ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

«Μελέτη καινοτόμων μεθόδων ταχείας μικροβιολογικής διάγνωσης Πνευμονίας σχετιζόμενης με Μηχανικό Αερισμό»

ΣΤΑΦΥΛΑΚΗ ΔΗΜΗΤΡΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2023

Αφιερώνεται στις κόρες μου
Εμμέλεια και Αικατερίνη-Μαρία

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Πανεπιστημιακό Νοσοκομείο Ηρακλείου σε συνεργασία με την Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του ΠΑΓΝΗ.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου και διευθυντή του εργαστηρίου κλινικής μικροβιολογίας και ιατρικής παθογένεσης του ΠΑΓΝΗ καθηγητή κ. Χαμηλό Γιώργο για την εμπιστοσύνη που μου δείχνει όλα αυτά τα χρόνια της συνεργασίας μας.

Οφείλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου στον καθηγητή εντατικής ιατρικής κ. Γεωργόπουλο Δημήτριο και την αναπληρώτρια καθηγήτρια εντατικής θεραπείας κ. Βαπορίδη Αικατερίνη για την εμπιστοσύνη και την καθοδήγηση τους στην διεκπεραίωση της μελέτης.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τους ιατρούς της ΜΕΘ με τους οποίους μοιράστηκα την ίδια αγωνία για το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα της μελέτης μας προς τους ασθενείς.

Επιπλέον θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου σε όλο το προσωπικό του μικροβιολογικού εργαστήριου του ΠΑΓΝΗ για τη άψογη συνεργασία και υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια της πορείας μου.

Ιδιαίτερα θέλω να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στη διευθύντρια του μικροβιολογικού εργαστήριου κ. Μαράκη Σοφία για την σημαντική βοήθεια και καθοδήγηση της όλα αυτά τα χρόνια, αλλά και στους διευθυντές Νεονάκη Ιωάννη και Μηναδάκη Γεώργιο, και στους συνάδελφους μου Κασιμάτη Άννα, Ηλιακή Ευαγγελία, Χατζηδοσπυριδάκη Ευαγγελία, Κουτεντάκη Δημήτριο, Μωραΐτη Παναγιώτη και Γοργομύτη Μαρία οι οποίοι συνετέλεσαν καθοριστικά στην υλοποίηση της μελέτης.

Τέλος να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, την μητέρα μου για την υποστήριξη της όλα αυτά τα χρόνια και φυσικά τον σύζυγο μου Ανδροκλή και τις κόρες μας Εμμέλεια και Αικατερίνη-Μαρία για την αγάπη και κατανόηση τους.

Το έργο αυτό διατίθεται με άδεια Creative Commons
Αναφορά Δημιουργού - Μη Εμπορική Χρήση - Όχι Παράγωγα Έργα 4.0 Διεθνές
(CC BY-NC-ND 4.0)

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Περίληψη…….……8
Summary……11
1. Γενικό μέρος……....14
1.1 Νοσοκομειακή πνευμονία
1.1.1 Ορισμός -επιδημιολογία……..…15
1.1.2 Παθογένεση……16
1.1.3 Αιτιολογία……17
1.1.4 Διαγνωστική προσέγγιση……17
1.1.5 Θεραπευτική αντιμετώπιση……19
1.2 Πνευμονία του αναπνευστήρα
1.2.1 Ορισμός -επιδημιολογία……..21
1.2.2 Παθογένεση……22
1.2.3 Αιτιολογία……24
1.2.4 Διαγνωστική προσέγγιση……25
1.2.5 Θεραπευτική αντιμετώπιση……29
1.3 Βιβλιογραφία……..33
2. Ειδικό μέρος……46
2.1 Εισαγωγή……47
2.2 Σκοπός της μελέτης……56
2.3 Ασθενείς και μέθοδοι……57
2.4 Αποτελέσματα……63
2.5 Συζήτηση……81
2.6 Συμπεράσματα……85
2.7 Βιβλιογραφία……..87
3. Παράρτημα……..94
4. Δημοσιεύσεις……108
5. Συντομογραφίες……....119

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή

Η ταχεία εξάπλωση ανθεκτικών βακτηρίων αποτελεί μια σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως. Οι νοσοκομειακές λοιμώξεις και ιδιαίτερα στο χώρο της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) αποτελούν ένα δύσκολα αντιμετωπίσιμο πρόβλημα, με τις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος να σχετίζονται με επιπλοκές τόσο ως προς την κλινική έκβαση του ασθενή (μεγαλύτερος χρόνος παραμονής, λοιμώξεις, αντοχές, κατανάλωση αντιβιοτικών, θνητότητα) αλλά και ως προς το κόστος νοσηλείας.

Το σύγχρονο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας εντάσσει καινοτόμες μεθόδους με σκοπό την ταχεία και έγκυρη μικροβιολογική διάγνωση. Η συμβολή των συνδρομικών μοριακών μεθόδων κατόπιν πρωτοκόλλων ορθής επιλογής αυτών επιφέρει τα βέλτιστα στην διαχείριση των νοσοκομειακών λοιμώξεων. Η γνώση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης σε χρονικό διάστημα λίγων ωρών καθώς και η δυνατότητα πρόσθετων πληροφορίων σχετικά με τις μικροβιακές αντοχές συντελούν στην καλύτερη διαχείριση των ασθενών μέσα από τη στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι να αξιολογηθεί η συμβολή της συνδρομικής μοριακής μεθόδου (Multiplex-PCR .BioFire FilmArray - Pneumonia plus Panel) στην διαχείριση των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου.

Μέθοδοι

Στη μελέτη μας εντάχθηκαν ασθενείς της ΜΕΘ με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (sCAP, HAP, VAP) κατά την διετία 2018-2020. Αναζητήθηκαν αντίστοιχα περιστατικά ένα χρόνο πριν την έναρξη της μελέτης (2017-2018) στο πλαίσιο συγκριτικής αξιολόγησης. Τα κριτήρια ένταξης στη μελέτη αποτέλεσαν κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα ενδεικτικά λοίμωξης του πνευμονικού παρεγχύματος, ενώ σε όλους τους ασθενείς έγινε καταγραφή των δημογραφικών και κλινικών δεδομένων. Κατά την χρονική στιγμή κλινικής διάγνωσης λοίμωξης, δείγμα ενδοτραχειακών εκκρίσεων αποστέλλονταν στο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας για έλεγχο τόσο με την συμβατική καλλιέργεια όσο και με την μοριακή μέθοδο.

Αποτελέσματα

Η μελέτη μας αξιολόγησε 79 ασθενείς (PCR group) κατά την διετία 2018-2020 και 40 ασθενείς (Control group) ένα χρόνο πριν. Η πλειοψηφία των περιστατικών αφορά λοιμώξεις που σχετίζονται με τον αναπνευστήρα (VAP) ενώ δεν υπήρξαν διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες ως προς τα δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά τους όπως επίσης και ως προς την κλινική έκβαση.

Η εφαρμογή της μοριακής μεθόδου έδωσε την δυνατότητα για ταχεία μικροβιολογική διάγνωση μέσα σε λίγες ώρες (3.5h vs 72h, $P < 0.0001$) συγκριτικά με την συμβατική καλλιεργητική μέθοδο, ενώ η σύγκριση των δύο μεθόδων ως προς τον αιτιολογικό παράγοντα έδειξε σε ποσοστό 40% συμφωνία μεταξύ αυτών. Επιπλέον σε ποσοστό 49% η μοριακή μέθοδος έδωσε σημαντικές επιπλέον πληροφορίες σε σχέση με τη συμβατική καλλιέργεια, ενώ σε ποσοστό 11% η μοριακή μέθοδος απέτυχε να ανιχνεύσει το λοιμογόνο αίτιο (έλλειψη του αντίστοιχου μοριακού στόχου στο πάνελ των παθογόνων της μεθόδου). Συγκριτική αξιολόγηση των καταναλώσεων αντιβιοτικών πριν και μετά την εφαρμογή της μοριακή μεθόδου ανέδειξε μια σημαντική μείωση στην κατανάλωση αντιβιοτικών τελευταίας γραμμής που

χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στελεχών (MDR/XDR), πιθανότητα λόγω αποκλιμάκωσης της αγωγής (de-escalation) στα πλαίσια μιας στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης.

Συμπεράσματα

Αν και είναι σημαντικό να τονισθεί ότι η συμβατική καλλιέργεια αποτελεί την Gold standard μέθοδο μικροβιολογικής διάγνωσης της πνευμονίας, η ένταξη συνδρομικών μοριακών μεθόδων σε ασθενείς με σοβαρή πνευμονία και ανάγκη νοσηλείας στη ΜΕΘ ενδέχεται να επιταχύνει σημαντικά και να βελτιστοποιήσει την αιτιολογική διάγνωση των λοιμώξεων αυτών, οδηγώντας στην καλύτερη διαχείριση της χρήσης αντιβιοτικών προς όφελος των ασθενών και του συστήματος υγείας.

SUMMARY

Introduction

Lower respiratory tract infections remain a leading cause of death worldwide. Furthermore, ventilator associated pneumonia (VAP) is a major cause of prolonged length of stay and poor outcome of patients in the Intensive Care Unit (ICU). Timely initiation of appropriate antibiotic therapy is the most critical determinant of the outcome of patients with severe community acquired pneumonia (CAP), health care associated pneumonia (HAP) and VAP. Nonetheless, empirical selection of antimicrobial therapy and optimal management of severe CAP, HAP and VAP is challenging, because of the emergence of multi- and/or pan-drug resistant (MDR/PDR) nosocomial pathogens. Molecular syndromic platforms are increasingly utilized in diagnosis of infectious diseases as a mean to improve etiological diagnosis and reduce antibiotic consumption through pathogen-guided empirical antimicrobial therapy.

The present study evaluated the performance of a molecular syndromic platform (BioFire FilmArray -Pneumonia plus Panel) in the management of lower respiratory tract infections caused by MDR/XDR pathogens in the ICU.

Methods

Eligible for enrollment to the study were all patients admitted in the ICU of University Hospital of Heraklion, Crete between June 2018 and June 2020 with severe CAP/HAP or those who developed VAP during ICU stay. Inclusion criteria were 1) age ≥ 18 years, 2) presence of clinical and radiological criteria for pneumonia according to the IDSA guidelines: new lung infiltrate on a chest X-ray and evidence that the infiltrate was of an infectious origin, i.e., at least two of three clinical features (fever greater than 38°C, leukocytosis or leukopenia, and purulent secretions), and 3) severe respiratory failure requiring ICU admission and mechanical ventilation. The following exclusion criteria were included (i) ICU patients with fever of another etiology, (ii) colonization of the

lung or ventilator associated tracheobronchitis (VAT), (iii) patient already enrolled in the study, and (iv) patients on palliative care.

Endotracheal aspirates were obtained from all the patients at the time of clinical indication of pneumonia and tested simultaneously, using conventional microbiological techniques and the PCR BioFire FilmArray Pneumonia Panel (bioMérieux S.A., France). Clinical and demographical characteristics were retrospectively obtained from the electronic medical records of each patient.

Results

We enrolled 79 consecutive critically ill patients diagnosed with different type of pneumonia (sCAP/HAP or VAP) in the ICU and compared them with an historical control group (n=40) of patients with pneumonia in the ICU during the year before the study (2017-2018). VAP comprised almost 2/3 of cases of pneumonia in both study groups. There were no significant differences in demographic and clinical characteristics of the patients, including median age, co-morbidities, and severity of illness as evidenced by APACHE II and SOFA score (on day 1). Importantly, we found no significant differences in the outcome, including mean number of days of hospitalization in the ICU and mortality rates, between the two groups of patients. Compared the results of syndromic PCR versus conventional culture of tracheal aspirates in the PCR group, we found that the syndromic PCR test was in agreement in 40 % of the cases, improved diagnosis in 49% of the cases and in11% of the cases the pathogens were identified only in culture, because the corresponding microbial targets were not included in the syndromic PCR panel.

In regard to the impact of syndromic PCR on antibiotic usage (expressed in DDD/100 BD) we found a significant reduction in the use of antimicrobials targeting MDR/XDR pathogens, including colistin, tigecycline, and carbapenems in the study group versus the historical control group. Additionally, the molecular syndromic test significantly improved time to diagnosis versus conventional culture (3.5 h vs 72 h, $P < 0.0001$).

Conclusions

The implementation of syndromic molecular diagnosis in critically ill patients with pneumonia is associated with timely and improved diagnosis and has significant impact on reduction of antibiotic consumption.

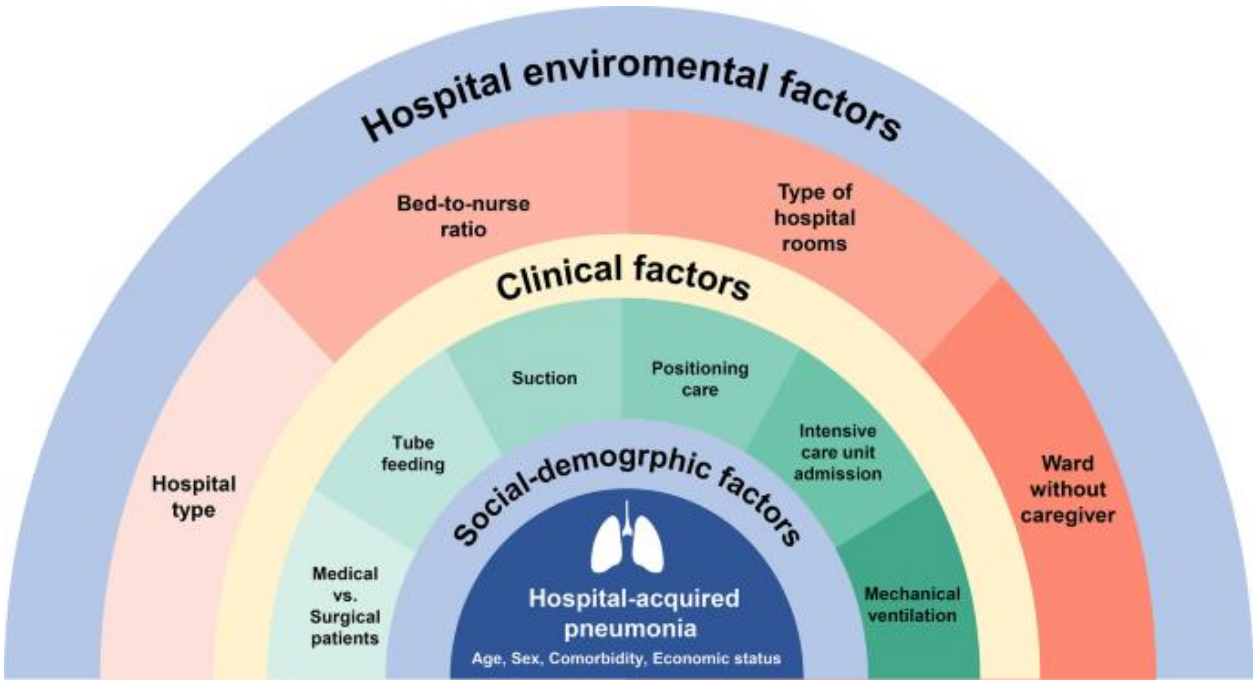
1. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Νοσοκομειακή Πνευμονία

1.1.1 Ορισμός - Επιδημιολογία

Η νοσοκομειακή πνευμονία (HAP - Hospital Acquired Pneumonia) ορίζεται ως η πνευμονική λοίμωξη που εκδηλώνεται μετά από 48 ώρες ή περισσότερο από την εισαγωγή στο νοσοκομείο σε ασθενείς που δεν χρήζουν μηχανικής υποστήριξης [1,2]. Η HAP αποτελεί μια από τις συχνότερες νοσοκομειακές λοιμώξεις με σημαντικές κλινικές και οικονομικές επιπτώσεις ως αποτέλεσμα της αύξησης σε χρόνο και κόστος νοσηλείας, νοσηρότητας και θνητότητας. Η επίπτωσή της HAP κυμαίνεται από 5 έως περισσότερες από 20 περιπτώσεις ανά 1000 εισαγωγές στο νοσοκομείο και από 2,5 έως περισσότερες από 6,1 περιπτώσεις ανά 1000 ασθενείς που δεν εισάγονται στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) [3-6]. Δυνητικά όλοι οι νοσηλευόμενοι ασθενείς έχουν αυξημένο κίνδυνο για HAP. Ο κίνδυνος αυτός αυξάνεται κυρίως σε ηλικιωμένους ασθενείς αλλά και σε ασθενείς με επιβαρυμένο ατομικό ιστορικό σοβαρών υποκείμενων νοσημάτων όπως πνευμονικών παθήσεων (ΧΑΠ, άσθμα, διάμεση πνευμονοπάθεια), καρδιακής και νεφρικής νόσου, ηπατικής κίρρωσης, μεταβολικών νοσημάτων, κακοήθειας, νευρολογικών παθήσεων, σημαντικής υποθρεψίας και ανοσοκαταστολής. Επιπλέον, η αναρρόφηση, η διασωλήνωση και ο μηχανικός αερισμός (MV) συγκαταλέγονται στους παράγοντες κινδύνου για HAP [7,8]. Στα πλαίσια της νοσοκομειακής πνευμονίας εντάσσεται πλέον και η πνευμονία που σχετίζεται με την υγειονομική περίθαλψη και αφορά την λοίμωξη του αναπνευστικού παρεγχύματος σε πρόσφατα νοσηλευόμενους ασθενείς, αιμοκαθαιρόμενους ή ασθενείς διαμένοντες σε οίκο ευγηρίας ή μονάδα μακροχρόνιας φροντίδας.

Συνεπώς ένα σύνολο παραγόντων συμβάλλουν καταλυτικά στην εκδήλωση της νοσοκομειακής πνευμονίας όπως φαίνεται στην εικόνα 1.



Εικ.1 Comprehensive risk assessment for hospital-acquired pneumonia [3].

1.1.2 Παθογένεση

Ο κύριος μηχανισμός παθογένεσης της νοσοκομειακής πνευμονίας σχετίζεται πρωτίστως με τον αποικισμό του ανώτερου αναπνευστικού από μικροοργανισμούς της ενδογενούς χλωρίδας αλλά και από εισροφήσεις εκκρίσεων. Η μικροβιολογία της λοίμωξης καθορίζεται από τον χρόνο έναρξής της. Οι λοιμογόνοι παράγοντες στην πρώιμη έναρξη της νόσου είναι κυρίως παθογόνα της κοινότητας, ενώ η όψιμη έναρξη της νόσου οφείλεται σε νοσοκομειακά πολυανθεκτικά στελέχη που είτε αποικίζουν τον στοματοφάρυγγα είτε προέρχονται από παλινδρόμηση γαστρικού περιεχομένου (εισρόφηση) το οποίο μέσω του στοματοφάρυγγα θα καταλήξει στο κατώτερο αναπνευστικό. Η επιβίωση και ο πολλαπλασιασμός των παθογόνων ευνοείται από την αλλαγή του pH του στομάχου κυρίως σε ασθενείς που λαμβάνουν αντιόξινα ή παρεντερική θρέψη. Τέλος οι μικροοργανισμοί μπορούν να εισέλθουν μέσω εισπνοής μολυσμένου αέρα ή φαρμακευτικού αερολύματος καθώς και από μη σωστή τήρηση κανόνων υγιεινής των χεριών από τους εργαζομένους [9].

1.1.3 Αιτιολογία

Η μικροβιολογική διάγνωση της νοσοκομειακής πνευμονίας (HAP) περιλαμβάνει ένα σύνολο παθογόνων που εκτός από κοινά βακτήρια περιλαμβάνει ιούς ακόμα και μύκητες. Η παρουσία νοσοκομειακών παθογόνων στελεχών όπως *Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella spp., Enterobacter spp., Escherichia coli, Acinetobacter spp., Stenotrophomonas maltophilia* και *Staphylococcus aureus* αποτελεί σε μεγάλο ποσοστό την κύρια αίτια αυτών των λοιμώξεων παγκοσμίως, με την παρουσία ιών από την κοινότητα όπως Respiratory Syncytial Virus (RSV), Influenza virus αλλά και μυκήτων όπως ο *Aspergillus Spp* σε ιδιαίτερες κατηγορίες ανοσοκατεσταλμένων ασθενών. Ιδιαίτερα ανησυχητικό είναι το γεγονός της ραγδαίας αύξησης ανθεκτικών στελεχών μικροβίων γνωστά πλέον με το ακρωνύμιο "ESKAPE" *(Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa* κα*ι Enterobacter spp*) σε βασικές κατηγορίες αντιβιοτικών αποτελώντας ένα μείζων πρόβλημα στην θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων [9-11].

1.1.4 Διαγνωστική Προσέγγιση

Η διάγνωση της νοσοκομειακής πνευμονίας αποτελεί πρόκληση για τον κλινικό ιατρό ακόμα και στα πιο καλά δομημένα συστήματα υγειονομικής περίθαλψης. Σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της IDSA (Infectious Diseases Society of America / American Thoracic Society 2016) η διάγνωση στηρίζεται στον συνδυασμό απεικονιστικών και κλινικών ευρημάτων που συνηγορούν υπερ λοίμωξης [12]. Νεότερες τεχνικές απεικόνισης και αιτιολογικής διάγνωσης καθώς και η χρήση βιοδεικτών και καινοτόμων τεχνικών μοριακής βιολογίας συντελούν στην ταχύτερη και έγκυρη διάγνωση της πνευμονίας, με σκοπό στην στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση μέσα από την διασφάλιση της χορήγησης κατάλληλης αγωγής και την αποκλιμάκωση μέσω της διακοπής της άσκοπης χορήγησης επιπλέον αντιβιοτικών.

Οι απεικονιστικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την ακτινογραφία θώρακος (Chest X-ray) ενώ τεχνικές όπως η αξονική τομογραφία χαμηλής ακτινοβολίας (LRCT) και πολύ χαμηλής ακτινοβολίας (ultra LRCT) καθώς και το διαθωρακικό υπερηχογράφημα

πνευμόνων (LUS) χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο στη διάγνωση της HAP [13,14].

Η ακτινογραφία θώρακος αποτελεί την πιο ευρέως διαθέσιμη και εύκολα πραγματοποιήσιμή ακόμα και σε κλινήρεις ασθενείς απεικονιστική μέθοδο. Πρόκειται για μη επεμβατική εξέταση, χαμηλής ακτινοβολίας και χαμηλού κόστους για την διάγνωση της πνευμονίας, η οποία μπορεί να αποτρέψει περαιτέρω απεικονιστικό έλεγχο. Η συμβολή της δεν περιορίζεται μόνο στην αρχική διάγνωση αλλά και στην εκτίμηση εξέλιξης της νόσου, την ανάδειξη νέων ευρημάτων ή ακόμα και νέων διαγνώσεων, την ανταπόκριση στην θεραπεία και την καθοδήγηση επεμβατικών διαγνωστικών διαδικασιών [15]. Συγκριτικά με την ακτινογραφία θώρακος, η αξονική τομογραφία (CT) παρέχει λεπτομερέστερη απεικόνισή του πνευμονικού παρεγχύματος [16]. Παρά όμως την υψηλή ευαισθησία της αξονικής τομογραφίας στην διαφορική διάγνωση των πνευμονικών παθήσεων ειδικά σε βαρέως πάσχοντες ασθενείς, τα ευρήματα μπορεί είναι μη ειδικά για παρουσία λοίμωξης. Η μεταφορά των ασθενών στον ειδικό χώρο εκτέλεσης της αξονικής τομογραίας αυξάνει τον κίνδυνο επιπλοκών [17], ενώ η έκθεση στην ακτινοβολία αποτελεί ένα ακόμα πρόβλημα ειδικά όταν χρησιμοποιείται φορητός αξονικός τομογράφος και απαιτούνται επαναληπτικές λήψεις στην εξέλιξη της νόσου[18]. Στους νεότερης τεχνολογίας αξονικούς τομογράφους όπως η χαμηλής (LRCT) και πολύ χαμηλής δόσης (ultra LRCT) αξονική τομογραφία η έκθεση στην ακτινοβολία τείνει την δόση της απλής ακτινογραφίας θώρακος [19,20]. Αν και το διαθωρακικό υπερηχογράφημα πνευμόνων (LUS) δεν αντικαθιστά την ακτινογραφία ή την αξονική τομογραφία θώρακος διαπιστώνεται η αποτελεσματικότητα του στην διάγνωση της πνευμονίας [21]. Η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) και η προκαλσιτονίνη (PCT) παραμένουν οι πλέον ευρέως χρησιμοποιούμενοι βιοδείκτες, παρά τους περιορισμούς που παρουσιάζουν, με το ενδιαφέρον να στρέφεται στην αναζήτηση περισσότερο ειδικών δεικτών διάγνωσης και εξέλιξης της πνευμονίας. Επιπλέον η εφαρμογή καινοτόμων μοριακών μεθόδων παρέχουν ταχεία και έγκυρη μικροβιολογική διάγνωση .

1.1.5 Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Η επιλογή της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας αποτελεί βασικό παράγοντα στην έκβαση της πνευμονίας [22-24]. Η αποτυχία της εμπειρικής αγωγής ως αποτέλεσμα της αυξημένης συχνότητας ανθεκτικών νοσοκομειακών στελεχών [25] καθιστά αναγκαία την αναζήτηση και χρήση νέων διαγνωστικών και θεραπευτικών προσεγγίσεων ικανών να ξεπεράσουν αυτό το πρόβλημα. Τα τελευταία χρόνια τα νεότερα αντιβιοτικά που έχουν λάβει έγκριση για την αντιμετώπιση των σοβαρών αναπνευστικών λοιμώξεων παρουσιάζονται στον πίνακα 1, ενώ μελετάται ή πρόκειται να μελετηθεί η δραστικότητα παραγόντων όπως Tedizolid [26], Ceftaroline–Avibactam [27], Plazomicin [28], Aztreonam–Avibactam [29] Cefoperazone–Sulbactam [30] Eravacycline, Murepavadin, και Iclaprim [31]. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον αποτελεί η χρήση αντιβιοτικών παραγόντων υπό την μορφή αερολύματος σε συνδυασμό με την συστηματική θεραπεία αλλά και σε περιπτώσεις αποτυχίας αυτής. Οι αμινογλυκοσίδες και η κολιστίνη αποτελούν τους κύριους αντιπροσωπευτικούς παράγοντες [32] με το ενδιαφέρον να στρέφεται στην αναζήτηση και μελέτη νεότερων όπως η λιποσωμιακή σιπροφλοξασίνη (liposomal Ciprofloxacin), ο συνδυασμός αερολύματος Amikacin-Fosfomycin inhalation system (AFIS), ο συνδυασμός Aztreonam - Tobramycin, ο παράγοντας Arbekacin καθώς και η χρήση βακτηριοφάγων στην διαχείριση δύσκολα αντιμετωπίσιμων λοιμώξεων [33].

Πιν.1 New molecules FDA and EMA approved for the treatment of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia.

Drug	Spectrum
Ceftobiprole	Nonextended spectrum β-lactamase, non-AmpC and non-carbapenemases-producing *Enterobacterales*, *P. aeruginosa*, MRSA
Ceftolozane-tazobactam	ESBL-producing *Enterobacterales*, MDR *P. aeruginosa*, some anaerobes, *Streptococcus spp*., MSSA
Ceftazidime-avibactam	ESBL, KPC, AmpC, and some OXA (e.g., OXA 48) producing *Enterobacterales*, MDR *P. aeruginosa*, MDR *A. baumannii*
Meropenem-vaborbactam	ESBL, KPC, AmpC-producing *Enterobacterales*, non-MDR *P. aeruginosa*, non-MDR *A. baumannii*, *Streptococcus spp*. MSSA
Cefiderocol	ESBL, CRE (class A, B, and D enzymes), CR *P. aeruginosa*, *S. maltophilia*, *A. baumannii*, *Streptococcus spp.*
Imipenem-relebactam cilastatin	ESBL, KPC-producing *Enterobacterales*, MDR *P. aeruginosa*, *Streptococcus spp*., MSSA

1.2 Πνευμονία του Αναπνευστήρα

1.2.1 Ορισμός - Επιδημιολογία

Η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) αποτελεί υποκατηγορία των νοσοκομειακών λοιμώξεων και ορίζεται ως η λοίμωξη του πνευμονικού παρεγχύματος σε ασθενείς υπό μηχανικό αερισμό για τουλάχιστον 48 ώρες. Αποτελεί την συχνότερη μορφή πνευμονίας στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας (ΜΕΘ) [34]. Η παρουσία της είναι γνωστή εδώ και πολλές δεκαετίες ως επιπλοκή της διασωλήνωσης με εκδήλωση πνευμονίας που αποδίδονταν τόσο σε παθογόνα κατά κύριο λόγο Gram- αρνητικά αλλά και στον ίδιο τον εξοπλισμό [35].

Η VAP μπορεί να εκδηλωθεί σε ποσοστό από 5-40% των ασθενών που λαμβάνουν μηχανική υποστήριξη για περισσότερες από 2 ημέρες, ενώ επηρεάζεται σημαντικά από την γεωγραφική κατανομή, τον τύπο μονάδας και τα κριτήρια που χρησιμοποιούνται για την διάγνωση της. Μελέτες που έχουν γίνει αναδεικνύουν ότι οι Ευρωπαϊκές χώρες υπερτερούν σε ποσοστά εκδήλωσης της VAP (18.3 επεισόδια ανά 1000 ημέρες μηχανικού αερισμού) σε σχέση με αντίστοιχες της Αμερικής (1.9-3.8 επεισόδια ανά 1000 ημέρες μηχανικού αερισμού) [36]. Ενώ μελέτες σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές ομάδες δείχνουν ότι ένα σύνολο παραγόντων κίνδυνου με χαρακτηριστικά του ασθενή όπως η ηλικία, συννοσηρότητες (διαταραχές του ανοσοποιητικού συστήματος, κρανιοεγκεφαλικές κακώσεις, κακοήθειες, τα σύνδρομα της χρόνιας αποφρακτικής πνευμονοπάθειας (COPD) και της οξείας αναπνευστικής δυσχέρειας, εγκαύματα), η παραμονή για μεγάλο χρονικό διάστημα στον αναπνευστήρα, προηγούμενη λήψη αντιβιοτικής αγωγής, νοσηλεία σε δομή υγείας ή επεμβατικοί χειρισμοί συνεπικουρούν στην αύξηση της επίπτωσής της [37].

Όσον αφορά την θνητότητά της ένα σύνολο καταστάσεων όπως η παρατεταμένη μηχανική υποστήριξη, ο καθυστερημένος απογαλακτισμός, η αυξημένη κατανάλωση αντιβιοτικών, η μεγαλύτερη διάρκεια νοσηλείας συντελούν στην αύξηση της θνητότητας σε ποσοστό 10% επιβαρύνοντας οικονομικά και τις δομές υγείας [38].

1.2.2 Παθογένεση

Το κατώτερο αναπνευστικό σύστημα φυσιολογικά είναι στείρο παθογόνων. Η παρουσία διαφορετικών μηχανισμών άμυνας συμβάλλει καθοριστικά στην μη εκδήλωση λοίμωξης όπως η ανατομία των αεραγωγών, το αντανακλαστικό του βήχα, η παραγωγή βλέννας, το κροσσωτό επιθήλιο, τα κυψελιδικά μακροφάγα κ.α (Πιν.2).

Πιν.2 Normal Host Defenses for Prevention of Pneumonia.

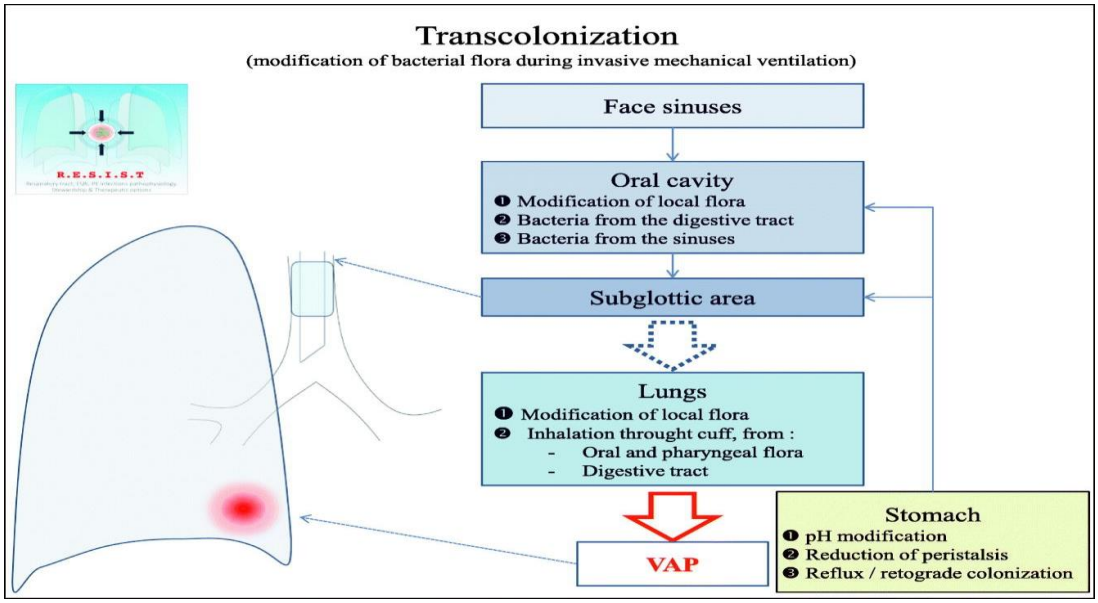
Anatomy of airways	Alveolar macrophages
Cough reflex	Leukocytes
Mucus	Immunoglobulins
Mucociliary clearance	Complement
Lactoferrin	Basement membrane

Στην εμφάνιση της VAP συνεπικουρούν πολλοί παράγοντες προκειμένου να επέλθει η λύση των αμυντικών μηχανισμών και η είσοδος δυνητικά παθογόνων στελεχών προκαλώντας τροποποιήσεις της βακτηριακής χλωρίδας γνωστό ως “transcolonization” (Εικ.2) [39]. Πρωτίστως ο ίδιος ο ξενιστής που στην πλειοψηφία των περιπτώσεων είναι βαρέως πάσχων, οι συννοσηρότητες, προηγούμενη νοσηλεία και λήψη αντιβιοτικών, ιατρικές επεμβατικές καθώς και η ίδια η διαδικασία της διασωλήνωσης με την παραμονή του μηχανικού αερισμού για μεγάλο διάστημα προδιαθέτουν την εκδήλωση της λοίμωξης η οποία θα μπορούσε να μετονομαστεί σε «πνευμονία που σχετίζεται με ενδοτραχειακή διασωλήνωση».

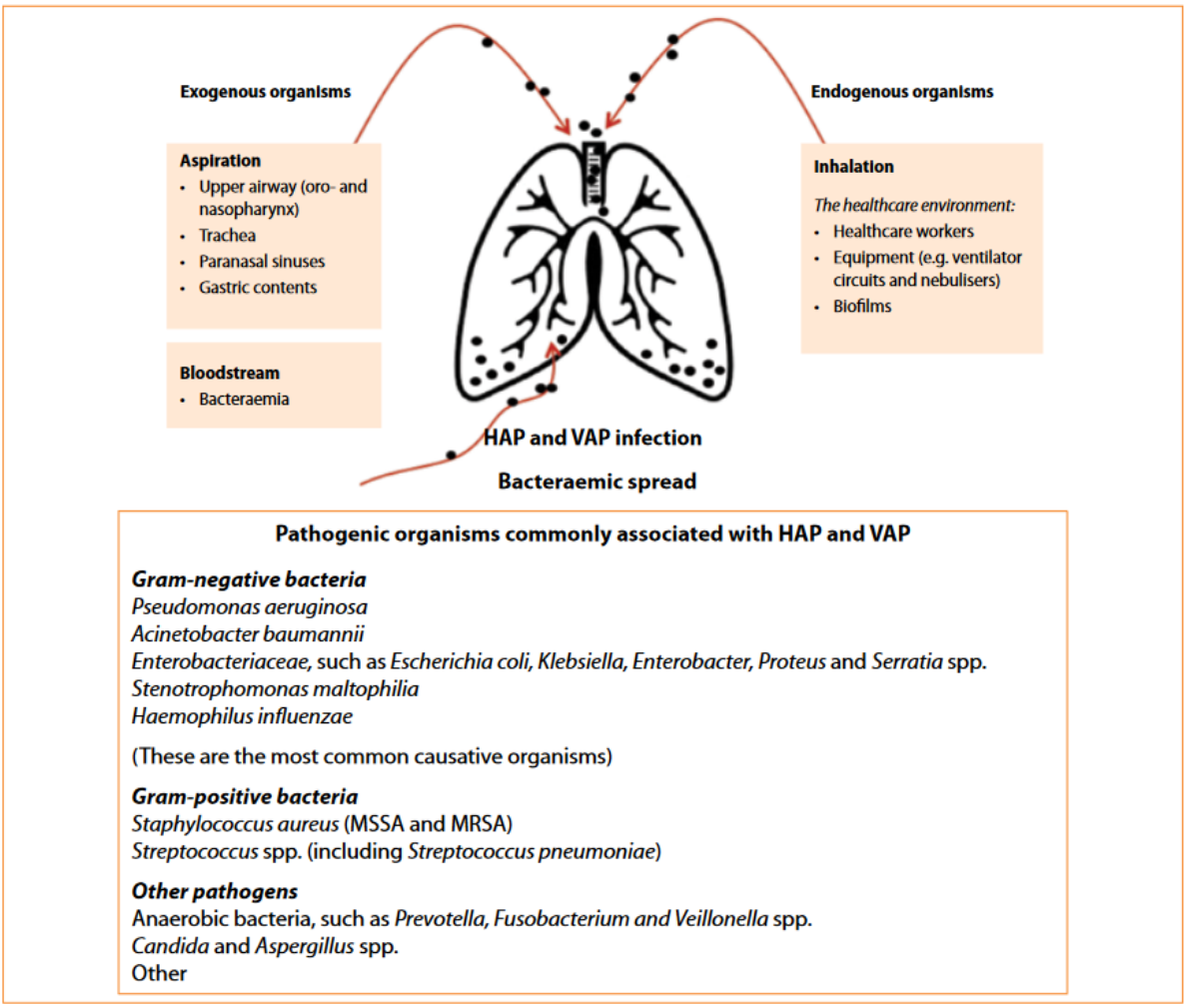
Οι οδοί μέσω των οποίων οι μικροοργανισμοί αποκτούν πρόσβαση στο στείρο περιβάλλον των πνευμόνων μπορεί να είναι μέσω μικρο-μακρο εισροφήσεων με την εμπλοκή πρωτίστως μικροοργανισμών της ενδογενούς χλωρίδας που αποικίζουν το ανώτερο αναπνευστικό και δευτερογενώς του πεπτικού σωλήνα. Οι εκκρίσεις αυτές προερχόμενες είτε από τον στοματοφάρυγγα είτε από τον στόμαχο μέσω παλινδρόμησης θα καταλήξουν στο κατώτερο αναπνευστικό σύστημα, προσβάλλοντας το πνευμονικό παρέγχυμα και ενεργοποιώντας την διαδικασία της φλεγμονώδους

εξεργασίας. Επιπλέον ο ίδιος ο ενδοτραχειακός σωλήνας μπορεί να λειτουργήσει ως πηγή ακόμα και πολυανθεκτικών στελεχών είτε με την παραμονή εκκρίσεων σε τμήματα του που θα επεκταθούν χαμηλότερα, είτε με τον σχηματισμό βιομεμβράνης γύρω από το ξένο σώμα. Η δημιουργία της βιομεμβράνης προσδίδει ανθεκτικότητα στην δράση των αντιβιοτικών και στους αμυντικούς μηχανισμούς του ξενιστή, ευνοώντας παράλληλα και την ανάπτυξη πολυανθεκτικών στελεχών, καθιστώντας εξαιρετικά δύσκολη την θεραπευτική αντιμετώπιση τους [40].

Στα πλαίσια της ενδημικής VAP η προσβολή μπορεί να συμβεί ως επέκταση παρακείμενης λοίμωξης κατά συνέχεια ιστού πχ του υπεζωκοτικού χώρου, είτε μέσω αιματογενούς διασποράς μικροοργανισμών ως βακτηριαιμία από καθετηριασμό. Πέραν όμως του μικροβιώματος του ξενιστή που κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες θα συμπεριφερθεί ως λοιμογόνος παράγοντας, μια λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος μπορεί να γίνει από μικροοργανισμούς εξωγενούς προέλευσης, από το περιβάλλον της μονάδας όπως η μη σωστή διαχείριση ατομικών μέτρων προστασίας, ιατρικού εξοπλισμού καθώς και η εισπνοή επιμολυσμένων ιατρικών αερολυμάτων, αέρα και νερού (Εικ.3).



Εικ.2 Transcolonization" as a nosological entity playing a central role in ventilator-associated pneumonia [39].



Εικ.3 The most common sources and pathogenic organisms associated with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia [41].

1.2.3 Αιτιολογία

Η μικροβιολογία της πνευμονίας που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα ποικίλει. Ένα σύνολο παραγόντων επηρεάζει και τελικά ορίζει ένα ή ακόμα και περισσότερα λοιμογόνα στελέχη υπεύθυνα της λοίμωξης. Στους παράγοντες αυτούς περιλαμβάνεται η χρονική διάρκεια του μηχανικού αερισμού, ο συνολικός χρόνος νοσηλείας σε δομές υγείας ή στην μονάδα εντατικής θεραπείας, προηγούμενη λήψη αντιβιοτικής αγωγής και η τοπική επιδημιολογία της μονάδας. Η πλειοψηφία των μικροοργανισμών που εμπλέκονται στην VAP περιλαμβάνει κυρίως Gram-αρνητικά παθογόνα όπως *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, και *Acinetobacter*

spp.,ενώ από τους Gram-θετικούς μικροοργανισμούς υπερτερεί *ο Staphylococcus aureus* [42-45]. Μελετώντας την αιτιολογία της VAP σε σχέση με τον χρόνο εμφάνισής της φαίνεται ότι οι μικροοργανισμοί που εμπλέκονται στην πρώιμη εμφάνιση της VAP (early-onset VAP), δηλαδή στις τέσσερις πρώτες ημέρες νοσηλείας, προέρχονται κυρίως από την χλωρίδα του ανωτέρου αναπνευστικού, εν αντιθέση με την όψιμη εμφάνιση της VAP (late-onset VAP), που χρονικά ορίζεται μετά την πέμπτη ημέρα νοσηλείας, όπου αποδίδεται στην παρουσία ακόμα και πολυανθεκτικών στελεχών. Φυσικά η παρουσία τέτοιων στελεχών με αντοχές σε αρκετές κατηγορίες αντιβιοτικών δεν μπορεί να αποκλειστεί ούτε στην πρώιμη εμφάνιση της πνευμονίας επι παρουσίας παραγόντων κινδύνου, όπως λήψη πρόσφατα αντιβιοτικής αγωγής, ο αποικισμός ήδη από πολυανθεκτικά στελέχη, μια εμμένουσα πνευμονία του αναπνευστήρα ακόμα και σηπτική καταπληξία. Υπάρχουν βέβαια και οι μελέτες στις οποίες δεν διαπιστώθηκαν διαφορές στην αιτιολογία της VAP στα αντίστοιχα χρονικά διαστήματα [34,46].Επιπρόσθετα η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών τύπου ESBL, AmpC β-λακταμάση, carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) καθώς και πολυανθεκτικών *Pseudomonas aeruginosa* (MDR Pa) και *Acinetobacter baumannii* (MDR-AB) αποτελεί ένα παγκόσμιο πλέον πρόβλημα διαχείρισης των λοιμώξεων [47-50].

1.2.4 Διαγνωστική Προσέγγιση

Λαμβάνοντας υπόψιν τις σημαντικές επιπλοκές της VAP ως προς την νοσηρότητα και την θνητότητα, τον χρόνο παραμονής, την κατανάλωση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών και την ανάδειξη ανθεκτικών στελεχών κρίνεται απαραίτητη η ταχεία και αληθή διάγνωση της λοίμωξης του πνευμονικού παρεγχύματος ακολουθούμενη από στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση.

Η διάγνωση της πνευμονίας προβληματίζει ιδιαίτερα τον κλινικό ιατρό στα πλαίσια της διαφορικής διάγνωσης μιας πραγματικής VAP, από τον αποικισμό ή την τραχειοβρογχίτιδα. Η διάγνωση της VAP ως επί το πλείστον περικλείει την συνύπαρξη κλινικών ενδείξεων, ακτινολογικών ευρημάτων και της μικροβιολογικής διάγνωσης που προκύπτει από την καλλιέργεια δείγματος του κατώτερου αναπνευστικού [22,46]. Ευρήματα κλινικής υποψίας της VAP αποτελούν η άνοδος της θερμοκρασίας, η

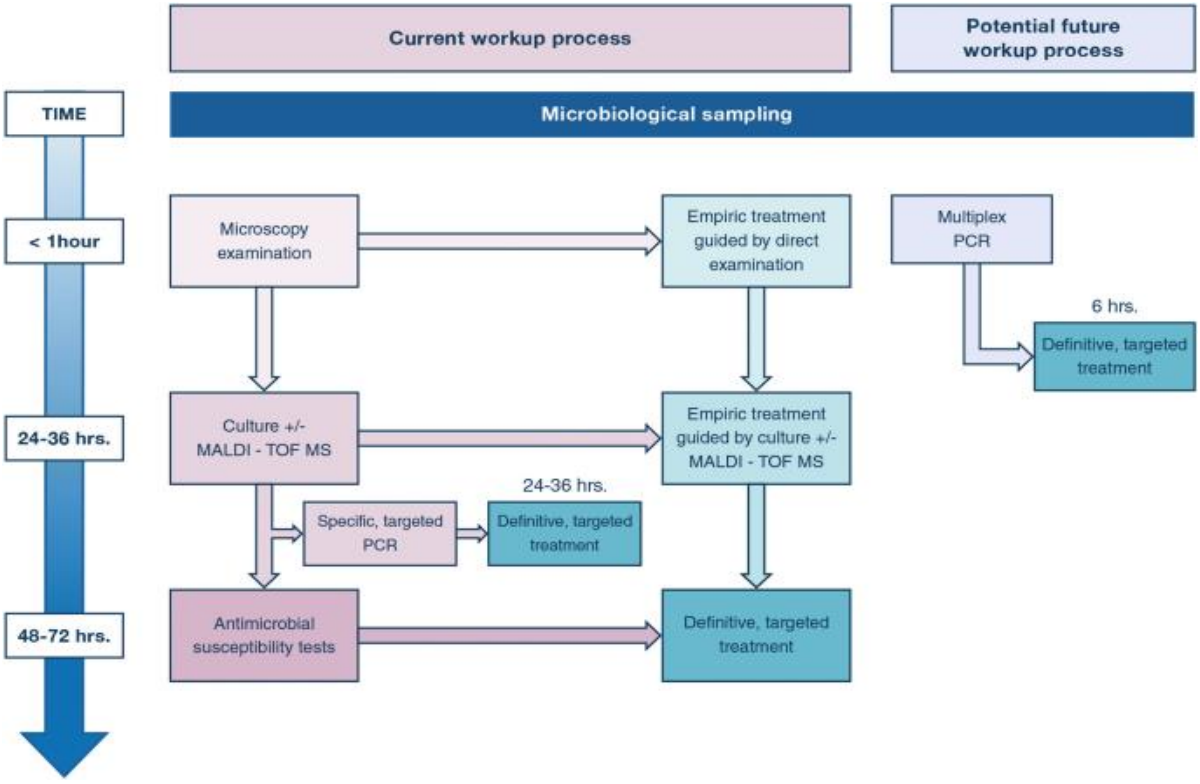
λευκοκυττάρωση, η αλλαγή των εκκρίσεων (πυώδεις εκκρίσεις), η αυξημένη ανάγκη οξυγόνωσης τα οποία συνδυάζονται με ακτινολογικά ευρήματα νέων ή εξελισσόμενων διηθήσεων μέσω απεικονιστικών τεχνικών όπως η απλή ακτινογραφίας θώρακος (chest X-rays) είτε εναλλακτικά ή αξονική τομογραφία (Computed tomography / CT) ακόμα και αν δεν αποτελούν τα μέσα διάγνωσης της VAP, με την χρήση τελευταία του διαθωρακικού υπερηχογράφηματος πνευμόνων (LUS) να αποτελεί ένα μέσο πιθανής διάγνωσης. Από τα βασικότερα κριτήρια διάγνωσης αποτελεί η μικροβιολογική ποσοτική καλλιέργεια του υπευθύνου λοιμογόνου παράγοντα (Πιν.3) [51]. Αποδεικνύεται ότι η καλλιέργεια δείγματος από το κατώτερο αναπνευστικό συμβάλλει σημαντικά στην βέλτιστη κλινική έκβαση [52] πολύ περισσότερο όταν πραγματοποιείται πριν την έναρξη της αντιβιοτικής θεραπείας, η οποία μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το αποτέλεσμα της μικροβιολογικής καλλιέργειας. Όσον αφορά την Gram χρώση η ευαισθησία και η ειδικότητα της δεν μπορούν να τεκμηριώσουν την VAP με το ενδιαφέρον να στρέφεται στην αναζήτηση βιοδεικτών καθώς και καινοτόμων τεχνικών που θα παρέχουν την ταχεία διάγνωσή της VAP. Στα πλαίσια επίτευξης μεγαλύτερης διαγνωστικής ακρίβειας της VAP έχουν επίσης προταθεί βαθμολογικές κλίμακες (scores) όπως το Clinical Pulmonary Infection Score (CPIS) βάση κλινικών, ακτινολογικών και μικροβιολογικών παραμέτρων τα οποία συνεπικουρούν στην διάγνωση της νόσου [53,54]. Στο στόχο αυτό συγκαταλέγεται η χρήση και μελέτη βιοδεικτών όπως η C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (C-reactive protein / CRP), η προκαλσιτονίνη (PCT) καθώς και ο ειδικός υποδοχέας (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells, sTREM-1) [55-57]. Συνεπώς η μεγαλύτερη διαγνωστική ακρίβεια και θεραπευτική ανταπόκριση αποτελεί ο παραπάνω συνδυασμός [58].

Πιν.3 Diagnostic criteria requested for VAP [51].

New or progressive persistent infiltrate on chest radiograph	Present
Clinical observation suggesting infection	At least two of the following: New onset of fever Purulent endotracheal aspirate Leukocytosis or leucopenia Increased minute ventilation Arterial oxygenation decline Need for increased vasopressor infusion to maintain blood pressure
Microbiological culture results	At least one of the following: Positive blood culture not related to another infection Positive pleural fluid culture Positive quantitative culture from minimally contaminated LRT specimen (e.g. BAL ≥104 CFU/mL) Positive quantitative culture from endotracheal aspirate specimen (e.g. ETA ≥105 CFU/mL) ≥5 % BAL-obtained cells contain intracellular bacteria on direct microscopic exam Histopathologic exam shows one of the following: Abscess formation or foci of consolidation with intense PMN accumulation in bronchioles and alveoli Positive quantitative culture of lung parenchyma

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της συμβατικής καλλιέργειας είναι ο χρόνος μικροβιολογικής διάγνωσης ο οποίος κυμαίνεται από 24-48 ώρες και κάποιες φορές ακόμα περισσότερο στην προσπάθεια ταυτοποίησης και ελέγχου ευαισθησίας του υπευθύνου παθογόνου (Εικ.4) με ότι αυτό συνεπάγεται από την έναρξη εμπειρικής

αντιβιοτικής αγωγής μέχρι του οριστικού αποτελέσματος. Τα τελευταία χρόνια η επιτακτική ανάγκη για την καλύτερη διαχείριση των λοιμώξεων επιβάλλει την ένταξη καινοτόμων μεθόδων υψηλής ευαισθησίας και ειδικότητας. Μοριακές τεχνικές επιτρέπουν την ανίχνευση γενετικού υλικού παθογόνων στελεχών συνδυαστικά με την ανίχνευση γονίδιων αντοχής απευθείας από το κλινικό δείγμα [59,60] χωρίς φυσικά να στερούνται και περιορισμών (υπερεκτίμηση ή μη ανίχνευση παθογόνων, αποικισμός, κόστος). Η φασματομετρία μάζας MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) technology, εντάσσεται πλέον στο κλινικό μικροβιολογικό εργαστήριο παρέχοντας ταχύτατη ταυτοποίηση σε επίπεδο είδους, γένους και οικογένειας, βακτηρίων και μυκήτων αλλά και ανίχνευσης ανθεκτικών στελεχών [61,62]. Η διαχείριση των λοιμώξεων με την χρήση νεότερων μεθόδων ταχείας διάγνωσης και στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης σε συνδυασμό με προγράμματα αντιβιοτικής επιτήρησης δικαιολογούν τη σχέση κόστους-οφέλους μέσω της αποκλιμάκωσης των αντιβιοτικών και ενδεχομένως επηρεάζουν θετικά την κλινική έκβαση των ασθενών μέσω της έγκαιρης χορήγησης κατάλληλης θεραπείας [63].



Εικ.4 Current and potential future workup processes for identification of pathogens responsible for VAP [34].

1.2.5 Θεραπευτική Αντιμετώπιση

Είναι γενικά αποδεκτό ότι η έγκαιρη έναρξη της κατάλληλης αντιβιοτικής θεραπείας καθορίζει σημαντικά την κλινική έκβαση [64]. Επί του παρόντος η επιλογή της εμπειρικής αγωγής στην VAP αποτελεί πρόκληση εξαιτίας της ραγδαίας αύξησης πολυανθεκτικών ή ακόμα και πανανθεκτικών νοσοκομειακών στελεχών (MDR/PDR) [65], ως φαινόμενο να εκδηλώνεται σε παγκόσμιο επίπεδο χωρών μεταξύ των οποίων και η Ελλάδα [66].

Ο χρόνος έναρξης και η επιλογή του κατάλληλου θεραπευτικού σχήματος καθορίζεται από την σοβαρότητα της κλινικής κατάστασης του ασθενούς, την παρουσία σημαντικών συννοσηροτήτων, την ύπαρξη παραγόντων κινδύνου για πολυανθεκτικά στελέχη και φυσικά την τοπική επιδημιολογία επικράτησης στελεχών με το αντίστοιχο προφίλ αντοχών. Στους παράγοντες κινδύνου εμφάνισης ανθεκτικών στελεχών συγκαταλέγεται η λήψη αντιβιοτικής αγωγής τις προηγούμενες 90 ημέρες, η πρόσφατη νοσηλεία, το σηπτικό σοκ, το σύνδρομο ARDS, η αιμοκάθαρση ο αποικισμός ήδη από ανθεκτικά στελέχη και ένα υψηλό ποσοστό ανθεκτικών στελεχών σε τοπικό επίπεδο [67]. Συνεπώς η επιλογή της εμπειρικής αντιβιοτικής αγωγής είναι πολυπαραγοντική όπως φαίνεται στον πίνακα 4 [46,68].

Το παγκόσμιο πρόβλημα στη αντιμετώπιση των λοιμώξεων αποτελούν οι μηχανισμοί αντοχών των Gram αρνητικών παθογόνων όπως extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), ampicillinase C (AmpC) και κυρίως η εξάπλωση των Carbapenem-resistant enterobacterales (CRE) [69]. Νέοι θεραπευτικοί παράγοντες καθώς και συνδυασμοί β-λαμταμικών με αναστολείς των β-λακταμασών είναι πλέον διαθέσιμοι καθώς είναι αρκετά αποτελεσματικοί και λιγότερο τοξικοί στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη [70-72]. Οι συνδυασμοί Ceftazidime-Avibactam, Imipenem-Relebactam και Meropenem-Vaborbactam είναι ιδιαιτερα αποτελεσματικοι έναντι των CRE και κυρίως της *Klebsiella pneumoniae*, όπως και οι παράγοντες Ceftazidime-Avibactam, Ceftolozane-Tazobactam, Imipenem-Relabactam και Cefiderocol έναντι ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* με το Cefiderocol να αντιμετώπίζει το *Acinetobacter baumannii* μαζί με Plazomicin και Eravacycline.

Αναλυτικότερα, ο νέος συνδυασμός αντιβιοτικών κεφταζιδίμη - αβιμπακτάμη περιλαμβάνει μια ημισυνθετική κεφαλοσπορίνη τρίτης γενιάς και έναν νέο αναστολέα

μη β-λακταμικής/β-λακταμάσης ο οποίος παρέχει προστασία έναντι της υδρολυτικής δράσης β-λακταμασών τάξεων A (π.χ ESBL και K. pneumoniae KPC), C (π.χ AmpC) και D (π.χ OXA-48 enzymes) με ελλειπή δράση έναντι της τάξης B και μειωμένη ως προς το *A. baumannii*, τα αναερόβια Gram-αρνητικά βακτήρια και τους Gram-θετικούς κόκκους [73,74]. Ο συνδυασμός κεφτολοζάνη – ταζομπακταμη (κεφαλοσπορίνη μαζί με β λακταμικό αναστολέα) αποτελεί ένα δραστικό παράγοντα έναντι ESBL-εντεροβακτηριακών και MDR/XDR στελεχών *P. aeruginosa*, με ελλειπή δράση προς τις καρβαπενεμάσες, το *A. baumannii* και την *S. maltophilia* [75,76]. Η κεφιντεροκόλη ως σιδηροφόρος κεφαλοσπορίνη παραμένει δραστική έναντι β-λακταμασών τάξεων κατά Ambler A, B, C, D εντεροβακτηριακών και αζυμώτικών στελεχών [77,78] ενώ ο συνδυασμός της μεροπενέμης με βαμπορβακτάμη περιορίζει την δράση των λακταμασών ταξης A και C [79]. Η ιμιπενέμη μαζί με τον αναστολέα ρελεμπακτάμη αποκαθιστά την δραστικότητα της ιμιπενέμης έναντι β-λακταμασών τάξεων κατά Ambler A και C [80], έναντι ανθεκτικών στελεχών *Pseudomonas aeruginosa* και KPC-εντεροβακτηριακών με ανεπαρκή δράση έναντι του *Acinetobacter baumannii* και της *Stenotrophomonas maltophilia* [81,82]. Δραστικότητα έναντι των καρβαπενεμασών τάξεων A, C και D β-lactamases, metallo-β-lactamases (MβLs) παρουσιάζει και ο συνδυασμός αζτρεονάμης με αβιμπακτάμη η δράση του οποίου μπορεί να επεκταθεί [83]. Η πλαζομικίνη ανήκει στην κατηγορία των αμινογλυκοσίδων με ανάλογη δράση κυρίως στις βακτηριαιμίες και τις ουρολοιμώξεις με ανεπαρκή δεδομένα ως προς την πνευμονία [84]. Τέλος η εραβακυκλίνη μια από τις νεότερες τετρακυκλίνες το φάσμα της οποίας περιλαμβάνει τόσο Gram- θετικά όσο και Gram- αρνητικά στελέχη επεκτείνεται ακόμα και στο *Acinetobacter baumannii* αποκλείοντας από την δράση της στελέχη *Pseudomonas aeruginosa* [85,86] (Εικ.5).

Καταλήγοντας, η παρουσία των εγκεκριμένων νεότερων θεραπευτικών επιλογών αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό άμυνας στην απειλή των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη. Μελέτες δείχνουν την αποτελεσματικότητα αυτών παράλληλα με την μικρότερη τοξικότητα άλλων θεραπευτικών παραγόντων. Προκειμένου να αποφευχθεί η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών απαιτείται ορθολογική χρήση των νεότερων αυτών παραγόντων σε συνδυασμό με προγράμματα επιτήρησης και γνώση της τοπικής επιδημιολογίας ώστε να επιτελείται η βέλτιστη θεραπευτική αντιμετώπιση [87,88].

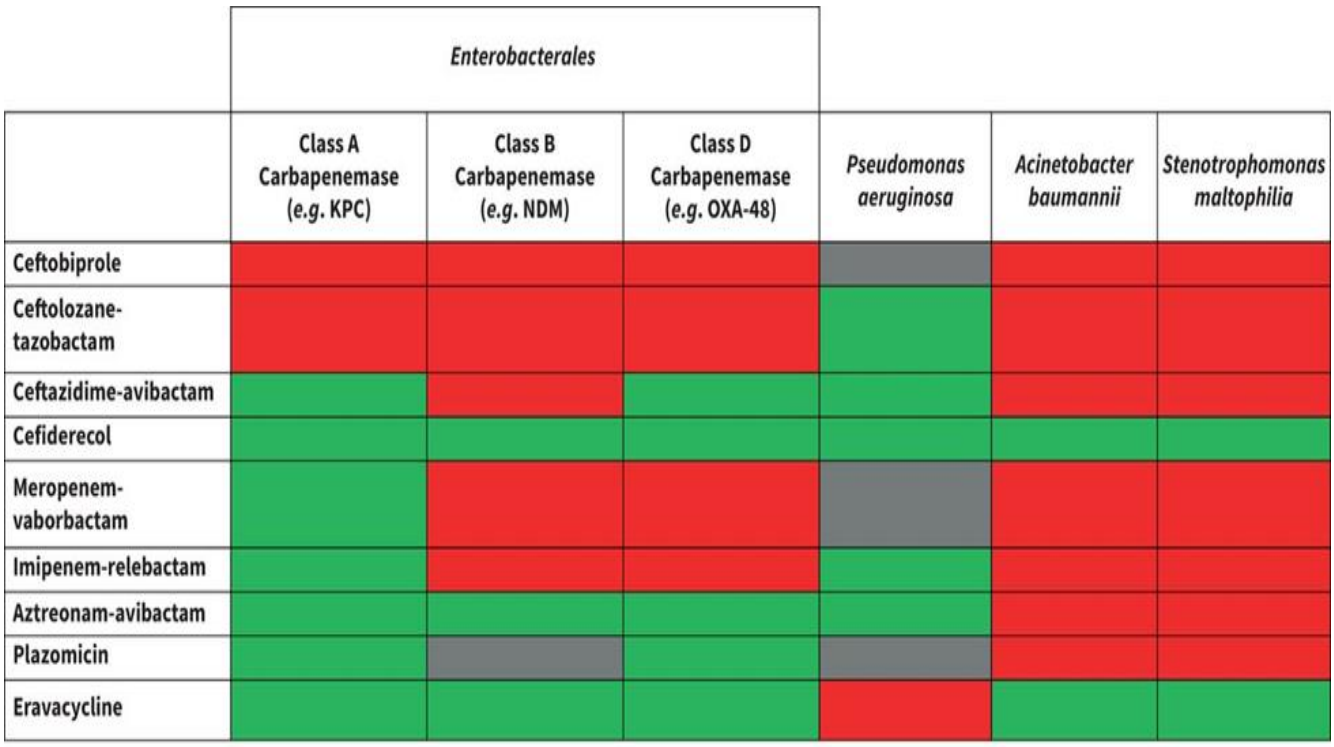
Πιν 4 Suggested initial empirical antimicrobial treatment of ventilator-associated pneumonia

Situation	Therapeutic class	Agent
Early VAP (< 5 days), without MDR bacteria risk factor*	Non-antipseudomonal β-lactam	Amoxicillin/clavulanic acid† OR Third generation cephalosporin
Late VAP (≥ 5 days), OR Risk factors for MDR bacteria	β-lactam active against *Pseudomonas aeruginosa* AND Non β-lactam antipseudomonal agent	Cefepime 2 g q 8 h OR Ceftazidime 2 g q 8 h OR Piperacillin–tazobactam 4 g q 6 h OR Meropenem 2 g q 8 h Amikacin 25 mg/kg/day OR Ciprofloxacin 1200 mg/day
Known MRSA colonization, or high (> 20%) MRSA prevalence in the unit	Agent active against MRSA	Vancomycin 30–45 mg/kg/day OR Linezolid 600 mg/12 h
Known colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae or *Pseudomonas aeruginosa* susceptible only to new beta-lactam agents	New β-lactam agent	Ceftolozane–tazobactam 3 g q 8 h‡ OR Ceftazidime–avibactam 2.5 g q 8 h‡ OR Meropenem–vaborbactam 4 g q 8 h‡ OR Imipenem–relebactam 1.5 g q 6 h‡

*This situation and the corresponding antimicrobial agents are not mentioned in IDSA/ATS guidelines [46]

†According to [68]

‡The empirical use of these agents should be restricted to patients colonized by specific pathogens (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae or extensively drug-resistant Pseudomonas aeruginosa), according to previous susceptibility testing showing that the pathogen is susceptible to the agent



Εικ.5 Activity of new agents against Gram-negative pathogens. Grey shading: variable activity; red shading: non-activity; green shading: activity. KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemases; OXA: OXA-β-lactamases; NDM: New Delhi metallo-β-lactamase [88].

1.3 Βιβλιογραφία

[1] Frantzeska Frantzeskaki, Stylianos E. Orfanos. Treating nosocomial pneumonia: what's new. ERJ Open Research 2018 4: 00058-2018; DOI: 10.1183/23120541.00058-2018

[2] Pavlos M Myrianthefs , Maria Kalafati, Irini Samara, George J Baltopoulos. Nosocomial pneumonia. Crit Care Nurs Q. 2004 Jul-Sep; 27(3):241-57. doi:10.1097/00002727-200407000-00005

[3] Kim et al. Comprehensive risk assessment for hospital-acquired pneumonia: sociodemographic, clinical, and hospital environmental factors associated with the incidence of hospital-acquired pneumonia. BMC Pulmonary Medicine (2022) 22:21. https://doi.org/10.1186/s12890-021-01816-9

[4] Eber MR, Laxminarayan R, Perencevich EN, Malani A. Clinical and economic outcomes attributable to health care-associated sepsis and pneumonia. Arch Intern Med.2010 Feb 22;170(4):347-53. doi: 10.1001/archinternmed.2009.509

[5] Park H, Adeyemi AO, Rascati KL. Direct Medical costs and utilization of health care services to treat pneumonia in the United States: an analysis of the 2007–2011 medical expenditure panel survey. Clin Ther. 2015 Jul 1;37(7):1466-1476.e1. doi:10.1016/j.clinthera.2015.04.013

[6] Sopena N, Sabrià M. Multicenter study of hospital-acquired pneumonia in non-ICU patients. Chest. 2005 Jan;127(1):213-9. doi: 10.1378/chest.127.1.213

[7] Nieves Sopena , Eva Heras , Irma Casas , Jordi Bechini , Ignasi Guasch , Maria Luisa Pedro-Botet , Silvia Roure , Miquel Sabrià . Risk factors for hospital-acquired pneumonia outside the intensive care unit: a case-control study. Am J Infect Control. 2014 Jan;42(1):38-42. doi: 10.1016/j.ajic.2013.06.021

[8] Sachin M. Patil. Hospital-Acquired Pneumonia BOOKS PNEUMONIA. DOI:10.5772/intechopen.101236

[9] Lynn S. Fine. Non-ventilator health care-associated pneumonia (NV-HAP): Pathogenesis and microbiology of NV-HAP. Am J Infect Control. 2020 May;48(5S):A7-A9. doi: 10.1016/j.ajic.2020.03.009

[10] Ronald N. Jones. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. Clinical Infectious Diseases, Volume 51, Issue Supplement_1, January-February 1988, Pages S81–S87, https://doi.org/10.1086/653053

[11] David M. P. De Oliveira, Brian M. Forde, Timothy J. Kidd et all. Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. American Society for Microbiology. DOI: https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19

[12] American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Feb 15;171(4):388-416.doi: 10.1164/rccm.200405-644ST

[13] Elena Xu, David Pérez-Torres, Paraskevi C. Fragkou , Jean-Ralph Zahar, Despoina Koulenti. Nosocomial Pneumonia in the Era of Multidrug-Resistance: Updates in Diagnosis and Management. Microorganisms. 2021 Mar 5;9(3):534.doi: 10.3390/microorganisms9030534

[14] Koulenti D, Zhang, Y, Fragkou, P.C. Nosocomial pneumonia diagnosis revisited. Curr Opin Crit Care. 2020 Oct;26(5):442-449. doi:10.1097/MCC.0000000000000756

[15] T. Franquet. Imaging of pneumonia: trends and algorithms. Eur Respir J. 2001 Jul;18(1):196-208. doi: 10.1183/09031936.01.00213501

[16] Wesley H Self, D Mark Courtney, Candace D McNaughton, Richard G Wunderink, Jeffrey A Kline. High discordance of chest x-ray and computed tomography for detection of pulmonary opacities in ED patients: implications for diagnosing pneumonia. Am J Emerg Med. 2013Feb;31(2):401-5. doi:10.1016/j.ajem.2012.08.041

[17] Patrick H Knight ,Neelabh Maheshwari ,Jafar Hussain, Michael Scholl, Michael Hughes, Thomas J Papadimos, Weidun Alan Guo, James Cipolla Stanislaw P Stawicki , Nicholas Latchana. Complications during intrahospital transport of critically ill patients: Focus on risk identification and prevention. Int J Crit Illn Inj Sci. 2015 Oct-Dec;5(4):256-64. doi: 10.4103/2229-5151.170840

[18] Fred, H.L. Drawbacks and limitations of computed tomography: Views from a medical educator. Tex. Heart Inst. J. 2004, 31, 345

[19] Hoesein,F,M.Low-dose computed tomography instead of radiography in suspected pneumonia. Breathe (Sheff). 2019 Mar;15(1):81-83. doi: 10.1183/20734735.0319-2018

[20] Kroft, Lucia J.M,van der Velden,,Levinia, Girón, Irene Hernández, Roelofs, Joost J.H. RT,de Roos, Albert, Geleijns, Jacob.Added value of ultra-low-dose computed tomography, dose Equivalent to chest x-ray radiography, for diagnosing chest pathology. Journal of Thoracic Imaging 34(3):p 179-186, May 2019. DOI:10.1097/RTI.0000000000000404

[21] Miguel A Chavez, Navid Shams, Laura E Ellington, Neha Naithani, Robert H Gilman, Mark C Steinhoff, Mathuram Santosham, Robert E Black, Carrie Price, Margaret Gross & William Checkley. Lung ultrasound for the diagnosis of pneumonia in adults: a systematic review and meta-analysis. Respir Res . 2014 Apr 23;15(1):50. doi: 10.1186/1465-9921-15-50

[22] Torres A, Niederman MS, Chastre J. et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT).Eur Respir J. 2017 Sep 10;50(3):1700582. doi: 10.1183/13993003.00582-2017

[23] Wilke M, Grube RF, Bodmann KF. Guideline-adherent initial intravenous antibiotic therapy for hospital-acquired/ventilator-associated pneumonia is clinically superior, saves lives and is cheaper than non guideline adherent therapy. Eur J Med Res 2011; 16 (07) 315-323. doi: 10.1186/2047-783X-16-7-315

[24] Venditti M, Falcone M, Corrao S, Licata G, Serra P. Study Group of the Italian Society of Internal Medicine. Outcomes of patients hospitalized with community-acquired, health care-associated, and hospital-acquired pneumonia.Ann Intern Med. 2009 Jan 6;150(1):19-26. doi: 10.7326/0003-4819-150-1-200901060-00005

[25] J-M Rolain, C Abat, M-T Jimeno, P-E Fournier, D Raoult. Do we need new antibiotics? Clin Microbiol Infect. 2016 May;22(5):408-15. doi:10.1016/j.cmi.2016.03.012

[26] Wunderink RG, Roquilly A, Croce M. et al. A phase 3, randomized, double-blind study comparing tedizolid phosphate and linezolid for treatment of ventilated gram-positive hospital-acquired or ventilator-associated bacterial pneumonia. Clin Infect Dis 2021; 73 (03) e710-e718. doi: 10.1093/cid/ciab032

[27] Russo A. Spotlight on new antibiotics for the treatment of pneumonia. Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med 2020; 14: 1179548420982786.

[28] US FDA Advisory Committee. FDA briefing document: plazomicin sulfate injection (NDA 210303). Accessed August 10, 2018 at: https://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Anti-InfectiveDrugsAdvisoryCommittee/UCM606039

[29] Sy SK, Beaudoin ME, Zhuang L. et al. In vitro pharmacokinetics/pharmacodynamics of the combination of avibactam and aztreonam against MDR organisms. J Antimicrob Chemother . 2016 Jul;71(7):1866-80. doi: 10.1093/jac/dkw082

[30] Chang PC, Chen CC, Lu YC. et al. The impact of inoculum size on the activity of cefoperazone-sulbactam against multidrug resistant organisms.J Microbiol Immunol Infect . 2018 Apr;51(2):207-213. doi: 10.1016/j.jmii.2017.08.026

[31] Huang DB, File Jr TM, Torres A. et al. A Phase II randomized, double-blind, multicenter study to evaluate efficacy and safety of intravenous iclaprim versus vancomycin for the treatment of nosocomial pneumonia suspected or confirmed to be due to gram-positive pathogens.Clin Ther . 2017 Aug;39(8):1706-1718. doi: 10.1016/j.clinthera.2017.07.007

[32] Yun Jung Jung,1 Eun Jin Kim,2 and Young Hwa. Choi. Aerosolized antibiotics in the treatment of hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia. Korean J Intern Med. 2022 Jan; 37(1): 1–12. doi: 10.3904/kjim.2021.277

[33] Matteo Bassetti,Alessandra Mularoni,Daniele Roberto Giacobbe,Nadia Castaldo,Antonio Vena. New Antibiotics for Hospital-Acquired Pneumonia and

Ventilator-Associated Pneumonia. Semin Respir Crit Care Med 2022; 43(02): 280-294 doi: 10.1055/s-0041-1740605

[34] Laurent Papazian ,Michael Klompas ,Charles-Edouard Luyt. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. Intensive Care Med . 2020 May;46(5):888-906. doi: 10.1007/s00134-020-05980-0

[35] Otavio T Ranzani, Michael S Niederman, Antoni Torres · Ventilator-associated pneumonia. Intensive Care Med . 2022 Sep;48(9):1222-1226. doi: 10.1007/s00134-022-06773-3

[36] D Koulenti ,E Tsigou ,J Rello . Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis . 2017 Nov;36(11):1999-2006. doi: 10.1007/s10096-016-2703-z

[37] Diling Wu, Chenfang Wu, Siye Zhang,Yanjun Zhong.Risk Factors of Ventilator-Associated Pneumonia in Critically III Patients. Front. Pharmacol.09 May 2019 Sec. Respiratory Pharmacology Volume 10 - 2019 | https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00482

[38] Farshid Rahimibashar,Andrew C. Miller , Mojtaba H. Yaghoobi and Amir Vahedian-Azim. A comparison of diagnostic algorithms and clinical parameters to diagnose ventilator-associated pneumonia: a prospective observational study. BMC Pulm Med(2021)21:161https://doi.org/10.1186/s12890-021-01527-1

[39] Romy Soussan, Caroline Schimpf, Benoît Pilmis, Thècle Degroote, Marc Tran, Cédric Bruel, François Philippart, RESIST Study Group. Ventilator-associated pneumonia: The central role of transcolonization. Journal of Critical Care Volume 50, April 2019, Pages 155-161. https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2018.12.005

[40] Nasia Safdar , Christopher J Crnich, Dennis G Maki .The Pathogenesis of Ventilator-Associated Pneumonia: Its Relevance to Developing Effective Strategies for Prevention. Respir Care. 2005 Jun;50 (6):725-39; discussion 739-41

[41] Schellack, Natalie & Schellack, G. (2015). Hospital-acquired pneumonia and its management. SA Pharmaceutical Journal. 82. 26-32.

[42] Mariano Esperatti, Miquel Ferrer, Anna Theessen, Adamantia Liapikou, Mauricio Valencia ,Lina Maria Saucedo, Elisabeth Zavala, Tobias Welte, Antoni Torres. Nosocomial pneumonia in the intensive care unit acquired by mechanically

ventilated versus non ventilated patients Am J Respir Crit Care Med. 2010 Dec 15;182(12):1533-9.doi: 10.1164/rccm.201001-0094OC.

[43] Di Pasquale M, Ferrer M, Esperatti M, Crisafulli E, Giunta V, Li Bassi G, Rinaudo M, Blasi F, Niederman M, Torres A. Assessment of severity of ICU-acquired pneumonia and association with etiology. Crit Care Med. 2014 Feb;42(2):303-12.doi: 10.1097/CCM.0b013e3182a272a2

[44] Yi Huang, Yang Jiao, Jing Zhang, Jinfu Xu, Qijian Cheng, Yi Li, Shuo Liang, Huayin Li, Jin Gong, Yinggang Zhu, Lin Song, Zhaohui Rong, Bin Liu, Zhijun Jie, Shuo Sun, Ping Li, Guifang Wang, Jieming Qu, Infection Assembly of Shanghai Respiratory Society. Microbial Etiology and Prognostic Factors of Ventilator-associated Pneumonia: A Multicenter Retrospective Study in Shanghai. Clinical Infectious Diseases, Volume 67, Issue suppl_2, 1 December 2018, Pages S146–S152, https://doi.org/10.1093/cid/ciy686

[45] Linda Bussini, Renato Pascale, Matteo Rinaldi, Michele Bartoletti. Diagnosis, management and treatment of nosocomial pneumonia in ICU: a narrative review.J Emerg Crit Care Med 2022;6:25 | https://dx.doi.org/10.21037/jec

[46] Andre C Kalil, Mark L Metersky , Michael Klompas , John Muscedere , Daniel A Sweeney , Lucy B Palmer , Lena M Napolitano , Naomi P O'Grady , John G Bartlett , Jordi Carratalà , Ali A El Solh , Santiago Ewig , Paul D Fey , Thomas M File Jr , Marcos I Restrepo , Jason A Roberts , Grant W Waterer , Peggy Cruse , Shandra L Knight , Jan L Brozek. Management of adults with hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America and the American thoracic society. Clin Infect Dis. 2016 Sep 1;63(5):e61-e111.doi: 10.1093/cid/ciw353

[47] Federico Perez 1 , Andrea Endimiani, Amy J Ray, Brooke K Decker, Christopher J Wallace, Kristine M Hujer, David J Ecker, Mark D Adams, Philip Toltzis, Michael J Dul, Anne Windau, Saralee Bajaksouzian, Michael R Jacobs, Robert A Salata, Robert A Bonomo. Carbapenem-resistant Acinetobacter baumannii and Klebsiella pneumoniae across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. J Antimicrob Chemother . 2010 Aug;65(8):1807-18. doi: 10.1093/jac/dkq191

[48] Federico Perez, Andrea M. Hujer, Kristine M. Hujer, Brooke K. Decker, Philip N. Rather, Robert A. Bonomo. Global Challenge of Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Oct; 51(10): 3471–3484. doi: 10.1128/AAC.01464-06

[49] Alessandro Russo, Simone Giuliano, Giancarlo Ceccarelli, Francesco Alessandri, Alessandra Giordano, Grazia Brunetti,Mario Venditti. Comparison of Septic Shock Due to Multidrug-Resistant Acinetobacter baumannii or Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing K. pneumoniae in Intensive Care Unit Patients. Antimicrob Agents Chemother. 2018 Jun; 62(6): e02562-17. doi: 10.1128/AAC.02562-17

[50] Denis JB, Lehingue S, Pauly V, Cassir N, Gainnier M, Leone M, Daviet F, Coiffard B, Baron S, Guervilly C, Forel JM, Roch A, Papazian L. Multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa and mortality in mechanically ventilated ICU patients Am J Infect Control. 2019 Sep;47 (9):1059-1064.doi: 10.1016/j.ajic.2019.02.030

[51] Jean Chastre, Charles-Edouard Luyt. Does this patient have VAP? Intensive Care Med. 2016 Jul;42(7):1159-63. doi: 10.1007/s00134-016-4239-1

[52] J Y Fagon, J Chastre, M Wolff, C Gervais, S Parer-Aubas, F Stéphan, T Similowski, A Mercat, J L Diehl, J P Sollet, A Tenaillon .Invasive and noninvasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. Ann Intern Med . 2000 Apr 18;132(8):621-30. doi: 10.7326/0003-4819-132-8-200004180-00004

[53] Pugin J. Clinical signs and scores for the diagnosis of ventilator-associated pneumonia. Minerva Anestesiologica 2002 April;68(4):261-5.Copyright © 2009 EDIZIONI MINERVA MEDICA

[54] Carolina A M Schurink , Christianne A Van Nieuwenhoven , Jan A Jacobs , Maja Rozenberg-Arska , Hans C A Joore , Erik Buskens , Andy I M Hoepelman , Marc J M Bonten. Clinical pulmonary infection score for ventilator-associated pneumonia: accuracy and inter-observer variability Intensive Care Med. 2004 Feb;30(2):217-224. doi: 10.1007/s00134-003-2018-2

[55] Sébastien Gibot, Aurélie Cravoisy, Bruno Levy, Marie-Christine Bene, Gilbert Faure, Pierre-Edouard Bollaert. Soluble triggering receptor expressed on myeloid

cells and the diagnosis of pneumonia N Engl J Med 2004 Jan 29;350(5):451-8. doi: 10.1056/NEJMoa031544

[56] P. Ramirez, M. A. Garcia, M. Ferrer, J. Aznar, M. Valencia, J. M. Sahuquillo, R. Menéndez, M. A. Asenjo, A. Torres. Sequential measurements of procalcitonin levels in diagnosing ventilator-associated pneumonia.European Respiratory Journal 2008 31: 356-362; DOI: 10.1183/09031936.00086707

[57] Pedro Póvoa ,Ignacio Martin-Loeches , Paula Ramirez , Lieuwe D Bos , Mariano Esperatti , Joana Silvestre, Gisela Gili , Gema Goma , Eugenio Berlanga , Mateu Espasa , Elsa Gonçalves , Antoni Torres , Antonio Artigas. Biomarker kinetics in the prediction of VAP diagnosis: results from the BioVAP study. Ann Intensive Care . 2016 Dec;6(1):32. doi: 10.1186/s13613-016-0134-8

[58] Jorge I F Salluh ,Vicente C Souza-Dantas, Pedro Póvoa. The current status of biomarkers for the diagnosis of nosocomial pneumonias. Current Opinion in Critical Care 23(5):p 391-397, October 2017. | DOI: 10.1097/MCC.0000000000000442

[59] Jamal W, Al Roomi E, AbdulAziz LR, Rotimi VO. Evaluation of curetis unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia .J Clin Microbiol. 2014 Jul; 52(7): 2487–2492. doi: 10.1128/JCM.00325-14

[60] Theodore S Rader, Michael P Stevens ,Gonzalo Bearman. Syndromic Multiplex Polymerase Chain Reaction (mPCR). Testing and Antimicrobial Stewardship: Current Practice and Future Directions. Curr Infect Dis Rep . 2021;23(4):5. doi: 10.1007/s11908-021-00748-z

[61] Ayman Elbehiry , Musaad Aldubaib ,Adil Abalkhail , Eman Marzouk , Ahmad ALbeloushi ,Ihab Moussa , Mai Ibrahem,Hamad Albazie, Abdullah Alqarni, Sulaiman Anagreyyah Saleh AlghamdiMohammedRawway. How MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology Contributes to Microbial Infection Control in Healthcare Settings Vaccines 2022, 10, 1881 https://doi.org/10.3390/vaccines10111881

[62] Walter Florio, Lelio Baldeschi, Cosmeri Rizzato, Arianna Tavanti, Emilia Ghelardi ,Antonella Lupetti. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF

Mass Spectrometry: An Expanding Area. Front Cell Infect Microbiol. 2020; 10: 572909.doi: 10.3389/fcimb.2020.572909

[63] Elina Eleftheria Pliakos, Nikolaos Andreatos, Fadi Shehadeh, Panayiotis D. Ziakas, Eleftherios Mylonakis, The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship ASM Journals Clinical Microbiology Reviews Vol. 31, No. 3 DOI:https://doi.org/10.1128/CMR.00095-17

[64] Manuel Iregui,Suzanne Ward, Glenda Sherman, Victoria J Fraser, Marin H Kollef. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. Chest. 2002 Jul;122(1):262-8.doi: 10.1378/chest.122.1.262

[65] Pieter O Depuydt, Dominique M Vandijck, Maarten A Bekaert, Johan M Decruyenaere, Stijn I Blot, Dirk P Vogelaers, Dominique D Benoit. Determinants and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. Crit Care. 2008;12(6):R142.doi: 10.1186/cc7119

[66] Constantinos Tsioutis , Evangelos I Kritsotakis , Spyridon A Karageorgos , Soultana Stratakou , Charalambos Psarologakis ,Sofia Kokkini , Achilleas Gikas. Clinical epidemiology, treatment and prognostic factors of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. Int J Antimicrob Agents. 2016 Nov;48(5):492-497.doi: 10.1016/j.ijantimicag.2016.07.007

[67] Gang Chen, Kailiang Xu, Fangyuan Sun, Yuxia Sun, Ziyuan Kong, Bangjiang Fang. Risk Factors of Multidrug-Resistant Bacteria in Lower Respiratory Tract Infections: A Systematic Review and Meta-Analysis. Can J Infect Dis Med Microbiol. 2020; 2020: 7268519.doi: 10.1155/2020/7268519

[68] Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauger S, Gibot S, Hraiech S, Jung B, Kipnis E, Launey Y, Luyt CE, Margetis D, Michel F, Mokart D, Montravers P, Monsel A, Nseir S, Pugin J, Roquilly A, Velly L, Zahar JR, Bruyere R, Chanques G. Brief summary of French guidelines for the prevention, diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia in ICU Ann Intensive Care. 2018; 8: 104. doi: 10.1186/s13613-018-0444-0

[69] Glen T. Hansen.Continuous Evolution: Perspective on the Epidemiology of Carbapenemase Resistance Among Enterobacterales and Other Gram-Negative Bacteria. Infect Dis Ther. 2021 Mar; 10(1): 75–92. doi: 10.1007/s40121-020-00395-2

[70] Paul M, Carrara E, Retamar P, et al. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) guidelines for the treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli (endorsed by European society of intensive care medicine). Clin Microbiol Infect. 2022 Apr;28(4):521-547. doi: 10.1016/j.cmi.2021.11.025

[71] Tamma PD, Aitken SL, Bonomo RA, et al.Infectious Diseases Society of America Guidance on the Treatment of Extended-Spectrum β-lactamase Producing Enterobacterales (ESBL-E), Carbapenem-Resistant Enterobacterales (CRE), and Pseudomonas aeruginosa with Difficult-to-Treat Resistance (DTR-P. aeruginosa. Clin Infect Dis. 2022 Aug 25;75(2):187-212.doi: 10.1093/cid/ciac268

[72] Karlowsky JA, Kazmierczak KM, de Jonge BLM, et al. In Vitro Activity of Aztreonam-Avibactam against Enterobacteriaceae and Pseudomonas aeruginosa Isolated by Clinical Laboratories in 40 Countries from 2012 to 2015. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9):e00472-17.doi: 10.1128/AAC.00472-17

[73] Shirley, M. Ceftazidime-Avibactam: A Review in the Treatment of Serious Gram-Negative Bacterial Infections. Drugs 78, 675–692 (2018). https://doi.org/10.1007/s40265-018-0902-x

[74] Antoni Torres, Doug Rank, David Melnick, Ludmyla Rekeda, Xiang Chen, Todd Riccobene, Ian A Critchley, Hassan D Lakkis, Dianna Taylor, Angela K Talley, Randomized Trial of Ceftazidime-Avibactam vs Meropenem for Treatment of Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia (REPROVE): Analyses per US FDA–Specified End Points, Open Forum Infectious Diseases, Volume 6, Issue 4, April 2019, ofz149, https://doi.org/10.1093/ofid/ofz149

[75] Francisco Javier Cande,Juan González del Castillo, Agustín Julián Jiménez,Mayra Matesanz. Ceftolozane-tazobactam in nosocomial pneumonia. Rev Esp Quimioter. 2022 Apr;35 Suppl 1(Suppl 1):35-39.doi: 10.37201/req/s01.08.2022

[76] Tamma PD, Hsu AJ. Defining the role of novel beta-lactam agents that target carbapenem-resistant Gram-negative organisms J Pediatric Infect Dis Soc. 2019 Jul 1;8(3):251-260. doi: 10.1093/jpids/piz002

[77] Aoki T, Yoshizawa H, Yamawaki K, et al. Cefiderocol (S-649266), a new siderophore cephalosporin exhibiting potent activities against Pseudomonas aeruginosa and other Gram-negative pathogens including multi-drug resistant bacteria: structure activity relationship. Eur J Med Chem. 2018 Jul 15;155:847-868. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.014

[78] Ito A, Nishikawa T, Matsumoto S, et al. Siderophore cephalosporin cefiderocol utilizes ferric iron transporter systems for antibacterial activity against Pseudomonas aeruginosa. Antimicrob Agents Chemother 2016; 60: 7396–7401. doi:10.1128/AAC.01405-16

[79] Novelli A, Del Giacomo P, Rossolini GM, et al. Meropenem/vaborbactam: a next generation beta-lactam beta-lactamase inhibitor combination. Expert Rev Anti Infect Ther 2020; 18: 643–655. doi:10.1080/14787210.2020.1756775

[80] Haidar G, Clancy CJ, Chen L, et al. Identifying spectra of activity and therapeutic niches for ceftazidime-avibactam and imipenem-relebactam against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Aug 24;61(9):e00642-17. doi: 10.1128/AAC.00642-17

[81] Lob SH, Hackel MA, Kazmierczak KM, et al. In vitro activity of imipenem-relebactam against Gram-negative ESKAPE pathogens isolated by clinical laboratories in the United States in 2015 (results from the SMART global surveillance program). Antimicrob Agents Chemother 2017; 61: e02209-16. doi:10.1128/AAC.02209-16

[82] Goldstein EJC, Citron DM, Tyrrell KL, et al. Comparative in vitro activities of relebactam, imipenem, the combination of the two, and six comparator antimicrobial agents against 432 strains of anaerobic organisms, including imipenem-resistant strains. Antimicrob Agents Chemother 2018; 62: e01992-17. doi:10.1128/AAC.01992-17

[83] Ryan K Shields, Yohei Doi. Aztreonam combination therapy: an answer to metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria? Clin Infect Dis 2020; 71: 1099–1101. doi:10.1093/cid/ciz1159

[84] US Food and Drug Administration, FDA briefing document: plazomicin sulfate injection. www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/Anti-InfectiveDrugsAdvisoryCommittee/UCM606039.pdf Date late updated: 2 May 2018. Date last accessed: 15 November 2022

[85] Zhanel GG, Cheung D, Adam H, et al. Review of eravacycline, a novel fluorocycline antibacterial agent. Drugs 2016; 76: 567–588. doi:10.1007/s40265-016-0545-8

[86] Seifert H, Stefanik D, Sutcliffe JA, et al. In-vitro activity of the novel fluorocycline eravacycline against carbapenem non-susceptible Acinetobacter baumannii. Int J Antimicrob Agents. 2018 Jan;51(1):62-64.doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.06.022

[87] Aaron Matlock, Joshua Allan Garcia, Kayvan Moussavi, Brit Long & Stephen Yuan-Tung Liang. Advances in novel antibiotics to treat multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. Intern Emerg Med. 2021 Nov;16(8):2231-2241.doi: 10.1007/s11739-021-02749-1

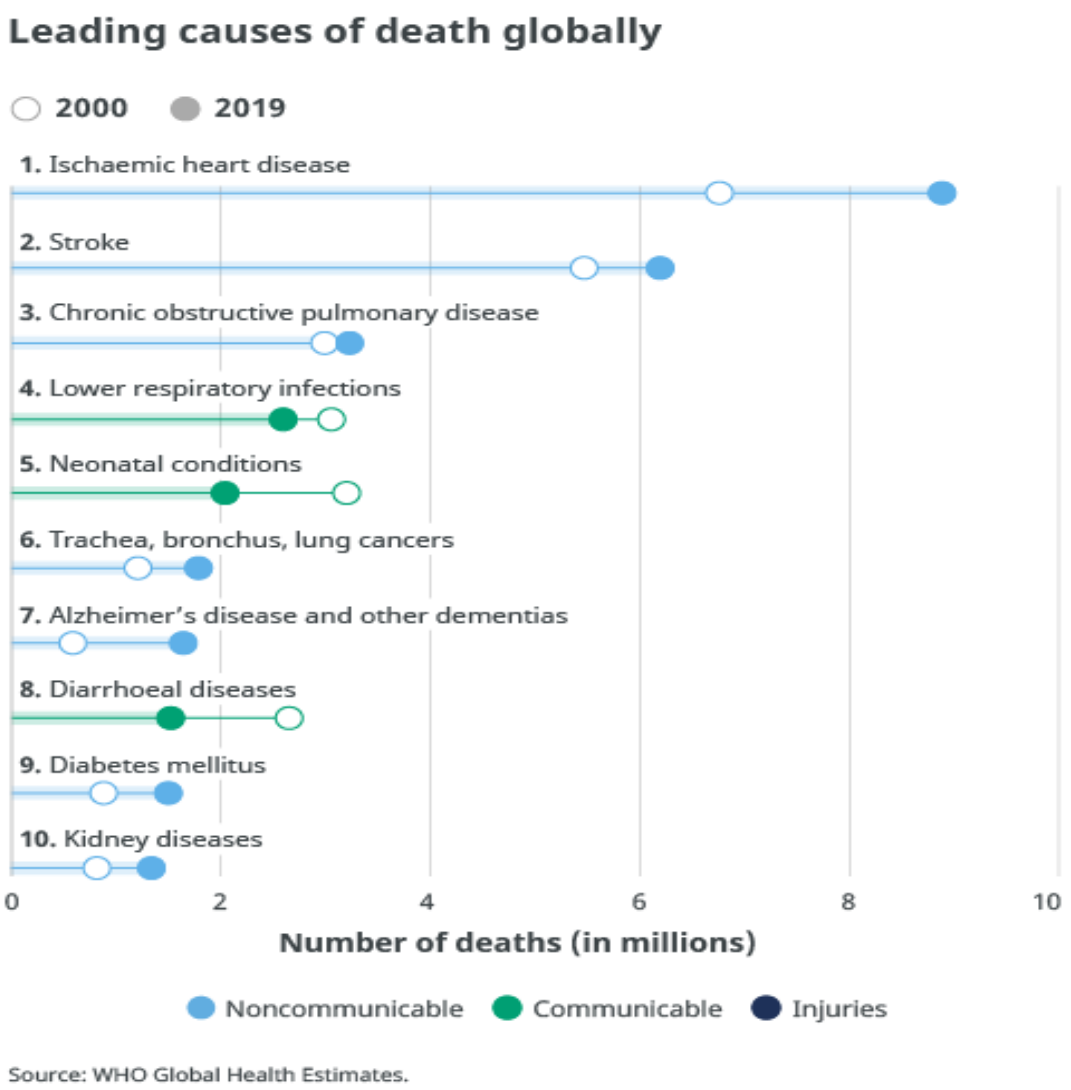
[88] Matteo Bassetti, Federica Magnè, Daniele Roberto Giacobbe, Lorenzo Bini, Antonio Vena. New antibiotics for Gram-negative pneumonia. European Respiratory Review 2022 31: 220119; DOI: 10.1183/16000617.0119-2022

2. ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

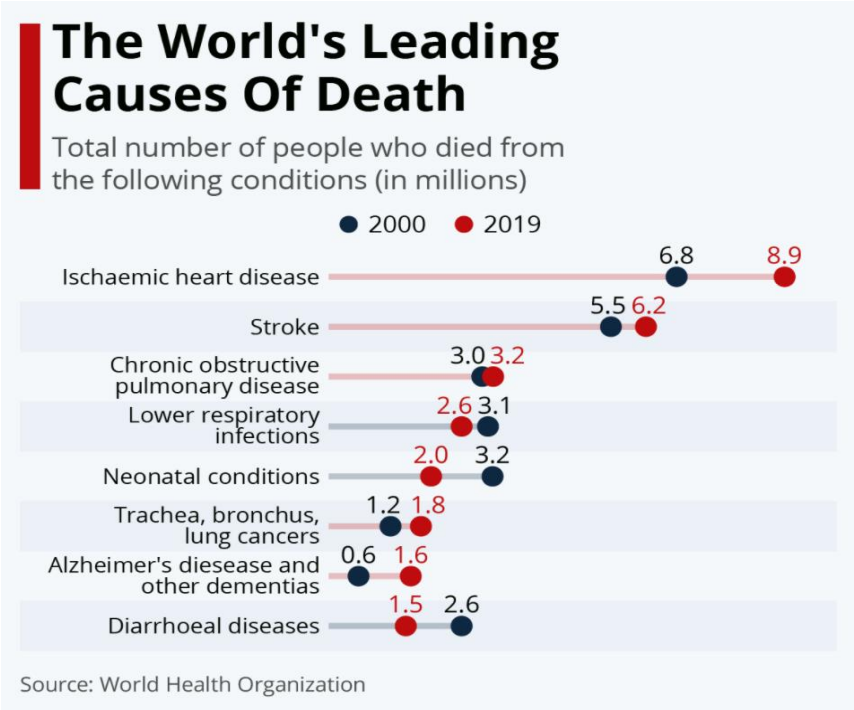
2.1 Εισαγωγή

Οι λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος (πνευμονίες) αποτελούν διαχρονικά την τέταρτη αιτία θανάτου παγκοσμίως σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό υγείας (Εικ.1,2). Στην χώρα μας την τελευταία δεκαετία παρατηρείται μια σημαντική αύξηση των θανάτων από λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού, με το μεγαλύτερο αριθμό αυτών να καταγράφεται στις ηλικίες άνω των 75 ετών (Εικ.3).

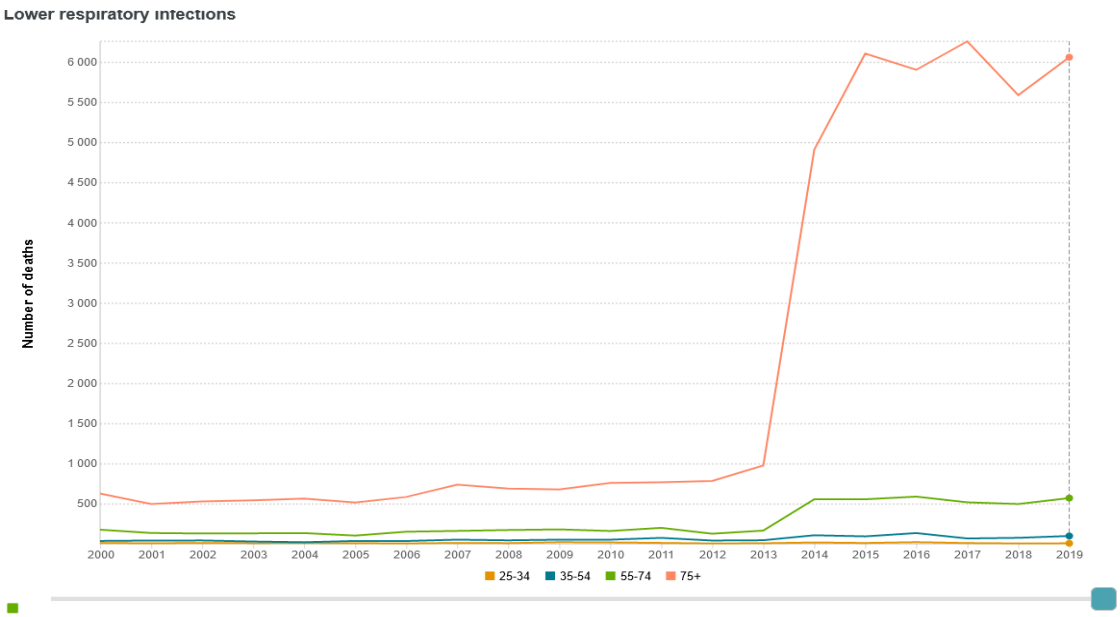
Ο μηχανικός αερισμός αν και αποτελεί σωτήρια θεραπευτική παρέμβαση για την υποστήριξη της αναπνευστικής λειτουργίας σε ασθενείς υψηλού κινδύνου με ανάγκη για νοσηλεία σε μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ), συνοδεύεται από αυξημένη πιθανότητα εκδήλωσης κλινικών επιπλοκών με κυριότερη την πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP), που συχνά καταλήγει σε σήψη, οξεία αναπνευστική δυσχέρεια (ARDS), πνευμονική εμβολή, πνευμονικό οίδημα ή ακόμα και θάνατο. Επιπλέον, η VAP επιμηκύνει σημαντικά την διάρκεια του μηχανικού αερισμού, τον χρόνο παραμονής στη μονάδα εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ) και στο νοσοκομείο το οποίο επιφέρει αυξημένο κόστος υγειονομικής περίθαλψης [1-3].



Εικ.1.Lower respiratory infections remained the world's most deadly communicable disease, ranked as the 4th leading cause of death [WHO].

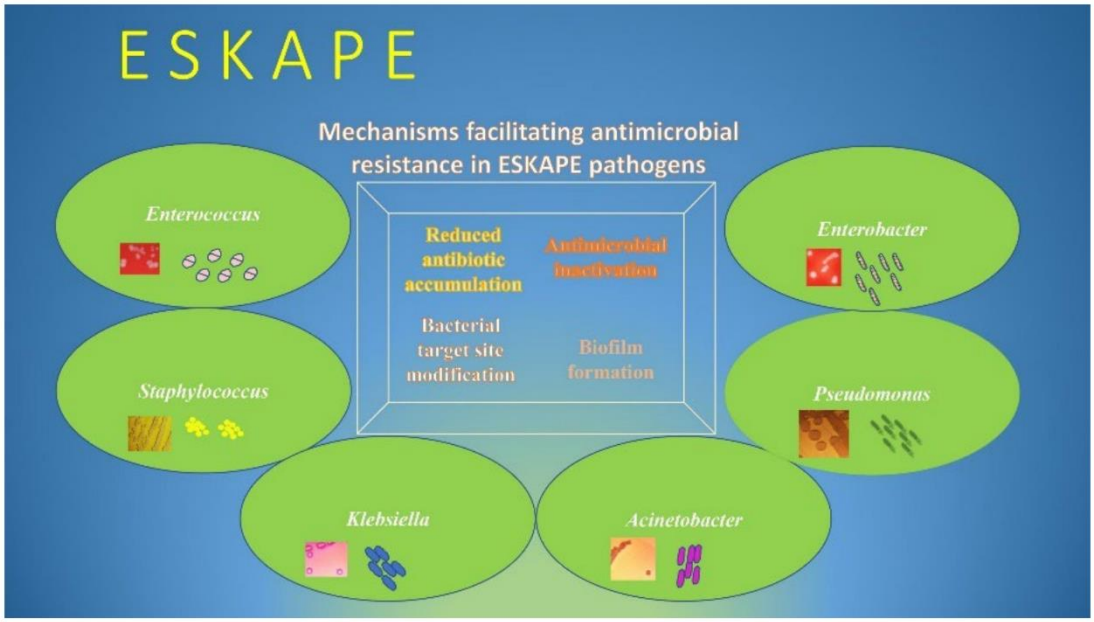


Εικ. 2. The top global causes, in order of lives lost, are associated with three broad conditions - cardiovascular (ischaemic heart disease, stroke), respiratory (chronic obstructive pulmonary disease, lower respiratory infections) and neonatal conditions (birth asphyxia and birth trauma, neonatal sepsis and infections, as well as preterm birth complications) [WHO].



Εικ.3. Trends in cause-specific mortality by all age-groups for a selected country and sex [WHO].

Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (ΠΟΥ) χαρακτηρίζει μια ομάδα βακτηρίων ως “Critical-priority bacteria” η οποία περιλαμβάνει μια ομάδα απειλητικών για τη ζωή νοσοκομειακών παθογόνων γνωστά με το ακρωνύμιο “ESKAPE”. Ο όρος αυτός υποδεικνύει τα ονόματα αυτών των βακτηρίων (*Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa και Enterobacter spp*) και την ικανότητά τους να αποφεύγουν την αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών με ποικίλους τρόπους όπως η τροποποίηση του στόχου δράσης, η αδρανοποίηση του θεραπευτικού παράγοντα, η έκφραση αντλίας εκροής και ο σχηματισμός βιομεμβρανών (biofilm) [4] (Εικ.4). Ως αποτέλεσμα, η ανθεκτικότητα την οποία αποκτούν τα στελέχη αυτά επιτρέπει την παραμονή τους για μεγάλο χρονικό διάστημα στο νοσοκομειακό χώρο, διευκολύνει την εξάπλωση τους και οδηγεί στην εκδήλωση δύσκολα αντιμετωπίσιμων λοιμώξεων.



Εικ.4 Mechanisms of antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens [4]

Σύμφωνα με τις διεθνείς κατευθυντήριες οδηγίες για την ορθολογική χρήση των αντιβιοτικών και την σωστή αντιμετώπιση των λοιμώξεων που περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, στην εκστρατεία αντιμετώπισης σήψης Surviving Sepsis Campaign [5] ή τις πιο πρόσφατες ευρωπαϊκές κατευθυντήριες οδηγίες για την αντιμετώπιση της

πνευμονίας της κοινότητας όσο και των πνευμονιών από νοσοκομειακά παθογόνα [6], η στοχευμένη αντιβιοτική αγωγή για την θεραπευτική αντιμετώπιση της πνευμονίας της κοινότητας (CAP), της νοσοκομειακής πνευμονίας (HAP) όσο και της πνευμονίας που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) πρέπει να ξεκινάει άμεσα καθώς αποτελεί βασική παράμετρο της κλινικής έκβασης του ασθενή [7]. Επιπρόσθετα η σωστή διαχείριση περιστατικών της Μονάδας Εντατικής Θεραπείας αποτελεί μια επιπλέον πρόκληση για τον κλινικό γιατρό. Η σοβαρότητα της λοίμωξης που απειλεί την ζωή του ασθενούς απαιτεί την άμεση χορήγηση εμπειρικής αντιβιοτικής αγωγής που λόγω της αυξημένης πιθανότητας λοίμωξης από πολυανθεκτικά ή και πανανθεκτικά νοσοκομειακά στελέχη (MDR/PDR), δυσκολεύει τη σωστή επιλογή κατάλληλων αντιβιοτικών αυξάνοντας την πιθανότητα επιπλοκών εξαιτίας της ανάγκης χορήγησης συνδυασμού ευρέως φάσματος αντιμικροβιακών παραγόντων. Επιπλέον, η χορήγηση τελευταίας γενιάς αντιβιοτικών σε σχήματα εμπειρικής αντιμικροβιακής αγωγής οδηγεί σε ένα φαύλο κύκλο εξελικτικής πίεσης που οδηγεί στην ταχεία ανάπτυξη αντιμικροβιακής αντοχής [8]. Λαμβάνοντας υπόψη το πλέον παγκόσμιο πρόβλημα υγείας που προκαλείται με την εμφάνιση Gram-ανθεκτικών στελεχών συμπεριλαμβανομένων των ανθεκτικών στην καρβαπενέμη (CR) *Enterobacerales* (CRE, blaKPC, blaNDM, blaOXA-48), CR- ή MDR/XDR-*Pseudomonas aeruginosa* (VIM, IMP ή NDM), *Acinetobacter baumannii* (OXA-23, OXA-58) και *Stenotrophomonas maltophilia* καθίσταται ιδιαίτερα δύσκολή η θεραπευτική αντιμετώπιση τους, εξαιτίας του περιορισμού στην επιλογή της αντιβιοτικής αγωγής [9,10]. Το γεγονός αυτό οδηγεί σε υψηλά ποσοστά θνησιμότητας καθώς η αρχική αντιμετώπιση τους ακόμα και με συνδυασμούς παραγόντων μπορεί να έχει αβέβαια αποτελέσματα. Πρόσφατα αρκετοί νέοι παράγοντες έχουν λάβει έγκριση ή βρίσκονται στην τελευταία φάση έγκρισης για την αντιμετώπιση ειδικά στελεχών με αντοχή στις καρβαπενέμες. Η λίστα αυτών περιλαμβάνει τους συνδυασμούς Ceftolozane-Tazobactam, Meropenem-Vaborbactam, Imipenem-Cilastatin-Relebactam αλλα και τους παράγοντες Plazomicin, Eravacycline και Cefiderocol. Καθώς οι νέες αυτές θεραπευτικές επιλογές είναι διαθέσιμες κρίνεται αναγκαίο η σωστή διαχείριση και ορθολογική χρήση αυτών σε μια προσπάθεια να επιβραδυνθεί η ανάπτυξη αντοχής στους τελευταίας γενεάς αντιμικροβιακούς παράγοντες [11].

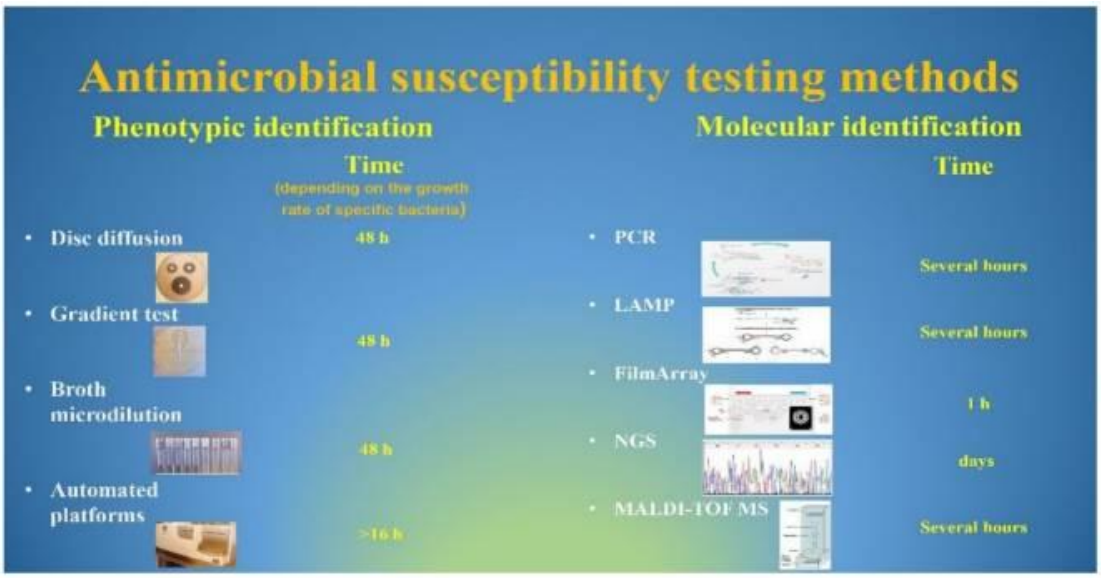
Ως εκ τούτου, απαιτούνται γρήγορες και ευαίσθητες μέθοδοι που θα επιτρέπουν την ταχεία και έγκυρη ταυτοποίηση των λοιμογόνων παραγόντων, την ανίχνευση γονιδίων αντοχής με σκοπό την βέλτιστη διαχείριση των λοιμώξεων και την αποφυγή άσκοπης χρήσης τελευταίας γενεάς αντιμικροβιακών παραγόντων [12].

Το σύγχρονο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας και παθογένεσης εντάσσει πλέον καινοτόμες τεχνολογίες στα πλαίσια της ταχείας διάγνωσης και της στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης, παρέχοντας πολύτιμες πληροφορίες στο θεράποντα ιατρό. Η συμβατική καλλιέργεια των κλινικών δειγμάτων μέσω καλλιεργητικών υλικών, βιοχημικών ιδιοτήτων και αυτοματοποιημένων συστημάτων αποτελεί την Gold standard μέθοδο μικροβιολογικής διάγνωσης με κύρια όμως μειονεκτήματα την δυσκολία απομόνωσης, την ανάγκη εκλεκτικών υλικών και τον συνολικό χρόνο που απαιτείται μέχρι την λήψη του αποτελέσματος [13].

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης πολλαπλών στόχων θεωρούνται ως ‘game-changer’ στην διάγνωση λοιμώξεων όπως η βακτηριαιμία, οι λοιμώξεις του ανώτερου και κατώτερου αναπνευστικού συστήματος, του γαστρεντερικού, του κεντρικού νευρικού συστήματος και των αρθρώσεων.

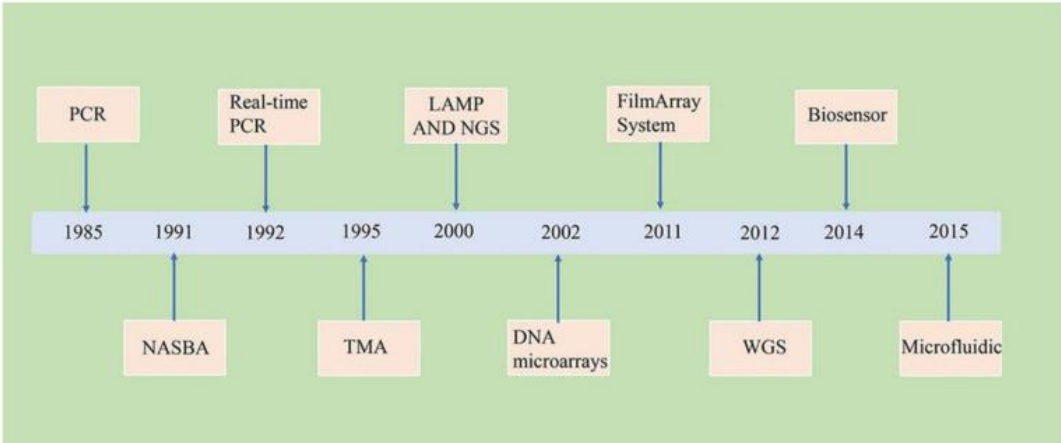
Η άμεση εφαρμογή τους απευθείας από το κλινικό δείγμα ελαχιστοποιεί την επαγγελματική έκθεση σε λοιμογόνους παράγοντες ενώ η έγκαιρη και έγκυρη ανίχνευση συγκεκριμένων παθογόνων ακόμα και μη καλλιεργήσιμων με συμβατικές τεχνικές καθώς και γονιδίων αντοχής που εμπλέκονται στις παραπάνω λοιμώξεις επιτρέπει την σωστή διαχείριση και θεραπευτική αντιμετώπιση τους με την αποτελεσματικότητα των συνδρομικών αυτών τεστ να βασίζεται στην ορθή εφαρμογή και προσεκτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων [14].

Η συνεχής βελτίωση των μοριακών μεθόδων σε συνδυασμό με νεότερες τεχνολογίες βιοπληροφορικής έχουν οδηγήσει στην διαδοχική ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων στην διάγνωση των λοιμώξεων (Εικ.5).



Εικ.5 Currently used methods for antimicrobial susceptibility testing [4]

Ξεκινώντας από την τεχνολογία ενίσχυσης νουκλεικών οξέων [NAATs] η PCR ήταν η πρώτη μέθοδος ενίσχυσης DNA, που εισήχθη από τον Mullis το 1985 με πολλές παραλλαγές έκτοτε να αποσκοπούν στον διπλό στόχο ταυτοποίησης και αντοχών [15]. Μια από τις πιο ευρέως και κλινικά χρησιμοποιούμενες τεχνικές για τη διάγνωση αποτελεί και η Real time PCR [16].Τα τελευταία χρόνια νεότερες εξελίξεις οδήγησαν στη δημιουργία μιας ποικιλίας τεχνικών ισοθερμικής ενίσχυσης, συμπεριλαμβανομένης της ενίσχυσης με μεσολάβηση βρόχου (LAMP), της ενίσχυσης που εξαρτάται από την ελικάση (HDA), της ενίσχυσης βάσει αλληλουχίας νουκλεϊκού οξέος (NASBA) και ενίσχυση μέσω μεταγραφής (TMA) [17-19] (Εικ.6).



Εικ.6 Timeline of major molecular techniques for the diagnosis of bacterial infections [4]

Συνδρομικές μοριακές μέθοδοι όπως το σύστημα Film Array το οποίο αποτέλεσε και την μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε και στην δική μας μελέτη δίνει την δυνατότητα για ταυτόχρονη ανίχνευση παθογόνων και γονιδίων αντοχής. Συγκεκριμένα ο ασκός εξέτασης Film Array Pneumonia Panel plus είναι ένα κλειστό σύστημα μιας χρήσης οπού αποθηκεύονται όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια για προετοιμασία του δείγματος, αντίστροφη μεταγραφή, αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) και ανίχνευση με στόχο την απομόνωση, την ενίσχυση και την ανίχνευση νουκλεικού οξέος από πολλαπλά παθογόνα του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος εντός ενός μεμονωμένου δείγματος τύπου βρογχοκυψελιδικού εκπλύματος (BAL) ή τύπου πτυέλων. Κατά την διάρκεια ενός τρεξίματος εκτελείται αρχικά ενυδάτωση (Hydration solution) και το δείγμα συνδέεται με ρυθμιστικό διάλυμα (Sample Buffer). Θα ακολουθήσει λύση του δείγματος μέσω ανάδευσης (θραύση με σφαιρίδια) εκχύλιση και καθαρισμός όλων των νουκλεικών οξέων από το δείγμα με τη χρήση τεχνολογίας μαγνητικών σφαιριδίων. Στη συνέχεια πραγματοποιείται μια εμφωλιασμένη πολυπλεκτική PCR αρχικά μέσω αντίστροφης μεταγραφής και μιας μεμονώμένης μαζικά πολυπλεκτικής αντίδρασης μεγάλου όγκου (PCR1) και στη συνέχεια λαμβάνουν χώρα πολλαπλές μονοπλεκτικές αντιδράσεις PCR δευτέρου σταδίου (PCR2) για την ενίσχυση των ακολουθιών στο πλαίσιο των προϊόντων της PCR1. Η ανίχνευση και η δημιουργία του αποτελέσματος για κάθε στόχο γίνεται με τη χρήση

δεδομένων καμπύλης τήξης τελικού σημείου. Επίσης χρησιμοποιείται ένα ποσοτικοποιημένο τυπικό υλικό Quantified Standard Material (QSM) για την παροχή μιας εκτιμώμενης τιμής γονιδιωματικών αντιγράφων ανά χιλιοστόλιτρο (αντίγραφα/ml) για τους βακτηριακούς αναλυτές.

Αρκετές μελέτες αποδεικνύουν την σημαντική συμβολή της Film Array multiplex PCR συγκριτικά με άλλες μεθόδους στην διάγνωση, διαχείριση και στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων καθώς επιτρέπει σε σύντομο χρονικό διάστημα την ανίχνευση πολλαπλών στόχων [20-22]. Ο συνδυασμός των αποτελεσμάτων μαζί με προγράμματα αντιβιοτικής διαχείρισης (antimicrobial stewardship) επιφέρουν βέλτιστα αποτελέσματα τόσο στην κλινική έκβαση όσο και στο κόστος υγειονομικής περίθαλψης (κατάλληλη αγωγή, διάρκεια νοσηλείας) [23,24] με μελέτες να αναζητούν το οικονομικό όφελος που μπορεί να προκύψει με την χρήση τέτοιων μεθόδων [25].
Είναι σημαντικό να αναφερθούν και οι περιορισμοί των συνδρομικών αυτών μεθόδων οι οποίοι περιλαμβάνουν, την έλλειψη ανίχνευσης για παθογόνα εκτός στόχου, την περιορισμένη δυνατότητα ανίχνευσης γονιδίων αντοχής στα αντιβιοτικά, το κόστος της εξέτασης το οποίο μεμονωμένα είναι υψηλό, συνεπώς δεν μπορεί να αποτελέσει εξέταση ρουτίνας και φυσικά η αξιοπιστία της εξέτασης ελαττώνεται από τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα και την απουσία μεθόδων επαλήθευσης. Ειδικότερα η δυνατότητα της πολυπλεκτικής μοριακής μεθόδου να ανιχνεύει νουκλεϊκά οξέα από νεκρά παθογόνα που δεν προκαλούν ενεργή λοίμωξη θα μπορούσε να οδηγήσει σε υπερβολική θεραπεία μη βιώσιμων μικροοργανισμών με επιβλαβείς συνέπειες για τη μικροβιακή αντοχή. Επιπλέον ένα ψευδώς θετικό αποτέλεσμα μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μιας κακής διαχείρισης του δείγματος. Ως εκ τούτου οι μοριακές τεχνικές διενεργούνται σε εξειδικευμένα εργαστήρια, σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους από κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό, προκειμένου να εκτελεστεί σωστά και να αποφευχθεί κάθε δυνατή επιμόλυνση με εξωγενές γενετικό υλικό. Απαιτείται η εφαρμογή πρωτοκόλλων και κατευθυντήριων γραμμών για την αποτελεσματική χρήση τέτοιων δοκιμών, καθώς και η αξιολόγηση νέων δεδομένων που συνδυαστικά με αυστηρά οριοθετημένα κριτήρια διάγνωσης πνευμονίας μαζί με προγράμματα

διαχείρισης αντιμικροβιακών θα αποτρέπει την αθρόα χρήση των μοριακών διαγνωστικών μεθόδων [26].

Τις τελευταίες δεκαετίες είναι εφικτή και η ανάλυση της αλληλουχίας του γονιδιώματος είτε με προσδιορισμό της αλληλουχίας ολόκληρου του γονιδιώματος (WGS) Whole-Genome Sequencing, είτε με την τεχνολογία Next-Generation Sequencing (NGS) με προσδιορισμό αλληλουχίας επόμενης γενιάς (NGS) ως μια ταχεία και οικονομικά αποδοτική τεχνολογία μαζικής παράλληλης αλληλουχίας με αδυναμία εφαρμογής στην εργαστηριακή κλινική πράξη. Εν αντίθεση η τεχνολογία MALDI TOF – MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) αποτελεί πλέον μέθοδο αναφοράς στην ταυτοποίηση παθογόνων και στον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά στα εργαστήρια κλινικής μικροβιολογίας. Πρόκειται για μια γρήγορη, εύκολη και χαμηλού κόστους μέθοδο σε θέση να ταυτοποιεί ένα μεγάλο αριθμό στελεχών την ημέρα που απομονώνονται από διαφορετικά είδη δειγμάτων όπως αίμα, αναπνευστικό, ούρα, πύου ,κ.α [27].

Αν και η μέθοδος στηρίζεται στο πρωτεϊνικό αποτύπωμα του στελέχους μέσω φασμάτων τα οποία αναλύονται και αναζητούνται σε μια αντίστοιχη βιβλιοθήκη φασμάτων για κάθε στέλεχος υπάρχουν αρκετές προκλήσεις όπως ο εντοπισμός των παθογόνων απευθείας από τα δείγματα, οι περιπτώσεις πολυμικροβιακών δειγμάτων καθώς και η ανίχνευση αντοχής στα αντιβιοτικά [28]. Η δυνατότητά του προς το παρόν επικεντρώνεται στην ανίχνευση της δραστικότητα της β- λακταμάσης, στην ανίχνευση ειδικής κορυφής που σχετίζεται με αντιβιοτική αντοχή ή και ειδικών κορυφών για πρωτεΐνες που συνεκφράζονται με την αντιβιοτική αντοχή μέσω σύγκρισης της περιοχής κάτω από την καμπύλη των φασμάτων βακτηρίων που επωάζονται με ή χωρίς αντιμικροβιακά φάρμακα[4,29].

2.2 Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η αξιολόγηση της συνδρομικής εξέτασης Multiplex PCR BioFire FilmArray-Pneumonia plus Panel (bioMérieux S.A., France), στην μικροβιολογική διάγνωση και διαχείριση λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος νοσηλευόμενων ασθενών στην Μονάδα Εντατικής

Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Γενικού Νοσοκομείου Ηρακλείου Κρήτης. Η περίθαλψη στην ΜΕΘ αποτελεί ένα δύσκολό χώρο στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων εξαιτίας της ραγδαίας αύξησης ανθεκτικών νοσοκομειακών στελεχών όπως το *Acinetobacter baumannii,* η *Pseudomonas aeruginosa,* η *Klebsiella pneumoniae,* το *Enterobacter* spp, ο *Enterococcus faecium, και ο Staphylococcus aureus.* Η παρούσα μελέτη αποτελεί την πρώτη μελέτη αξιολόγησης της πολυπλεκτικής μοριακής μεθόδου στον Ελλαδικό χώρο και συγκεκριμένα στον χώρο της ΜΕΘ, προκειμένου να αξιολογηθεί η απόδοση στην μικροβιολογική διάγνωση της πνευμονίας, να εκτιμηθεί ο χρόνος μοριακής διάγνωσης και το όφελος που προκύπτει από την στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση βάση του αποτελέσματος στις καταναλώσεις των αντιβιοτικών.

2.3 Ασθενείς και μέθοδοι

Από τον Ιούνιο 2018 έως τον Ιούνιο του 2020 όλοι οι ασθενείς που εισήχθησαν στην ΜΕΘ του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηράκλειου με σοβαρή πνευμονία κοινότητας (severe-CAP), νοσοκομειακή πνευμονία (HAP) ή που εκδήλωσαν πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) συμμετείχαν στην μελέτη (PCR group). Τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη είναι η ηλικία ≥18 ετών, κλινικά και ακτινολογικά ευρήματα που συνηγορούν υπέρ λοίμωξης του πνευμονικού παρεγχύματος σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες της IDSA (Infectious Diseases Society of America) (Πιν.1) όπως υποθερμία, λευκοπενία, νέα διηθήματα στην ακτινογραφία θώρακος και σοβαρή αναπνευστική δυσχέρεια η οποία επιβάλλει την εισαγωγή στην ΜΕΘ και τον μηχανικό αερισμό. Από την μελέτη αποκλείστηκαν ασθενείς της ΜΕΘ με πυρετό αγνώστου αιτιολογίας, τραχειοβρογχίτιδα (VAT) ή με εικόνα αποικισμού καθώς και αυτοί που είχαν ήδη ενταχθεί στην μελέτη. Επιπρόσθετα αναζητήσαμε αντίστοιχα περιστατικά ένα χρόνο πριν την έναρξη της μελέτης προκειμένου να γίνει η σύγκριση των αποτελεσμάτων μας (Historical control group).

Πιν.1.Inclusion criteria.

Table 1. 2007 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Criteria for Defining Severe Community-acquired Pneumonia
Validated definition includes either one major criterion or three or more minor criteria
Minor criteria
Respiratory rate ≥ 30 breaths/min
Pa_{O2}/Fi_{O2} ratio ≤ 250
Multilobar infiltrates
Confusion/disorientation
Uremia (blood urea nitrogen level ≥ 20 mg/dl)
Leukopenia* (white blood cell count < 4,000 cells/μl)
Thrombocytopenia (platelet count < 100,000/μl)
Hypothermia (core temperature < 36°C)
Hypotension requiring aggressive fluid resuscitation
Major criteria
Septic shock with need for vasopressors
Respiratory failure requiring mechanical ventilation
*Due to infection alone (i.e., not chemotherapy induced).

Η σοβαρή πνευμονία κοινότητας (sCAP) αποτελεί την πιο απειλητική για τη ζωή μορφή πνευμονίας της κοινότητας (CAP) που συνοδεύεται από υψηλή νοσηρότητα και θνησιμότητα, με τα ευρέως αποδεκτά κριτήρια ορισμού της να δίνονται από την Infectious Disease Society of America (IDSA)/American Thoracic Society (ATS) (Πιν.1) [31]. Ως νοσοκομειακή πνευμονία (Nosocomial pneumonia ή hospital-acquired pneumonia, HAP) ορίζεται η πνευμονία που εμφανίζεται 48 ώρες ή περισσότερες μετά την εισαγωγή στο νοσοκομείο η οποία δεν ήταν σε επώαση κατά την στιγμή της εισαγωγής και είναι ανεξάρτητη από τον μηχανικό αερισμό. Η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα ή τον μηχανικό αερισμό ορίζεται ως η πνευμονική λοίμωξη που θα εκδηλωθεί 48 ώρες ή περισσότερο από την ενδοτραχειακή διασωλήνωση και την έναρξη του μηχανικού αερισμού χωρίς ενδείξεις πνευμονίας κατά την χρονική στιγμή της διασωλήνωσης [32,33].

Κατά την χρονική στιγμή που κλινικά και εργαστηριακά ευρήματα υποδεικνύουν λοίμωξη του πνευμονικού παρεγχύματος ο υπεύθυνος ιατρός της ΜΕΘ επικοινωνεί με

το μικροβιολογικό εργαστήριο προκειμένου και εφόσον πληρούνται τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη να πραγματοποιηθεί η εξέταση. Ακολουθεί δειγματοληψία από το κατώτερο αναπνευστικό όπως βρογχικές εκκρίσεις ή βρογχικό έκπλυμα και το δείγμα αποστέλλεται στο εργαστήριο το οποίο συνοδεύεται από παραπεμπτικό με γενικές πληροφορίες για τον ασθενή (ονοματεπώνυμο, ηλικία, κωδικός ασθενή), κριτήρια εισαγωγής στην μελέτη και επιπλέον κλινικές πληροφορίες (ημέρες νοσηλείας στην ΜΕΘ, ημέρες σε μηχανικό αερισμό, τρέχον και νέο αντιβιοτικό σχήμα). Ακολουθεί ο χειρισμός του που περιλαμβάνει τόσο την συμβατική μικροβιολογική καλλιέργεια όσο και την συνδρομική μοριακή εξέταση του.

Αξίζει να σημειωθεί ότι πριν την έναρξη της μελέτης πραγματοποιήθηκε παρουσίαση/εκπαίδευση της μοριακής τεχνικής στο ιατρικό προσωπικό του εργαστήριου μας καθώς δίνεται η δυνατότητα εκτέλεσης της σε καθημερινή βάση εβδομαδιαίως από τις 8:00 έως τις 20:00. Ακολούθησε ενημέρωση/παρουσίαση στο ιατρικό προσωπικό της ΜΕΘ για τα οφέλη της μοριακής διάγνωσης και την δυνατότητα του εργαστηρίου μας στην ταχεία και έγκυρη διάγνωση και διαχείριση σοβαρών λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος ενώ ο κλινικός ιατρός είχε την δυνατότητα απευθείας επικοινωνίας με τον υπεύθυνο της μελέτης για την ερμηνεία του αποτελέσματος. Επιπλέον με βάση την τοπική επιδημιολογία της ΜΕΘ και το αποτέλεσμα της μοριακής μεθόδου προτάθηκε πιθανή εμπειρική αγωγή.

Μικροβιολογική διάγνωση

Η διαχείριση του δείγματος στο μικροβιολογικό εργαστήριο ξεκινάει από την καταλληλόλητα του δείγματος ως προς την σωστή λήψη, την ποσότητα και ποιότητα του. Η Gram χρώση θεωρείται απαραίτητη προσφέροντας σημαντικές πληροφορίες για την ποιότητα του δείγματος, προσδιορίζοντας τον αριθμό των επιθηλιακών κυττάρων, των ουδετερόφιλων πολυμορφοπύρηνων ακόμα και της παρουσίας μικροβίου. Ένα αποδεκτό μικροβιολογικά δείγμα για καλλιέργεια περιέχει <10 επιθηλιακά κύτταρα και >25 ουδετερόφιλα πολυμορφοπύρηνα [34]. Η απομόνωση ενός ή περισσοτέρων παθογόνων γίνεται με την χρήση καλλιεργητικών στέρεων θρεπτικών υλικών σε

επωαστικούς κλιβάνους για 18-24 ώρες σε θερμοκρασία 37ºC καθώς και σε συνθήκες 5% CO_2. Υλικά όπως το αιματούχο (Columbia agar plate, COS) και το σοκολατόχρωμο άγαρ (Chocolate agar PolyViteX, PVX) επιτρέπουν την ανάπτυξη τόσο Gram θετικών όσο και Gram αρνητικών βακτηρίων. Εκλεκτικά υλικά ανάπτυξης εντεροβακτηριακών ζυμούντων και μη την λακτόζη όπως το Drigalski Agar καθώς και εκλεκτικά υλικά ανάπτυξης μυκήτων όπως το Sabouraud Dextrose Agar χρησιμοποιούνται επίσης. Η συμβατική καλλιέργεια του δείγματος προσδιορίζει ποσοτικά σε cfu/ml (colony forming units/milliliter) τον αιτιολογικό παράγοντα της λοίμωξης με την μέθοδο των αραιώσεων. Η ποσοτική αξιολόγηση του δείγματος χαρακτηρίζει ένα αριθμό αποικιών $<10^4$ ως αποικισμό, ενώ αριθμός αποικιών $\geq 10^4$, $\geq 10^5$/ml και αριθμός $>10^5$/ml αξιολογείται στις λήψεις βρογχικού εκπλύματος και ενδοτραχειακών εκκρίσεων αντίστοιχα ως πραγματικός λοιμογόνος παράγοντας [35,36]. Η ταυτοποίηση των παθογόνων στελεχών που σχετίζονται με την λοίμωξη καθώς και ο έλεγχος ευαισθησίας στα αντιβιοτικά γίνεται με την χρήση αυτοματοποιημένων συστημάτων VITEK 2 system (bioMérieux S.A., France) [37,38]. Η προηγμένη χρωματομετρική τεχνολογία επιτρέπει την ασφαλή αναγνώριση των ειδών ενώ η φαινοτυπική ανίχνευση βάση προτύπων MIC (Minimum inhibitory concentration) παρέχει πληροφορίες ως προς την στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση της λοίμωξης.

Το σύστημα BIOFIRE® FILMARRAY® είναι μια κατοχυρωμένη (FDA-cleared και CE-marked) πολυπλεκτική εξέταση νουκλεικού οξέος η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλαπλών ιικών και βακτηριακών νουκλεικών οξέων, καθώς και επιλεγμένων γονιδίων αντοχής που σχετίζονται με τις λοιμώξεις του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Επιπλέον δίνεται η δυνατότητα του ημιποσοτικού προσδιορισμού στα συχνότερα βακτήρια σε διαστήματα που αντιπροσωπεύουν γονιδιωματικά αντίγραφα βακτηριακού νουκλεικού οξέος ανά χιλιοστόλιτρο (αντίγραφα/mL). Συνολικά ανιχνεύονται 18 βακτήρια εκ των οποίων 11 Gram αρνητικά, 4 Gram θετικά και 3 άτυπα, 7 γονίδια αντοχής καθώς και 9 ιοί που σχετίζονται με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού [39,40] (Πιν.2).

Πιν 2. The BioFire PN Panel identifies 33 clinically relevant targets.

Bacteria (semi quantitative)	**Antibiotic Resistance Genes**
Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex *Enterobacter cloacae* *Escherichia coli* *Haemophilus influenzae* *Klebsiella aerogenes* *Klebsiella oxytoca* *Klebsiella pneumoniae group* *Moraxella catarrhalis* *Proteus spp.* *Pseudomonas aeruginosa* *Serratia marcescens* *Staphylococcus aureus* *Streptococcus agalactiae* *Streptococcus pneumoniae* *Streptococcus pyogenes*	**ESBL** CTX-M **Carbapenemases** KPC NDM Oxa48-like VIM IMP **Methicilin Resistance** mecA/mecC and MREJ
Atypical Bacteria	**Viruses**
Legionella pneumophila *Mycoplasma pneumoniae* *Chlamydia pneumoniae*	Influenza A Influenza B Adenovirus Coronavirus Parainfluenza virus Respiratory Syncytial virus Human Rhinovirus/Enterovirus Human Metapneumovirus Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)

Κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά

Τα κλινικά και δημογραφικά χαρακτηριστικά των ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη αναζητήθηκαν από το εργαστηριακό πρόγραμμα LIS (laboratory information system) και το ολοκληρωμένο σύστημα ιατρικής παρακολούθησης ασθενών της ΜΕΘ CRITIS MEDICAL SYNERGY. Η καταγραφή έγινε σε βάση δεδομένων για όλους τους ασθενείς που εντάχθηκαν στην μελέτη τόσο ένα χρόνο πριν την έναρξη της όσο και κατά την διετή διάρκειά της. Αναλυτικά για κάθε ασθενή καταγράφηκε ο κωδικός, τα αρχικά του, η ηλικία, το φύλο, η ημερομηνία εισαγωγής και εξόδου από την ΜΕΘ

καθώς επίσης η χρονική διάρκεια νοσηλείας και η αιτία εισόδου του. Επιπρόσθετα υπολογίστηκαν με βάση τα κλινικοεργαστηριακά ευρήματα των ασθενών κατά το πρώτο εικοσιτετράωρο εισαγωγής τους κλίμακες αξιολόγησης βαρύτητας νόσου όπως SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) και APACHE II (Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II). Ακολούθησε καταγραφή του ατομικού ιστορικού των ασθενών ως προς τις συνοσηρότητες και την λήψη φαρμακευτικής αγωγής. Από την χρονική στιγμή έναρξης της λοίμωξης και για τις επόμενες δεκατέσσερις ημέρες νοσηλείας έγινε καταγραφή του τύπου λοίμωξης (sCAP, possible VAP, VAP, HAP) καθώς και πληροφοριών που σχετίζονται με την καλλιέργεια του δείγματος, που εστάλη στο μικροβιολογικό εργαστήριο, σχετικά με το αποτέλεσμα της ως προς το παθογόνο στέλεχος (είδος και ποσότητά), τον έλεγχο ευαισθησίας στα αντιβιοτικά ανά κατηγορία και τον χρόνο μικροβιολογικής διάγνωσης. Ομοίως και για την μοριακή μέθοδο έγινε καταγραφή του αποτελέσματος το οποίο πρόκυπτε από την ανίχνευση συγκεκριμένων στόχων (βακτήρια σε αντίγραφα/mL, άτυπα βακτήρια, ιούς και γονίδια αντοχής) καθώς και ο χρόνος μοριακής διάγνωσης. Η καταγραφή συνεχίστηκε με την μικροβιολογική διάγνωση (παθογόνο, αντοχές) ακόμα και για λοιμώξεις που πιθανόν εκδηλώθηκαν μέσα στο συγκεκριμένο χρονικό διάστημα όπως αίματος, ούρων, καθετήρων και αναπνευστικών δειγμάτων. Ακολούθησε καταγραφή της φαρμακευτικής αγωγής σε αντιβιοτικούς και αντιικούς παράγοντες που έλαβε ο κάθε ασθενής για το χρονικό διάστημα των δεκατεσσάρων ημερών από την χρονική στιγμή της κλινικής διάγνωσης της λοίμωξης. Ανάλογα με το είδος και την ποσότητα του κάθε φαρμακευτικού παράγοντα υπολογίστηκε ως δείκτης κατανάλωσης η ημερήσια καθορισμένη δόση (Daily Defined Dose - DDD) και DDD per 100 bed days [41]. Η κατηγοριοποίηση των αντιβιοτικών έγινε σύμφωνα με το σύστημα ATC/DDD (AnatomicalTherapeuticClassification) του WHO για όσα αντιβιοτικά έχουν κωδικό στο σύστημα ATC (ATC/DDD classification). Τέλος καταγράφηκε η έκβαση νοσηλείας (ίαση, βελτίωση, στασιμότητα, επιδείνωση, θάνατος) καθώς έγινε και σύγκριση του αποτελέσματος μεταξύ της συμβατικής καλλιεργητικής μεθόδου και της μοριακής μεθόδου (agreement, improved diagnosis, missed cases, not applicable).

Στατιστική ανάλυση

Η στατιστική ανάλυση όλων των δεδομένων της μελέτης έγινε με το λογισμικό GraphPad Prism (version 8.0.2). Αναλύθηκαν όλες οι παράμετροι όπως δημογραφικά και κλινικά χαρακτηριστικά των δύο ομάδων ασθενών που συμμετείχαν στην μελέτη καθώς επίσης και οι καταναλώσεις των αντιβιοτικών για τον εντοπισμό στατιστικά σημαντικών μεταβολών. Η στατιστική σύγκριση των παραμέτρων όπως η ηλικία, οι κλίμακες θνητότητας, ο χρόνος νοσηλείας και ο χρόνος διάγνωσης έγινε με την μέθοδο του unpaired t-test. Παράμετροι όπως το φύλο, η αιτία εισόδου, οι συννοσηρότητες, ο τύπος λοίμωξης, οι καταναλώσεις αντιβιοτικών, η σύγκριση των μεθόδων και η έκβαση νοσηλείας αναλύθηκαν με την μέθοδο Contingency Chi-squared (and Fisher's exact) test. Στατιστικά σημαντικές μεταβολές θεωρήθηκαν όσες από τις παραμέτρους είχαν $P<0.05$.

2.4 Αποτελέσματα

Συνολικά στην διετή χρονική διάρκεια της μελέτης (2018-2020) οι νοσηλευόμενοι ασθενείς της ΜΕΘ με λοίμωξη του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος ήταν 79 (PCR-group) ενώ η αναδρομική μελέτη αναζήτησης ένα χρόνο πριν ανέδειξε 40 ασθενείς (historical control group). Το ηλικιακό εύρος και για τις δυο ομάδες ασθενών (PCR-group / control group) ήταν από 22-87 έτη με μέση ηλικία τα 69 έτη και από 20-86 με μέση ηλικία τα 68 έτη αντίστοιχα. Η πλειοψηφία των ασθενών και στις δυο ομάδες ήταν άρρενες σε ποσοστό 67,1% και 82,5%. Ο τύπος λοίμωξης που επικρατεί είναι η πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) σε ποσοστό >50%, με την πνευμονία της κοινότητας (CAP), την πνευμονία των ιδρυμάτων παροχής ιατρικής φροντίδας (HCAP) και την νοσοκομειακή πνευμονία(HAP) σε μικρότερα ποσοστά. Υπολογίζοντας τις κλίμακες αξιολόγησης βαρύτητας νόσου SOFA και APACHE II και για τις δυο ομάδες ασθενών δεν προκύπτει στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ αυτών. Οι συνοσηρότητες που επικρατούν είναι η αρτηριακή υπέρταση, ο σακχαρώδης διαβήτης, η καρδιακή ανεπάρκεια και η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (Πιν.3). Επιπλέον έγινε καταγραφή του ατομικού ιστορικού και της λήψης φαρμακευτικής

αγωγής (κορτικοστεροειδή / ανοσοκατασταλτικά) σε όλους τους συμμετέχοντες στην μελέτη. Η αιτία εισόδου στην ΜΕΘ διαφέρει ανάμεσα στις δυο ομάδες. Η αναπνευστική ανεπάρκεια (37%),τα νευρολογικά νοσήματα (15%) και η μετεγχειρητική νοσηλεία (15%) υπερτερούν στην ομάδα μοριακής διάγνωσης (PCR-group) συγκριτικά με την ομάδα ελέγχου (historical control group) όπου οι τραυματικές κακώσεις (35%), η αναπνευστική ανεπάρκεια (17,5%) και η μετεγχειρητική νοσηλεία (15%) αποτελούν τις κύριες αιτίες εισόδου. Συνολικά η αιτιολογία εισόδου αναλύεται στον πίνακα 4.

Πιν 3. Demographics, clinical characteristics and outcome of patients and historical group.

Characteristic	**Control group (n=40)**	**Syndromic PCR group (n=79)**	***P* value (odds ratio)**	**Analysis Method**
Age	68 (20-86)	69 (22 - 87)	0.62	Unpaired t-test
Sex				
Male	82.5% (n=33)	67.1% (n=53)	0.08	Contingency
Female	17.5% (n=7)	32.9% (n=26)	0.08	Contingency
Type of Pneumonia				
VAP	57,5% (n=23)	69,62% (n=55)	0.22	Contingency
CAP	27.5% (n=11)	17.72% (n=14)	0.24	Contingency
HCAP	10% (n=4)	2.53% (n=2)	0.18	Contingency
HAP	5% (n=2)	10.13% (n=8)	0.49	Contingency
Apache II	26 (10-41) ±6.5	26 (7-45) ± 7.8	0.78	Unpaired t-test
SOFA	11 (6-14) ±2.8	11 (7-21) ± 2.9	0.77	Unpaired t-test
Days of Hospitalization	17 (3-120) ± 19.63	17 (3-54) ± 11.4	0.31	Unpaired t-test
Outcome				
Improvement	67.5% (n=27)	78.48% (n=62)	0.26	Contingency
No change	12.5% (n=5)	1.27% (n=1)	0.02	Contingency
Death	20% (n=8)	20.25% (n=16)	>0.99	Contingency
Underlying disease				
COPD	20% (n=8)	21.52% (n=17)	>0.99	Contingency
Arterial Hypertension	42.5% (n=17)	56.96% (n=45)	0.17	Contingency
Diabetes Mellitus	22.5% (n=9)	29.11% (n=23)	0.52	Contingency
Heart Failure	20% (n=8)	31.65% (n=25)	0.2	Contingency
Liver Disease/Failure	7.5% (n=3)	5.06% (n=4)	0.69	Contingency
Renal Disease/Failure	7,5% (n=3)	15,19% (n=12)	0.38	Contingency
Hematological Diseases	0	5.06% (n=4)	0.3	Contingency
Cancer	7.5% (n=3)	10.13% (n=8)	0.75	Contingency
Neurological Diseases	22.5% (n=9)	15.19% (n=12)	0.32	Contingency
Drug Abuse	0	1.27% (n=1)	>0.99	Contingency
Alcohol	5% (n=2)	2.53% (n=2)	0.6	Contingency
Obesity	5% (n=2)	1,27% (n=1)	0.26	Contingency
No other comorbidity	30% (n=12)	10.13% (n=8)	0.0092	Contingency
HIV	2,5% (n=1)	0	0.34	Contingency
Unknown	0	3.80% (n=3)	0.55	Contingency
Immunodeficiency	0	5.06% (n=4)	0.3	Contingency
Bed-days	14(2-14) ± 2.83	9(1-14) ± 4.13	0.001	Unpaired t-test
Time to diagnosis	72(10.88-169.07) ± 38.26	3.5(2.92-4.2) ± 0.3	<0.0001	Unpaired t-test

Πιν.4 Cause of Admission.

Cause of Admission	Control	TOTAL PCR
Pulmonary Diseases	17,5% (n=7)	36,71% (n=29)
Neurological Diseases	12,5% (n=5)	15,19% (n=12)
Cardiovascular Diseases	7.5% (n=3)	6,33% (n=5)
Liver Diseases	0	1,27% (n=1)
Sepsis	12,5% (n=5)	10,13% (n=8)
Trauma	35% (n=14)	12,66% (n=10)
Hematological Diseases	0	2,53% (n=2)
Post Operative Admission	15% (n=6)	15,19% (n=12)

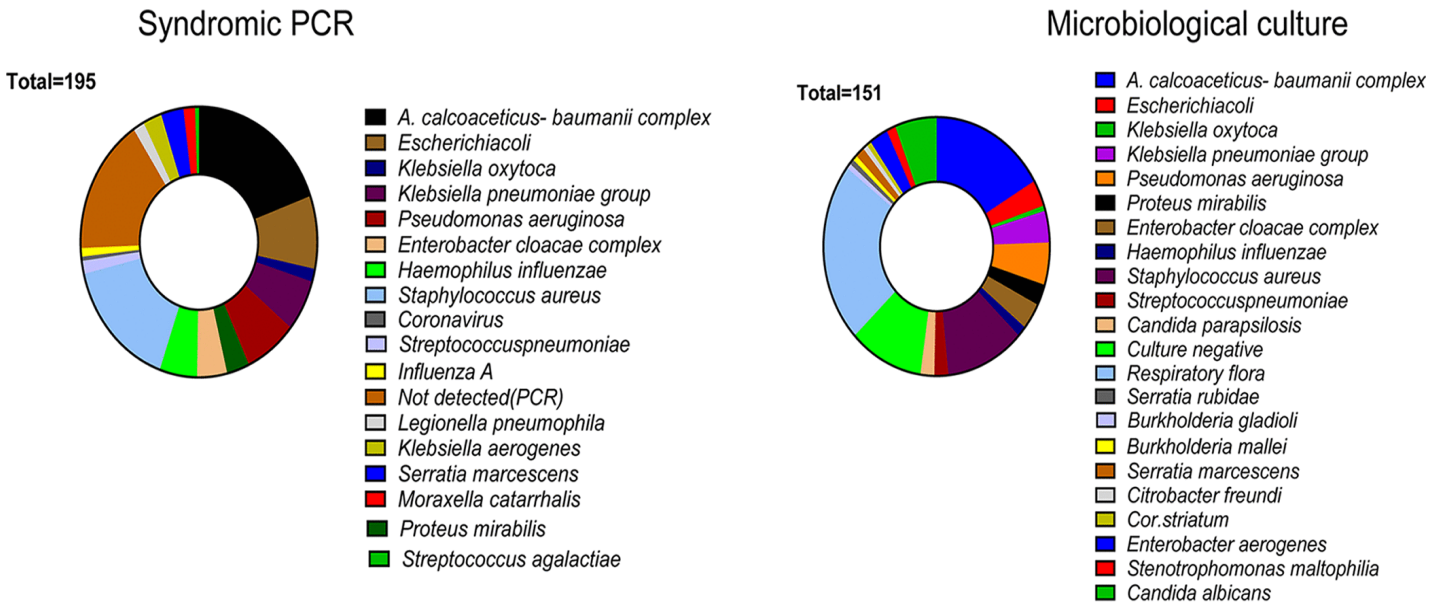
Η συμβατική καλλιεργητική μέθοδος και στις δυο ομάδες ασθενών αναδεικνύει ως βασικούς αιτιολογικούς παράγοντες της λοίμωξης του κατώτερου αναπνευστικού κυρίως Gram αρνητικά παθογόνα όπως *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumonia group,* και άλλα εντεροβακτηριακά και μη καθώς και Gram θετικά παθογόνα όπως *Staphylococcus aureus* και *Streptococcus pneumoniae*. Η απομόνωση μυκήτων θεωρείται περισσότερο ως αποικισμός χωρίς να αποτελεί πραγματικό αίτιο λοίμωξης. Η αναλυτική καταγραφή όλων των στελεχών που απομονώθηκαν από την καλλιέργεια του δείγματος που εστάλη στο μικροβιολογικό εργαστήριο όπως και οι περιπτώσεις όπου η καλλιέργεια ήταν στείρα ή αξιολογήθηκε ως αρνητική λόγω της παρουσίας φυσιολογικής χλωρίδας του ανώτερου αναπνευστικού συστήματος φαίνεται στον πίνακα.5.

Πιν.5 Results of microbiological cultures of control and syndromic PCR group of patients.

Bal Culture Pathogens MICROBIOLOGY CHART		
	Control Group	**PCR Group**
Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex	32,5% (n=13)	10% (n=10)
Escherichia coli	10% (n=4)	5% (n=5)
Klebsiella oxytoca	5% (n=2)	1% (n=1)
Klebsiella pneumoniae group	10% (n=4)	5% (n=5)
Pseudomonas aeruginosa	22,5% (n=9)	6% (n=6)
Proteus mirabilis	7,5% (n=3)	3% (n=3)
Enterobacter aerogenes	2,5% (n=1)	1% (n=1)
Enterobacter cloacae complex	5% (n=2)	5% (n=5)
Haemophilus influenzae	2,5% (n=1)	2% (n=2)
Stenotrophomonas maltophilia	7,5% (n=3)	1% (n=1)
Serratia marcescens	5% (n=2)	0
Staphylococcus aureus	12,5% (n=5)	11% (n=11)
Streptococcus pneumoniae	5% (n=2)	3% (n=3)
Candida albicans	7,5% (n=3)	6% (n=6)
Candida tropicalis	2,5% (n=1)	0
Candida parapsilosis	0	1% (n=1)
Στείρα	0	16% (n=16)
Αρνητική	0	21% (n=21)
Burkolderia gladioli	0	1% (n=1)
Serratia rubidae	0	1% (n=1)
Burkolderia mallei	0	1% (n=1)

Κατόπιν έγινε καταγραφή του αποτελέσματος ως προς το παθογόνο στέλεχος που ταυτοποιήθηκε τόσο από την συμβατική καλλιέργεια όσο και από το αποτέλεσμα της μοριακής μεθόδου (Εικ.7). Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έδειξε ότι σε ποσοστό 40% υπήρξε απόλυτη συμφωνία μεταξύ των δυο μεθόδων σχετικά με την ταυτοποίηση του αιτιολογικού παράγοντα, όμως σε ποσοστό 49% η μοριακή μέθοδος ανέδειξε περισσότερα λοιμογόνα στελέχη συγκριτικά με την καλλιέργεια. Υπήρξε και ένα ποσοστό 11% όπου παθογόνα όπως *Stenotrophomonas maltophilia, Burkolderia spp.* και *Serratia spp* ταυτοποιήθηκαν αποκλειστικά και μόνο από την συμβατική καλλιέργεια και αυτό γιατί δεν περιλαμβάνονται στους στόχους ανίχνευσης της μοριακής μεθόδου (Πίν.6, Εικ.9C).

Εικ.7 Summary of the results of syndromic PCR with culture of tracheal aspirates or BAL.



Πιν.6 Comparison PCR vs Culture result.

Diagnostic Method Comparison PCR vs Culture	TOTAL PCR
Agreement	40,00%
Improved Diagnosis	49,41%
Missed Cases	0,00%
NA	10,59%

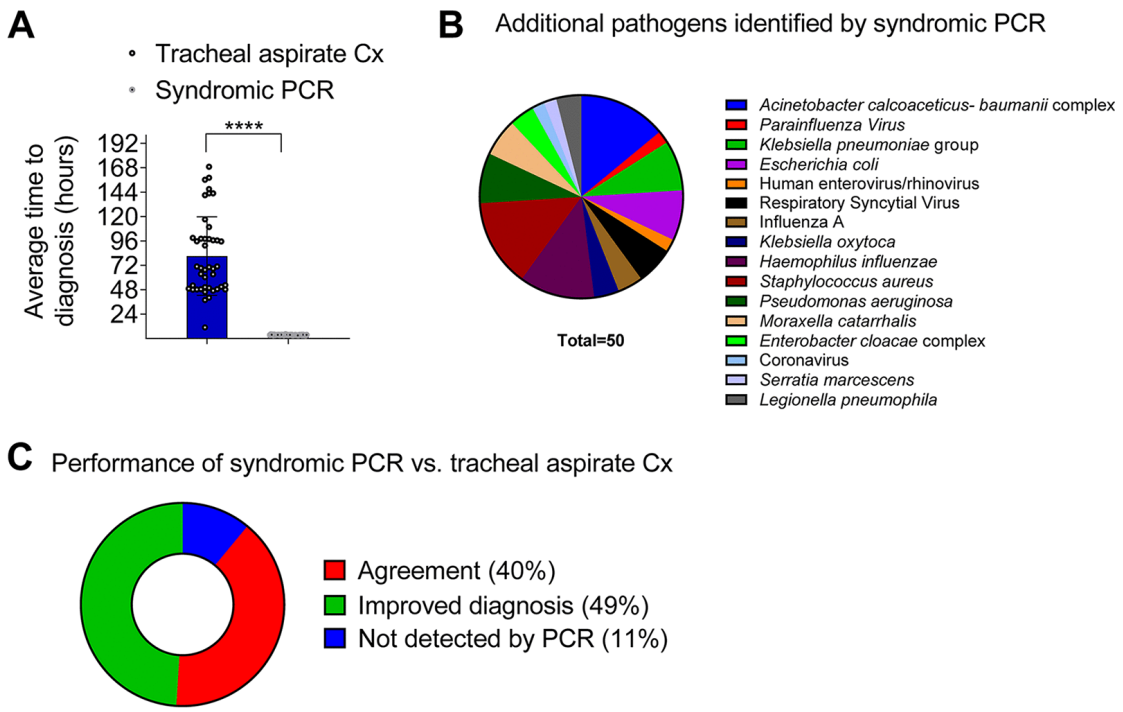
Αναλυτικότερα προέκυψε ότι το αποτέλεσμα της μοριακής μεθόδου multiplex PCR είναι σε συμφωνία με το αποτέλεσμα της καλλιέργειας σε 34 περιπτώσεις μοριακής εξέτασης (40%).Συγκεκριμένα υπήρξαν 15 περιπτώσεις χωρίς παθογόνα στελέχη και 19 περιπτώσεις απόλυτης συμφωνίας ως προς τα λοιμογόνα αίτια που ανιχνευτήκαν και απομονώθηκαν αντίστοιχα είτε ως μονοκαλλιέργεια είτε και ως πολυμικροβιακή λοίμωξη. Επιπλέον η ποσοτική εκτίμηση μεταξύ των δυο μεθόδων αν και δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμές (Gene copies/mL, Colony Forming Units/milliliter) δεν διαφέρει σημαντικά στην πλειοψηφία των περιστατικών (93%) με εξαίρεση 2 περιπτώσεις που η μοριακή εξέταση υποεκτίμησε την βακτηριακή συγκέντρωση (Πιν.7).

Πιν.7. Agreement between culture result and syndromic PCR result.

No	**CULTURE RESULT (CFU/mL)**	**PCR RESULT (Bin Copies/mL)**
1	*Staphylococcus aureus* (2x10^5)	*Staphylococcus aureus* (10^6)
2	*Escherichia coli* (14*10^7)	*Escherichia coli* (≥10^7)
3	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (18*10^7)	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (≥10^7)
4	*Pseudomonas aeruginosa* (4*10^7)	*Pseudomonas aeruginosa* (≥10^7)
5	*Enterobacter cloacae complex* (2*10^7), *Klebsiella pneumoniae group* (2*10^7)	*Enterobacter aerogenes* (10^4), *Klebsiella pneumoniae group* (10^6)
6	*Pseudomonas aeruginosa* (10^7)	*Pseudomonas aeruginosa* (≥10^7)
7	*Haemophilus influenzae* (>10^9)	*Haemophilus influenzae* (≥10^7)
8	*Staphylococcus aureus* (6*10^5)	*Staphylococcus aureus* (10^6)

9	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (>10^7)	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (≥10^7)
10	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (3*10^5), *Pseudomonas aeruginosa* (4*10^6)	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (10^5), *Pseudomonas aeruginosa* (10^6)
11	*Staphylococcus aureus* (>10^9)	*Staphylococcus aureus* (≥10^7)
12	*Staphylococcus aureus* (10^5), *Enterobacter cloacae complex* (10^5), *Proteus mirabilis* (10^5)	*Staphylococcus aureus* (≥10^7), *Enterobacter cloacae complex* (10^5), *Proteus mirabilis* (10^5)
13	*Staphylococcus aureus* (10^7)	*Staphylococcus aureus* (≥10^7)
14	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (10^5)	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (10^6)
15	*Pseudomonas aeruginosa* (2*10^7)	*Pseudomonas aeruginosa* (10^4)
16	*Staphylococcus aureus* (5*10^7), *Pseudomonas aeruginosa* (10^5)	*Staphylococcus aureus* (≥10^7), *Pseudomonas aeruginosa* (≥10^7)
17	*Staphylococcus aureus* (≥10^7), *Enterobacter cloacae complex* (>10^9)	*Staphylococcus aureus* (≥10^7), *Enterobacter cloacae complex* (≥10^7)
18	*Escherichia coli* (>10^9), *Enterobacter aerogenes* (25*10^7)	*Escherichia coli* (≥10^7), *Klebsiella aerogenes* (10^5)
19	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (10^5)	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (10^6)

Η μελέτη ανέδειξε ότι η μοριακή εξέταση σε ποσοστό 49% των περιπτώσεων έδωσε περισσότερες πληροφορίες συγκριτικά με το αποτέλεσμα της καλλιέργειας. Ανιχνευτήκαν 44 σημαντικά βακτηριακά παθογόνα τα οποία δεν απομονώθηκαν από την καλλιέργεια όπως επίσης και ιούς που εμπλέκονται στις λοιμώξεις **(**Πιν.8, Εικ.9Β).



Εικ.9 Comparative analysis of performance of syndromic PCR platform versus conventional culture of tracheal aspirates or BAL related to (A) time to diagnosis, (B) new pathogens identified (C) performance in diagnosis.

Πιν.8 Analysis of additional pathogens identified by syndromic PCR panel.

Cases	Culture result	Syndromic PCR result
1	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*
2	*Klebsiella pneumoniae group*	*Klebsiella pneumoniae group, Parainfluenza Virus*
3	No Pathogen	*Klebsiella pneumoniae group*
4	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Escherichia coli*
5	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Parainfluenza Virus*
6	No Pathogen	*Human enterovirus/rhinovirus*

7	No Pathogen	*Respiratory Syncytial Virus*
8	No Pathogen	*Respiratory Syncytial Virus*
9	No Pathogen	*Influenza A, Respiratory Syncytial Virus*
10	No Pathogen	*Klebsiella oxytoca*
11	No Pathogen	*Haemophilus influenzae*
12	No Pathogen	*Haemophilus influenzae*
13	No Pathogen	*Staphylococcus aureus*
14	No Pathogen	*Pseudomonas aeruginosa*
15	No Pathogen	*Escherichia coli*
16	*Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae group, Burkolderia gladioli*	*Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae group, Haemophilus influenzae*
17	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae group*
18	*Proteus mirabilis*	*Proteus mirabilis, Haemophilus influenzae*
19	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae*
20	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae, Staphylococcus aureus*
21	*Escherichia coli*	*Escherichia coli, Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*
22	*Enterobacter cloacae complex*	*Enterobacter cloacae complex, Staphylococcus aureus*
23	No Pathogen	*Staphylococcus aureus*
24	*Escherichia coli*	*Escherichia coli, Moraxella catarrhalis*
25	No Pathogen	*Enterobacter cloacae complex*
26	No Pathogen	*Pseudomonas aeruginosa*

27	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus, Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Klebsiella pneumoniae group, Legionella pneumophila*
28	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*
29	*Staphylococcus aureus*	*Staphylococcus aureus, Influenza A*
30	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae group*	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae group, Coronavirus*
31	*Escherichia coli, Proteus mirabilis*	*Escherichia coli, Proteus mirabilis, Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*
32	*Klebsiella pneumoniae group, Klebsiella oxytoca*	*Klebsiella pneumoniae group, Klebsiella oxytoca, Staphylococcus aureus*
33	No Pathogen	*Haemophilus influenzae*
34	No Pathogen	*Serratia marcescens, Klebsiella oxytoca*
35	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae group, Haemophilus influenzae, Pseudomonas aeruginosa*
36	*Streptococcus pneumoniae*	*Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis, Proteus mirabilis*
37	No Pathogen	*Staphylococcus aureus, Haemophilus influenzae*
38	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*
39	*Candida albicans*	*Enterobacter cloacae complex, Escherichia coli*

40	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex*
41	*Haemophilus influenzae, Burkolderia mallei*	*Haemophilus influenzae, Moraxella catarrhalis*
42	No Pathogen	*Legionella pneumophila*

Υπήρξαν 9 περιπτώσεις (11%) μοριακού ελέγχου όπου η multiplex PCR δεν ανίχνευσε το λοιμογόνο αίτιο της λοίμωξης καθώς τα παθογόνα που απομονώθηκαν και ταυτοποιήθηκαν από την καλλιέργεια όπως *Stenotrophomonas maltophilia, Serratia, rubidiae* και *Bukholderia gladioli* δεν περιλαμβάνονται στου στόχους ανίχνευσης της μεθόδου, όπως και η απομόνωση μυκήτων από τις καλλιέργειες θεωρείται ως αποικισμός.

Η δυνατότητα της multiplex PCR να ανιχνεύει γονίδια αντοχής παρουσιάζει περιορισμούς στις περιπτώσεις πολυανθεκτικών στελεχών (*Acinetobacter spp, Pseudomonas aeruginosa)* με πολύπλοκους μηχανισμούς αντοχής. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων της μοριακής εξέτασης ανέδειξε 12 περιπτώσεις γονιδίων αντοχής. Αναλυτικά ανιχνευτήκαν 5 περιπτώσεις *Staphylococcus aureus* με γονίδια αντοχής mecA/C και MREJ, 2 περιπτώσεις *Escherichia coli* CTX-M, 1 περίπτωση *Escherichia coli* KPC και 1 περίπτωση *Klebsiella pneumonia* KPC σε συμφωνία με την φαινοτυπική μέθοδο ελέγχου ευαισθησίας των αντιβιοτικών του εργαστηρίου. Σε 3 περιπτώσεις ανιχνευτήκαν επιπρόσθετα γονίδια αντοχής στα εξής παθογόνα *Klebsiella pneumonia* CTX-M, *Staphylococcus aureus* mecA/C και MREJ και *Escherichia coli* VIM.

Ιδιαίτερα σημαντική αποδεικνύεται η ελάττωση στον χρόνο μικροβιολογικής διάγνωσης στην ομάδα ασθενών της μοριακής εξέτασης από τις 72 ώρες της συμβατικής καλλιέργειας σε 3.5 ώρες με την multiplex PCR (Πιν.9, Εικ.9Α).

Πιν.9.Time to diagnosis.

Time to Diagnosis	Control	TOTAL PCR
Culture (Hr)	73,57 (38,23-196,08) ± 37,58	72 (10,88-169,07) ± 38,26
PCR (Hr)	NA	3,5 (2,92-4,2) ± 0,3
Decrease	NA	95,14%

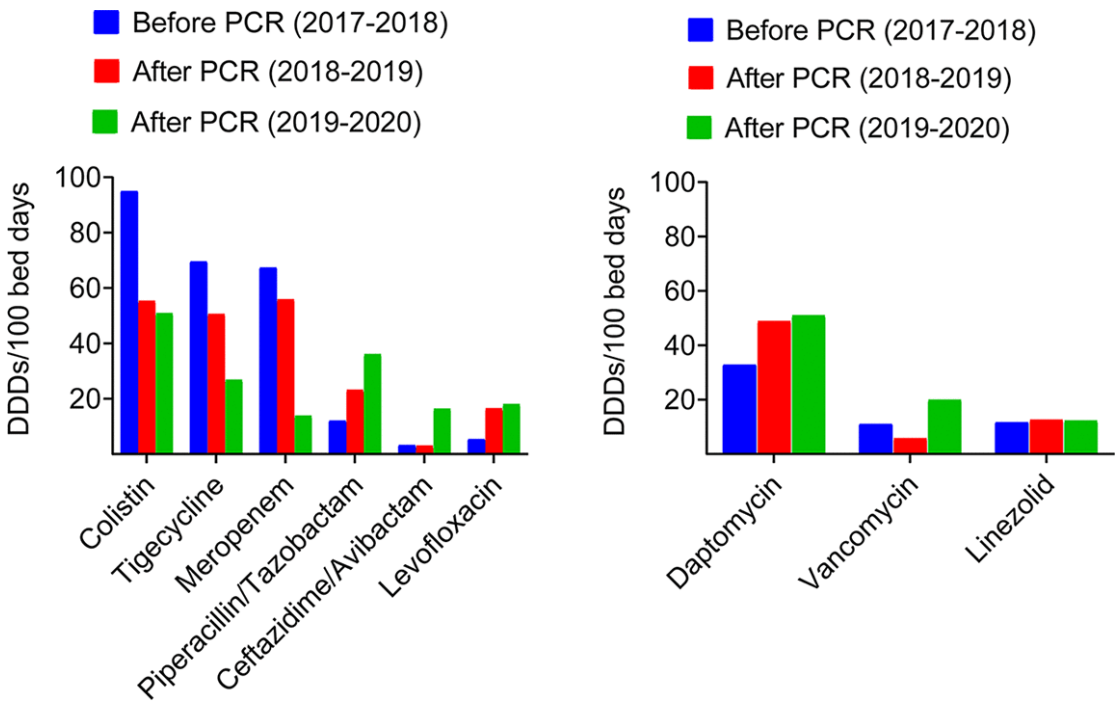
Προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβολή της μοριακής μεθόδου στην στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση έγινε υπολογισμός των DDDs/100 Bed days ως δείκτη κατανάλωσης αντιβιοτικών.

Ο υπολογισμός σε DDD (Defined Daily Dose) έγινε σε όλους τους ασθενείς της μελέτης με ποσοτική καταγραφή της θεραπευτικής αγωγής τους κατά την χρονική στιγμή της κλινικής διάγνωσης της λοίμωξης και για τις επόμενες 14 ημέρες. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα προκύπτει μια σημαντική μείωση στην κατανάλωση αντιβιοτικών που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση ανθεκτικών στελεχών (MDR/XDR) όπως η κολιστίνη, η τιγεκυκλίνη και η μεροπενέμη. Αντιθέτως καταγράφεται αύξηση στην χρήση συνδυασμών παραγόντων β-λακταμικών με αναστολείς των β-λακταμασών όπως οι συνδιασμοί αμπικιλλίνη - σουλμπακτάμη (Ampicillin–sulbactam), πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη (Piperacillin-tazobactam) και κεφταζιδίμη-αβιβακτάμη (Ceftazidime–avibactam) καθώς και στην κατανάλωση της λεβοφλοξασίνης (Levofloxacin). Επιπρόσθετα η διαδοχική αύξηση στην κατανάλωση παραγόντων όπως η δαπτομυκίνη (Daptomycin), η βανκομυκίνη (Vancomycin) και η λινεζολίδη (Linezolid) σχετίζεται με την παρουσία λοιμώξεων από Gram θετικά στελέχη (Πιν.10, Εικ.10).

Πιν.10. Comparative analysis of antibiotic consumption in control and syndromic PCR group of patients expressed as DDD/100 bed days (BD) values.

Antibiotic	Control DDDs/100BD	Syndromic PCR DDDs/100BD	P value
Ampicillin-sulbactam	6.7	13.22	0.1177
Piperacillin-tazobactam	11.96	33.02	0.0003
Ceftazidime-avibactam	3.14	13.23	0.0091
Ceftazidime		2.6	N/A
Ceftriaxone	2.49	0.52	0.9999
Cefepime	14.97	16.63	0.5875
Meropenem	67.22	23.61	<0.0001
Levofloxacine	5.3	17.64	0.0027
Ciprofloxacine	4.99	2.67	0.728
Colistin	94.86	51.91	0.0011
Vancomycin	10.91	16.63	0.1772
Tigecycline	69.44	32.36	0.0008
Gentamycin	5.13	1.14	0.2203
Daptomycin	32.74	50.49	0.0137
Amikacin	2.08	3.13	0.6718
Clindamycin	0.69	0.65	>0.9999
Linezolid	11.54	12.37	0.8373
Tirimethoprime-sulfamethoxazole		12.18	N/A
Metronidazole	4.44	2.69	>0.9999
Rifampicin	1.25	1.41	>0.9999
Itraconazole	0.21	4.98	0.0234
Fluconazole	0.73	1.3	>0.9999
Isavuconazole		1.62	N/A
Amphotericin B		4.65	N/A
Micafungin	2.29	16.41	0.0004

Anidulafungin	4.99	5.73	0.7639
Oseltamivir		1.75	N/A
Ceftolozan tazobactam	1.04	1.56	0.6057
Tobramycin		0.65	N/A
Acyclovir		1.06	N/A
Azithromycin		0.26	N/A
Isoniazid		0.85	N/A
Ceftraolin fosamil		2.34	N/A
Voriconazole		0.13	N/A
Moxifloxacin		0.13	N/A



Εικ.10 Trends in consumption of antibiotics against Gram negative (left panel) and Gram positive (right panel) bacterial pathogens in control and syndromic PCR group of patients over the study period.

Τα παραπάνω αποτελέσματα αποτελούν ένδειξη της συμβολής της multiplex PCR στην τροποποίηση και περισσότερο στοχευμένη θεραπευτική αντιμετώπιση των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος όπως προκύπτει σε διαδοχικά χρονικά διαστήματα.

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή, ο κλινικός ιατρός είχε την δυνατότητα απευθείας επικοινωνίας με τον υπεύθυνο της μελέτης προκειμένου να πληρούνται τα κριτήρια ένταξης στην μελέτη για κάθε περιστατικό, αλλά επιπλέον και για την ερμηνεία του αποτελέσματος της μοριακής μεθόδου, καθώς είχαν παρουσιαστεί στους ιατρούς της ΜΕΘ γραπτές οδηγίες καθοδήγησης (diagnostic stewardship) για τις πιθανές επιλογές στην χρήση αντιμικροβιακών έναντι των κυριότερων αιτιών της VAP (Πιν.11), με βάση ανάλυση της VAP στην ΜΕΘ ως προς τον λοιμογόνο παράγοντα και το φάσμα αντοχών του (Εικ.11, 12).

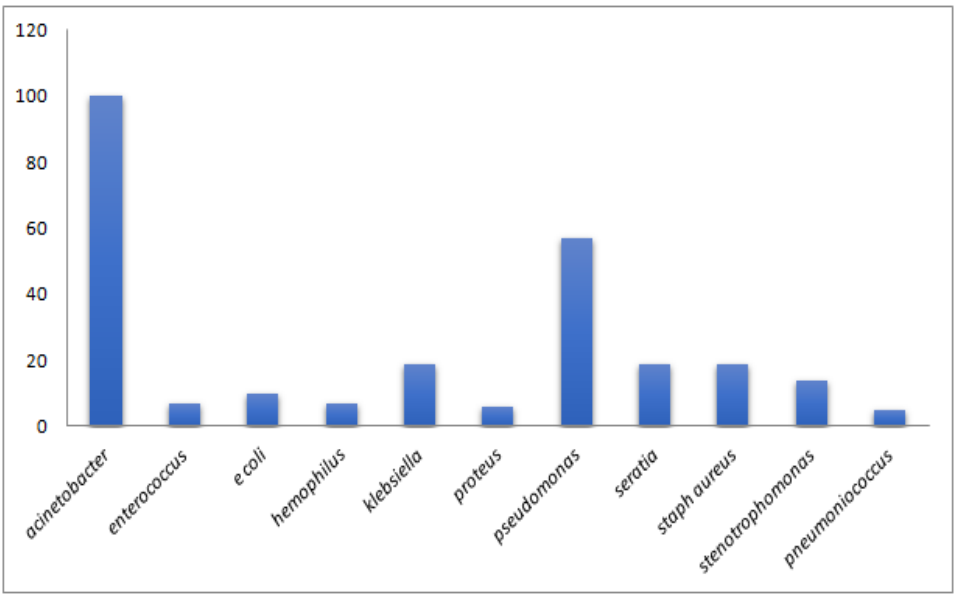
Πιν.11 Επιλογή εμπειρικής αγωγής με βάση την τοπική επιδημιολογία και το αποτέλεσμα της M-PCR

Παθογόνο	**Πιθανή εμπειρική αγωγή**
E. coli	Μικρή <1% πιθανότητα για Carbapenem R • **Severe sepsis: Carbapenem. Σε κάθε άλλη περίπτωση Carbapenem** sparing (π.χ. cefepime, ciprofloxacin)
Proteus mirabilis	Μικρή <1% πιθανότητα για Carbapenem R, Pip/Tazo 100% S • **Σε κάθε περίπτωση Carbapenem sparing:** (π.χ. Cefepime, Piperacillin-Tazobactam)
Enterobacter spp.	Μικρή <1% πιθανότητα για Carbapenem R, Cephalosporin Inducible R, Pip/Tazo: 30% R. **Εμπειρική αγωγή Carbapenem σε κάθε περίπτωση**
Serratia marscecens	**Μικρή <1% πιθανότητα για Carbapenem R, Pip/Tazo 100% S.** **Carbapenem sparing** (π.χ. Piperacillin-Tazobactam)
Pseudomonas spp	Colistin 0%R, Cipro 17% R, Ceftaz: 26% R • **Διπλή αντιμικροβιακή κάλυψη** • **Σε σοβαρή σήψη** προσθήκη κολιστίνης εμπειρικά (colistin + ciprofloxacin or ceftazidime)

	• Σε ήπιας βαρύτητας λοίμωξη ceftazidime + cirpofloxacin
Acinetobacter spp	• Εμπειρική θεραπεία με βάση Colistin + Tigecycline
Klebsiella pneumonia	Carbapenem Resistance (π.χ., ανίχνευση KPC) • Colistin + Tigecycline +/- gentamicin (σοβαρή σήψη) Carbapenem Susceptible • Carbapenem sparing (Pip/Tazo, Cefepime) ή Carbapenem (severe sepsis)
Staphylococcus	Αγωγή με βάση αντοχή στη μεθικιλλίνη (MSSA ή MRSA)
(Gram negative bacilli, PCR negative)	***Υποψία Stenotrophomonas*** *ή άλλο gram negative nosocomial pathogen* • **Εμπειρικά Bactrim** σε συνδυασμό με ευρέως φάσματος κάλυψη (π.χ. Carbapenem +/- aminoglycoside in severe sepsis)

Παθογόνο (αριθμός στελεχών)	Καρβα-πενέμες	Κολιμικίνη	Τιγκε-κυκλίνη	Γεντα-μικίνη	Αμικασίνη	Σιπροφλο-ξασίνη	Οξακιλ-λίνη	Βανκομυ-κίνη	Νταπτο-μυκίνη	Λινεζο-λίδη	ESBL
Escherichia coli (1517)	1%	0,3%	0,4%	7,3%	7,4%	25,2%					13,8%
Proteus mirabilis (211)	1,4%			10,9%	4,3%	19,9%					
Klebsiella pneumonia (468)	28%	4,9%	16,5%	11,1%	36,8%	41,5%					16,7%
Enterobacter spp (177)	6,2%	1,1%	5%	1,7%	3,4%	5,6%					
Acinetobacter baumannii (323)	89,5%	24,5%	55%								
Pseudomonas aeruginosa (532)	26,7%	0,6%			15,8%	26,9%					
Staphylococcus aureus (493)							25,8%	0,8%	-	0%	
Enterococcus faecalis (594)								0,5%	0%	2,7%	
Enterococcus faecium (197)								22,8%	-	3%	

Εικ.11 Ανάλυση δεδομένων μικροβιολογικού εργαστηρίου ΠΑΓΝΗ για το ποσοστό ανθεκτικών στελεχών στα αντιβιοτικά (1/2017-12/2017).



Εικ.12 Μικροβιολογία VAP (ΜΕΘ ενηλίκων ΠΑΓΝΗ).

Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποκλιμάκωσης (De–escalation) της αγωγής αποτελούν περιστατικά διακοπής της κολιστίνης και επιλογής διαφορετικής αγωγής με βάση το αποτέλεσμα της μοριακής μεθόδου ως προς τον αιτιολογικό παράγοντα και την ανίχνευση γονίδιου αντοχής, όπως περιστατικά πνευμονίας λόγω MRSA (*S.aureus*, mecA/C-MREJ), *Enterobacter cloacae* και *Enterobacter aerogenes* μαζί με *Klebsiella pneumoniae.* Ανάλογη τροποποίηση έγινε και στις περιπτώσεις όπου η multiplex PCR ανέδειξε ως λοιμογόνο αίτιο άτυπα παθογόνα όπως η *Legionella pneumophila* ή ιογενή αίτια όπως Influenza A και ο αναπνευστικός συγκυτιακός ιός (Respiratory Syncytial Virus, RSV).

2.5 Συζήτηση

Η παρούσα μελέτη είχε ως στόχο να εκτιμήσει την συμβολή της μοριακής μεθόδου BioFire FilmArray - Pneumonia plus Panel σε ένα ιδιαίτερα δύσκολο χώρο ανθεκτικών στελεχών (XDR, MDR, PDR) όπως είναι η Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου, στην διαχείριση των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Η διετή χρονική περίοδος της μελέτης (2018-2020) ανέδειξε την ομάδα ελέγχου (PCR group) νοσηλευόμενων ασθενών στην ΜΕΘ με λοίμωξη του πνευμονικού παρεγχύματος ενώ ο σχεδιασμός της μελέτης μας περιέλαβε την αναζήτηση αντίστοιχων περιστατικών (Control group) ένα χρόνο πριν την χρήση της μοριακής μεθόδου (2017-2018). Η νοσηλεία στην ΜΕΘ αφορά σε σοβαρή πνευμονία κοινότητας (sCAP), σε νοσοκομειακή πνευμονία (HAP) ή πνευμονία που σχετίζεται με τον αναπνευστήρα (VAP) η οποία αποτέλεσε και το μεγαλύτερο ποσοστό ασθενών. Αξίζει να σημειωθεί ότι η μικροβιολογική διάγνωση αφορά τη λοίμωξη και όχι τη λοιμώδη νόσο, επομένως έχει τεράστια αξία η εφαρμογή σε ασθενείς με υψηλό pretest probability διαφορετικά θα αυξηθεί δραματικά η εμφάνιση ψευδών θετικών αποτελεσμάτων. Κριτήρια ένταξης στην μελέτη μας αποτέλεσαν κλινικά,

εργαστηριακά και απεικονιστικά ευρήματα πιθανής λοίμωξης του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος.

Η καταγραφή των δημογραφικών και κλινικών χαρακτηριστικών τους δεν παρουσίασε διαφορές ανάμεσα στις δυο ομάδες ενώ τα μικροβιολογικά δεδομένα κατέστησαν τις δυο ομάδες συγκρίσιμες μεταξύ τους, γεγονός που επέτρεψε την μελέτη της συμβολής της multiplex PCR στην διαχείριση της αντιβιοτικής αγωγής.

Συμπερασματικά η συμβολή της μοριακής μεθόδου έδωσε την δυνατότητα για ταχεία μικροβιολογική διάγνωση μέσα σε λίγες ώρες (3.5h vs 72h, $P < 0.0001$) συγκριτικά με την συμβατική καλλιεργητική μέθοδο. Σε ποσοστό 40% υπήρξε συμφωνία των δυο μεθόδων ως προς το παθογόνο στέλεχος της λοίμωξης, ενώ σε ποσοστό 49% η μοριακή μέθοδος ανίχνευσε περισσότερα παθογόνα σε σχέση με την συμβατική καλλιεργητική μέθοδο, καθώς έχει την δυνατότητα να ανιχνεύει εκτός από τα συχνότερα βακτήρια ,άτυπα βακτήρια καθώς και ιούς που εμπλέκονται στις λοιμώξεις του κατωτέρου αναπνευστικού συστήματος. Υπήρξαν και τα περιστατικά στα οποία ο αιτιολογικός παράγοντας της λοίμωξης προέκυψε από την μικροβιολογική καλλιέργεια καθώς δεν περιλαμβάνεται στους στόχους ανίχνευσης της μοριακής μεθόδου.

Επιπρόσθετα, η ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων που προσδίδουν ανθεκτικότητα στα στελέχη και περιορίζουν τις θεραπευτικές επιλογές σε συνδυασμό και με την τοπική επιδημιολογία της ΜΕΘ οδήγησε τον κλινικό ιατρό, βάση του αποτελέσματος της Multiplex PCR, να τροποποιήσει την αγωγή συμβάλλοντας έτσι στον περιορισμό της εμφάνισης ανθεκτικότητας και τοξικότητας που σχετίζεται με την χρήση ευρέως φάσματος αντιβιοτικών χωρίς να επηρεαστεί η έκβαση της νοσηλείας του ασθενή.

Ως γνωστόν και όπως φάνηκε και από την δική μας μελέτη τα συχνότερα παθογόνα των συγκεκριμένων λοιμώξεων είναι κυρίως Gram αρνητικά βακτήρια. Ειδικότερα όμως σε παθογόνα με πολύπλοκους μηχανισμούς αντοχής όπως το *Acinetobacter baumannii* και η *Pseudomonas aeruginosa* η μοριακή μέθοδος απέτυχε να ανιχνεύσει τους μηχανισμούς αντοχής.

Προκειμένου να αξιολογηθεί η συμβολή της Multiplex PCR στην θεραπευτική διαχείριση των περιστατικών υπολογίστηκε ο δείκτης κατανάλωσης αντιβιοτικών

DDDs/100BD. Έγινε καταγραφή της φαρμακευτικής αγωγής για 14 ημέρες από την ημέρα της κλινικής διάγνωσης της λοίμωξης και υπολογισμός σε DDD βάση του συστήματος του WHO ATC/DDD.

Η μελέτη ανέδειξε σημαντικές αλλαγές στην κατανάλωση βασικών θεραπευτικών παραγόντων οι οποίοι αποτελούν την θεραπεία εκλογής στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων από ανθεκτικά στελέχη (MDR/XDR) στην ΜΕΘ. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η σταδιακή μείωση που παρατηρήθηκε σε βασικούς αντιβιοτικούς παράγοντες για την αντιμετώπιση Gram αρνητικών παθογόνων όπως η κολιστίνη, η τιγεκυκλίνη και οι καρβαπενέμες. Παράλληλα προέκυψε αύξηση στην κατανάλωση αντιβιοτικών όπως οι συνδυασμοί των β-λακταμικών με αναστολείς των β-λακταμασών όπως οι συνδυασμοί αμπικιλλίνη-σουλμπακτάμη (Ampicillin–sulbactam), πιπερακιλλίνη-ταζομπακτάμη (Piperacillin-tazobactam) και κεφταζιδίμη-αβιβακτάμη (Ceftazidime–avibactam) καθώς και στην κατανάλωση της λεβοφλοξασίνης (Levofloxacin). Όσον αφορά παράγοντες για την αντιμετώπιση Gram θετικών στελεχών παρατηρήθηκε αύξηση στην κατανάλωση αντιβιοτικών όπως η δαπτομυκίνη (Daptomycin), η βανκομυκίνη (Vancomycin) και η λινεζολίδη (Linezolid).

Η παρούσα μελέτη παρουσιάζει περιορισμούς που οφείλουμε να αναφέρουμε. Πρόκειται για μια αναδρομική μελέτη καταγραφής με τον αριθμό των ασθενών που εντάχθηκαν βάση κριτηρίων να είναι περιορισμένος. Επιπλέον οι πιθανές αλλαγές στον έλεγχο των λοιμώξεων και επιλογής της αντιμικροβιακής θεραπείας μέσω της αλληλεπίδρασης του κλινικού μικροβιολόγου και του κλινικού γιατρού της ΜΕΘ δεν μπορεί να αποδοθεί. Η αδυναμία ανίχνευσης σημαντικών νοσοκομειακών παθογόνων όπως η *Stenotrophomonas maltophilia* καθιστά αναγκαία την αναζήτηση συμπληρωματικών διαγνωστικών μεθόδων, όπως ανίχνευση ενός ευρέος μικροβιακού στόχου όπως το 16S RNA, για να υποδείξει την παρουσία ενός μη αναγνωρισμένου παθογόνου προκειμένου να εξασφαλιστεί η βέλτιστη φροντίδα του ασθενούς. Ακόμη και αν οι ποσοτικές εκτιμήσεις των δυο μεθόδων δεν είναι απόλυτα συγκρίσιμές (Gene copies/mL, Colony Forming Units/milliliter) απαιτείται περαιτέρω μελέτη και αξιολόγηση της κλινικής σημασίας των συγκεντρώσεων εκείνων που δεν ανιχνεύονται

από την PCR με τις αντίστοιχες 10^4 CFU/ml της καλλιέργειας. Το περιορισμένο φάσμα ανίχνευσης αντοχών της μοριακής μεθόδου και η αδυναμία ανίχνευσης περισσότερο σύνθετων μηχανισμών μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη θεραπευτική επιλογή.

Ενώ στους αρχικούς μας στόχους ήταν και η αναζήτηση φλεγμονωδών βιοδεικτών από την ομάδα σθενών του μοριακού ελέγχου, για τους οποίους διατηρούμε ορό, φιλοδοξούμε σε μια μελλοντική μελέτη την υλοποίηση αυτού του στόχου με πιθανή ένταξη μεγαλύτερου αριθμού ασθενών αναζητώντας και αναλύοντας διαφορετικές παραμέτρους. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι το οικονομικό όφελος από την χρήση της μοριακής μεθόδου δεν έχει αναλυθεί στην παρούσα μελέτη. Σίγουρα αξίζει να αναλυθεί ως ξεχωριστή παράμετρος σε μελέτη κόστους – οφέλους, αναφορικά με το κόστος της μοριακής μεθόδου ως εξέτασης και το οικονομικό όφελος το οποίο προκύπτει με την εφαρμογή της.

Ανατρέχοντας στην βιβλιογραφία αρκετές μελέτες αποδεικνύουν την σημαντική συμβολή μοριακών μεθόδων στην πνευμονία της κοινότητας (CAP) [42-46], της νοσοκομειακής πνευμονίας (HAP) και της πνευμονίας που σχίζεται με τον μηχανικό αερισμό (VAP) [47-50].

Οι μελέτες αυτές υπογραμμίζουν με ακρίβεια τα πολλά οφέλη και τις ισχυρές αλληλεπιδράσεις που απαιτούνται μεταξύ μιας ομάδας κλινικών μικροβιολόγων και ιατρών για την εφαρμογή και ερμηνεία τους σύμφωνα με το κλινικό και επιδημιολογικό πλαίσιο, με στόχο την βέλτιστη έκβαση των ασθενών, την ελαχιστοποίησή της ανάπτυξης αντοχών και τη μείωση του κόστους νοσηλείας. Οι μοριακές συνδρομικές μέθοδοι οι οποίες εντάσσονται στο κλινικό εργαστήριο παρέχουν μια γρήγορη πληροφόρηση του αιτιολογικού παράγοντα της λοίμωξης και της αντοχής στα αντιβιοτικά, με σκοπό να βελτιώσουν τη θεραπεία και την αντιμικροβιακή διαχείριση στις μονάδες εντατικής θεραπείας (ΜΕΘ). Απαραίτητη προϋπόθεση για να γίνει αυτό είναι η επικοινωνία και εμπιστοσύνη μεταξύ των ιατρών του μικροβιολογικού εργαστήριου και της ΜΕΘ σχετικά με τα κριτήρια επιλογής των ασθενών που θα έχουν όφελος από τη δοκιμασία αυτή, με τις δυνατότητες της μοριακής μεθόδου και τους περιορισμούς αυτής και φυσικά τη σωστή αξιολόγηση του αποτελέσματος της

μεθόδου. Επιπλέον το μικροβιολογικό εργαστήριο παρέχοντας τις πληροφορίες αναφορικά με την τοπική επιδημιολογία επιτρέπει έμμεσα την στοχευμένη θεραπευτική προσέγγιση. Φυσικά όλα αυτά μαζί με ένα οργανωμένο πρόγραμμα επιτήρησης αντιβιοτικών θα μπορούσε να έχει σημαντικά οφέλη κυρίως στην ελάττωση της κατανάλωσης αντιβιοτικών, τον περιορισμό της χρήσης τελευταίας γενεάς αντιμικροβιακών και την ελάττωση της τοξικότητας από την ευρεία χρήση αντιμικροβιακών καθώς η ταχεία εξάπλωση ανθεκτικών στελεχών (MDR/XDR/PDR) αποτελεί μια σοβαρή απειλή για τη δημόσια υγεία παγκοσμίως.

Ως εκ τούτου νεότερες καινοτόμες μέθοδοι παροχής ταχείας και έγκυρης μικροβιολογικής διάγνωσης συνδυαστικά με προγράμματα επιτήρησης αποδίδουν σημαντικά οφέλη τόσο για τον ασθενή όσο και για το σύστημα παροχής υγείας. Παλαιότερες [51] αλλά και πρόσφατες μελέτες [52] αναδεικνύουν τη σημασία της έγκαιρης και στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης απειλητικών για τη ζωή λοιμώξεων συμβάλλοντας σημαντικά στη μείωση της θνητότητας. Η εφαρμογή ταχέων διαγνωστικών μεθόδων μέσα στις πρώτες 12 ώρες της λοίμωξης συμβάλει σημαντικά στην καλύτερη έκβαση του ασθενούς ιδιαίτερα σε περιπτώσεις λοιμώξεων από πολυανθεκτικά στελέχη [53]. Είναι σημαντικό να αναλυθεί σε μελλοντικές μελέτες το ποσοστό κατάλληλης αντιβιοτικής αγωγής ιδιαίτερα στις λοιμώξεις από πολυανθεκτικά στελέχη και κατά πόσο η ταχεία μοριακή διάγνωση μπορεί να βελτιώσει την έκβαση των ασθενών.

2.6 Συμπεράσματα

Η καλλιέργεια που διενεργείται στο εργαστήριο κλινικής μικροβιολογίας αποτελεί την μέθοδο εκλογής στην μικροβιολογική διάγνωση και θεραπευτική αντιμετώπιση των σοβαρών βακτηριακών λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος. Η εισαγωγή μοριακών συνδρομικών μεθόδων πρέπει να συγκαταλέγεται στα σημαντικά διαγνωστικά μέσα με σκοπό την ταχεία και έγκυρη μικροβιολογική διάγνωση βακτηρίων, άτυπων βακτηρίων και ιών καθώς και της στοχευμένης θεραπευτικής αντιμετώπισης. Η μελέτη μας παρουσίασε την συμβολή της πολυπλεκτικής μοριακής

μεθόδου Film Array multiplex PCR system ως ένα χρήσιμο μέσο στην διαχείριση των λοιμώξεων του κατώτερου αναπνευστικού συστήματος στην Μονάδα Εντατικής Θεραπείας του Πανεπιστημιακού Νοσοκομείου Ηρακλείου. Σίγουρα απαιτούνται περαιτέρω μελέτες αξιολόγησης της εφαρμογής αυτών των μεθόδων διάγνωσης στην πραγματική κλινική πράξη (real life experience) για να κατανοηθεί το συνολικό όφελος το οποίο δεν περιορίζεται μόνο στην βέλτιστη διαχείριση των λοιμώξεων αλλά επηρεάζει σημαντικά και το συνολικό κόστος νοσηλείας.

2.7 Βιβλιογραφία

[1] Nasia Safdar, Cameron Dezfulian, Harold R Collard, Sanjay Saint. Clinical and economic consequences of ventilator-associated pneumonia: a systematic review.CritCareMed33(10):218493.doi:10.1097/01.ccm.0000181731.53912.d9

[2] Luo et al. The effect of ventilator-associated pneumonia on the prognosis of intensive care unit patients within 90 days and 180days.BMC Infectious Diseases21:684 https://doi.org/10.1186/s12879-021-06383-2

[3] Ventilator-Associated Event (VAE) National healthcare safety network. January 2023

[4] Elisabetta Gerace, Giuseppe Mancuso, Angelina Midiri, Stefano Poidomani, Sebastiana Zummo, Carmelo Biondo. Recent Advances in the Use of Molecular Methods for the Diagnosis of Bacterial Infections.Pathogens.2022 Jun 8;11(6):663.doi: 10.3390/pathogens11060663

[5] Mitchell M Levy, Laura E Evans, Andrew Rhodes. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. Intensive Care Med. 2018; 44(6):925-928. doi: 10.1007/s00134-018-5085-0

[6] Antoni Torres, Michael S. Niederman, Jean Chastre, Santiago Ewig, Patricia Fernandez-Vandellos, Hakan Hanberger, Marin Kollef, Gianluigi Li Bassi, Carlos M. Luna, Ignacio Martin-Loeches, J. Artur Paiva, Robert C. Read, David Rigau, Jean François Timsit, Tobias Welte, Richard Wunderink . International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT European Respiratory Journal 2017 50: 1700582; DOI: 10.1183/13993003.00582-201

[7] Manuel Iregui, Suzanne Ward, Glenda Sherman, Victoria J Fraser, Marin H Kollef. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for

ventilator - associated pneumonia. Chest 2002;122 (1) :262-8. doi:10.1378/chest.122.1.262.

[8] Pieter O Depuydt, Dominique M Vandijck, Maarten A Bekaert, Johan M Decruyenaere, Stijn I Blot, Dirk P Vogelaers & Dominique D Benoit. Determinants and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. CritCare.2008;12(6): R142doi:10.1186/cc7119

[9] Constantinos Tsioutis ,Evangelos I Kritsotakis, Spyridon A Karageorgos , Soultana Stratakou, Charalambos Psarologakis , Sofia Kokkini , Achilleas Gikas. Clinical epidemiology, treatment and prognostic factors of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator - associated pneumonia in critically illpatients. Int J Antimicrob Agents. 2016Nov;48(5):492497. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.07.007

[10] Shio-Shin Jean, Dorji Harnod, Po-Ren Hsueh. Global Threat of Carbapenem-Resistant Gram-Negative Bacteria. Front Cell Infect Microbiol. 2022 Mar 15;12:823684. doi:10.3389/fcimb.2022.823684

[11] Yohei Doi. Treatment Options for Carbapenem-resistant Gram-negative Bacterial Infections. Clinical Infectious Diseases, Volume 69, Issue Supplement_7, 2019, Pages S565–S575, https://doi.org/10.1093/cid/ciz830

[12] Luyt, CE., Hékimian, G., Bonnet, I. et al. Usefulness of point-of-care multiplex PCR to rapidly identify pathogens responsible for ventilator-associated pneumonia and their resistance to antibiotics: an observational study. Crit Care 24, 378 (2020). https://doi.org/10.1186/s13054-020-03102-2

[13] Ephraim L Tsalik , Robert A Bonomo , Vance G Fowler Jr. New Molecular Diagnostic Approaches to Bacterial Infections and Antibacterial Resistance. Annu Rev Med2018 Jan 29; 69:379-394.doi: 10.1146/annurev-med-052716-030320

[14] Lisa E Dumkow , Lacy J Worden , Sonia N Rao .Syndromic diagnostic testing: a new way to approach patient care in the treatment of infectious diseases.J AntimicrobChemother.2021Sep23;76(Suppl3):iii4iii11.doi:10.1093/jac/dkab245

[15] Jason L Cantera, Heather White , Maureen H Diaz , Shivani G Beall , Jonas M Winchell , Lorraine Lillis , Michael Kalnoky , James Gallarda , David S Boyle . Assessment of eight nucleic acid amplification technologies for potential use to detect

infectious agents in lower source settings.PLoSOne.2019;14(4):e0215756. doi:10.1371/journal.pone.0215756

[16] Zhu H., Zhang H., Xu Y., Lassakova S., Korabecna M., Neuzil P. PCR past, present and future. BioTechniques. 2020;69:317–325.doi:10.2144/btn-2020-0057

[17] Antti Vasala, Vesa P Hytönen, Olli H Laitinen. Modern Tools for Rapid Diagnostics of Antimicrobial Resistance. Front CellInfect Microbiol.2020Jul15;10:308. doi:10.3389/fcimb.2020.00308

[18] Noa Wolff, Michaela Hendling , Fabian Schroeder , Silvia Schönthaler , Andreas F. Geiss ,Branka Bedenic & Ivan Barišić. Full pathogen characterization: species identification including the detection of virulence factors and antibiotic resistance genes via multiplex DNA-assays.Sci. Rep. 2021; 11: 6001. doi: 10.1038/s41598-021-85438-5

[19] Obande G.A., Banga Singh K.K. Current and Future Perspectives on Isothermal Nucleic Acid Amplification Technologies for Diagnosing Infections. Infect Drug Resist. 2020; 13: 455–483.doi: 10.2147/IDR.S217571

[20] Huanzhu Chen , Huilan Weng , Meirui Lin , Ping He , Yazhen Li , Qingdong Xie , Changwen Ke , Xiaoyang Jiao . The Clinical Significance of FilmArray Respiratory Panel in Diagnosing Community-Acquired Pneumonia. Biomed Res Int.Volume2017ArticleID7320859https://doi.org/10.1155/2017/7320859

[21] In Young Yoo , Kyungmin Huh , Hyang Jin Shim , Sun Ae Yun , Yoo Na Chung , On Kyun Kang , Hee Jae Huh , Nam Yong Lee. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for rapid detection of respiratory bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in sputum and endotracheal aspirate specimens. Int J Infect Dis. 2020 Jun;95:326-331.doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.024

[22] Kosai et al. BioFire FilmArray Pneumonia Panel enhances detection of pathogens and antimicrobial resistance in lower respiratory tract specimens. Ann Clin Microbiol Antimicrob (2022) 21:24https://doi.org/10.1186/s12941-022-00512-8

[23] Urania Rappo, Audrey N Schuetz, Stephen G Jenkins, David P Calfee, Thomas J Walsh, Martin T Wells, James P Hollenberg, Marshall J Glesby. Impact of Early Detection of Respiratory Viruses by Multiplex PCR Assay on Clinical Outcomes in

Adult Patients. J Clin Microbiol. 2016 Aug;54(8):2096-103. doi: 10.1128/JCM.00549-16

[24] Karri A Bauer , Katherine K Perez , Graeme N Forrest , Debra A Goff. Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs. Clin Infect Dis. 2014 Oct 15;59 Suppl 3: S134-45. doi: 10.1093/cid/ciu547

[25] Guillotin, F, Poulain, C, Gaborit, B, Bouras M, Cinotti R et al. Potential Impact of Rapid Multiplex PCR on Antimicrobial Therapy Guidance for Ventilated Hospital-Acquired Pneumonia in Critically Ill Patients,A Prospective Observational Clinical and Economic Study. Front. Cell. Infect. Microbiol .https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.804611

[26] Jenna Adams, Kaitlin Ferguson , RaeAnn Hirschy , Erica Konopka , Jordan Meckel, Grace Benanti ,Shannon Kuhrau , Fritzie Albarillo , Kevin Chang , Maressa Santarossa , Julia Sapozhnikov ,Brian Hoff , Megan A Rech. Antimicrobial Stewardship Techniques for Critically Ill Patients with Pneumonia. Antibiotics 2023, 12(2),295 https://doi.org/10.3390/antibiotics12020295

[27] Neelja Singhal , Manish Kumar , Pawan K. Kanaujia ,Jugsharan S. Vird. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol. 6:791. doi:10.3389/fmicb.2015.00791

[28] Eun-Jeong Yoon ,Seok Hoon Jeong. MALDI-TOF Mass Spectrometry Technology as a Tool for the Rapid Diagnosis of Antimicrobial Resistance in Bacteria.Antibiotics2021,10(8),982;https://doi.org/10.3390/antibiotics10080982

[29] Florio W, Baldeschi L, Rizzato C,Tavanti A, Ghelardi E and Lupetti A. Detection of Antibiotic-Resistance by MALDI-TOF Mass Spectrometry: An Expanding Area. Front. Cell. Infect. Microbiol.10:572909.doi: 10.3389/fcimb.2020.572909

[30] Weis, C., Cuénod, A., Rieck, B. et al. Direct antimicrobial resistance prediction from clinical MALDI-TOF mass spectra using machine learning. Nat Med 28, 164–174 (2022). https://doi.org/10.1038/s41591-021-01619-9

[31] Michael S. Niederman, Antoni Torres. Severe community-acquired pneumonia. European Respiratory Review 2022 31: 220123; DOI: 10.1183/16000617.0123-2022

[32] Andre C Kalil , Mark L Metersky , Michael Klompas , John Muscedere , Daniel A Sweeney , Lucy B Palmer et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clinical Infectious Diseases, Volume 63, Issue 5, 1 September 2016, https://doi.org/10.1093/cid/ciw353

[33] American Thoracic Society, Infectious Diseases Society of America. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Feb 15;171(4):388-416. doi: 10.1164/rccm.200405-644ST

[34] Murray & Nadel's .Textbook of Respiratory Medicine edited by V.Courtney Broaddus, Joel D Ernst, Talmadge E King, Jr, Stephen C. Lazarus, Kathleen F. Sarmiento, Lynn M. Schnapp, Renee D Stapleton, Michael B. Gotway.

[35] Sheldon Campbell , Betty A. Forbes. The Clinical Microbiology Laboratory in the Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. J Clin Microbiol. 2011 Sep; 49(9 Suppl): S30–S33. doi: 10.1128/JCM.00789-11

[36] Atul Ashok Kalanuria, Wendy Zai,Marek Mirski. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. Crit Care. 2014; 18(2): 208. doi: 10.1186/cc13775

[37] Thomas K. W. Ling, P. C. Tam, Z. K. Liu, Augustine F. B. Cheng. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System against Gram-Negative Clinical Isolates. Journal of Clinical Microbiology.DOI: https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2964-2966.2001

[38] Guido Funke, Dominique Monnet, Chiara de Bernardis, Alexander von Graevenitz, Jean Freney. Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Medically Relevant Gram-Negative Rods. J Clin Microbiol. 1998 Jul; 36(7): 1948–1952.doi: 10.1128/jcm.36.7.1948-1952.1998

[39] Caitlin N. Murphy, Randal Fowler, Joan Miquel Balada-Llasat, Amanda Carroll, Hanna Stone, Oluseun Akerele, Blake Buchan. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for Detection and Quantification of Agents of Lower Respiratory Tract Infection. J Clin Microbiol. 2020 Jun 24;58(7): e00128-20. doi: 10.1128/JCM.00128-20

[40] Alicia Edin, Hinnerk Eilers, Annika Allard. Evaluation of the Biofire Filmarray Pneumonia panel plus for lower respiratory tract infections. Infectious Diseases. https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1755053

[41] Y A Hekster, T B Vree, R J Goris, J B Boerema. The defined daily dose per 100 bed-days as a unit of comparison and a parameter for studying antimicrobial drug use in a university hospital. A retrospective study of the effects of guidelines and audit on antimicrobial drug use. J Clin Hosp Pharm. 1982 Dec;7(4):251-60. doi: 10.1111/j.1365-2710.1982.tb01030.x

[42] Niclas Johansson, Mats Kalin, Annika Tiveljung-Lindell, Christian G Giske, Jonas Hedlund. Etiology of community-acquired pneumonia: increased microbiological yield with new diagnostic methods. Clin Infect Dis. 2010 Jan 15;50(2):202-9. doi: 10.1086/648678

[43] Solen Kerneis, Benoit Visseaux, Laurence Armand-Lefevre, Jean-François Timsit. Molecular diagnostic methods for pneumonia: how can they be applied in practice? Curr Opin Infect Dis. 2021 Apr 1;34(2):118-125. doi:10.1097/QCO.0000000000000713

[44] Antoni Torres, Nelson Lee, Catia Cilloniz, Jordi Vila, Menno Van der Eerden. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. Eur Respir J. 2016 Dec;48(6):1764-1778. doi: 10.1183/13993003.01144-2016

[45] Kate E. Templeton, Sitha A. Scheltinga, Willian C. J. F. M. van den Eeden, Willy A. Graffelman,Peterhans J. van den Broek, Eric C. J. Claas. Improved Diagnosis of the Etiology of Community-Acquired Pneumonia with Real-Time Polymerase Chain Reaction. Clin Infect Dis. 2005 Aug 1; 41(3): 345–351.doi: 10.1086/431588

[46] Douglas, Ivor S. New diagnostic methods for pneumonia in the ICU. Current Opinion in Infectious Diseases 29(2): p197-204, April 2016. | DOI:10.1097/QCO.0000000000000249

[47] Ivor S Douglas. Pulmonary infections in critical/intensive care - rapid diagnosis and optimizing antimicrobial usage. Current Opinion in Pulmonary Medicine 23(3): p198-203.DOI:10.1097/MCP.0000000000000366

[48] Juliet High, Virve I Enne, Julie A Barber, David Brealey, David A Turner, Robert Horne, Mark Peters, Zaneeta Dhesi, Adam P Wagner, Alyssa M Pandolfo, Sue

Stirling, Charlotte Russell, Justin O'Grady, Ann Marie Swart, Vanya Gant, David M Livermore INHALE Study Group. INHALE: the impact of using FilmArray Pneumonia Panel molecular diagnostics for hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia on antimicrobial stewardship and patient outcomes in UK Critical Care-study protocol for a multicentre randomised controlled trial. Trials. 2021 Oct 7;22(1):680. doi: 10.1186/s13063-021-05618-6

[49] Stephen Poole, Alex R Tanner, Vasanth V Naidu, AhilanandanDushianthan, Helen Moyses, Tristan W Clark et al. Molecular point-of-care testing for lower respiratory tract pathogens improves safe antibiotic de-escalation in patients with pneumonia in the ICU: Results of a randomised controlled trial. Journal of Infection Volume 85, Issue 6, December 2022, Pages 625-633. DOI:https://doi.org/10.1016/j.jinf.2022.09.003

[50] Anupop Jitmuang, Soravit Puttinad, Sivaporn Hemvimol Siri Pansasiri, Navin Horthongkham. A multiplex pneumonia panel for diagnosis of hospital-acquired and ventilator-associated pneumonia in the era of emerging antimicrobial resistance. Front. Cell. Infect. Microbiol., Volume 12 - 2022 | https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.977320

[51] Anand Kumar et.al. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock Crit Care Med. 2006 Jun;34(6):1589-96. doi: 10.1097/01.CCM.0000217961.75225.E9

[52] Christopher W Seymour, Foster Gesten, Hallie C Prescott et.al**.** Time to Treatment and Mortality during Mandated Emergency Care for Sepsis N Engl J Med 2017 Jun 8;376(23):2235-2244. doi: 10.1056/NEJMoa1703058. Epub 2017 May 21

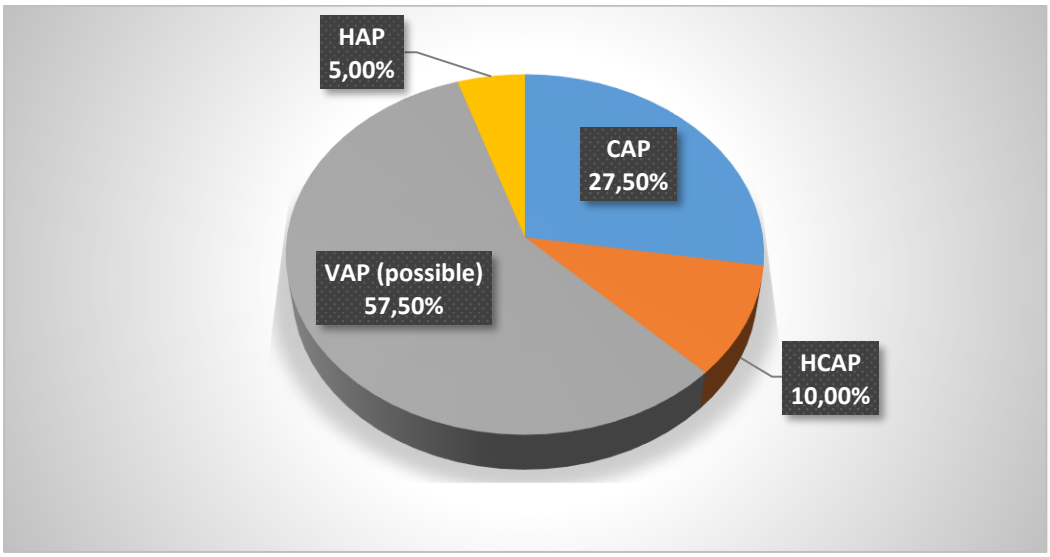
[53] Tetsu Ohnuma, Shingo Chihara, Blair Costin, et al. Association of Appropriate Empirical Antimicrobial Therapy With In-Hospital Mortality in Patients With Bloodstream Infections in the US. JAMA Netw Open. 2023;6(1):e2249353. doi:10.1001/jamanetworkopen.2022.49353

3. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

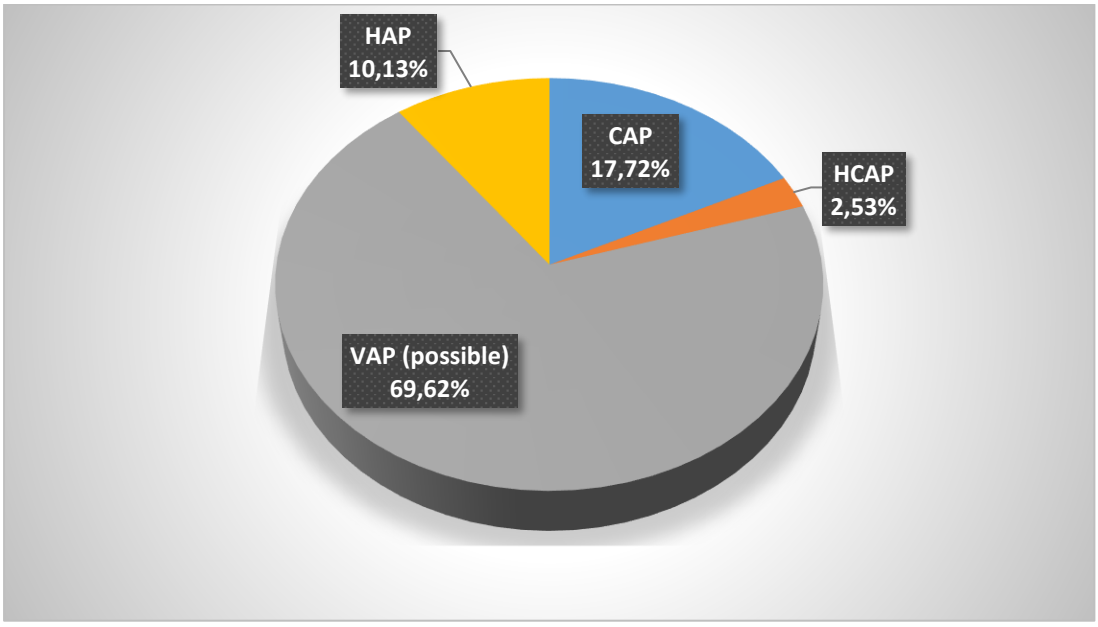
ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικ.1,2 Types of LRTI at **Control** and **PCR group**. Ventilator associated pneumonia comprise almost 2/3 of cases in both study groups.

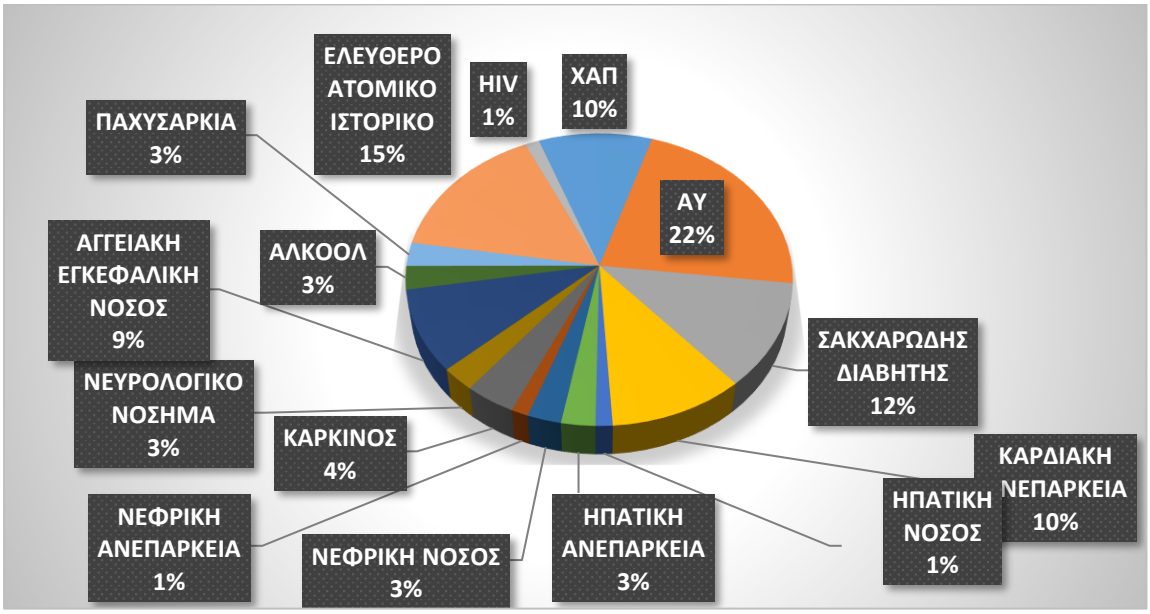
Control group



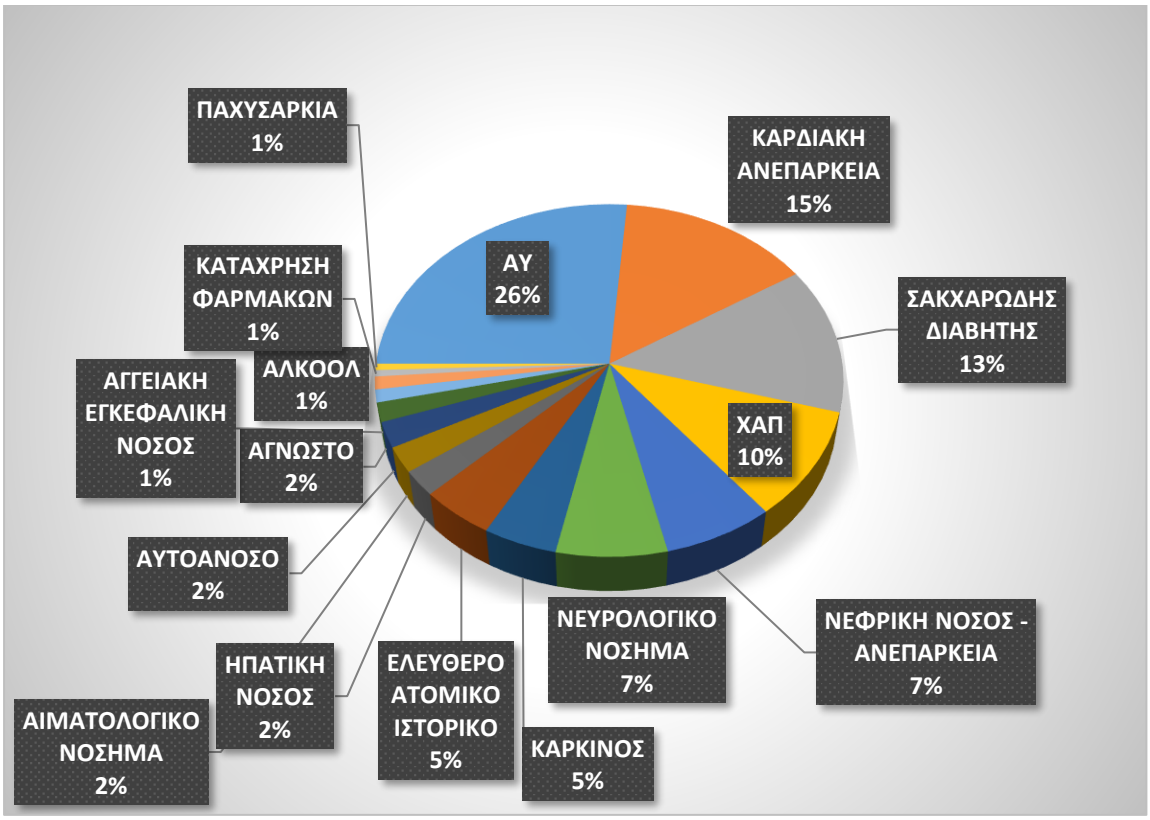
PCR group



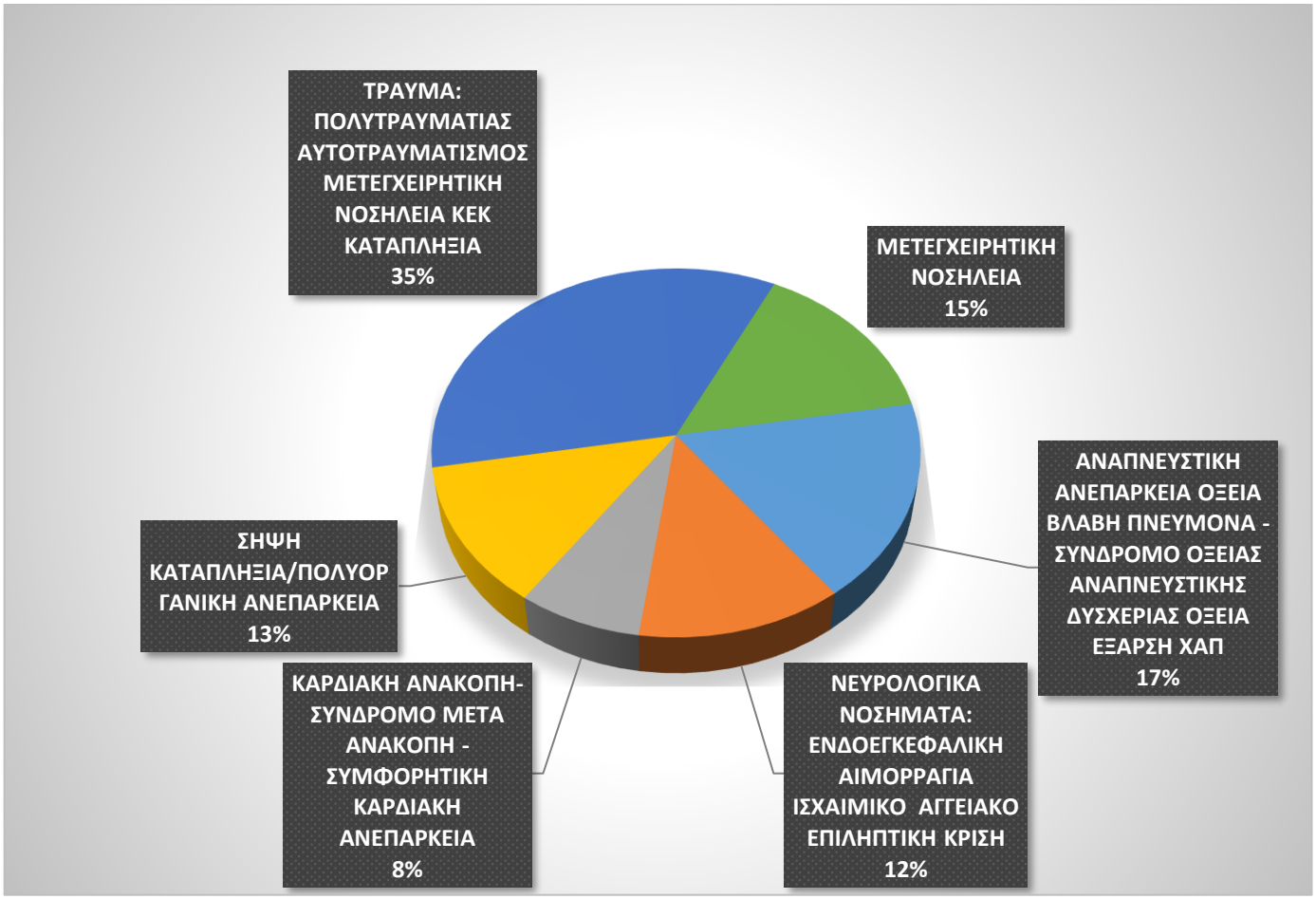
Εικ.3. Underlying diseases of Control group.



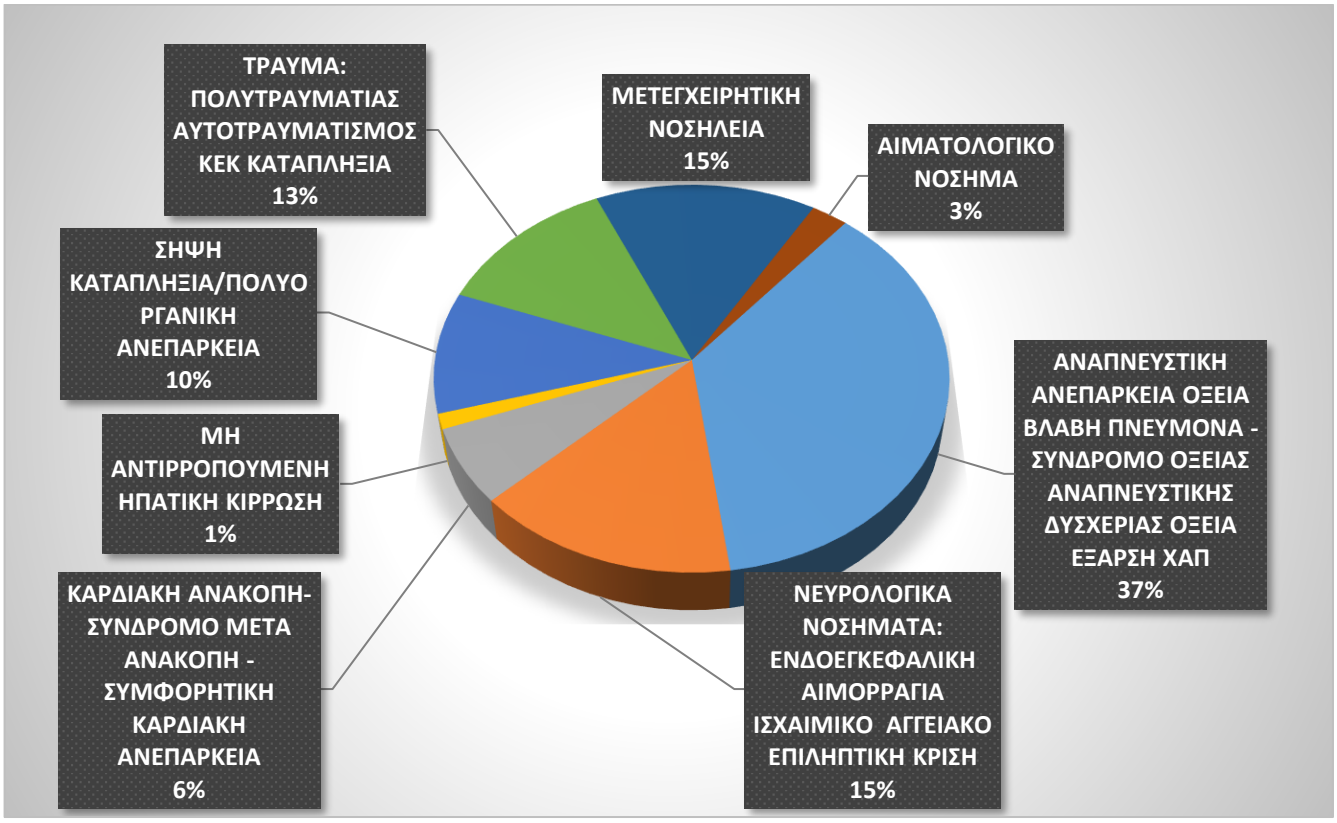
Εικ.4 Underlying diseases of PCR group.



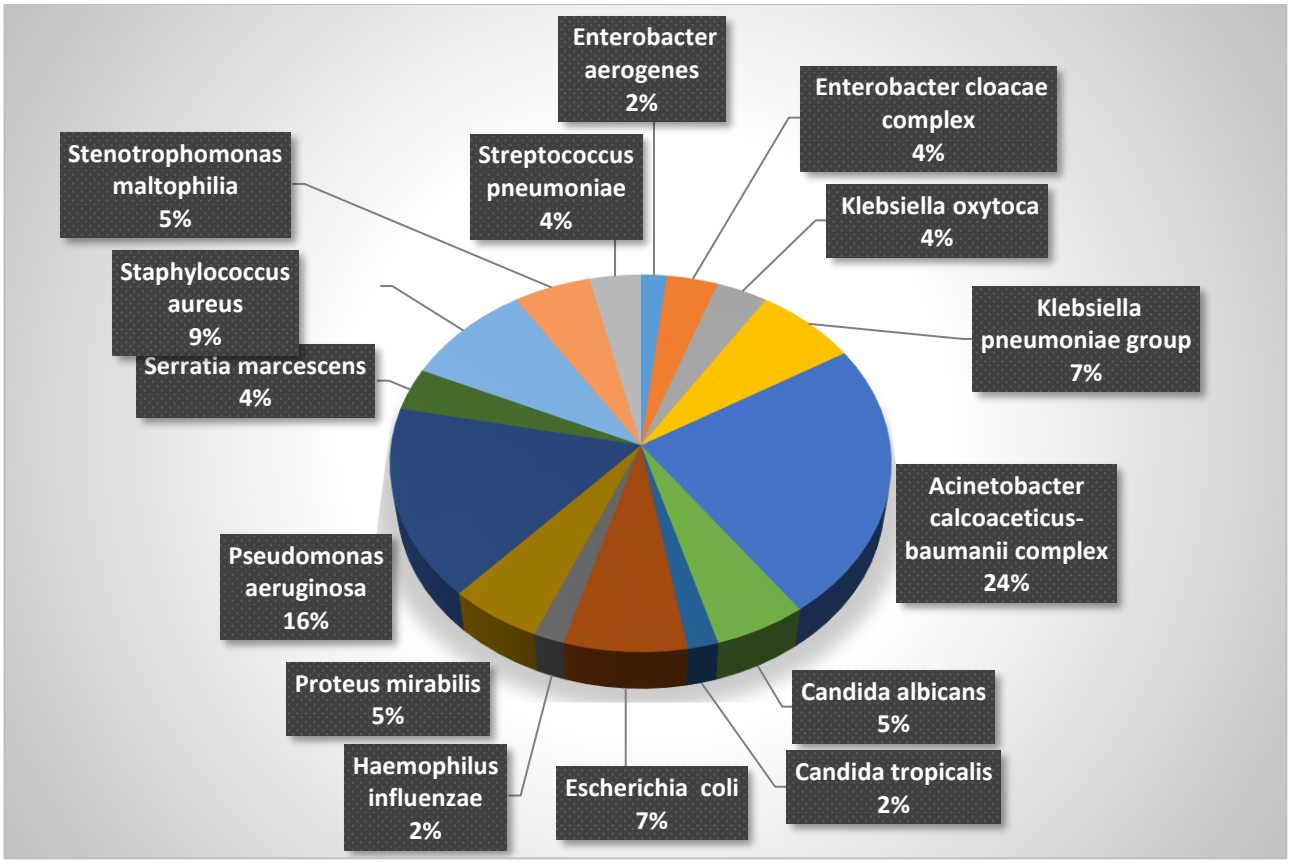
Εικ.5 Cause of Admission at Control group.



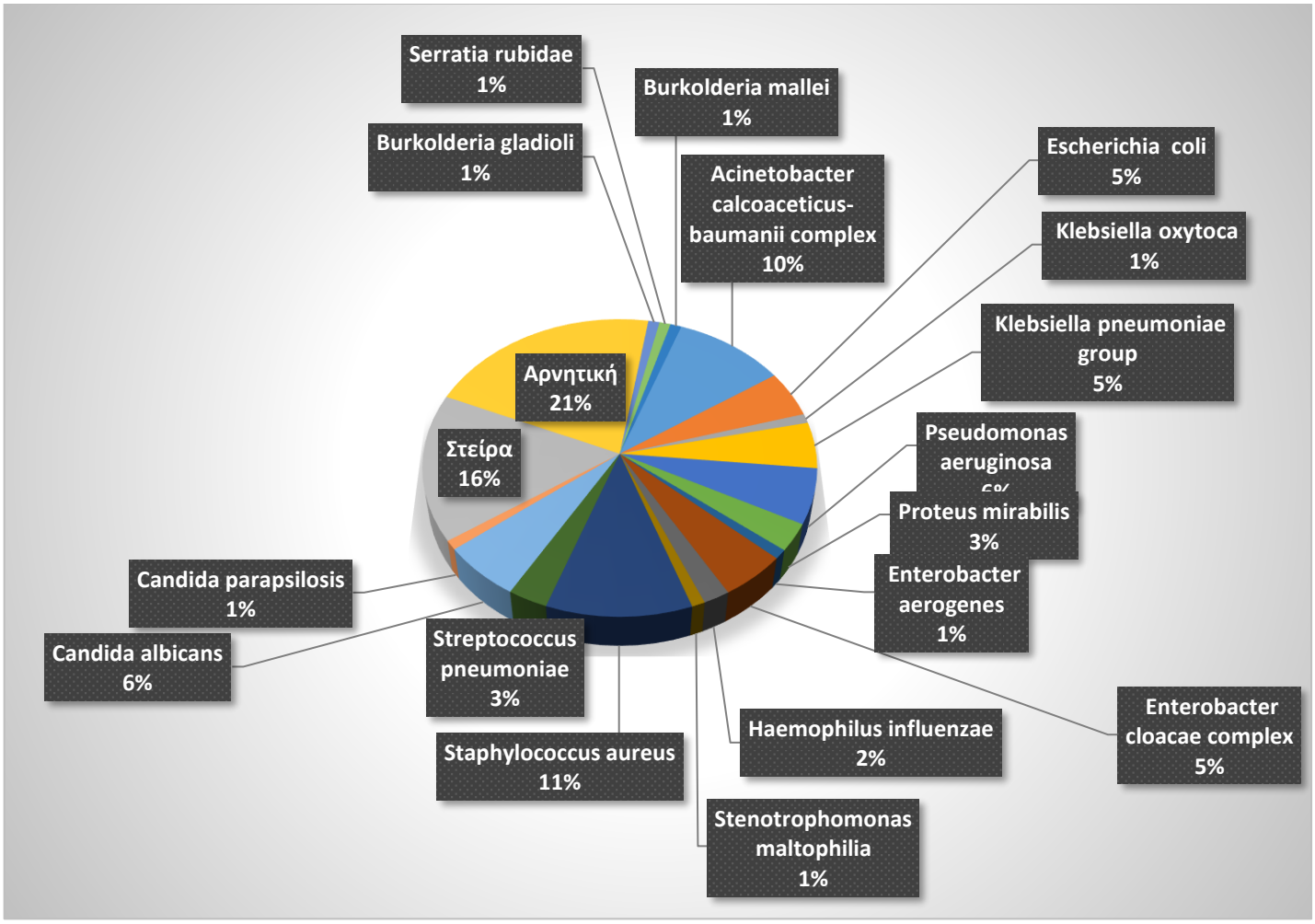
Εικ.6 Cause of Admission at PCR group.



Εικ.7 Control group Bal culture pathogens.



Εικ.8 PCR group Bal culture pathogens.



ΦΟΡΜΑ ΚΑΤΑΓΡΑΦΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΑΣΘΕΝΩΝ ΜΕΘ ΜΕ VAP / ΣΟΒΑΡΗ ΛΟΙΜΩΞΗ ΑΝΑΠΝΕΥΣΤΙΚΟΥ.

ΚΩΔΙΚΟΣ ΑΣΘΕΝΗ……. ΑΡΧΙΚΑ ΑΣΘΕΝΗ…….. ΦΥΛΟ……. ΗΛΙΚΙΑ……

ΗΜΕΡ.ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ…../……/…..... ΗΜΕΡ.ΕΞΟΔΟΥ…../……./……. ΗΜΕΡΕΣ ΜΕΘ…….

ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΕΙΣΟΔΟΥ…….

APACHE score…… SOFA score……

ΑΤΟΜΙΚΟ ΑΝΑΜΝΗΣΤΙΚΟ

ΣΥΝΝΟΣΗΡΟΤΗΤΑ:

☐ ΧΑΠ	☐ ΣΑΚΧΑΡΩΔΗΣ ΔΙΑΒΗΤΗΣ	☐ ΚΑΡΔΙΑΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	☐ ΕΜΦΡΑΓΜΑ ΜΥΟΚΑΡΔΙΟΥ	☐ ΗΠΑΤΙΚΗ ΝΟΣΟΣ
☐ ΗΠΑΤΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	☐ ΝΕΦΡΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	☐ ΝΕΦΡΙΚΗ ΑΝΕΠΑΡΚΕΙΑ	☐ ΟΞΕΙΑ ΛΕΥΧΑΙΜΙΑ	☐ ΑΙΜΑΤΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ
☐ ΚΑΡΚΙΝΟΣ	☐ ΝΕΥΡΟΛΟΓΙΚΟ ΝΟΣΗΜΑ	☐ ΑΓΓΕΙΑΚΗ ΕΓΚΕΦΑΛΙΚΗ ΝΟΣΟΣ	☐ ΚΑΤΑΧΡΗΣΗ ΦΑΡΜΑΚΩΝ	☐ ΚΑΤΑΧΡΗΣΗ ΑΛΚΟΟΛ

CAP ☐ HCAP ☐ VAP (possible ☐ documented☐

ΚΟΡΤΙΚΟΣΤΕΡΟΕΙΔΗ ☐ ΑΝΟΣΟΚΑΤΑΣΤΑΛΤΙΚΑ ☐

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΚΛΙΝΙΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΛΟΙΜΩΞΗΣ - (ΗΜΕΡΑ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ)

……/……../…… (……)

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ: ΟΧΙ ☐ ΝΑΙ ☐ (ΠΡΟΦΥΛΑΚΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ, ΛΟΙΜΩΞΗ,

ΠΥΡΕΤΟΣ ΑΓΝΩΣΤΟΥ ΑΙΤΙΟΛΟΓΙΑΣ)

ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (cfu/ml)	ΑΝΤΟΧΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ (Hr)
1)				
2)				

ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΛΟΙΜΩΞΗΣ:

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ Bin (copies/mL)	ΑΝΤΟΧΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ (Hr)
1)				
2)				
3)				

ΒΑΚΤΗΡΙΑΙΜΙΑ : ΝΑΙ ☐ ΟΧΙ ☐

ΑΛΛΗ ΛΟΙΜΩΞΗ: ΝΑΙ ☐ ΟΧΙ ☐

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	ΠΑΘΟΓΟΝΟ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (cfu/ml)	ΑΝΤΟΧΗ	ΧΡΟΝΟΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ (Hr)
1)				
2)				

ΘΕΡΑΠΕΙΑ:

ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΗ ΑΓΩΓΗ	ΔΟΣΟΛΟΓΙΑ	ΔΙΑΡΚΕΙΑ
1)		
2)		
3)		

ΕΚΒΑΣΗ ΝΟΣΗΛΕΙΑΣ:

☐ ΙΑΣΗ ☐ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ☐ΣΤΑΣΙΜΟΤΗΤΑ ☐ ΕΠΙΔΕΙΝΩΣΗ

☐ ΔΙΑΚΟΜΙΔΗ ΠΡΟΣ ☐ΘΑΝΑΤΟΣ

ΠΑΡΑΠΕΜΠΤΙΚΟ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΑΓΝΩΣΗΣ ΠΝΕΥΜΟΝΙΑΣ ΣΕ ΑΣΘΕΝΕΙΣ ΤΗΣ ΜΕΘ (VAP severe /CAP)

Υπεύθυνος επικοινωνίας: Δηήμητρα Σταφυλάκη (τηλ.)

Αποστολή δείγματος τραχειακού εκκρίματος στο Εργαστήριο Μικροβιολογίας του ΠΑΓΝΗ (καθημερινά, 08:00 – 20:00)

Γενικές πληροφορίες ασθενή:

ΟΝΟΜΑ:	ΕΠΩΝΥΜΟ:	ΗΛΙΚΙΑ:
AM amed:	Critis Ep. ID:	Ημερομηνία:

Κριτήρια Εισαγωγής: Σοβαρή Πνευμονία με αναγκη νοσηλείας σε ΜΕΘ ή Κλινική υποψία VAP (εφόσον πληρούνται όλα τα παρακάτω κριτήρια 1+2+3)

		ΝΑΙ	ΟΧΙ
1	Υπάρχει ισχυρή υποψία VAP και απουσία άλλης εμφανούς εστίας		
2	1. Πυρετός > 38°C ή 2. WBC > 12000/mm^3 ή < 4000/mm^3		
3	1. Αύξηση ή αλλαγή εκκρίσεων ή 2. Επιδείνωση στην ανταλλαγή αερίων		

Επιπλέον κλινικές πληροφορίες:

Μέρες νοσηλείας σε ΜΕΘ	
Μέρες σε μηχανικό αερισμό	
Τρέχον αντιβιοτικό σχήμα	
Νέο εμπειρικό σχήμα	
Νέο τελικό σχήμα	

ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΤΟΥ ΑΣΘΕΝΗ ΝΑ ΣΥΝΟΔΕΥΕΤΑΙ ΜΕ ΕΝΑ ΚΟΚΚΙΝΟ ΦΙΑΛΙΔΙΟ ΑΙΜΑΤΟΣ

Ο Θεράπων Ιατρός

ΕΝΤΥΠΟ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΟΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

FilmArray
LRTI Panel - IUO

BIOFIRE
A BIOMÉRIEUX COMPANY
www.BioFireDx.com

Run Information

Sample ID:	73252	**Run Date:**	26 Jul 2018 8:46 AM
Pouch:	LRTI Panel v2.0	**Controls:**	Passed
Run Status:	Completed	**Protocol:**	BAL v3.3
Serial No.:	14395318	**Operator:**	123 123 (123)
Lot No.:	892118	**Instrument:**	2FA05657

Result Summary

Bacteria

		Bin (copies/mL)		Bin (copies/mL)			
				10^4	10^5	10^6	≥10^7
✓	Detected	≥10^7	*Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex				
	Not Detected		*Enterobacter aerogenes*				
	Not Detected		*Enterobacter cloacae* complex				
	Not Detected		*Escherichia coli*				
	Not Detected		*Haemophilus influenzae*				
✓	Detected	10^5	*Klebsiella oxytoca*				
	Not Detected		*Klebsiella pneumoniae* group				
	Not Detected		*Moraxella catarrhalis*				
	Not Detected		*Proteus* spp.				
	Not Detected		*Pseudomonas aeruginosa*				
	Not Detected		*Serratia marcescens*				
✓	Detected	≥10^7	*Staphylococcus aureus*				
	Not Detected		*Streptococcus agalactiae*				
	Not Detected		*Streptococcus pneumoniae*				
	Not Detected		*Streptococcus pyogenes*				

Antimicrobial Resistance Genes

	Not Detected	CTX-M
	Not Detected	IMP
	Not Detected	KPC
✓	Detected	*mecA/C* and MREJ
	Not Detected	NDM
	Not Detected	OXA-48-like
	Not Detected	VIM

⚠ **Note:** Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for the FilmArray antimicrobial resistance gene assays does not indicate antimicrobial susceptibility to the resistance drug class. Culture is required for species identification and susceptibility testing of isolates.

Atypical Bacteria

Not Detected	*Chlamydia pneumoniae*
Not Detected	*Legionella pneumophila*
Not Detected	*Mycoplasma pneumoniae*

Viruses

Not Detected	Adenovirus
Not Detected	Coronavirus
Not Detected	Human Metapneumovirus
Not Detected	Human Rhinovirus/Enterovirus
Not Detected	Influenza A
Not Detected	Influenza B
Not Detected	Parainfluenza Virus
Not Detected	Respiratory Syncytial Virus

<u>ΑΠΟΦΑΣΗ</u>

ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ ΗΘΙΚΗΣ ΚΑΙ ΔΕΟΝΤΟΛΟΓΙΑΣ ΤΗΣ ΕΡΕΥΝΑΣ (Ε.Η.Δ.Ε.) ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΚΡΗΤΗΣ

ΓΙΑ

ΕΓΚΡΙΣΗ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΟΥ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ

Αριθμός Πρωτοκόλλου Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας (Ε.Η.Δ.Ε.)
158/16.07.2020
Αριθμός& Ημερομηνία Απόφασης Επιτροπής Ηθικής και Δεοντολογίας της Έρευνας (Ε.Η.Δ.Ε.)
158/03.08.2020

4. ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

31th ECCMID - VIENNA, AUSTRIA 9-12 JULY 2021 (e-poster)

- ***"Impact of molecular syndromic diagnosis in the management of pneumonia in the ICU of a University Hospital in Greece"*** *Abstract ID 01949.*

31st ECCMID Online 9 – 12 July 2021

ESCMID EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Impact of molecular syndromic diagnosis in the management of pneumonia in the intensive care unit (ICU) of a university hospital in Greece

D. STAFYLAKI[1] University Hospital of Heraklion – Heraklion (Greece), S. MARAKI[1], K. VAPORIDI[1], D. GEORGOPOULOS[1], D.P. KOFTERIDIS[1], G. HAMILOS[1]

www.pagni.gr Πα.Γ.Ν.Η.

PURPOSE / OBJECTIVES

The impact of targeted molecular diagnosis in the management of nosocomial infections caused by MDR pathogens has been incompletely characterized. We evaluated the performance of a molecular syndromic platform such as Multiplex PCR (Biofire FilmArray - Pneumonia plus Panel) in diagnosis and management of pneumonia in the ICU.

MATERIAL & METHODS

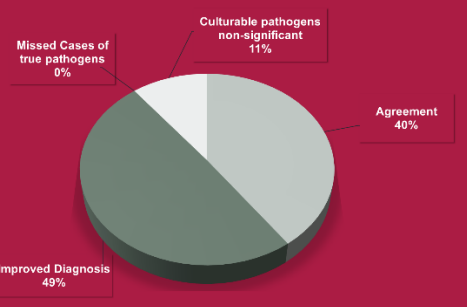
We implemented a protocol of molecular syndromic diagnosis of pneumonia in consecutive patients in the ICU of a University Hospital over a two years period, which included evaluation by an expert microbiologist and an algorithm for guidance on antimicrobial therapy. ICU patients with diagnosis of pneumonia the year before initiation of the study (n = 40) served as control group.

RESULTS

We enrolled 63 and 16 patients with VAP with CA-PNA, respectively. These included XDR (n = 10) bacteria, such as *Acinetobacter spp* (n = 10) and *Klebsiella pneumoniae* KPC (n = 1). We found an excellent agreement (89.4% 76/85 cases) of molecular diagnosis with tracheal aspirate cultures. There was a significant decrease in the average time to diagnosis of syndromic test as compared to culture result (3.5h vs 85h).

Implementation of a syndromic Biofire FilmArray-Pneumonia plus Panel in ICU patients with VAP or severe CA-PNA resulted in a significant decrease on time to diagnosis, provided new microbiological information and resulted in a significant reduction in antibiotic consumption.

PCR vs CULTURE



RESULTS

Furthermore, in 49% of the cases of pneumonia, PCR identified new pathogens not detected by conventional cultures such as *S. aureus* 15%, *Acinetobacter spp* 13%, *Haemophilus influenzae* 13%, *Legionella spp* 4% and 16% respiratory viral pathogens. In 2 cases of pneumonia the causative pathogen was not included in the panel such as *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1) and *Serratia rubidaea* (n=1). Importantly, there was a significant reduction in antibiotic use during the study period as compared to the historical control group presented in Fig.1.

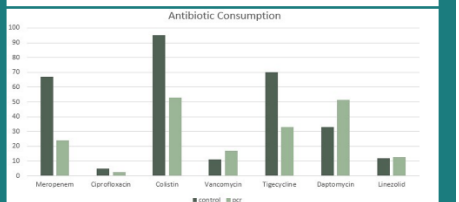


Fig.1: Antibiotic consumption (DDDs/100BedDays) for the control and PCR group indicate a significant decrease in specific classes of antibiotics such as Meropenem (64%), Ciprofloxacin (46%), Colistin (44%) and Tigecycline (53%).

SUMMARY / CONCLUSION

In the setting of ICUs with a broad spectrum of CA- and MDR nosocomial pathogens, implementation of syndromic molecular diagnosis in conjunction with expert opinion improves accuracy in diagnosis of pneumonia and reduces antibiotic consumption.

AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY | Microbiology Spectrum

RESEARCH ARTICLE

Impact of Molecular Syndromic Diagnosis of Severe Pneumonia in the Management of Critically Ill Patients

Dimitra Stafylaki,[a] Sofia Maraki,[a] Katerina Vaporidi,[b] Dimitrios Georgopoulos,[b] Dimitrios P. Kontoyiannis,[d] Diamantis P. Kofteridis,[c] Georgios Chamilos[a]

[a]Department of Clinical Microbiology and Microbial Pathogenesis, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece
[b]ICU Department, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece
[c]Internal Medicine Department, University Hospital of Heraklion, Heraklion, Crete, Greece
[d]Department of Infectious Diseases, The University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA

ABSTRACT The impact of syndromic molecular diagnosis in the management of nosocomial infections caused by multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) pathogens has been incompletely characterized. We evaluated the performance of a molecular syndromic platform (BioFire FilmArray-Pneumonia plus Panel) in patients with pneumonia in the intensive care unit (ICU) of a University Hospital in Greece over a 2-year period. We evaluated 79 consecutive patients diagnosed with pneumonia in the ICU (2018–2020), including 55 patients with ventilator associated pneumonia (VAP). We included 40 control patients diagnosed with pneumonia in the ICU the year before the study (2017–2018). We identified 16 cases of VAP due to XDR bacterial pathogens. We found an excellent agreement (89.4% 76/85 reported results) between the results of syndromic platform and conventional cultures of tracheal aspirates. The molecular syndromic test significantly improved time to diagnosis versus conventional culture (3.5 h vs 72 h, P , 0.0001), and identified new pathogens not detected by cultures in 49% of the cases. However, three cases of pneumonia with targets not included in the molecular platform, were not detected. Implementation of the molecular syndromic facilitated treatment modification from broad to narrow spectrum antimicrobial therapy, resulting in significant reductions in antibiotic consumption in the study group compared to the control group, without a negative impact in patient outcome. The implementation of syndromic molecular diagnosis in critically ill patients with pneumonia is associated with timely and improved diagnosis and has significant impact on reduction of antibiotic consumption.

IMPORTANCE The impact of syndromic molecular diagnosis in the management of nosocomial infections caused by MDR/XDR pathogens has been incompletely characterized. We evaluated the performance of a molecular syndromic platform (BioFire FilmArray -Pneumonia plus Panel) in 79 patients with pneumonia in the intensive care unit (ICU) of a University Hospital in Greece over a 2-year period (2018–2020) compared to 40 control patients diagnosed with pneumonia in the ICU the year before the study (2017–2018). Importantly, implementation of syndromic pneumonia panel improved time to diagnosis, identified new pathogens not detected by cultures in 49% of the cases and resulted in a significant reduction in antibiotic consumption compared to the year before initiation of the study without a negative impact in mortality of patients. Collectively, our study demonstrates the positive value of PCR syndromic testing in the management of pneumonia in ICUs high rates of MDR/XDR nosocomial pathogens.

KEYWORDS ICU, severe CAP, syndromic testing, VAP, multidrug resistance, pneumonia

Lower respiratory tract infections remain a leading cause of death worldwide (1). Furthermore, ventilator associated pneumonia (VAP) is a major cause of prolonged length of stay and poor outcome of patients in the Intensive Care Unit (ICU) (2). Timely initiation of

Editor Tulip A. Jhaveri, University of Mississippi Medical Center

Copyright © 2022 Stafylaki et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Georgios Chamilos, hamilos@imbb.forth.gr.

The authors declare a conflict of interest. This study was supported by an Investigator Initiated Study sponsored by Bio-Mérieux. The authors have no conflicting financial interests in this work other than the sponsorship of the study.

Received 5 May 2022
Accepted 5 September 2022
Published 26 September 2022

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

appropriate antibiotic therapy is the most critical determinant of the outcome of patients with severe community acquired pneumonia (CAP), health care associated pneumonia (HAP) and VAP (3). Nonetheless, empirical selection of antimicrobial therapy and optimal management of severe CAP, HAP and VAP is challenging, because of the emergence of multi- and/or pan-drug resistant (MDR/PDR) nosocomial pathogens (4). In particular, infections by Carbapenem resistant Gram-negative bacterial pathogens (e.g., *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Enterobacter* species) has become an epidemic in many European countries, including Greece (5). Therefore, empirical antibiotic therapy of severe CAP/HAP and VAP typically includes a combination of antibiotics, which is associated with increased toxicity and cost, and selection for antimicrobial resistance.

Molecular syndromic platforms are increasingly utilized in diagnosis of infectious diseases as a mean to improve etiological diagnosis and reduce antibiotic consumption through pathogen-guided empirical antimicrobial therapy (6–10). However, the value of these molecular diagnostics has not been previously tested in the setting of nosocomial infections due to multidrug resistant microbial pathogens. Herein, we evaluated a recently implemented molecular syndromic platform in the management of severe pneumonia in the ICU, in a setting of high rates of antimicrobial resistance. Of interest, implementation of syndromic pneumonia panel improved diagnosis and facilitated de-escalation of antimicrobial therapy, resulting in a significant reduction in antibiotic consumption, compared to the year before initiation of the study.

RESULTS

We enrolled 79 consecutive critically ill patients diagnosed with different type of pneumonia (severe CAP/HAP or VAP) in the ICU and compared them with an historical control group of patients with pneumonia in the ICU during the year before initiation of the study. The demographics and clinical characteristics of both groups of patients are presented in Table 1. VAP comprised almost 2/3 of cases of pneumonia in both study groups (Table 1). There were no significant differences in demographic and clinical characteristics of the patients, including median age, co-morbidities, and severity of illness as evidenced by APACHE II and SOFA score (on day 1). Importantly, we found no significant differences in the outcome, including mean number of days of hospitalization in the ICU and mortality rates, between the two groups of patients (Table 1).

The causative pathogens of pneumonia in the study (syndromic PCR) and control groups identified by conventional cultures are shown in Table 2. In both groups Gram negative nosocomial pathogens including *Acinetobacter*, *Pseudomonas, and Klebsiella* species were the main causes of bacterial pneumonia in the ICU. Of interest, there was a trend of increased rates of MDR/XDR causes of pneumonia in the historical control group. Next, we compared the yield of syndromic PCR versus conventional culture of tracheal aspirates in the study group of patients (Fig. 1). We found that the syndromic PCR test (a) was in agreement with culture in 34 patients (40% of cases; Fig. 2 and Table 3) and resulted in correct identification of 29 bacterial pathogens in 19 patients. Accordingly, there was a high degree of concordance (93%; 27/29) between the quantitative culture result (CFU/mL) and the reported semi-quantitative PCR equivalent in these cases (Table 3). Additionally, 44 significant pathogens were exclusively identified by syndromic PCR, which are shown in Table 3. Overall, syndromic PCR provided new information that resulted in improved diagnosis in 42 (49%) of patients with pneumonia (Fig. 2B and C). Nonetheless, in 9 (11%) cases of pneumonia (Fig. 2C), the pathogens were identified only in culture, because the corresponding microbial targets were not included in the syndromic PCR panel; these cases included VAP (n = 3) caused by Gram negative pathogens (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkolderia* spp., *Serretia* spp.) and 6 co-infections with *C. albicans* (considered as co-pathogen by the primary physician) (Table 2). Appropriate empirical antimicrobial therapy in bacterial pneumonia not identified by syndromic PCR was guided by Gram stain of the tracheal aspirate.

The syndromic PCR panel correctly identified resistance genes in 12 cases of bacterial pneumonia caused by *S. aureus* (n = 6), *E. coli* (n = 4), and *Klebsiella* spp. (n = 2), in agreement

TABLE 1 Demographics, clinical characteristics and outcome of patients and historical controls

Characteristic	Control group (*n* = 40)	Syndromic PCR group (*n* = 79)	*P* value
Age	68 (20–86)	69 (22–87)	0.62
Sex			
Male Sex (%)	82.5 (*n* = 33)	67.1 (*n* = 53)	0.08
Type of Pneumonia			
VAP	57,5% (*n* = 23)	69,62% (*n* = 55)	0.22
Apache II	26 (10–41) 6 6.5	26 (7–45) 6 7.8	0.78
SOFA	11 (6–14) 6 2.8	11 (7–21) 6 2.9	0.77
Days of Hospitalization	17 (3–120) 6 19.63	17 (3–54) 6 11.4	0.31
Outcome			
Improvement	67.5% (*n* = 27)	78.48% (*n* = 62)	0.26
No change	12.5% (*n* = 5)	1.27% (*n* = 1)	0.02
Death	20% (*n* = 8)	20.25% (*n* = 16)	- 0.99
Underlying disease			
COPD	20% (*n* = 8)	21.52% (*n* = 17)	- 0.99
Arterial Hypertension	42.5% (*n* = 17)	56.96% (*n* = 45)	0.17
Diabetes Mellitus	22.5% (*n* = 9)	29.11% (*n* = 23)	0.52
Heart Failure	20% (*n* = 8)	31.65% (*n* = 25)	0.2
Liver Disease/Failure	7.5% (*n* = 3)	5.06% (*n* = 4)	0.69
Renal Disease/Failure	7,5% (*n* = 3)	15,19% (*n* = 12)	0.38
Hematological Diseases	0	5.06% (*n* = 4)	0.3
Cancer	7.5% (*n* = 3)	10.13% (*n* = 8)	0.75
Neurological Diseases	22.5% (*n* = 9)	15.19% (*n* = 12)	0.32
Drug Abuse	0	1.27% (*n* = 1)	- 0.99
Alcohol	5% (*n* = 2)	2.53% (*n* = 2)	0.6
Obesity	5% (*n* = 2)	1,27% (*n* = 1)	0.26
No other comorbidity	30% (*n* = 12)	10.13% (*n* = 8)	0.0092
HIV	2.5% (*n* = 1)	0	0.34
Unknown	0	3.80% (*n* = 3)	0.55
Other immunodeficiency	0	5.06% (*n* = 4)	0.3
Bed-days	14 (2–14) 6 2.83	9 (1–14)14.13	0.001
Time to diagnosis	72 (10.88–169.07) 6 38.26	3.5 (2.92–4.2) 6 0.3	, 0.0001

with the phenotype of susceptibility testing of the corresponding isolates (Table 3). However, the syndromic PCR failed to detect resistance phenotype in other MDR/XDR pathogens including *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, which display complex underlying resistance mechanisms. Collectively, in comparison the conventional cultures PCR syndromic test resulted in sharp decrease in time to diagnosis (Fig. 2A) and provided new microbiological information in almost half of the cases of pneumonia (49%) (Fig. 2B and C).

Next, we assessed the impact of syndromic PCR on antibiotic usage by comparing antimicrobial consumption (expressed in DDD/100 BD) in the study group versus the historical control group (Table 4 and Fig. 3). Of interest, we noticed a significant reduction in use of antimicrobials targeting MDR/XDR pathogens, including colistin, tigecycline, and carbapenems (Table 4 and Fig. 3). In parallel, we found a significant increase in use of b-lactam/b-lactamase inhibitors (e.g., ampicillin/sulbactam, piperacillin/sulbactam, and ceftazidime-avibactam) and levofloxacin following implementation of syndromic PCR, which is consistent with antimicrobial de-escalation from broad-spectrum to narrow spectrum antimicrobial therapy. Importantly, the effect of syndromic PCR on reduced consumption of the aforementioned antibiotics was evident across the years of the study (Fig. 3).

DISCUSSION

Previous studies demonstrated an excellent performance of syndromic PCR panel in diagnosis of the causative agent of pneumonia compared to conventional microbiological

TABLE 2 Results of microbiological cultures of control and syndromic PCR group of patients

Microbial pathogen[a]	Control group	Syndromic PCR group
Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex	32.5% (*n* = 13)	10% (*n* = 10)
Escherichia coli	10% (*n* = 4)	5% (*n* = 5)
Klebsiella oxytoca	5% (*n* = 2)	1% (*n* = 1)
Klebsiella pneumoniae group	10% (*n* = 4)	5% (*n* = 5)
Pseudomonas aeruginosa	22.5% (*n* = 9)	6% (*n* = 6)
Proteus mirabilis	7.5% (*n* = 3)	3% (*n* = 3)
Enterobacter aerogenes	2.5% (*n* = 1)	1% (*n* = 1)
Enterobacter cloacae complex	5% (*n* = 2)	5% (*n* = 5)
Haemophilus influenzae	2.5% (*n* = 1)	2% (*n* = 2)
Stenotrophomonas maltophilia	7.5% (*n* = 3)	1% (*n* = 1)
Serratia marcescens	5% (*n* = 2)	0%
Staphylococcus aureus	12.5% (*n* = 5)	11% (*n* = 11)
Streptococcus pneumoniae	5% (*n* = 2)	3% (*n* = 3)
Candida albicans	7.5% (*n* = 3)	6% (*n* = 6)
Candida tropicalis	2.5% (*n* = 1)	0%
Candida parapsilosis	0%	1% (*n* = 1)
No pathogen identified	0%	16% (*n* = 16)
Negative (respiratory tract flora)	0%	21% (*n* = 21)
Burkolderia gladioli	0%	1% (*n* = 1)
Serratia rubidae	0%	1% (*n* = 1)
Burkolderia mallei	0%	1% (*n* = 1)

[a]There were 3 cases of bacterial pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia*, *rubidiae*, *and Bukholderia gladioli* exclusively identified by culture (the relevant targets are not included in the PCR panel). In 6 patients with pneumonia, *C. albicans* was identified in cultures of tracheal aspirate and considered as co-pathogen by the primary physician (target not included in the PCR panel).

cultures (14, 15). Of interest, these studies including patients with CAP (14, 15), HAP, or VAP of different disease severity and provided the rationale of use of syndromic PCR as a complementary tool for de-escalation of antimicrobial therapy within the prospect of a dedicated antimicrobial stewardship program (15). However, these studies included a limited number of MDR or XDR pathogens, and a group of patients who did not receive Colistin, Tigecycline and other last resource antimicrobial therapies. Therefore, the feasibility and impact of syndromic PCR in a setting of high prevalence of MDR pathogens has not been previously evaluated.

Herein, we employed a study in ICU patients hospitalized with different types of severe pneumonia (CAP, HAP, VAP) with a need for mechanical ventilation. The majority of these patients (~ 60%) had VAP due to MDR and XDR bacterial pathogens. In contrast to previous studies, we employed a historical control group of patients with pneumonia hospitalized in the ICU during the previous year of the study. Importantly, the control group had comparable

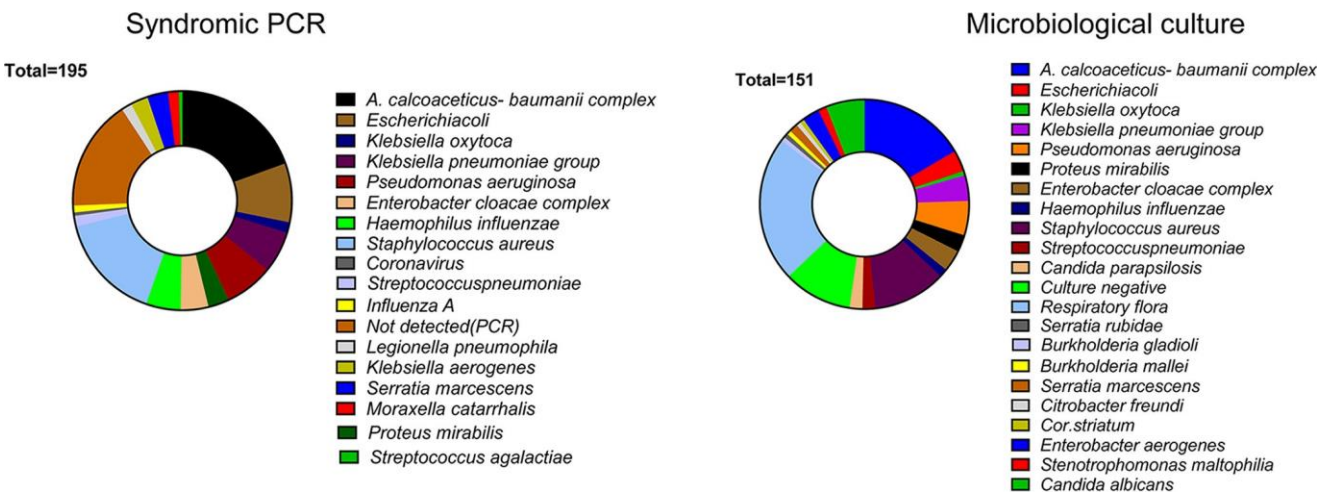


FIG 1 Summary of the results of syndromic PCR with culture of tracheal aspirates or BAL.

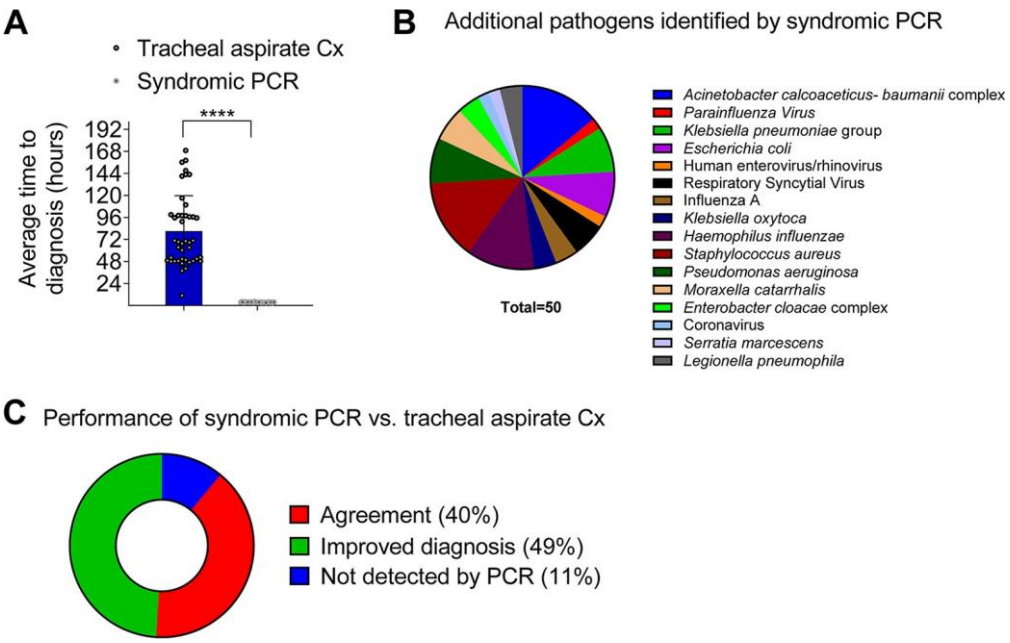


FIG 2 Comparative analysis of performance of syndromic PCR platform versus conventional culture of tracheal aspirates or BAL related to (A) time to diagnosis, (B) new pathogens identified (C) performance in diagnosis.

clinical and microbiological features with the PCR syndromic group, which allowed to study the impact of the diagnostic platform on antibiotic consumption rates in a relatively unbiased approach. Furthermore, the choice of antimicrobial therapy guided by the PCR result was a decision made by the primary physician (intensivist) following discussion with the primary investigators, rather than by an expert committee (15), a practice that reflect on the real use of this diagnostic platform on the daily hospital care. The results of the study clearly validate the use of syndromic PCR in the ICU setting, particularly in the setting of high rates of antimicrobial resistance as a complementary intervention to reduce selection pressure of MDR/XDR pathogens and reduce toxicity associated with the use of broad spectrum empirical antimicrobial therapies. Importantly, comprehensive assessment of the clinical utility of a new syndromic PCR test should evaluate the impact on additional parameters, including length of hospital stay and cost of patient care. Additionally, implementation of antibiotic stewardship substantially improves cost-effectiveness of rapid molecular diagnostic tests in infectious diseases (16) and should be evaluated in future studies on syndromic PCR panel for pneumonia.

Limitations of the study include its retrospective nature, possible changes in infection control and antimicrobial therapy strategies which have not been captured by the investigators of the study (e.g., the impact of the feedback of clinical microbiologist on decisions in empirical antibiotic therapy is difficult to measure), the single center nature of the study and the relatively limited numbers of patients enrolled. Furthermore, the lack of certain nosocomial pathogens (e.g., *Stenotrophomonas*) in the molecular platform requires increased vigilance and the need for complementarity with other diagnostic procedures (e.g., detection of a broad microbial target such as 16S RNA to indicate the presence of a non-identified pathogen) to ensure optimal patient care. The clinical relevance of detection of microbial causes of VAP at relatively low copy numbers (e.g., corresponding value of 10^4 CFU/mL) exclusively by syndromic PCR requires validation in future studies. While early report of resistance mechanism in very useful for targeted antibiotic therapy (e.g., KPC versus NDM *Klebsiella* spp.), the PCR panel does not capture complex resistance mechanisms in certain nosocomial pathogens (e.g., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter*) leading to potential misguidance of therapy. Therefore, microbiological cultures remain the gold standard in diagnosis and guidance on targeted therapy in severe bacterial pneumonia. Nonetheless, molecular syndromic platforms should be regarded as important adjunct diagnostic tools for antibiotic stewardship and timely diagnosis of non-culturable pathogens (e.g., viruses). Collectively, our study illustrates that the PCR syndromic approach

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

TABLE 3 Analysis of additional pathogens identified by syndromic PCR panel[a]

Cases	Culture result (CFU/mL)	Syndromic PCR result (corresponding CFU/mL value)[b]
1	No Pathogen (culture)	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^6)
2	*Klebsiella pneumoniae group* ($3*10^5$)	*Klebsiella pneumoniae group* (10^6), *Parainfluenza Virus*
3	No Pathogen	*Klebsiella pneumoniae group* (10^4)
4	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* ($4*10^7$)	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^5), *Escherichia coli* (10^4)
5	*Acinetobacter calcoaceticus- baumanii complex* (- 10^9)	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^7), *Parainfluenza Virus*
6	No Pathogen	*Human enterovirus/rhinovirus*
7	No Pathogen	*Respiratory Syncytial Virus*
8	No Pathogen	*Respiratory Syncytial Virus*
9	No Pathogen	*Influenza A, Respiratory Syncytial Virus*
10	No Pathogen	*Klebsiella oxytoca* (10^5)
11	No Pathogen	*Haemophilus influenzae* (10^6)
12	No Pathogen	*Haemophilus influenzae* (10^4)
13	No Pathogen	*Staphylococcus aureus* (10^4)
14	No Pathogen	*Pseudomonas aeruginosa* (10^6)
15	No Pathogen	*Escherichia coli* (10^5)
16	*Staphylococcus aureus* ($4*10^7$), *Klebsiella pneumoniae group* ($3*10^5$), *Burkolderia gladioli* ($2*10^6$)	*Staphylococcus aureus* (10^7), *Klebsiella pneumoniae group* (10^5), *Haemophilus influenzae* (10^5)
17	*Staphylococcus aureus* ($25*10^3$)	*Staphylococcus aureus* (10^5), *Klebsiella pneumoniae group* (10^4)
18	*Proteus mirabilis* ($20*10^7$)	*Proteus mirabilis* (10^7), *Haemophilus influenzae* (10^7)
19	*Streptococcus pneumoniae* (- 10^7)	*Streptococcus pneumoniae* (10^7), *Staphylococcus aureus* (10^4), *Streptococcus agalactiae* (10^5)
20	*Streptococcus pneumoniae* ($2*10^5$)	*Streptococcus pneumoniae* (10^7), *Staphylococcus aureus* (10^4)
21	*Escherichia coli* (- 10^7)	*Escherichia coli* (10^7), *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^4), *Staphylococcus aureus* (10^5), *Pseudomonas aeruginosa* (10^4)
22	*Enterobacter cloacae complex* (10^5)	*Enterobacter cloacae complex* (10^5), *Staphylococcus aureus* (10^4)
23	No Pathogen	*Staphylococcus aureus* (10^4)
24	*Escherichia coli* ($6*10^5$)	*Escherichia coli* (10^6), *Moraxella catarrhalis* (10^5)
25	No Pathogen	*Enterobacter cloacae complex* (10^5)
26	No Pathogen	*Pseudomonas aeruginosa* (10^5)
27	*Staphylococcus aureus* (- 10^7)	*Staphylococcus aureus* (10^7), *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^5), *Klebsiella pneumoniae group* (10^5), *Legionella pneumophila*
28	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^5)
29	*Staphylococcus aureus* ($2*10^7$)	*Staphylococcus aureus* (10^7), *Influenza A*
30	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (- 10^9), *Pseudomonas aeruginosa* ($2*10^7$), *Klebsiella pneumoniae group* ($40*10^7$)	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^7), *Pseudomonas aeruginosa* (10^6), *Klebsiella pneumoniae group* (10^6), *Coronavirus*
31	*Escherichia coli* ($4*10^7$), *Proteus mirabilis* ($80*10^7$)	*Escherichia coli* (10^7), *Proteus mirabilis* (10^7), *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^7)
32	*Klebsiella pneumoniae group* ($5*10^5$), *Klebsiella oxytoca* ($2*10^5$)	*Klebsiella pneumoniae group* (10^6), *Klebsiella oxytoca* (10^5), *Staphylococcus aureus* (10^5)
33	No Pathogen	*Haemophilus influenzae* (10^5)
34	No Pathogen	*Serratia marcescens* (10^5), *Klebsiella oxytoca* (10^4)
35	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^9)	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^7), *Escherichia coli* (10^5), *Klebsiella pneumoniae group* (10^5), *Haemophilus influenzae* (10^4), *Pseudomonas aeruginosa* (10^7)
36	*Streptococcus pneumoniae* (- 10^9)	*Streptococcus pneumoniae* (10^7), *Haemophilus influenzae* (10^6), *Moraxella catarrhalis* (10^4), *Proteus mirabilis* (10^4)
37	No Pathogen	*Staphylococcus aureus* (10^4), *Haemophilus influenzae* (10^5)
38	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^5)
39	*Candida albicans* (10^8)	*Enterobacter cloacae complex* (10^6), *Escherichia coli* (10^4)
40	No Pathogen	*Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* (10^7)
41	*Haemophilus influenzae* ($2*10^5$), *Burkolderia mallei* (10^5)	*Haemophilus influenzae* (10^7), *Moraxella catarrhalis* (10^7)
42	No Pathogen	*Legionella pneumophila*

[a]There were 34 cases of bacterial pneumonia with agreement between syndromic PCR and culture results, including 15 cases with no pathogen identified and 19 cases of concordant identification of bacterial pathogens (7 *Staphylococcus aureus*,4 *Pseudomonas aeruginosa*,5 *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex*, and 6 bacterial co-infections). Coinfections included 1 case of *Enterobacter cloacae complex* plus *Klebsiella pneumoniae group;* 1 case of *Acinetobacter calcoaceticus-baumanii complex* plus *Pseudomonas aeruginosa;* 1 case of *Staphylococcus aureus plus Enterobacter cloacae complex and Proteus mirabilis;* 1 case of *Staphylococcus aureus plus Pseudomonas aeruginosa;* 1 case of *Staphylococcus aureus plus Enterobacter cloacae complex;* and 1 case of *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*. In all 19 cases of bacterial pneumonia with concordant identification of the pathogen, there was excellent agreement (38/40, 95%) between the quantitative culture result reported in CFU/mL and the semi-quantitative result of the syndromic PCR reported as CFU/mL equivalent gene copy numbers. In two cases syndromic PCR underestimated the bacterial burden compared to microbiological culture (*Enterobacter aerogenes* 10^4 vs. 2×10^7 CFU/mL; *Pseudomonas aeruginosa* 10^4 vs. 2×10^7 CFU/mL).

[b]The syndromic PCR panel identified 12 cases with resistance genes; 9 of them (5 cases of *Staphylococcus aureus* mecA/C and MREJ, 2 cases of *Escherichia coli* CTX-M, 1 case of *Escherichia coli* KPC and 1 case of *Klebsiella pneumonia* KPC) were in agreement with the phenotype in susceptibility testing of the isolate. In 3 additional cases PCR detected additional resistance genes (*Klebsiella pneumonia* CTX-M, *Staphylococcus aureus* mecA/C and MREJ, *Escherichia coli* VIM). Detection of resistance genes was not considered as an indication of improved diagnosis, because in several cases of MDR/XDR pathogens with complex resistance mechanisms (e.g., *Pseudomonas*, *Acinetobacter*) the resistance phenotype was not identified by syndromic PCR.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

TABLE 4 Comparative analysis of antibiotic consumption in control and syndromic PCR group of patients expressed as DDD/100 bed days (BD) values

Antibiotic	Control group (DDDs/100BD)	Syndromic PCR group (DDDs/100BD)	*P* value
Ampicillin/sulbactam	6.7	13.22	0.1177
Piperacillin tazobactam[a]	11.96	33.02	0.0003
Ceftazidime–Avibactam[b]	3.14	13.23	0.0091
Ceftazidime		2.6	
Ceftriaxone	2.49	0.52	0.9999
Cefepime	14.97	16.63	0.5875
Meropenem	67.22	23.61	, 0.0001
Levofloxacine	5.3	17.64	0.0027
Ciprofloxacine	4.99	2.67	0.728
Colistin[c]	94.86	51.91	0.0011
Vancomycin	10.91	16.63	0.1772
Tigecycline	69.44	32.36	0.0008
Gentamycin	5.13	1.14	0.2203
Daptomycin	32.74	50.49	0.0137
Amikacin	2.08	3.13	0.6718
Clindamycin	0.69	0.65	0.9999
Linezolid	11.54	12.37	0.8373
Trimethoprime sulfomethoxazol		12.18	NA[d]
Metronidazol	4.44	2.69	0.9999
Rifampicine	1.25	1.41	0.9999
Itraconazole	0.21	4.98	0.0234
Fluconazole	0.73	1.3	0.9999
Isavuconazole		1.62	NA
Amphotericin B		4.65	NA
Micafungin	2.29	16.41	0.0004
Anidulafungin	4.99	5.73	0.7639
Oseltamivir		1.75	NA
Ceftolozan tazobactam	1.04	1.56	0.6057
Tobramycin		0.65	NA
Acyclovir		1.06	NA
Azithromycin		0.26	NA
Isoniazid		0.85	NA
Ceftraolin fosamil		2.34	NA
Voriconazole		0.13	NA
Moxifloxacin		0.13	NA

[a]There were 15 cases of pneumonia in the control group and 33 cases of pneumonia in the PCR group that received appropriate therapy with piperacillin-tazobactam.

[b]There were 2/40 and 19/79 patients with pneumonia in the control and syndromic PCR groups who received Ceftazidime-Avibactam, respectively. These included 1 case of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* in the control group, 8 cases of *Acinetobacter baumannii* (2 PDR and 6 XDR) and 2 cases of carbapenem resistant (KPC) *Klebsiella pneumoniae* in the PCR group.

[c]Examples of de-escalation due to discontinuation of colistin in VAP include (a) a patient with MRSA pneumonia (*S. aureus*, detection of mecA/C-MREJ resistance genes) who received empirical antimicrobial therapy with colistin plus piperacillin-tazobactam and following PCR result the treatment was modified to linezolid/cefepime (b) a patient with pneumonia caused by *Enterobacter cloacae* on empirical therapy with colistin plus piperacillin-tazobactam who received piperacillin-tazobactam following the PCR result, and (c) a patient of mixed infection by *Enterobacter aerogenes* plus *Klebsiella pneumoniae* on empirical therapy with meropenem/colistin who received piperacillin-tazobactam following the PCR result. In addition to de-escalation, targeted antimicrobial therapy was started upfront based on the PCR report in several cases of pneumonia (e.g., influenza, *Legionella*).

[d]NA, not applicable.

is a useful tool in the management of pneumonia in the ICU, especially in the nosocomial setting of high rates of MDR/XDR nosocomial pathogens.

MATERIALS AND METHODS

Study participants. Between June 2018 and June 2020 all patients admitted the ICU of University Hospital of Heraklion, Crete with severe CAP/HAP or those who developed VAP during ICU stay were eligible for enrollment to the study. The following criteria were required for patient inclusion: (1) age $ 18 years, (2) presence of clinical and radiological criteria for pneumonia according to the IDSA guidelines: new lung infiltrate on a chest X-ray and evidence that the infiltrate was of an infectious origin, i.e., at least two of three clinical features (fever greater than 38°C, leukocytosis or leukopenia, and purulent secretions), and (3) severe respiratory

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

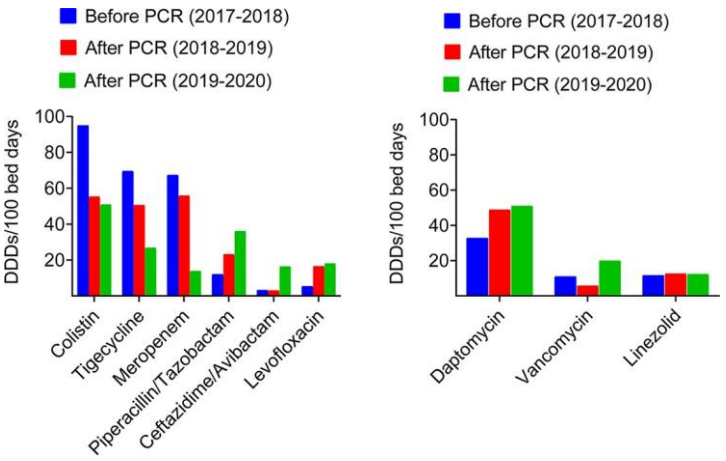


FIG 3 Trends in consumption of antibiotics against Gram negative (left panel) and Gram positive (right panel) bacterial pathogens in control and syndromic PCR group of patients over the study period.

failure requiring ICU admission and mechanical ventilation. Criteria for pneumonia were retrospectively evaluated by two clinical investigators (K.V., and D.G.). Severe CAP or HAP requiring ICU admission, and VAP were included. HAP was defined as pneumonia occurring 48 h or more after admission, which was not incubating at the time of admission and not associated with mechanical ventilation (11, 12). VAP referred to pneumonia occurring . 48 h after endotracheal intubation (11). CAP included all episodes of pneumonia acquired outside of the hospital setting. The presence of immunodeficiency, malignancy or other co-morbidity was not considered as an exclusion criterion. All intubations were preformed according to "American Journal of respiratory and critical care medicine" (13). Endotracheal aspirates were obtained from all the patients at the time of clinical indication of pneumonia and tested simultaneously, using conventional microbiological techniques and the PCR BioFire FilmArray Pneumonia Panel (bioMérieux S.A., France). The following targets are included in the test: *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae group*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, Adenovirus, Coronavirus, Human metapneumovirus, Human rhinovirus/enterovirus, Influenza A vírus, Influenza B vírus, Parainfluenza virus, Respiratory syncytial virus*, CTX-M, KPC, NDM, Oxa48-like, VIM, IMP, mecA/mecC, and MREJ.

Exclusion criteria included (i) ICU patients with fever of another etiology, (ii) colonization of the lung or ventilator associated tracheobronchitis (VAT), (iii) patient already enrolled in the study, and (iv) patients on palliative care.

Microbiology methods. Endotracheal aspirate (EA) samples with , 10 epithelial cells per low power field on Gram-stained smears were acceptable for culture (3). The respiratory samples (EA and bronchoalveolar lavage (BAL) fluid) were quantitatively cultured for aerobic microorganisms using chocolate agar, sheep blood agar, and MacConkey agar plates. Plates were incubated overnight in a 5% CO_2 atmosphere at 35°C for 48 h. Colonies were then counted and bacterial concentrations (CFU/mL) were calculated. Diagnostic thresholds of $ 10^4 CFU/mL and $ 10^5 CFU/mL were adopted for BAL cultures and EA, respectively; bacteria grown in numbers , 10^4 CFU/mL were not reported as a relevant cause of pneumonia (3). Pure cultures and dominant pathogens were identified by the VITEK2 system (bioMérieux). Diagnostic tests for viruses and atypical bacteria were not conducted routinely. Respiratory samples were simultaneously tested upon receipt with the BioFire FilmArray Pneumonia Panel according to the manufacturer's instructions directly on native respiratory samples.

Clinical data. Clinical and demographical characteristics were retrospectively obtained from the electronic medical records of each patient. Investigators collected demographic characteristics (age, gender) and medical data including comorbidities, classification of pneumonia (VAP, HAP, or CAP), severity scores, antibiotics prescribed, and outcome. For each episode, the result of the syndromic PCR was presented to the primary physician on call (intensivist) and the primary investigators of the study (D.S., G.C., K.V.) in real time. The clinical microbiologist in charge of the study (D.S.) provided explanation on the results of the syndromic PCR test to the primary physician, including discussion on antibiotic choices based on detected pathogen and the results of the genetic markers of antimicrobial resistance. Detailed information on the susceptibility of the predominant causes of VAP in the ICU (e.g., *Pseudomonas*, *Klebsiella* spp.) in the year before the study was provided to all participating physicians. The primary physician decided on the most appropriate antimicrobial therapy for each pneumonia episode.

Endpoints. Primary aim of the study was to evaluate the rationale for broad use of BIOFIRE FILMARRAY Pneumonia Panel plus in routine management of severe CAP/HAP and VAP in hospitals with high rates of MDR and pan-drug resistant (PDR) bacterial pathogens. To address this endpoint, we performed comparative analysis of the rates of antimicrobial consumption in ICU patients with pneumonia the year before (2018; historical control group) and over the study period (2018–2020). Rates of antibiotic consumption were expressed as defined daily dose (DDD) per 100 bed days (14).

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

Additionally, the following measures were assessed: The accuracy of multiplex PCR compared to routine microbiological diagnosis, the decrease in time to diagnosis associated with the use of multiplex PCR; the impact of molecular diagnosis on establishment of etiological diagnosis of severe pneumonia and VAP; the effect of rapid molecular diagnostic result on the outcome of patients, defined by days of ICU hospitalization and overall mortality.

Statistical analysis. All data were anonymously collected and stored on a secured database. Two-sided unpaired Student's *t* test was used for statistical comparisons of continuous variables between the two groups. Fisher's exact test was used for analysis of categorical variables. *P* , 0.05 was considered statistically significant. Analysis was performed using the GraphPad Prism software (version VII). The study was approved by the Ethics Committee of the University of Crete (IRB approval # *58/16.07.2020)*.

The data sets used during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by an Investigator Initiated Study sponsored by Bio-Mérieux.

Georgios Chamilos conceived and supervised the study, and wrote the manuscript along with comments from coauthors. Dimitra Stafylaki performed all the microbiological studies, collected and analyzed data and participated in the writing of the manuscript. Sofia Maraki supervised the clinical protocol and analyzed data; Katerina Vaporidi and Dimitrios Georgopoulos participated in patient recruitment and data analysis Dimitrios P. Kontoyiannis and Diamantis P. Kofteridis analyzed data and participated in writing of the manuscript.

We have no conflicting financial interests in this work other than the sponsorship of the study.

REFERENCES

1. Torres A, Cilloniz C, Niederman MS, Menéndez R, Chalmers JD, Wunderink RG, van der Poll T. 2021. Wunderink RG, van der Poll T. Pneumonia. Nat Rev Dis Primers 7:25. https://doi.org/10.1038/s41572-021-00259-0.
2. Bekaert M, Timsit JF, Vansteelandt S, Depuydt P, Vésin A, Garrouste-Orgeas M, Decruyenaere J, Clec'h C, Azoulay E, Benoit D, Outcomerea Study Group. 2011. Attributable mortality of ventilator-associated pneumonia: a reappraisal using causal analysis. Am J Respir Crit Care Med 184:1133–1139. https://doi.org/10.1164/rccm.201105-0867OC.
3. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. 2002. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. Chest 122:262–268. https://doi.org/10.1378/chest.122.1.262.
4. Depuydt PO, Vandijck DM, Bekaert MA, Decruyenaere JM, Blot SI, Vogelaers DP, Benoit DD. 2008. and impact of multidrug antibiotic resistance in pathogens causing ventilator-associated-pneumonia. Crit Care 12:R142. https://doi.org/10.1186/cc7119.
5. Tsioutis C, Kritsotakis EI, Karageorgos SA, Stratakou S, Psarologakis C, Kokkini S, Gikas A. 2016. Clinical epidemiology, treatment and prognostic factors of extensively drug-resistant Acinetobacter baumannii ventilator-associated pneumonia in critically ill patients. Int J Antimicrob Agents 48:492–497. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.07.007.
6. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, Pritt BS, Patel R. 2017. Syndromic panelbased testing in clinical microbiology. Clin Microbiol Rev 31:1–28.
7. Bauer KA, Perez KK, Forrest GN, Goff DA. 2014. Review of rapid diagnostic tests used by antimicrobial stewardship programs. Clin Infect Dis 59:S134–S145. https://doi.org/10.1093/cid/ciu547.
8. Buchan BW, Windham S, Balada-Llasat JM, Leber A, Harrington A, Relich R, Murphy C, Dien Bard J, Naccache S, Ronen S, Hopp A, Mahmutoglu D, Faron ML, Ledeboer NA, Carroll A, Stone H, Akerele O, Everhart K, Bonwit A, Kwong C, Buckner R, Warren D, Fowler R, Chandrasekaran S, Huse H, Campeau S, Humphries R, Graue C, Huang A. 2020. Practical Comparison of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel to Routine Diagnostic Methodsand Potential Impact on Antimicrobial Stewardship in Adult Hospitalized Patients with Lower Respiratory Tract Infections. J Clin Microbiol 58:e00135-20. https://doi.org/10.1128/JCM.00135-20.
9. Gadsby NJ, Russell CD, McHugh MP, Mark H, Conway Morris A, Laurenson IF, Hill AT, Templeton KE. 2016. Comprehensive Molecular Testing for Respiratory Pathogens in Community-Acquired Pneumonia. Clin Infect Dis 62:817–823. https://doi.org/10.1093/cid/civ1214.
10. Monard C, Pehlivan J, Auger G, Alviset S, Tran Dinh A, Duquaire P, Gastli N, d'Humières C, Maamar A, Boibieux A, Baldeyrou M, Loubinoux J, Dauwalder O, Cattoir V, Armand-Lefèvre L, Kernéis S, ADAPT study group. 2020. Multicenter evaluation of a syndromic rapid multiplex PCR test for early adaptation of antimicrobial therapy in adult patients with pneumonia. Crit Care 24:434. https://doi.org/10.1186/s13054-020-03114-y.
11. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, Napolitano LM, O'Grady NP, Bartlett JG, Carratalà J, El Solh AA, Ewig S, Fey PD, File TM, Restrepo MI, Roberts JA, Waterer GW, Cruse P, Knight SL, Brozek JL. 2016. Management of adults with hospital-acquired and ventilatorassociated pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. Clin Infect Dis 63:e61–111–e111. https://doi.org/10.1093/cid/ciw353.
12. American Thoracic Society; Infectious Diseases Society of America. 2005. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator associated, and healthcare-associated pneumonia. Am J Respir Crit Care Med American Thoracic Society - AJRCCM 171:388–416. https://doi.org/10.1164/rccm.200405-644ST.
13. Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, Cooley LA, Dean NC, Fine MJ, Flanders SA, Griffin MR, Metersky ML, Musher DM, Restrepo MI, Whitney CG. 2019. Diagnosis and treatment of adults with community-acquired pneumonia. An official clinical practice guideline of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. Am J Respir Crit Care Med 200:e45–67–e67. https://doi.org/10.1164/rccm.201908-1581ST.
14. Humphries RM, Ambler J, Mitchell SL, Castanheira M, Dingle T, Hindler JA, Koeth L, Sei K, Hardy D, Zimmer B, Butler-Wu S, Dien Bard J, Brasso B, Shawar R, Dingle T, Humphries R, Sei K, Koeth L. 2018. CLSI Methods Development and Standardization Working Group of the Subcommittee on Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI Methods Development and Standardization Working Group Best Practices for Evaluation of Antimicrobial Susceptibility Tests. J Clin Microbiol 56:e01934-17. https://doi.org/10.1128/JCM.01934-17.
15. Hekster YA, Vree TB, Goris RJ, Boerema JB. 1982. The defined daily dose per 100 bed-days as a unit of comparison and a parameter for studying antimicrobial drug use in a university hospital. A retrospective study of the effects of guidelines and audit on antimicrobial drug use. J Clin Hosp Pharm 7:251–260. https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1982.tb01030.x.
16. Pliakos EE, Andreatos N, Shehadeh F, Ziakas PD, Mylonakis E. 2018. The Cost-Effectiveness of Rapid Diagnostic Testing for the Diagnosis of Bloodstream Infections with or without Antimicrobial Stewardship. Clin Microbiol Rev 31:e00095-17. https://doi.org/10.1128/CMR.00095-17.

Downloaded from https://journals.asm.org/journal/spectrum on 25 February 2023 by 2a02:587:810c:e2b2:a59d:dc5c:80f4:c7bf.

5.Συντομογραφίες

1) APACHE II: Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II
2) ARDS: Acute respiratory distress syndrome
3) ATC/DDD: Anatomical Therapeutic Classification
4) ATS: American Thoracic Society
5) AmpC: Ampicillinase C
6) BAL: Bronchoalveolar lavage
7) CAP: Community-acquired pneumonia
8) CRP:C-reactive protein
9) CRE: Carbapenem-resistant Enterobacterales
10) CT: Computed tomography
11) CPIS: Clinical Pulmonary Infection Score
12) COS: Columbia agar plate
13) cfu/ml: Colony forming units/milliliter
14) COPD: *Chronic obstructive pulmonary disease*
15) CE: Conformité Européenne
16) CXR: Chest X-ray
17) DDD: Daily Defined Dose
18) ESKAPE: *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter spp*
19) ETAs: Endotracheal aspirates
20) ESBL: Extended-spectrum beta-lactamases
21) EMA: European Medicines Agency
22) FDA: Food And Drug Administration
23) GNB: Gram-negative bacteria
24) HAP: Hospital-acquired pneumonia
25) HAD: Helicase-dependent amplification
26) IMP: Active-on-imipenem

27) IDSA: Infectious Diseases Society of America
28) KPC: Klebsiella pneumoniae carbapenemases
29) LIS: Laboratory information system
30) LAMP: Loop-mediated amplification
31) LRT: Lower respiratory tract infection
32) LUS: Lung ultrasound
33) LRCT: Low-dose computed tomography
34) MV: Mechanical ventilation
35) MDR: Multidrug resistance
36) MIC: Minimum inhibitory concentration
37) MALDI TOF –MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry
38) MBL: Metallo-β lactamase
39) MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus
40) MSSA: Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus
41) NDM: New Delhi metallo-β-lactamase
42) NGS: Next-Generation Sequencing
43) NAATs: Nucleic acid amplification technologies
44) NASBA: Nucleic acid sequence-based amplification
45) OXA: OXA-β-lactamases
46) PVX: Chocolate agar PolyViteX
47) PCR: Polymerase Chain Reaction
48) PMN: Polymorphonuclear leukocyte
49) PDR: Pandrug-resistant
50) PCT: Serum procalcitonin
51) QSM: Quantified Standard Material
52) SOFA: Sequential Organ Failure Assessment
53) sCAP: Severe community-acquired pneumonia
54) sTREM: Soluble triggering receptor expressed on myeloid cells
55) TMA: Transcription-mediated amplification
56) ultra LRCT: Ultra-low-dose computed tomography,

57) VAP: ventilator-associated pneumonia

58) VAT: Ventilator-associated tracheobronchitis

59) VIM: Verona integron-mediated metallo-β-lactamase

60) VAT: Ventilator-associated tracheobronchitis

61) WGS: Whole-Genome Sequencing

62) XDR: Extensive drug resistance