-, operations- och intensivvårds-kliniken
joohan.petersson@karolinska.se

MATS KALIN, professor, överläkare, infektionskliniken
CHRISTIAN G GISKE, med dr, specialistläkare, klinisk mikrobiologi; samtliga Karolinska Universitetssjukhuset Solna

Vårdrelaterade infektioner orsakar extra lidande, ökad risk för död och ökade sjukvårdskostnader. Detta gäller inte minst ventilatorassocierad pneumoni (VAP), en komplikation som drabbar många intensivvårdspatienter. VAP orsakas ofta av bakterier med nedsatt känslighet för ett flertal antibiotika. Vi vet också att adekvat initial, empirisk antibiotikabehandling har avgörande betydelse för behandlingsresultatet [1-4]. VAP medför därför ökad användning av bredspektrumantibiotika inom intensivvården. Vi har kommit in i en ond cirkel, där ökande antibiotikaresistens leder till utökad användning av bredspektrumantibiotika, vilket leder till ännu mer antibiotikaresistens osv. Problematiken förvärras ytterligare av att diagnosen VAP är svår.

Risk för överanvändning av antibiotika inom intensivvård

Det finns inget säkert sätt att diagnostisera VAP. Hälften av de patienter som utvecklar lunginfiltrat under respiratorbehandling har ingen lunginfektion utan kan ha atelektaser, ARDS, hjärtsvikt, lungemboli, blödning, aspiration utan infektion, läkemedelsbiverkan eller annan immunologisk reaktion. Vid dessa tillstånd föreligger ofta feber och tex förhöjd CRP. Klinisk och radiologisk misstanke om pneumoni hos en ventilatorbehandlad patient leder därför ofta till empirisk antibiotikabehandling av patienter utan infektion. Behandlingen har då ingen effekt men riskerar att orsaka läkemedelsbiverkningar och resistensutveckling. Dessutom fördröjs adekvat handläggning av det tillstånd som orsakar patientens lunginfiltrat.

VAP är en vanlig misstanke på en intensivvårdsavdelning, där samtidigt risken för överanvändning av antibiotika och därav följande resistensutveckling är särskilt påtaglig [5-7]. Handläggningen av patienter med lunginfiltrat på intensivvårdsavdelningar är därför av stor vikt med hänsyn till den mycket oroande utvecklingen när det gäller antibiotikaresistens. I aktuella riktlinjer för behandling av vårdrelaterad pneumoni föreslås med hänsyn till ovanstående att antibiotikabehandling alltid ska föregås av adekvat mikrobiologisk provtagning [8-10]. Målsättningen är att odlingsresultaten ska kunna användas för att snabbt byta till antibiotika med smalast möjliga spektrum och för att avsluta antibiotikabehandlingen när ingen infektion föreligger.

Varför kvantitativa odlingar?

När det gäller odlingar från nedre luftvägarna används kvalitativa data för att identifiera agens, men kvantitativa odlingar

behövs för att bedöma om en infektion verkligen föreligger. Anledningen är att alla människor är koloniserade med stora mängder bakterier i övre luftvägarna, vilket påverkar möjligheterna till okontaminerad provtagning från nedre luftvägarna. Normalt är luftvägarna nedom stämbanden sterila, men upphostade sputumprov kontamineras alltid med oralfloora. Hos patienter som är intuberade eller trakeotomerade etablerar sig snabbt en koloniserande flora i trakea, dock med begränsad bakteriekoncentration, oftast understigande 10^5 CFU/ml (colony forming units). De bakterier som etablerar sig i trakea kommer från den flora patienten är koloniserad med i övre luftvägarna.

Vid längre sjukhusvård och svårare sjukdom utgörs koloniserande bakterier i större utsträckning av sjukhusflora inkluderande gramnegativa bakterier. Detta gäller både munfloran och koloniserande bakterier i trakea hos patienter med mekanisk ventilation. Efter längre sjukhusvistelse och inte minst efter längre ventilatortid är koloniserande bakterier ofta multiresistenta problembakterier.

Vid obehandlad pneumoni är bakterieförekomsten i sekret från nedre luftvägarna minst 10^5 – 10^6 CFU/ml [11-15], medan lägre bakteriekoncentrationer alltså kan förekomma även utan infektion [12, 16]. Fynd av $\leq 10^4$ CFU/ml betraktas därför

»Vi saknar en egentlig gold standard för diagnosen pneumoni, vilket försvårar alla försök att utvärdera eller jämföra odlingsresultat ...«

SAMMANFATTAT

Vårdrelaterade infektioner, särskilt pneumoni hos ventilatorbehandlade patienter, VAP, orsakas ofta av bakterier med ökad resistens mot många antibiotika. Adekvat antibiotikabehandling är avgörande för behandlingsresultatet.

VAP medför därför hög användning av bredspektrumantibiotika inom intensivvården, vilket kan påskynda resistensutvecklingen.

Kvantitativa luftvägsodlingar bör ingå i en strategi för att undvika inadekvat eller onödigt bred antibiotikabehandling av infekterade patienter och inte minst för att undvika

behandling av patienter utan infektion.

Kvantitativ odling av prov från nedre luftvägarna kan användas för att skilja infektion från kolonisation. Diskrimineringsförmågan är dock inte absolut. Kliniska beslut att inleda/avsluta behandling kan därför inte grundas enbart på odlingsresultat.

Rätt tolkning av kvantitativa odlingsresultat förutsätter att provtagningstekniken är standardiserad och att det mikrobiologiska laboratoriet får korrekt information om vilken teknik som använts och kunskap om vilka tröskelvärden som ska tillämpas.



Figur 1. Utrustning för provtagning med skyddad borste. Längst till vänster provtagningskatetern som den ser ut innan prov tagits. Till höger om denna en kateter där borsten förts ut ur den skyddande katetern, som vid provtagning. Längst ned pluggen som skyddar borsten före provtagningen. Högst upp till höger hela provtagningskatetern och under denna ett provrör med den avklippta borsten i 1 ml lösning.

i allmänhet som kolonisation eller kontamination. Dessa observationer utgör grund för diagnostiska gränsvärden som tillämpas för kvantitativa odlingar från nedre luftvägarna [11, 15, 16]. Odlingresultaten påverkas också i hög grad av vilken provtagningsteknik man använder. Rätt bedömning förutsätter därför standardiserad teknik och tolkning. Syftet med den här artikeln är att referera och kommentera vilka möjligheter till adekvat mikrobiologisk diagnostik som finns vid pneumoni, framför allt VAP, samt klargöra skillnaderna mellan olika provtagningstekniker.

Odlingar från prov tagna med skyddad borste

Hos sjukhuspatienter, speciellt intensivvårdspatienter, är således de centrala delarna av nedre luftvägarna ofta koloniserade med potentiella luftvägspatogener utan att de orsakar infektion. Detta försvårar förståelse tolkningen av odlingresultaten. Vid pneumoni är infektionen lokaliserad till de perifera luftvägarna. Provtagning med sk skyddad borste (PBS, protected brush specimen) via flexibelt bronkoskop medger provtagning från perifera bronker samtidigt som risken för kontamination från mer proximala delar av luftvägarna minimeras. Provet tas med en millimeterstor borste på spetsen av en metallvajer skyddad av dubbla plastkatetrar förseglade med en plugg (Figur 1). Provtagningen beräknas ge ett utbyte på 0,001–0,01 ml sekret. Katetern klipps av, och borsten skickas till det mikrobiologiska laboratoriet i 1 ml buljong.

Detta förfaringssätt medför alltså en utspädning av prov-

tagningsmaterialet med en faktor 100–1000, och fynd av 10^3 CFU/ml motsvarar en bakteriekoncentration på 10^5 – 10^6 CFU/ml i provtagen bronk [11, 17]. Tekniken har utvärderats i ett stort antal studier, och även om det inte finns någon »gold standard« att jämföra med råder enighet om att fynd av $\geq 10^3$ CFU/ml ska betraktas som signifikant [9, 11, 13–15, 17, 18]. I en metaanalys inkluderande 18 studier av intensivvårdspatienter fann man en sensitivitet och specificitet avseende bakteriell pneumoni på 85 respektive 94 procent [19]. Samma provtagningsteknik kan också användas utan hjälp av bronkoskop, sk blind skyddad borste. Detta blir då en mindre riktad provtagning från mer centrala delar av bronkträdet, men resultaten är ändå tillfredsställande med nästan lika hög sensitivitet och specificitet som med bronkoskopisk provtagning [20]. Det är viktigt att notera att i de flesta länder, och därmed i internationell litteratur, rapporteras det observerade odlingsresultatet, medan svensk praxis är att rapportera den beräknade bakterieförekomsten i sekretet på borsten före spädningen med 1 ml buljong [17]. Svenska gränsvärden är därför 1000 gånger högre än internationellt använda, dvs $\geq 10^6$ CFU/ml. En harmonisering av svenska svarsrutiner med internationella vore önskvärd för att minimera missförstånd och tolkningsproblem.

Bronkoalveolärt lavage

Korrekt utförd bronkoalveolärt lavage (BAL) innebär att bronkoskopet positioneras så att det isolerar luftvägarna distalt om bronkoskopspetsen. 100–150 ml fysiologisk NaCl injiceras och aspireras i portioner om 20–50 ml. Den första portionen kasseras eller odlas separat [14]. Därefter aspireras så mycket som möjligt, i regel 100 ml [13]. Man uppskattar att utbytet av en sådan sköljning motsvarar ca 1 ml vätska från perifera luftvägarna, vilket innebär en spädningsfaktor på 10–100 [11, 14, 17]. Ett odlingsresultat på 10^4 CFU/ml motsvarar därför 10^5 – 10^6 CFU/ml in vivo [14].

Även om olika gränsvärden föreslagits för diagnostik av pneumoni tycks det i dag råda enighet om att tillämpa ett gränsvärde på $\geq 10^4$ CFU/ml i den återaspirerade vätskan [9, 13–15, 17, 18]. I en sammanställning av 23 studier av intensivvårdspatienter fann Chastre et al att sensitivitet och specificitet avseende bakteriell pneumoni var 73 och 82 procent [13].

Enligt svenska riktlinjer rapporteras den observerade koncentrationen om resultatet är $>10^4$ CFU/ml [17]. För BAL föreligger det ingen diskrepans mellan svensk och internationell praxis avseende rapportering av kvantitativa odlingresultat.

Medan skyddad borste används enbart för diagnostik av bakteriell pneumoni, då skyddet runt borsten är avgörande för god specificitet, kan BAL också användas för diagnostik av infektioner med virus, mykobakterier, Legionellabakterier, mögelsvampar och Pneumocystis jiroveci samt för cytologisk diagnostik av icke-infektiösa lungsjukdomar.

Bronksekret och bronksköljvätska

Vid diagnostik av luftvägsinfektioner i praktisk sjukvård, t ex på intensivvårdsavdelningar, tas ofta prov i bronkträdet nedom trakea utan att bronkoskopspetsen kilas fast i en bronk, oftast med sköljning med 10–20 ml. Alternativt aspireras bronksekret direkt utan sköljning. Enligt svenska riktlinjer analyseras dessa odlingar inte kvantitativt [17]. Tekniken återspeglar bakterieförekomsten i de proximala luftvägarna mer än bakterieförekomsten i periferin. Dessa odlingar motsvarar med andra ord mer odling av trakealsekret än en korrekt utförd BAL [11]. Bronksekret som aspirerats utan spädning kan därför skickas till laboratoriet som trakealsekret. Bronksköljvätska bör enbart användas för diagnostik av in-

fektioner där kvantitativ odling inte är av värde, t ex Legionella, P jiroveci och virus.

Mini-BAL

I litteraturen har begreppet mini-BAL använts för att beskriva en icke-bronkoskopisk (blind) teknik tillämpad på intuberade patienter [21-24]. I detta fall innebär mini-BAL att en kateter förs ned via endotrakealtuben tills man känner motstånd; därefter injiceras 10–20 ml fysiologisk NaCl, som sedan aspireras. Metoden är inte allmänt spridd i Sverige. Utbytet är ofta mindre än 20 procent av den injicerade volymen [25].

Kollef et al [22] jämförde odlingar från mini-BAL med odlingar från skyddad borste. Gränsvärdet $\geq 10^3$ CFU/ml tillämpades för båda teknikerna. I 83 procent av fallen ledde båda teknikerna till samma slutsats avseende förekomst av infektion. Bregeon et al [24] fann en sensitivitet på 78 procent och en specificitet på 86 procent när mini-BAL ($\geq 10^3$ CFU/ml) jämfördes med en kombination av histopatologi och vävnadsodling.

Bronkoskopisk provtagning på svenska intensivvårdsavdelningar omfattar ofta BAL med en mindre volym sköljvätska (10–20 ml och utbyte < 10 ml). Denna teknik kallas ibland mini-BAL men skiljer sig alltså både från korrekt utförd BAL och från mini-BAL såsom tekniken beskrivs i litteraturen. En alternativ benämning vore lågvolyms-BAL (Figur 2). Om bronkoskopet positioneras som vid BAL påminner tekniken dock mycket om den form av mini-BAL som beskrivs i publicerade studier. Det är oklart vilket gränsvärde som ska tillämpas för dessa odlingar, $\geq 10^4$ CFU/ml som för BAL eller $\geq 10^3$ CFU/ml som föreslagits för mini-BAL. Om bronkoskopet inte positionerats så att det isolerar luftvägarna distalt om bronkoskopets från mer proximala luftvägar motsvarar tekniken mer odling på bronksköljvätska.

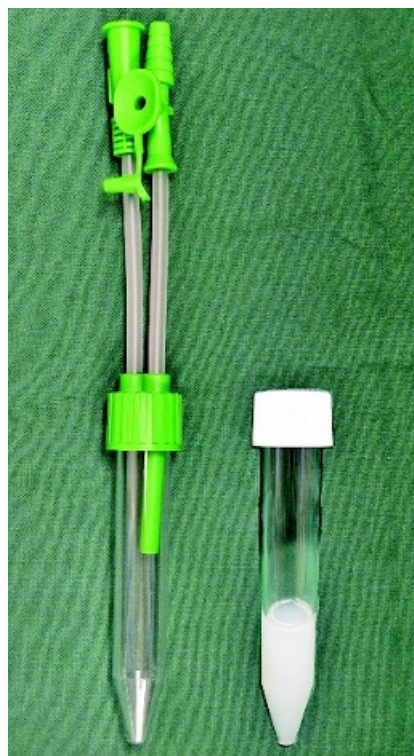
Oavsett provtagningsförfarandet är tekniken lämplig för annan diagnostik än kvantitativ odling, t ex påvisande av mykobakterier, atypiska pneumoniagens, P jiroveci etc.

Trakealsekret

Som framgått ovan är bakteriell kolonisation av trakea vanligt hos intuberade intensivvårdspatienter. Kvalitativa odlingar av trakealsekret är därför av begränsat värde för att diagnostisera infektion i nedre luftvägarna. Positiva odlingsresultat är vanliga även utan infektion [26, 27]. Negativa odlingsresultat talar dock starkt mot infektion [9, 13, 28].

Odling av prov från trakea har använts för att skilja kolonisation från infektion. Till exempel studerade Wu et al [29] intensivvårdspatienter med misstänkt VAP. Jämfört med odlingar från skyddad borste ($\geq 10^3$ CFU/ml) resulterade odlingar från trakea med $\geq 10^5$ CFU/ml i en sensitivitet på 91 procent och en specificitet på 72 procent. Gränsvärdet $\geq 10^6$ CFU/ml resulterade i högre specificitet (95 procent) men oacceptabelt låg sensitivitet (45 procent). I en liknande studie jämförde Jourdain et al [30] odlingar från BAL och skyddad borste med odlingar från trakea med $\geq 10^6$ CFU/ml och fann en sensitivitet på 68 procent och en specificitet på 84 procent avseende förekomst av bakteriell pneumoni. Hos många patienter fann man signifikant växt av olika patogener i prov från trakea och i prov taget samtidigt med skyddad borste. Jämfört med en retrospektiv bedömning av huruvida patienten haft pneumoni eller inte fann Marquette et al [31] att trakeaodlingar med $\geq 10^6$ CFU/ml hade en sensitivitet på 82 procent och en specificitet på 83 procent.

Sammantaget har en positiv kvalitativ odling från trakea lågt bevisvärde för pneumoni. Däremot har ett flertal studier visat att fynd av en hög koncentration ($\geq 10^5$ – 10^6 CFU/ml) av



Figur 2. Till vänster provtagningsmaterial för lågvolyms-BAL. Till höger provrör med den mängd som kunde aspireras efter injektion av 10 ml.

bakterier identifierade med kvantitativ odling från trakea bör inge stark misstanke om att infektion föreligger [15, 32].

Om klinisk och radiologisk misstanke om infektion finns bör man välja ett antibiotikum som är effektivt mot de patogener som isolerats med någon teknik om de kan betecknas som sannolik orsak till pneumoni. Sannolikheten för att ett isolerat agens ska vara orsak till en infektion är mycket olika, även om detta agens isolerats i hög koncentration från nedre luftvägarna. Pneumokocker representerar nästan alltid ett sant fynd. Detsamma gäller oftast H influenzae, S aureus, Pseudomonas och de flesta gramnegativa tarmbakterier om korrekt provtagning tillämpats. Däremot är fynd av koagulasnegativa stafylokocker, enterokocker, alfastreptokocker och jästsvampar sällan av diagnostiskt värde.

Sputumodling

Sputumprov blir alltid kontaminerade av bakterier från övre luftvägarna. Kontaminationen resulterar dessutom i bakteriekoncentrationer (i otvättat prov) motsvarande eller överstigande dem som återfinns i sekret från nedre luftvägarna hos patienter med pneumoni, dvs $\geq 10^5$ – 10^6 CFU/ml. Sputumodlingar är därför mer svårtolkade än andra odlingar från nedre luftvägarna.

Svarsrutinen vid svenska laboratorier innebär att växt av $\geq 10^5$ CFU/ml besvaras som positiv odling med signifikant växt. Utan kvantitativ teknik är sputumodling i stort sett utan värde. Specificiteten kan också förbättras genom att bara odla ut prov som är representativa för nedre luftvägarna, indikerat av lågt antal skivepitelceller och högt antal neutrofila granulocyter vid direktmikroskopi. Signifikant växt av ett bakteriellt agens som kan anses rimligt som orsak till bakteriell pneumoni talar för att infektion föreligger [17].

Specificiteten kan förbättras ytterligare ett steg genom att tvätta sputumproven med kranvatten i en konisk tesil, varvid mer än 99 procent av oralfloren elimineras, medan pus från nedre luftvägarna i stort sett inte alls påverkas. Direktmikro-

TABELL I. Rekommenderade gränsvärden för tolkning av kvantitativa luftvägsodlingar.

Provtagningsteknik	Definition	Gränsvärde för signifikans, CFU/ml	Gränsvärde för möjlig signifikans, CFU/ml
BAL	BAL via bronkoskop, aspiration av ≥ 100 ml	$\geq 10^4$	$\geq 10^3$
Mini-BAL	BAL via kateter, aspiration av ≥ 1 –10 ml	$\geq 10^3$	
Lågvolyms-BAL	BAL via bronkoskop, aspiration av ≥ 1 –10 ml	— ^a	— ^a
Skyddad borste ^b		$\geq 10^3$	$\geq 10^2$
Trakeal-/bronksekret och sputum		$\geq 10^5$ – 10^6	

^a För lågvolyms-BAL saknas för närvarande underlag för att fastslå gränsvärden, se texten.

^b Angivna värden avser koncentrationen i 1 ml buljong, vilket är internationell praxis. Vid svenska laboratorier tillämpas för närvarande en avvikande rutin för rapportering av odlingsresultat, vilket medför att gränsvärdena blir 1 000 gånger högre (dvs $\geq 10^6$ respektive $\geq 10^5$ CFU/ml).

»Avseende odlingsresultat från skyddad borste föreslår vi att svenska svarsrutiner harmoniseras med internationella.«

skopi för identifiering av bakterier och kvantitativ odling ger med denna teknik mycket distinkta resultat.

Begränsningarna är att många patienter inte kan producera purulenta sputumprov, att många patienter fått antibiotika före provtagning och att tvättmomentet är lite besvärligt, särskilt som risken för spridning av tex tuberkelbakterier måste hanteras när man sätter upp tekniken.

Kommentarer

Vi saknar en egentlig gold standard för diagnosen pneumoni, vilket försvårar alla försök att utvärdera eller jämföra odlingsresultat med olika provtagningstekniker. Olika kriterier för pneumoni är en orsak till att sensitiviteten och specificiteten för samma provtagningsteknik varierar kraftigt mellan olika studier.

Gränsvärden för kvantitativa odlingar är alltid en avvägning mellan sensitivitet och specificitet. Odlingsresultat strax under gränsvärdet kan vara förenligt med infektion (falskt negativt resultat) om behandling med antibiotika startats inom de senaste 48–72 timmarna [13, 31, 33]. Provtagning tidigt i förloppet kan också ge resultat under gränsvärdet. När odlingar från skyddad borste resulterade i 10^2 – 10^3 CFU/ml upprepade Dreyfuss et al [34] provtagningen några dagar senare och fann $\geq 10^3$ CFU/ml hos 35 procent av patienterna.

Ett annat problem med kvantitativa odlingar är bristande reproducerbarhet. När flera prov tas vid samma tillfälle, med samma eller med olika provtagningsteknik, fås ibland odlingsresultat som hamnar på olika sidor om gränsvärdet. Exempelvis har två studier utvärderat reproducerbarheten vid provtagning med skyddad borste [35, 36]. Hos 59 respektive 67 procent av patienterna var skillnaden mellan olika prov mer än ett spädningssteg, dvs $>10^1$ CFU/ml. Hos 14 respektive

17 procent av patienterna fördelade sig odlingsresultaten på båda sidor om gränsvärdet för pneumoni. Diskrepansen mellan olika odlingsresultat förklaras bl a av att koncentrationen av bakterier varierar med 10^1 – 10^2 /ml till och med mellan olika provtagningslokaler inom samma lungsegment [37]. Ytterligare en orsak är naturligtvis att upprepade provtagningar resulterar i olika mängd provmaterial. Det är därför inte förvånande att de flesta kliniska studier som utvärderat kvantitativa luftvägsodlingar redovisat både falskt negativa och falskt positiva odlingsresultat. Kliniska behandlingsbeslut måste därför alltid grundas på en bedömning av sannolikheten för infektion, där resultaten från kvantitativa odlingar vägs samman med andra parametrar. När odlingar tagits utan att ny antibiotikabehandling startats de föregående 72 timmarna bör dock odlingsresultat under gränsvärdena alltid leda till att eventuell antibiotikabehandling kritiskt omprövas och möjligheterna till alternativ diagnos noggrant övervägas.

Konklusion

Kvalitativa luftvägsodlingar är otillräckliga för att avgöra om en patient är infekterad eller inte, och detta gäller särskilt intensivvårdspatienter. Kvantitativa odlingar erbjuder bättre beslutsunderlag. Vilka bakteriekoncentrationer som tyder på infektion varierar med provtagningsteknik och förutsättningar vid provtagningen. Tabell I sammanfattar rekommenderade gränsvärden för tolkning av kvantitativa luftvägsodlingar. Korrekt tolkning av odlingsresultatet förutsätter att det mikrobiologiska laboratoriet får korrekt information om provtagningstekniken och att standardiserade gränsvärden används. Avseende odlingsresultat från skyddad borste föreslår vi att svenska svarsrutiner harmoniseras med internationella.

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

Kommentera denna artikel på lakartidningen.se

REFERENSER

- Kollef MH, Ward S. The influence of mini-BAL cultures on patient outcomes: implications for the antibiotic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 1998;113(2):412–20.
- Luna CM, Aruj P, Niederman MS, Garzon J, Violi D, Prignoni A, et al. Appropriateness and delay to initiate therapy in ventilator-associated pneumonia. *Eur Respir J*. 2006;27(1):158–64.
- Hubmayr RD, Burchardi H, Elliot M, Fessler H, Georgopoulos D, Jubran A, et al. Statement of the 4th International Consensus Conference in Critical Care on ICU-Acquired Pneumonia – Chicago, Illinois, May 2002. *Intensive Care Med*. 2002;28(11):1521–36.
- American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and health-care-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171(4):388–416.
- Torres A, Carlet J. Ventilator-associated pneumonia. *European Task Force on ventilator-associated pneumonia*. *Eur Respir J*. 2001;17(5):1034–45.
- Baselski VS, Wunderink RG. Bronchoscopic diagnosis of pneumonia. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7(4):533–58.
- Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165(7):867–903.

14. Meduri GU, Chastre J. The standardization of bronchoscopic techniques for ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 1992;102(5 Suppl 1):557S-564S.
15. Koenig SM, Truitt JD. Ventilator-associated pneumonia: diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(4):637-57.
17. Claesson B, Hallander H, Nyberg A, Thore M, Wollin R, Åkerlind B, editors. Referensmetodik för laboratoriediagnostik vid kliniskt mikrobiologiska laboratorier. Stockholm: Smittskyddsinstitutet; 2005.
18. Baughman RP. Microbiologic diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Clin Chest Med*. 2005; 26(1):81-6.
19. Baughman RP. Protected-specimen brush technique in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2000;117(4 Suppl 2):203S-206S.
23. Fujitani S, Yu VL. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: focus on nonbronchoscopic techniques (nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage, including mini-BAL, blinded protected specimen brush, and blinded bronchial sampling) and endotracheal aspirates. *J Intensive Care Med*. 2006;21(1):17-21.
29. Wu CL, Yang D, Wang NY, Kuo HT, Chen PZ. Quantitative culture of endotracheal aspirates in the diagnosis of ventilator-associated pneumonia in patients with treatment failure. *Chest* 2002;122(2): 662-8.
30. Jourdain B, Novara A, Joly-Guilou ML, Dombret MC, Calvat S, Trouillet JL, et al. Role of quantitative cultures of endotracheal aspirates in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152(1):241-6.
31. Marquette CH, Georges H, Wallet F, Ramon P, Saulnier F, Neviere R, et al. Diagnostic efficiency of endotracheal aspirates with quantitative bacterial cultures in intubated patients with suspected pneumonia. Comparison with the protected specimen brush. *Am Rev Respir Dis*. 1993;148(1):138-44.
33. Souweine B, Veber B, Bedos JP, Gachot B, Dombret MC, Regnier B, et al. Diagnostic accuracy of protected specimen brush and bronchoalveolar lavage in nosocomial pneumonia: impact of previous antimicrobial treatments. *Crit Care Med*. 1998;26(2):236-44.
34. Dreyfuss D, Mier L, Le Bourdelles G, Djedaini K, Brun P, Boussougant Y, et al. Clinical significance of borderline quantitative protected brush specimen culture results. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(4): 946-51.
35. Marquette CH, Herengt F, Mathieu D, Saulnier F, Courcol R, Ramon P. Diagnosis of pneumonia in mechanically ventilated patients. Repeatability of the protected specimen brush. *Am Rev Respir Dis*. 1993;147(1):211-4.
36. Timsit JF, Misset B, Francoual S, Goldstein FW, Vaury P, Carlet J. Is protected specimen brush a reproducible method to diagnose ICU-acquired pneumonia? *Chest*. 1993; 104(1):104-8.