

Alsó légúti minták molekuláris mikrobiológiai vizsgálata a koronavírus-járvány időszakában

Károlyi Sándor dr. ■ Juhász Emese dr. ■ Iván Miklós dr. ■ Szabó Edina dr.
Farkas Petronella dr. ■ Székely Kamilla dr. ■ Kristóf Katalin dr.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Laboratóriumi Medicina Intézet, Budapest

Bevezetés: A BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel (bioMérieux) az alsó légúti fertőzések mikrobiológiai diagnosztikájára kidolgozott „real-time” PCR-rendszer, mely 18 baktérium, 9 vírus és 7 antibiotikum-rezisztenciagén kimutatására képes. A két órán belül eredményt adó módszer segíti a pneumonia differenciáldiagnosztikáját, a terápiás döntéshozatalt.

Célkitűzés: Laboratóriumunkban pneumonia kivizsgálása érdekében végzett PCR-paneltesztek eredményeinek áttekintése, a hagyományos bakteriológiai feldolgozás eredményeivel való összehasonlítása.

Módszerek: A 2020. október és 2021. szeptember közötti időszakban 820, feltételezeten pneumóniás kórházi betegtől származó alsó légúti mintát vizsgáltunk a PCR-panellel. A mintákból a multiplex PCR-vizsgálat mellett tenyésztést is végeztünk. A kiegészítő SARS-CoV-2-PCR-vizsgálatok orr-garat törletből vett mintákból történtek.

Eredmények: A minták 40%-a SARS-CoV-2-pozitív betegtől származott. A minták 60%-ánál jelzett patogént vagy rezisztenciagént a PCR-panel. A három leggyakrabban kimutatott kórokozó a *Pseudomonas aeruginosa*, a *Staphylococcus aureus* és az *Acinetobacter baumannii* volt. A PCR-rel detektált baktériumok 44%-a tenyésztéssel nem igazolódott, és viszont: tenyésztéssel számos olyan baktériumot, gombafajt, antibiotikum-rezisztenciamechanizmust igazoltunk, melyet a PCR-panel nem vizsgált, vagy melyre negatív eredményt adott. A SARS-CoV-2-pozitív csoportban a *S. aureus* adta az azonosított kórokozók 25,8%-át. A leggyakrabban kimutatott rezisztenciagén a *mecA/C* (MRSA) volt. A SARS-CoV-2-pozitív betegek mintáinak 2%-ában, míg a SARS-CoV-2-negatív betegek mintáinak 13%-ában mutattunk ki egyéb légúti vírusgént is.

Következtetés: A kórházi pneumóniák gyakori kórokozóit PCR-vizsgálataink eredményei igazolták. A PCR-panel célspektrumában nem szereplő kórokozók jelentősége és az antibiotikumrezisztenciák multifaktoriális volta miatt a pneumoniaspecifikus multiplex PCR-vizsgálatokat tenyésztéssel együtt javasolt végezni, és ezek eredményét együttesen érdemes értelmezni.

Orv Hetil. 2022; 163(33): 1295–1302.

Kulcsszavak: BioFire, multiplex PCR, pneumonia

Molecular microbiological testing of lower respiratory tract samples during COVID-19 pandemic

Introduction: BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel (bioMérieux) is a PCR method for microbiological diagnostics of lower respiratory infections. It can detect 18 bacteria, 9 viruses and 7 antibiotic resistance genes in real time. It can help the differential diagnosis and the choice of therapy of pneumonia, by giving results in two hours.

Objective: Reviewing the results of pneumonia PCR tests performed in our laboratory, and comparing them with the results of conventional culturing.

Method: From October 2020 to September 2021, 820 lower respiratory tract samples were analyzed from inpatients with suspected pneumonia. Beside the PCR test, culturing was also performed. Oropharyngeal swabs were used for supplementary SARS-CoV-2 PCR.

Results: 40% of samples were collected from SARS-CoV-2-positive patients. In 60% of the samples, the PCR test detected pathogens or resistance genes. The most commonly detected pathogens were *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii*. 44% of the bacteria detected by PCR were not verified by culturing, whereas by culturing, several other bacteria, fungi and antibiotic resistance mechanisms were detected, which were not shown in the results of the multiplex PCR tests. In SARS-CoV-2-positive inpatients, 25.8% of the detected bacteria was *S. aureus*. The most common resistance gene was *mecA/C* (MRSA). In this group, other respiratory virus genes were detected in 2% of SARS-CoV-2-positive patients, whereas in 13% in samples of SARS-CoV-2-negative patients.

Conclusions: Because of the importance of pathogens excluded from the PCR targets and multifactorial mechanisms of antibiotic resistance, culturing is recommended to perform beside pneumonia-specific multiplex PCR tests.

Keywords: BioFire, multiplex PCR, pneumonia

Károlyi S, Juhász E, Iván M, Szabó E, Farkas P, Székely K, Kristóf K. [Molecular microbiological testing of lower respiratory tract samples during COVID-19 pandemic]. *Orv Hetil.* 2022; 163(33): 1295–1302.

(Beérkezett: 2022. április 12.; elfogadva: 2022. május 17.)

Rövidítések

BAL = bronchoalveolaris lavage; CE-IVD = (European conformity – *in vitro* diagnostics) Európai megfelelés – *in vitro* diagnosztika; CFU = (colony-forming unit) telepképző egység; COVID-19 = (coronavirus disease 2019) koronavírus-betegség 2019; ESBL = (extended-spectrum beta-lactamase) kiterjesztett spektrumú béta-laktamáz; EUCAST = (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) Antimikrobiális Érzékenységi Vizsgálatok Európai Bizottsága; MALDI-TOF = (matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight) mátrixasszisztált lézer deszorpciós-ionizációs, a repülési idő mérésén alapuló; MERS-CoV = (Middle East respiratory syndrome coronavirus) közel-keleti légúti koronavírus; MIC = (minimal inhibitory concentration) minimális inhibitoros koncentráció; MRSA = meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus*; PCR = (polymerase chain reaction) polimeráz-láncreakció; SARS-CoV-2 = (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2

A klinikai mikrobiológiai diagnosztikában a technológiai fejlődés jelentős változásokat eredményezett az elmúlt két évtizedben. A polimeráz-láncreakción (PCR) alapuló diagnosztikai eljárások a mindennapi gyakorlat részévé váltak. Az irodalmi adatok alapján az adaptált, illetve saját fejlesztésű PCR-teszteket egyre inkább kiszorították a gyakorlatból a kereskedelmi forgalomban kapható, laboratóriumi minőségi kritériumok szempontjából megfelelően validált, CE-IVD minősítésű tesztek. Az egy-egy kórokozó kimutatására alkalmas tesztek mellett megjelentek a szindrómaalapú, infekciótípus-specifikus multiplex PCR-rendszerek, melyek több kórokozó egyidejű kimutatására képesek. A véráramfertőzések, a légúti fertőzések, a gastrointestinalis, a központi idegrendszeri vagy a szexuális úton terjedő fertőzések leggyakoribb kórokozóit kimutatni képes multiplex PCR-rendszerek terjedtek el [1]. A gyártók igyekeztek rendszereiket a felhasználók igényeihez igazítani, ennek megfelelően könnyen elvégezhető tesztekét kínálnak. A PCR-t megelőző, a klinikai mintából történő nukleinsav-izoláció a laboratórium részéről pluszreagenseket és -felszerelést igényelne, ezért rendszereiket úgy alakították ki, hogy azok a vizsgálandó nukleinsav felszabadítását és azt követően a PCR-t egyaránt magukban foglalják. Emellett a PCR-rendszer valós idejű detektálással működik, tehát

nem szükséges a PCR-t követően egy pluszlépés (például gélelektroforézis) az amplifikált gének kimutatására, mivel a detektálás az amplifikációval egy időben zajlik. Többnyire az eredményt kiértékelő elemzőszoftver szintén a rendszer része. A teljes vizsgálati folyamat zárt rendszerben zajlik. A felhasználónak szinte nincs más feladata, mint a klinikai minta tesztkazettába történő bemérése, majd kb. 90–120 perc elteltével az elkészült PCR-eredmény értelmezése. Az ilyen komplex PCR-rendszerek „point-of care”, azaz akár a beteg mellett végezhető vizsgálatként is elérhető.

A pneumonia világszerte az egyik legjelentősebb morbiditási és mortalitási tényező [2]. A hagyományos mikrobiológiai módszerek (tenyésztés, szerológia) túl időigényesek ahhoz, hogy megfelelően segítsék a klinikust az alsó légúti fertőzések antimikrobiális terápiájának gyors megválasztásában. Az empirikus terápia sokszor széles spektrumú antibiotikumot jelent, melynek számos negatív következményével kell számolni. Éppen ezért minden gyors diagnosztikai módszer – akár a vizeletből végezhető *Streptococcus pneumoniae* vagy *Legionella pneumophila* antigént detektáló immunkromatográfiás tesztek, akár a PCR-alapú tesztek – kiemelkedő jelentőségű a pneumoniás betegek differenciáldiagnosztikája során. A pneumonia kórokozóinak felderítése epidemiológiai szempontból ugyancsak elengedhetetlen.

A BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Franciaország) olyan, alsó légúti fertőzéseket okozó patogénekre specifikált multiplex PCR-rendszer, mely a pneumonia lehetséges kórokozóinak közül 18 baktérium és 9 vírus génjét képes azonosítani. Ezen túl 7 antibiotikum-rezisztenciagén detektálására alkalmas. Az 1. táblázatban látható a panel teljes célspektruma. A humán koronavírusok közül az endémiás OC43, NL63, HKU1 és 229E koronavírusok, illetve a közel-keleti légúti koronavírus (MERS-CoV) kimutatására képes. A SARS-CoV-2-t (2019) *nem* detektálja. A gyártó a világjárvány hatására a *felső* légúti fertőzések kimutatására szolgáló multiplex PCR-rendszerét egészítette ki a SARS-CoV-2- „targettel”, a vizsgálatunkban szereplő alsó légúti paneljét azonban nem. A BioFire Pneumonia panel bronchoalveolaris lavage (BAL-) és köpetmintákra van validálva, a gyártó által megadott szenzitivitása 96%, specifitása 97% [3]. A típusos bakteriális kórokozók mennyiségét a mintában a nukleinsav-

1. táblázat | A BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel célspektruma [3]

Baktériumok	Antibiotikum-rezisztenciagének
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> komplex	ESBL
<i>Enterobacter cloacae</i>	CTX-M
<i>Escherichia coli</i>	Karbapenemázok
<i>Haemophilus influenzae</i>	KPC
<i>Klebsiella aerogenes</i>	NDM
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Oxa48-like
<i>Klebsiella pneumoniae</i> csoport	VIM
<i>Moraxella catarrhalis</i>	IMP
<i>Proteus</i> spp.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
<i>Serratia marcescens</i>	Meticillinrezisztencia (MRSA)
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>mecA/mecC</i> és MREJ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	
Atípusos pneumoniabaktériumok	Vírusok
<i>Legionella pneumophila</i>	Influenza A
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Influenza B
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Adenovírus
	Koronavírus
	Parainfluenza-vírus
	Respiratory syncytial vírus
	Humán rhinovírus/enterovírus
	Humán metapneumovírus
	Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)

ESBL = kiterjesztett spektrumú béta-laktamáz; MERS-CoV = közlekeleti légúti koronavírus; MRSA = meticillinrezisztens *Staphylococcus aureus*; PCR = polimeráz-láncreakció

kópiaszám függvényében, $10^4 - >10^7$ relatív csíraszám-ban (CFU) adja meg. Klinikai vizsgálatok igazolták, hogy a teszttel kapott gyors eredmény segítségével javítható a pneumonia kezelésének hatékonysága, csökkenthető a fertőzés miatt kórházban töltött napok száma és csökkenthető a felhasznált antibiotikumok mennyisége. Segítheti a kezelés optimalizálását, akár az antibakteriális terápia eskalációjával, de még inkább annak deeskalációjával [4–6].

Közleményünkben a laboratóriumunkban végzett BioFire FilmArray Pneumonia PCR-vizsgálat eredményeinek összefoglaló elemzését kívánjuk bemutatni.

Anyagok és módszerek

A Semmelweis Egyetem Laboratóriumi Medicina Intézetének Mikrobiológiai Laboratóriumában egy év alatt (2020. október 1. – 2021. szeptember 30.) végzett, összesen 820 BioFire Pneumonia teszt eredményét vontuk be vizsgálatunkba. A köpet-, BAL- és tracheaspirátum-mintákat a Semmelweis Egyetem klinikáiról, illetve kis részben külső beküldő intézményekből fogadtuk. A minták 80%-a intenzív terápiás osztályról érkezett. Egy beteg

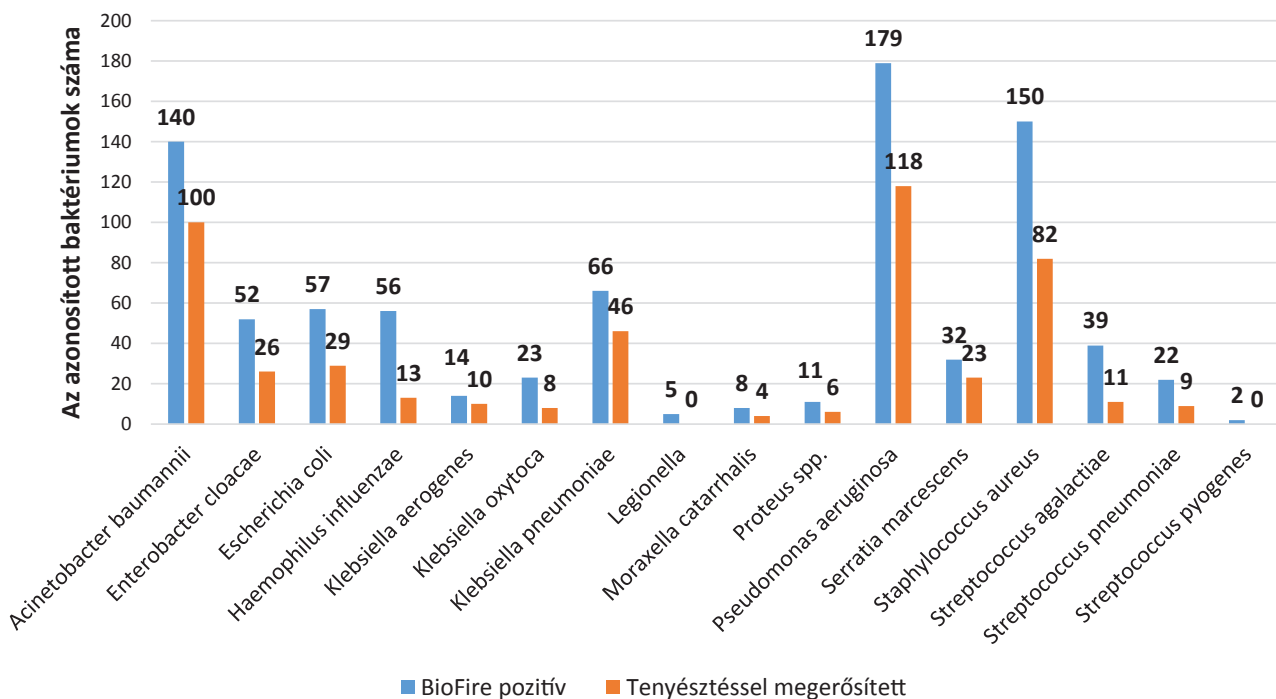
több mintáját is vizsgáltuk abban az esetben, ha a minták vétele között legalább öt nap eltel.

A PCR-vizsgálatokat a gyártó útmutatásának megfelelően végeztük. A PCR-folyamat minőségét ellenőrző belső kontrollok megfelelő amplifikálódását minden esetben ellenőriztük. A mintákból emellett a klasszikus tenyésztést is elvégeztük, a szakma szabályának megfelelően. A kitenyésztett kórokozók azonosítása „matrix-assisted laser desorption ionization–time-of-flight” (MALDI-TOF) tömegspektrométerrel, antibiotikumérzékenységük meghatározása a European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) iránymutatása szerint korongdiffúziós módszerrel, illetve szükség esetén a minimális inhibitoros koncentráció (MIC) meghatározásával történt. A vizsgált időszak magában foglalja a SARS-CoV-2-járvány (2019) magyarországi második és harmadik hullámát. Emiatt a legtöbb beteg esetében SARS-CoV-2-PCR-vizsgálat is történt laboratóriumunkban, az alsó légúti mintát megelőzően vagy azzal párhuzamosan vett orr-garat törletből, ritkábban magából az alsó légúti mintából.

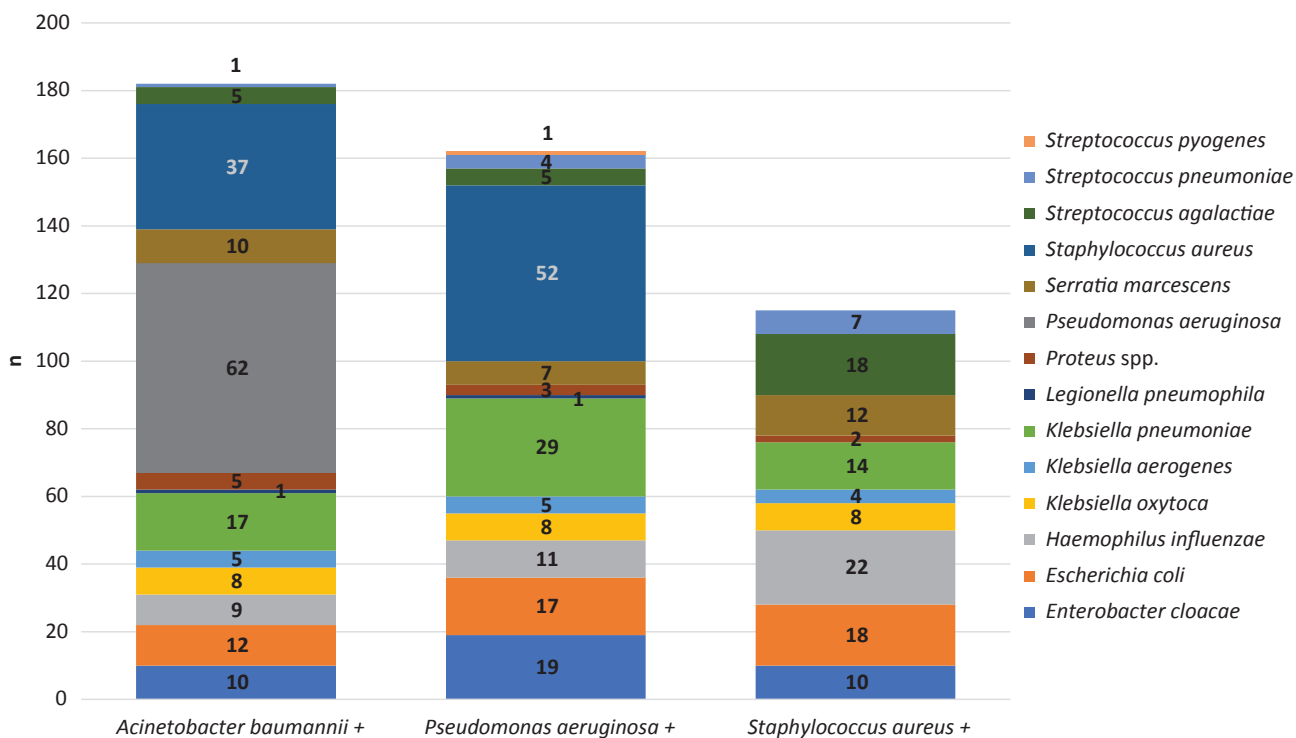
Eredmények

A 820 vizsgált mintából 494 esetén (60,2%) kaptunk pozitív eredményt a PCR-panelvizsgálattal. A pozitív mintákban a *Pseudomonas aeruginosa* (179/494, 36,2%), a *Staphylococcus aureus* (150/494, 30,3%), az *Acinetobacter baumannii* (140/494, 28,3%), a *Klebsiella pneumoniae* (66/494, 13,3%) és az *Escherichia coli* (57/494, 11,5%) bizonyult az öt leggyakoribb kórokozónak. Az atípusos baktériumok közül csak a *Legionellát* detektáltuk, mindössze 5 mintában (1%). A pozitív minták felében egy kórokozót azonosított a teszt, míg 139 mintában (28,1%) két, 62 mintában (12,5%) három, 23 mintában (4,6%) négy, 12 mintában (2,4%) öt, 6 mintában (1,2%) hat patogént detektált. Egy-egy mintában (0,2%) hét, illetve nyolc kórokozó került egyidejűleg azonosításra. A molekuláris módszerrel azonosított mindösszesen 856 baktérium közül 485 baktériumot (56%) sikerült kitenyészteni. A PCR-panellel kimutatott baktériumok megoszlását és emellett a tenyésztéssel nyert eredményeket az 1. ábra mutatja be. A BioFire-vizsgálattal polimikrobásként azonosított mintákban a társuló baktériumok összetételét a 2. ábra szemlélteti, a három leggyakrabban azonosított kórokozó vonatkozásában. Az *A. baumannii*, a *P. aeruginosa* és a *S. aureus* együtt is gyakran fordult elő. A *S. aureus*hoz a *Haemophilus influenzae* és a *Streptococcus agalactiae* gyakrabban társult, mint a másik két kórokozóhoz.

A PCR- és a tenyésztési eredmények közötti diszkrepanciáról a következőket állapítottuk meg. Összesen 253 olyan minta volt, mely esetében a pozitív PCR-eredményt tenyésztéssel nem sikerült teljes egészében (minden kórokozó tekintetében) megerősíteni. Vírusgép-pozitív minták esetén ez értelemszerű, a pozitív bakteriális PCR-eredmények esetén viszont további elemzést ígé-



1. ábra | A BioFire Pneumonia PCR-vizsgálattal és a párhuzamosan végzett tenyésztéssel igazolt baktériumok és számuk



2. ábra | A polimikrobás mintákban társuló baktériumok összetétele a három leggyakrabban azonosított kórokozó vonatkozásában

nyel. *Legionella* fajok tenyésztését laboratóriumunk nem végzi. A csak PCR-rel detektált baktériumok (n = 371) 44,5%-ában 10^4 volt a PCR alapján becsült relatív csíraszám, 25,6%-ban azonban 10^5 , 15,4%-ban 10^6 és 12,7%-ban 10^7 .

A PCR-negatív, míg tenyésztéssel -pozitív eredményt adó minták esetében az eltérést döntően olyan kóroko-

zók adták, melyek a PCR-rendszer vizsgálati spektrumában nincsenek benne. A mindösszesen 109 tenyésztéssel kimutatott, de PCR-rel nem detektált kórokozóból 80 (73%) esetében ez az eltérés magyarázata. A csak tenyésztéssel detektált (a PCR célspektrumában nem szereplő) kórokozókat és számukat a 2. táblázat foglalja össze. A kitenyésztett baktériumok közül a *Stenotropho-*

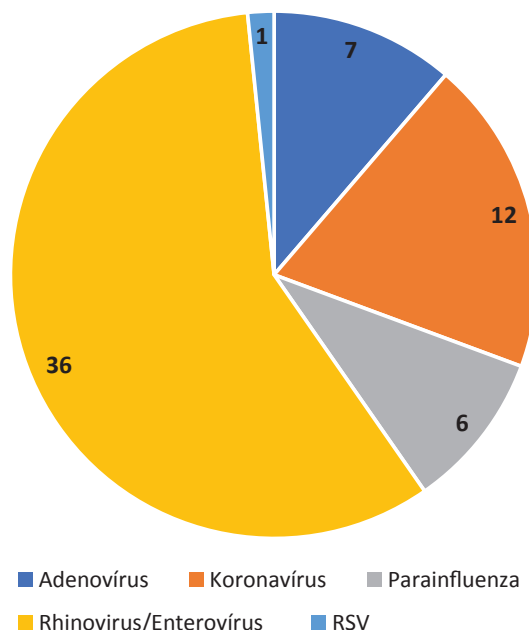
2. táblázat | A tenyésztéssel kimutatott, de a PCR-teszt célspektrumából hiányzó kórokozók száma (n = 80)

Species	n
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	3
<i>Aeromonas</i> spp.	3
<i>Aspergillus</i> spp.	21
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	1
<i>Burkholderia cenocepacia complex</i>	6
<i>Chryseobacterium</i> spp.	6
<i>Citrobacter</i> spp.	7
<i>Morganella morganii</i>	2
<i>Cryptococcus neoformans</i>	1
<i>Mucor</i> spp.	1
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	1
<i>Rhizobium radiobacter</i>	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	25
<i>Streptococcus pseudopneumoniae</i>	1
<i>Pseudomonas luteola</i>	1

PCR = polimeráz-lánreakció

monas maltophilia felel a diszkrepancia nagy részéért (23%). A mintákból kitenyésztett *Candida* fajokat nem tekintettük alsó légúti kórokozóknak [7]. A minták 7,2%-ában detektált a PCR-panel légútívirus-gént. Ezek számát és megoszlását a 3. ábra mutatja be.

A PCR-panelben lévő rezisztenciagének közül a *mecA/C* (MRSA) 56, a CTX-M (ESBL) 32, a VIM (karbapenemáz) 12, míg az OXA-48 (karbapenemáz) és IMP (karbapenemáz) gének egy-egy mintából kerültek kimutatásra. Az antibiogram az esetek 40,2%-ában (41/102) megerősítette a rezisztenciagén jelenlétét.



3. ábra | A BioFire PCR-vizsgálattal kimutatott vírusok és azok eloszlása

A *mecA/C* gén jelenlétét 34%-ban, a CTX-M génét 53,1%-ban (13 *K. pneumoniae* és 3 *E. coli* izolátumban), a VIM génét 41,7%-ban (5 *P. aeruginosa* izolátumban) erősítette meg a tenyésztés és az antibiogram-vizsgálat is. Az OXA-48 és IMP gének jelenlétét nem sikerült tenyésztéssel is igazolni.

A minták 39,7%-a (326/820) igazoltan SARS-CoV-2-pozitív betegtől, 46,4%-a (381/820) pedig igazoltan SARS-CoV-2-negatív betegtől származott. Összesen 110 minta esetében (13,4%) a beteghez tartozó koronavírus-PCR-eredmény nem volt elérhető, mivel vagy más laboratórium végezte a koronavírus-vizsgálatot (külső beküldő intézmények esetén), vagy nem rendeltek a betegnek koronavírus-PCR-t. Összevetettük a SARS-CoV-

3. táblázat | A SARS-CoV-2-pozitív (n = 326) és -negatív (n = 381) betegek mintáiban detektált kórokozók száma és aránya

	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
SARS-CoV-2-pozitív betegek mintái	70 (21,5%)	22 (6,7%)	14 (4,3%)	23 (7,1%)	7 (2,1%)	6 (1,8%)	23 (7,1%)
SARS-CoV-2-negatív betegek mintái	38 (10%)	27 (7,1%)	38 (10%)	28 (7,3%)	5 (1,3%)	14 (3,7%)	34 (8,9%)

	<i>Proteus</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
SARS-CoV-2-pozitív betegek mintái	5 (1,5%)	75 (23%)	10 (3,1%)	84 (25,8%)	20 (6,1%)	7 (2,1%)	0
SARS-CoV-2-negatív betegek mintái	2 (0,5%)	73 (19,2%)	18 (4,7%)	56 (14,7%)	18 (4,7%)	14 (3,7%)	2 (0,5%)

	Adenovírus	Koronavírus	Parainfluenza	Rhinovirus/Enterovírus	RSV
SARS-CoV-2-pozitív betegek mintái	2 (0,6%)	1 (0,3%)	1 (0,3%)	3 (0,9%)	0
SARS-CoV-2-negatív betegek mintái	4 (1,0%)	11 (2,9%)	5 (1,3%)	29 (7,6%)	1 (0,3%)

RSV = respiratory syncytial vírus; SARS-CoV-2 = súlyos akut légúti tünetegyüttest okozó koronavírus-2

2-pozitív és -negatív betegek mintáiból kapott pozitív BioFire PCR-eredményeket. A koronavírus-pozitív betegek mintáinak 64,1%-a, míg a koronavírus-negatív betegek mintáinak 57%-a adott pozitív eredményt a BioFire Pneumonia PCR-teszttel. A kórokozók számát és arányát a két csoportban a 3. táblázat foglalja össze. A SARS-CoV-2-pozitív betegek mintáiban az *A. baumannii* aránya 21,5%, a *S. aureus* aránya 25,8% volt, míg a koronavírus-negatív betegek mintáiban 10%, illetve 14,7%. A PCR-rel azonosított rezisztenciagéneket tekintve csak a *mecA/mecC* (MRSA) gén esetén mutatkozott különbség a két csoport között: a SARS-CoV-2-pozitív betegek mintáiban 10,7%-ban, míg a SARS-CoV-2-negatív betegek mintáiban 4,2%-ban volt jelen. A SARS-CoV-2-pozitív betegek mintáinak 2,1%-ában, míg a SARS-CoV-2-negatív betegek mintáinak 13%-ában mutattunk ki egyéb légútívírus-gént.

A második és harmadik járványhullámot eltérő SARS-CoV-2-variánsok okozták, ezért az adatokat a két hullám szerint megosztva: 2020. október – 2021. január, illetve 2021. február – 2021. szeptember időszakokban is elemeztük. A második hullámban a koronavírus-pozitív betegek PCR-vizsgálatai 16,9%-ban *A. baumannii*- és 18,8%-ban *S. aureus*-pozitivitást mutattak, míg a harmadik hullámban az *A. baumannii* aránya 25,9%-ra, a *S. aureus* pedig 32,5%-ra emelkedett. A többi kórokozó esetében lényeges eltérést a két időszak között nem találtunk.

Megbeszélés

A kórokozó-specifikus antimikrobiális kezelés korai megkezdése súlyos fertőzésekben elsődleges cél. A gyors mikrobiológiai eredményt adó, szindrómaalapú multiplex PCR-panelek ehhez segítséget adnak. Ugyanakkor figyelembe kell vennünk e módszerek korlátait is. A detektált gének származhatnak már elhalt kórokozókból is [1]. A hatékony antimikrobiális kezelés, illetve az immunválasz hatására ezek a kórokozók már nem szaporodnak, a pneumonia további patomechanizmusában nem vesznek részt, maradvány nukleinsavuk mégis jelen van a légutakban. Akár egy hónapig is detektálható maradhat egy patogén génállománya a mintában. A PCR-rel és tenyésztéssel igazolt kórokozók száma közötti lényeges eltérés (856 *versus* 485) vizsgálatunkban részben ezt igazolja. A detektált rezisztenciagének vonatkozásában hasonló megállapítást tehetünk: a gén származhatott egy már elpusztult, így nem tenyészthető kórokozóból, de számolni kell azzal is, hogy a gén nem fejeződött ki fenotípusosan, és ezért nem mutatkozott az antibiogramban. A PCR által 10^4 vagy 10^5 csíraszámban detektált baktériumokat 70%-ban tenyésztéssel nem tudtuk igazolni. Kérdéses, hogy a BioFire Pneumonia PCR-teszttel ilyen alacsony csíraszámokban kimutatott baktériumok klinikailag mennyire relevánsak [8]. A PCR-rel 10^6 vagy 10^7 csíraszámokban kimutatott baktériumok 28%-át ugyanis csak nem sikerült kitenyészteni. Magyarán szólva

a minta antibiotikumtartalma vagy felső légúti kontamináció esetében a polimikrobás környezet mátrixhatása. A ki nem tenyészett kórokozók 23%-át a *H. influenzae* adta.

A mikrobiológiai vizsgálatok eredményességét befolyásolja, hogy a mintavétel és a feldolgozás között mennyi idő telik el. A mikrobiológiai vizsgálatok elrendelésének időpontja az informatikai rendszerben rögzítésre kerül, azonban a mintavétel pontos időpontja és a minta laboratóriumba érkezése közt eltelt pontos időre nincs rálátásunk. A minták a laboratóriumba érkezést követően lehetőség szerint azonnal feldolgozásra kerültek. A PCR-rendszer kapacitása és a laboratórium nappali munkarendje azonban korlátozta, hogy a PCR-vizsgálat mikor történt meg. A mintákat a PCR-tesztig $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. E preanalitikai tényezőket a tenyésztés és a PCR közti különbségek értékelésekor szintén figyelembe kell venni.

Egy PCR-rel kimutatott kórokozó tényleges kóroki szerepének megítélése légúti mintában újabb problémát jelent. A BAL-minta esetében kevésbé, köpetminta esetén viszont mindig számolni kell azzal, hogy egy fakultatív patogén baktérium (például *S. aureus*, bélbaktérium) a felső légutakat kolonizálja, és ily módon (a pneumonia szempontjából irreleváns) mellékleletként fog megjelenni a PCR-eredményben. A tenyésztéssel párhuzamosan végzett mikroszkópos kenet eredménye: a kenetben lévő fehérvérsejtek száma alkalmasint segítheti a 'kolonizáció vagy infekció' kérdés eldöntését, de ez már egy PCR mellett végzett egyéb laboratóriumi vizsgálat. Egy multiplex PCR-rendszer célspektrumát nem lehet (és nem is célszerű) határtalanul növelni. Minél több kórokozóra specifikálnak egy tesztet, annál nagyobb a valószínűsége, hogy egy-egy kórokozó vonatkozásában a teszt érzékenysége csökken. A BioFire FilmArray Pneumonia PCR-teszt esetében is igazolták, hogy a különböző kórokozók kimutatásának szenzitivitása eltérő: mérsékelt szenzitivitással rendelkezik az influenza A H1/2009 (73%), az influenza B- (77%) és az adenovírus (57%) esetén [1]. Mindig lesznek olyan kórokozók, melyek kimutatására egy panel nem alkalmas. Hogy egy PCR-rendszer milyen irányban érdemes változtatni, azt a helyi epidemiológiai viszonyokhoz kell igazítani. A 2. táblázatban bemutatott eredményeink alapján a *S. maltophilia* kimutathatóságára érdemes lenne törekedni. Kórházban szerzett, illetve lélegeztetéssel összefüggő pneumonia esetén számolni kell e multirezisztens baktériummal. Egy amerikai vizsgálat 2%-ban detektált *S. maltophiliiát* a mintáiban, ami eredményünkkel (3%) szinte megegyező [9]. Van olyan, kifejezetten kórházi pneumóniák diagnosztikájára kidolgozott multiplex PCR-rendszer (Curetis Unyvero Hospitalized Pneumonia Panel), melynek része a *S. maltophilia* is [10].

A mintában lévő bizonyos anyagok (például egyes gyógyszerek) gátolhatják a PCR-t. Ilyen esetekben a belső kontrollok sem amplifikálódnak, így a PCR eredménye nem értékelhető. A jelenség ritka, mindössze három inhibitoros minta fordult elő vizsgálatunkban. Egy klini-

kai mintákra validált multiplex PCR-rendszer korlátainak sorában jelentős tényező annak magas ára is [11].

Több vizsgálat igazolta, hogy a SARS-CoV-2 melletti koinfekciók ritkák (3–7%), számolni kell azonban a kórházi kezelés, illetve a gépi lélegeztetés időtartamával összefüggően megjelenő bakteriális szuperinfekciókkal [12, 13]. Az *A. baumannii* COVID-19-pozitív betegek csoportjában detektált 21,5%-os aránya aggodalomra ad okot, tekintve az *A. baumannii* okozta nosocomialis pneumoniák 30–75%-os mortalitási rátáját, a multirezisztens törzsek korlátozott antibiotikumérzékenységét és a kolisztinrezisztens törzsek kb. 3%-os előfordulását [14]. A *P. aeruginosa* 21,8%-os aránya az általunk vizsgált mintákban szintén a nosocomialis eredetű fertőzések jelentőségét mutatja. Fontos megjegyeznünk, hogy a tenyésztéssel igazolt *A. baumannii* törzsek 96%-a multirezisztens, a tenyésztéssel igazolt *P. aeruginosa* törzsek 49,2%-a karbapenemrezisztens volt, ami a szóba jövő antibakteriális szerek körét igen szűkre korlátozta. A SARS-CoV-2-fertőzést komplikáló szekunder infekciók gyakran polimikrobás, kevert fertőzések [15]. Ezt mutatja eredményünk is: a SARS-CoV-2-pozitív betegek mintáinak 65%-ában több kórokozó egyidejű jelenlétét detektáltuk. Az *A. baumannii* és *P. aeruginosa* fertőzésekhez gyakran társuló *S. aureus* még inkább komplikálja a terápia megválasztását.

A SARS-CoV-2-világjárvány megjelenésével más légúti vírusok előfordulási gyakorisága lényegesen csökkent [16]. Eredményünk is ezt igazolta. Az influenzavírusok teljesen kiszorultak a légúti vírusok köréből a vizsgált időszakban, és az egyéb vírusok jelenléte is csekély volt. A detektált vírusok és azok eloszlása nagyban egyezik egy dél-afrikai vizsgálat eredményével [17].

A BioFire Pneumonia PCR-teszt alapján a leggyakoribb rezisztenciagén a *mecA/C* volt. Összevetve eredményünket egy átfogó európai vizsgálat, megállapítható, hogy a CTX-M gén az általunk vizsgált mintákban ritkábban (3,9% vs. 5,4%), míg a *mecA/C* gyakrabban (6,8% vs. 4,3%) fordult elő [18]. A PCR-vizsgálattal és a tenyésztéssel kapott eredmények közti eltérés a már említetteken túl azzal is magyarázható, hogy az alacsony csíraszámú PCR-rel detektált, a rezisztenciagént feltételezően hordozó baktériumot sok esetben nem sikerült kitenyészteni. A PCR-rel, illetve antibiogrammal igazolt antibiotikumrezisztencia közti diszkrpanciát más vizsgálat is igazolta, eredményünkkel nagyságrendileg megegyező mértékben (33,3% vs. 40,2%) [19, 20]. Fontos rögzíteni, hogy a PCR-panelek csak néhány rezisztenciagént tartalmaznak, míg a hagyományos tenyésztésen alapuló vizsgálattal az antibiotikumrezisztenciát egészében tudjuk értékelni, annak pontos mechanizmusától függetlenül. A tenyésztés alapján ESBL-termelőnek bizonyuló baktériumok 30%-át a BioFire CTX-M-negatívnak, a karbapenemrezisztens *P. aeruginosa* törzsek 91%-át a BioFire karbapenemnegatívnak adta. A rezisztencia hátterében a CTX-M-től, illetve a panelben lévő karba-

penemázgénekéntől eltérő, számos egyéb mechanizmus állhatott. Ez is bizonyítja, hogy az antibiotikumérzékenység meghatározásának szükségessége miatt a tenyésztés egyelőre nem nélkülözhető, PCR-vizsgálattal nem helyettesíthető.

A molekuláris technika fejlődése és az újgenerációs szekvenálási módszerek elterjedése miatt a jövőben várható, hogy kizárólag molekuláris tesztek alapján komplett mikrobiológiai eredmények kerüljenek közlésre. Az „operational taxonomic units” rendszerekben a riboszomális gének komparatív analízisével rengeteg, nem tenyészthető mikroorganizmust is azonosítanak.

Retrospektív vizsgálatunk korlátja, hogy kizárólag a mikrobiológiai vizsgálati leletekre alapul, minden klinikai adatot nélkülöz (így az oltottsági statuszt is), a BioFire Pneumonia PCR-tesztek eredményeinek klinikai döntéshozatalban játszott szerepéről nem ad információt.

Következtetés

A pneumoniák mikrobiológiai diagnosztikájára kidolgozott BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel költséges, de egyszerűen használható és két órán belül eredményt adó módszer. Széles célspektruma miatt a kórházban szerzett pneumonia gyakori kórokozóinak, így az *A. baumannii* vagy a *P. aeruginosa* kimutatására is alkalmas. A PCR-panel célspektrumában nem szereplő kórokozók jelentősége miatt a pneumoniaspecifikus multiplex PCR-vizsgálatokat tenyésztéssel együtt javasolt végezni. Bár a rendszer alkalmas hét gyakori rezisztenciagén, köztük a *mecA/C* (MRSA) gén kimutatására, az antibiotikumrezisztenciák multifaktoriális volta miatt a tenyésztésen alapuló fenotípusos vizsgálatokat egyelőre nem lehet elhagyni. Az alsó légúti mintából a multiplex PCR-rendszerrel nyert eredmény klinikai értelmezése a beteg kezelő orvos feladata [21, 22].

Anyagi támogatás: A vizsgálatok elvégzése és a dolgozat megírása anyagi támogatásban nem részesült. A szerzőknek a teszt gyártójával nincs kapcsolatuk.

Szerzői munkamegosztás: K. S.: A kézirat elkészítése, a hipotézisek kidolgozása, vizsgálat lefolytatása, statisztikai elemzések végzése, a kézirat megszövegezése. J. E.: A kézirat elkészítése, a hipotézisek kidolgozása, vizsgálat lefolytatása, statisztikai elemzések, a kézirat megszövegezése. I. M.: Vizsgálat lefolytatása, a kézirat megszövegezése, javítása. Sz. E.: Vizsgálat lefolytatása, a kézirat megszövegezése, javítása. F. P., Sz. K.: Vizsgálat lefolytatása. K. K.: Hipotézisek kidolgozása, vizsgálat lefolytatása, statisztikai elemzések, a kézirat megszövegezése. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

Irodalom

- [1] Ramanan P, Bryson AL, Binnicker MJ, et al. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31: e00024-17.
- [2] Lee SH, Ruan SY, Pan SC, et al. Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. *J Microbiol Immunol Infect.* 2019; 52: 920–928.
- [3] bioMérieux. BIOFIRE® FILMARRAY® Pneumonia *plus* Panel. Available from: <https://www.biomerieux-diagnostics.com/biofire-filmarray-pneumonia-panel> [accessed: 10 April 2022].
- [4] Gilbert DN, Leggett JE, Wang L, et al. Enhanced detection of community-acquired pneumonia pathogens with the BioFire® Pneumonia FilmArray® Panel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021; 99: 115246.
- [5] Endicott-Yazdani TR. Concordance of BioFire Pneumonia Panel with traditional respiratory bacterial culture results. In TP93. TP093 New developments in diagnostics and treatments of pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2021; 203: A3869.
- [6] Furukawa D, Kim B, Jeng A. 2002. BioFire® Filmarray® Pneumonia Panel: a powerful rapid diagnostic test for antimicrobial stewardship. *Open Forum Infect Dis.* 2019; 6(Suppl 2): S671.
- [7] Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, et al. Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. *Intensive Care Med.* 2009; 35: 1526–1531.
- [8] Kolenda C, Ranc AG, Boisset S, et al. Assessment of respiratory bacterial coinfections among severe acute respiratory syndrome coronavirus 2-positive patients hospitalized in intensive care units using conventional culture and BioFire, FilmArray Pneumonia Panel *plus* assay. *Open Forum Infect Dis.* 2020; 7: ofaa484.
- [9] Webber DM, Wallace MA, Burnham CAD, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for detection of viral and bacterial pathogens in lower respiratory tract specimens in the setting of a tertiary care academic medical center. *J Clin Microbiol.* 2020; 58: e00343-20.
- [10] Tellapragada C, Giske CG. The Unyvero Hospital-Acquired Pneumonia Panel for diagnosis of secondary bacterial pneumonia in COVID-19 patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021; 40: 2479–2485. Erratum: *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021 Sep 13. PMID: 33661410; PMCID: PMC7930892.
- [11] Babady NE. The FilmArray® respiratory panel: an automated, broadly multiplexed molecular test for the rapid and accurate detection of respiratory pathogens. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013; 13: 779–788.
- [12] Lansbury L, Lim B, Baskaran V, et al. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020; 81: 266–275.
- [13] Pasero D, Cossu AP, Terragni P. Multi-drug resistance bacterial infections in critically ill patients admitted with COVID-19. *Microorganisms* 2021; 9: 1773.
- [14] Manchanda V, Sanchaita S, Singh NP. Multidrug resistant acinetobacter. *J Glob Infect Dis.* 2010; 2: 291–304.
- [15] Fontana C, Favaro M, Minelli S, et al. Co-infections observed in SARS-CoV-2 positive patients using a rapid diagnostic test. *Sci Rep.* 2021; 11: 16355.
- [16] Calcagno A, Ghisetti V, Burdino E, et al. Co-infection with other respiratory pathogens in COVID-19 patients. *Clin Microbiol Infect.* 2021; 27: 297–298.
- [17] Mitton B, Rule R, Said M. Laboratory evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel compared to conventional methods for the identification of bacteria in lower respiratory tract specimens: a prospective cross-sectional study from South Africa. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021; 99: 115236.
- [18] Ginocchio CC, Garcia-Mondragon C, Mauerhofer B, et al. Multinational evaluation of the BioFire® FilmArray® Pneumonia *plus* Panel as compared to standard of care testing. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2021; 40: 1609–1622.
- [19] Caméléna F, Poncin T, Dudoignon E, et al. Rapid identification of bacteria from respiratory samples of patients hospitalized in intensive care units, with FilmArray Pneumonia *plus* Panel. *Int J Infect Dis.* 2021; 108: 568–573.
- [20] Foschi C, Zignoli A, Gaibani P, et al. Respiratory bacterial coinfections in intensive care unit-hospitalized COVID-19 patients: conventional culture *vs* BioFire FilmArray Pneumonia *plus* Panel. *J Microbiol Methods* 2021; 186: 106259.
- [21] Rojkovich B, Németh D, Török E, et al. Immunogenicity and safety of the BNT162b2 mRNA COVID-19 vaccine in health-care workers. [A BNT162b2 mRNS-Pfizer-BioNTech védőoltás hatékonyságának és immunogénitásával monitorozása egészségügyben dolgozókon.] *Orv Hetil.* 2021; 162: 1551–1557. [Hungarian]
- [22] Szekanez Z, Bogos K, Constantin T, et al. Antiviral and anti-inflammatory therapies in COVID-19. [Antivirális és gyulladáscsökkentő kezelési lehetőségek COVID-19-ben.] *Orv Hetil.* 2021; 162: 643–651. [Hungarian]

(Károlyi Sándor dr.,

Budapest, Nagyvárad tér 4., 14. emelet, 1083
e-mail: karolyi.sandor@med.semmelweis-univ.hu)

SZEGEDI BELVÁROSI RENDELŐ

Szeretném megtalálni azt a foglalkozás egészségügyi kollégát,
aki szegedi belvárosi, közkedvelt, és ismert, jól felszerelt, hangulatos rendelóm
bérleti jogát átvinné és tevékenységemet a pacientúrával tovább folytatná.

Tel.: +36 30 953 7536

email: babka89@t-online.hu

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)