

Estudio multicéntrico argentino sobre la utilidad del panel de neumonía de *FilmArray*[®]

- Rolando Soloaga^{1a*}, Laura Barcán^{2b}, Marisa Bettiol^{3c}, Natalia Carrión^{4a}, Wanda Cornistein^{5d}, Analía De Cristofano^{6b}, Sofía Esposto^{7e}, Graciela Greco^{8b}, Alejandra Margari^{9a}, Sebastián Oderiz^{8e}, Verónica Paz^{2c}, Juan Pidone^{4a}, Alejandra Rodríguez^{3c}, María Staneloni^{2b}, Cecilia Vescina^{3e}, Viviana Vilches^{3b}, Mariangeles Visus^{8b}

¹ Doctor en Bioquímica.

² Médica Infectóloga.

³ Bioquímica.

⁴ Bioquímica/o, Especialista en Microbiología Clínica.

⁵ Médica Especialista en Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas.

⁶ Médica Infectóloga.

⁷ Médica Especialista en Pediatría e Infectología Pediátrica.

⁸ Médica Especialista en Enfermedades Infecciosas.

⁹ Bioquímica/o, Especialista en Bacteriología Clínica.

^a Hospital Naval Cirujano Mayor Pedro Mallo, Buenos Aires.

^b Hospital Italiano, Buenos Aires.

^c Sanatorio de Los Arcos, Buenos Aires.

^d Hospital Austral, Pilar, Buenos Aires.

^e Hospital de Niños Sor María Ludovica, La Plata.

* Autor para correspondencia.

Resumen

Las infecciones de las vías respiratorias inferiores se encuentran entre aquellas en las que el uso inadecuado de antimicrobianos es frecuente, por lo que es fundamental contar con una prueba diagnóstica rápida, sensible y específica. El sistema de *FilmArray* es un análisis de PCR múltiple con un panel de neumonía que incluye 26 microorganismos y 7 marcadores de resistencia antimicrobiana. Los objetivos de este estudio fueron: a) establecer la correlación entre los cultivos cuantitativos para agentes bacterianos de muestras de vías respiratorias inferiores (MRVB) y la detección fenotípica de mecanismos de resistencia con los correspondientes resultados de *FilmArray*; b) determinar el cambio terapéutico generado con el informe del resultado inmediato. Se incluyó un total de 194 MRVB correspondientes a 191 pacientes con neumonía y se documentaron 277 bacterias. *FilmArray* identificó 253/277 (91%) bacterias y 161/277 (58%) se aislaron del cultivo, 58 (23%) coincidieron con el mismo recuento, 116 (46,7%) dieron mayores recuentos con *FilmArray* y 72 (28,9%) fueron detectadas por este método pero el cultivo fue negativo. Se detectaron marcadores de resistencia antimicrobiana en 63 aislados, pero solo 28 fueron confirmados por métodos fenotípicos. Estos resultados podrían haber provocado cambios en el tratamiento antibiótico en el 74,6% (174/194). *FilmArray* es una herramienta útil para optimizar el tratamiento antimicrobiano en pacientes con neumonía.

Palabras clave: *FilmArray*; Neumonía; Diagnóstico

Argentine multicenter study on the utility of the FilmArray[®] pneumonia panel

Abstract

Lower respiratory tract infections are among those in which the inappropriate use of antimicrobials is common, so it is essential to have a rapid, sensitive and specific diagnostic test. The FilmArray system is a multiplex PCR assay with a pneumonia panel that includes 26 microorganisms and 7 antibiotic resistance markers. The objectives of this study were: a) to estab-

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957 (impresa)

ISSN 1851-6114 (en línea)

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

lish the correlation between quantitative cultures for bacterial agents from lower respiratory tract samples (MRVB) and the phenotypic detection of resistance mechanisms with the corresponding results of FilmArray b) to determine the therapeutic change generated with the immediate result report. A total of 194 MRVB corresponding to 191 patients with pneumonia were included and 277 bacterial strains were documented. FilmArray identified 253/277 (91%) bacteria and 161/277 (58%) were isolated from culture, 58 (23%) matched the same count, 116 (46.7%) yielded higher counts with FilmArray, and 72 (28.9%) with negative culture were detected by this method. Antibiotic resistance markers were detected in 63 strains, but only 28 were confirmed by phenotypic methods. These results may cause changes in the antimicrobial treatment in 74.6% (174/194). FilmArray is a useful tool to optimize antimicrobial therapy in patients with pneumonia.

Keywords: FilmArray; Pneumonia; Diagnostic

Estudo multicêntrico argentino sobre a utilidade do painel de pneumonia FilmArray®

Resumo

As infecções do trato respiratório inferior estão entre aquelas em que o uso inadequado de antimicrobianos é comum, por isso é essencial um teste diagnóstico rápido, sensível e específico. O sistema FilmArray é um ensaio de PCR múltiplo com um painel de pneumonia que inclui 26 microrganismos e 7 marcadores de resistência antimicrobiana. Os objetivos deste estudo foram: a) estabelecer a correlação entre as culturas quantitativas de agentes bacterianos de amostras do trato respiratório inferior (MRVB) e a detecção fenotípica de mecanismos de resistência com os resultados correspondentes do FilmArray b) determinar a alteração terapêutica gerada com o relatório de resultado imediato. Um total de 194 MRVB correspondendo a 191 pacientes com pneumonia foram incluídos e 277 cepas bacterianas foram documentadas. FilmArray identificou 253/277 (91%) bactérias e 161/277 (58%) foram isoladas da cultura, 58 (23%) coincidiram com mesma contagem, 116 (46,7%) deram contagens mais altas com FilmArray e 72 (28,9%) foram detectados por este método, mas a cultura foi negativa. Marcadores de resistência antimicrobiana foram detectados em 63 cepas, mas apenas 28 foram confirmados por métodos fenotípicos. Esses resultados puderam causar alterações no tratamento antibiótico em 74,6% (174/194). FilmArray é uma ferramenta útil para otimizar a terapia antimicrobiana em pacientes com pneumonia.

Palavras-chave: FilmArray; Pneumonia; Diagnóstico

Introducción

Las infecciones del tracto respiratorio inferior se encuentran dentro de aquellas donde el uso inadecuado de antimicrobianos es elevado, en muchos casos debido a la falta de diagnóstico etiológico, lo cual es muy frecuente sobre todo en la neumonía adquirida en la comunidad (1) (2) (3) (4) (5).

La falta de diagnóstico microbiológico lleva a que muchos de los tratamientos sean empíricos y a veces con antibióticos de un mayor espectro y por un tiempo más prolongado de lo necesario, lo que puede asociarse a un alto costo, a la presión de selección de cepas resistentes, a diarrea por *Clostridioides difficile* y en algunos casos, incluso, a una importante toxicidad (1) (2) (3) (4) (5).

Por otro lado, la morbilidad y la mortalidad pueden ser muy altas en ciertos grupos de riesgo, principalmente si el tratamiento empírico no es efectivo contra el agente infeccioso (1) (2) (3) (4) (5).

Todo esto indica que es crucial contar con un *test* rápido y al mismo tiempo sensible y específico que permita establecer si la neumonía es de causa viral o bacteria-

na, si se trata de agentes virales que podrían recibir un tratamiento específico (p. ej. influenza y oseltamivir) y si se está en presencia de bacterias sensibles o multirresistentes (1) (2) (3) (4) (5).

Las técnicas moleculares que permiten obtener resultados rápidos en el día pueden ser herramientas fundamentales para adecuar la terapia antimicrobiana desde el comienzo, pero hay que tener en cuenta que las mismas deberían incluir a múltiples analitos y a la vez ser cuantitativas o semicuantitativas para ayudar a diferenciar colonización de infección bacteriana (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14).

El sistema de *FilmArray*® (*BioFire*®, Salt Lake City UT, EE.UU.) con su panel de neumonía (PP) es una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) múltiple que incluye a 26 microorganismos frecuentemente relacionados con neumonía y a 7 genes de resistencia; los resultados se obtienen a partir de muestras respiratorias bajas (esputo, lavado broncoalveolar broncoscópico y no broncoscópico o secreciones traqueales) en 1 h con un tiempo de preparación de las mismas de 2-3 min y se presentan en forma semicuantitativa (copias/mL) para

las bacterias que usualmente producen neumonía, a excepción de *Legionella pneumophila*, *Chlamydia pneumoniae* y *Mycoplasma pneumoniae* y de virus, donde el resultado fue cualitativo (positivo o negativo).

El objetivo del presente trabajo fue establecer a partir de muestras de vías respiratorias bajas (MRVB): a) la correlación entre el cultivo cuantitativo o semicuantitativo (QC) (UFC/mL) y el PP (copias/mL) de agentes bacterianos, b) la correlación entre la detección fenotípica de resistencias y los correspondientes resultados obtenidos con el PP y c) el potencial cambio terapéutico generado con la comunicación inmediata del resultado del PP.

Materiales y Métodos

Este trabajo multicéntrico colaborativo de 5 hospitales de la Argentina se realizó en forma prospectiva y observacional durante los meses de julio a noviembre de 2019 e incluyó un total de 194 MRVB consecutivas (59 lavados broncoalveolares obtenidos por fibrobroncoscopia, 39 lavados broncoalveolares no broncoscópicos, 85 aspirados traqueales y 11 esputos). Estas muestras correspondían a 191 pacientes (194 episodios) con criterios clínicos y radiológicos de neumonía: 90 casos de la comunidad, 86 adquiridos en el hospital (54 de ellos en asistencia respiratoria mecánica) y 18 pacientes con neumonía asociada a cuidados de la salud. El rango de edades de los pacientes incorporados al estudio fue de 9 días a 89 años con una mediana de edad en los adultos de 57,8 años y en los pediátricos menores de 1 año, de 11,04 meses; 59% fueron de sexo masculino y 41% de sexo femenino. Los resultados del estudio no fueron usados para tomar conducta terapéutica aunque se registró el potencial cambio en antibioticoterapia que el Servicio de Infectología de cada institución hubiera indicado; el motivo de esto radica en que en el momento de su realización, este método no tenía aprobación de ANMAT para diagnóstico clínico.

El procesamiento de las muestras y la interpretación final fue realizada acorde a lo sugerido en el procesamiento de muestras respiratorias por Lopardo *et al.* (15).

Las MRVB procesadas cumplieron con criterios citológicos de calidad para ser incluidas en el protocolo; en el caso de las muestras de esputo y de aspirado traqueal debían presentar <10 células epiteliales escamosas y >25 leucocitos, en ambos casos por campo con aumento de 100X y en el caso de lavado broncoalveolar (broncoscópico o no) debían presentar <1% de células epiteliales escamosas (15).

A todas las MRVB se les realizó como mínimo coloración de Gram y en algunos casos coloraciones complementarias (Ziehl Neelsen, Giemsa, Blanco de Calcofluor) y luego se sembraron en forma semicuantitativa (esputos) o cuantitativa (aspirados traqueales y lavados broncoalveolares broncoscópicos y no broncoscópicos).

Para el procesamiento de la secreciones traqueales, previamente se mezclaron volúmenes iguales de la muestra con N-acetil cisteína al 1%, se homogeneizó por agitación con vórtex por 2-3 min y luego se sembraron 100 µL de las diluciones 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10 000 y 1/100 000 en placas de agar sangre, agar chocolate, CLDE o agar MacConkey; todas se incubaron a 35 °C por 48 h en atmósfera con 5-10% de CO₂ (agar sangre y agar chocolate) y en aerobiosis (CLDE o agar MacConkey). El procesamiento en cuanto a diluciones, volumen sembrado, medios empleados, tiempo y temperatura de incubación, fue igual para los lavados broncoalveolares (broncoscópicos y no broncoscópicos), pero los mismos no fueron mezclados inicialmente con N-acetil cisteína.

Solo se consideraron aquellos aislamientos que alcanzaron los puntos de corte establecidos para cada muestra o bien aquellos correspondientes a un recuento de una dilución por debajo de éste, de una cepa potencialmente neumopatógena (*Staphylococcus aureus*, estreptococos beta-hemolíticos, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Streptococcus pneumoniae* y bacilos gram negativos) y que el Servicio de Infectología considerara clínica y radiológicamente como el probable agente etiológico (15). En el caso del lavado broncoalveolar (broncoscópico o no) se tomó el valor de 10⁴ UFC/mL como punto de corte y para secreciones traqueales/esputo el de 10⁶ UFC/mL. Para *L. pneumophila* (n=2) y *M. pneumoniae* (n=2) solo se consideró el resultado cualitativo positivo del PP ya que no se realizaron cultivos adecuados para los mismos y tampoco se realizó la detección de agentes virales ni de *C. pneumoniae* por un método diferente al PP.

La identificación fenotípica y la sensibilidad antibiótica fue realizada por medio de *Vitek 2* (Biomérieux, Marcy, Francia) en tres hospitales y por medio de *Phoenix* (Beckton Dickinson, EE.UU.) en dos; en tres hospitales la identificación también fue realizada por espectrometría de masas con tiempo de vuelo (MALDI-TOF MS). Cuando correspondió, se agregaron métodos adicionales para confirmar ciertos mecanismos de resistencia como, por ejemplo, la detección de beta-lactamasas de espectro extendido por medio de la sinergia entre discos de cefotaxima y ceftazidima con discos de amoxicilina-ácido clavulánico (*Oxoid Ltd.*, Basingstoke, Reino Unido). La detección de carbapenemasas se realizó por medio de la sinergia con discos de ácido borónico y EDTA (ambos de Laboratorios Britania, Argentina), con discos de imipenem y meropenem (*Oxoid Ltd.*, Basingstoke, Reino Unido), métodos cromatográficos (*Test NG CARBA-5*; *NG Biotech*, Guipry, Francia) y *Carba Blue* por un método caseo acorde a la publicación de Pasterán *et al.* (16).

Paralelamente, las MRVB fueron procesadas por el panel PP según las indicaciones del fabricante y los resultados, obtenidos en 1 h, fueron comunicados inmediatamente al responsable del Servicio de Infectología correspondiente de cada hospital y que integraba el protocolo. El panel PP incluye la detección semicuantitativa

(copias/mL) de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella aerogenes*, *Proteus spp.*, *Escherichia coli*, complejo *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter baumannii*; también detecta en forma cualitativa (positivo o negativo) a *L. pneumophila*, *C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, virus de influenza A y B, parainfluenza, sincicial respiratorio, adenovirus, rinovirus/enterovirus, metapneumovirus y coronavirus (no está incluido el SARS-CoV-2 ni el MERS-CoV). Por otro lado detecta los genes de resistencia para CTX-M (beta-lactamasas de espectro extendido), *mecA/C* (metilino resistencia) y de carbenemasas del tipo VIM, IMP, NDM, OXA-48-like y KPC.

Cada caso se analizó en conjunto tanto por el Servicio de Microbiología como por el de Infectología y se registró el tratamiento previo al mismo y el eventual cambio terapéutico al que hubiera llevado de tener la aprobación de la ANMAT.

Se calculó el *chi* cuadrado para establecer si las diferencias entre ambos métodos eran significativas o no y se consideró que un valor de $p \leq 0,05$ era significativo.

Aspectos éticos

Los respectivos Comités de Ética aprobaron este proyecto.

Los resultados no fueron usados para tomar decisiones terapéuticas por lo que no fue necesario pedir autorización a los pacientes.

Resultados

De los 194 episodios se documentaron 277 bacterias y 118 virus. Los resultados se muestran en la Tabla I. En total, el 50,8% mostró más de un microorganismo.

Tabla I. Resultados obtenidos con el panel de neumonía FilmArray® con respecto al número y distribución de microorganismos

Microorganismos	n	%
Una bacteria	24	12
Un virus	34	17,6
Dos o más bacterias	34	17,6
Dos o más virus	20	10,6
Bacteria + virus	45	23
Negativo	19	37

Sobre un total de 277 agentes bacterianos, el PP identificó a 253 (91,3%) y 161 (58,1%) fueron aislados en cultivos QC incluyendo 20 aislados de especies que no estaban incluidas en la base de datos y por lo tanto no fueron detectadas por el PP. En 4 casos (2 *L. pneumophila* y 2

M. pneumoniae) la detección fue solo por el PP dado que no se realizaron otros métodos para poder documentar estas bacterias. En 157 (56,67%) agentes bacterianos la detección fue concordante por ambos métodos y el PP detectó 1,57 (253/161) más de agentes bacterianos que el cultivo. La diferencia fue estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$) en lo que respecta a *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis* y *S. agalactiae*.

En la Tabla II se muestran los agentes bacterianos identificados por QC y por el PP.

Tabla II. Comparación de resultados entre los cultivos cuantitativos/semicuantitativos (QC/SQ) bacterianos y el panel de neumonía de FilmArray®

Microorganismo	PP	QC/SQ	p
<i>S. aureus</i>	43	24	<0,05
<i>K. pneumoniae</i>	33	27	0,14
<i>H. influenzae</i>	47	15	<0,05
<i>S. pneumoniae</i>	23	10	<0,05
<i>M. catarrhalis</i>	22	5	<0,05
<i>A. baumannii</i>	7	11	0,49
<i>P. aeruginosa</i>	21	19	0,42
<i>E. cloacae</i>	16	9	0,06
<i>E. coli</i>	12	6	0,07
<i>S. marcescens</i>	7	4	0,23
<i>K. oxytoca</i>	7	6	0,59
<i>L. pneumophila</i>	2	ND	ND
<i>M. pneumoniae</i>	2	ND	ND
<i>K. aerogenes</i>	2	1	0,48
<i>P. mirabilis</i>	3	3	0,87
<i>S. agalactiae</i>	5	0	<0,05
<i>S. pyogenes</i>	2	1	0,48
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	ND	7	ND
<i>Achromobacter xylooxidans</i>	ND	2	ND
<i>Streptococcus viridans</i>	ND	2	ND
<i>Delftia acidovorans</i>	ND	1	ND
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	ND	1	ND
<i>Klebsiella varicola</i>	ND	1	ND
<i>Neisseria subflava</i>	ND	2	ND
<i>Enterococcus hirae</i>	ND	4	ND
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	0	ND	ND
Total bacterias	253	161	<0,05

ND: no determinado, microorganismo no incluido en la base de datos del PP o detección no realizada por cultivo QS o SQ en el caso de *L. pneumophila*, de *M. pneumoniae* o de *C. pneumoniae*.

PP: panel de neumonía.

QC/SQ: cultivo cuantitativo/semicuantitativo.

La relación bacteria/virus fue de 253/118: 2,1. Los virus identificados por el PP fueron rinovirus/enterovirus (n=41), sincicial respiratorio (n=41), influenza (n=21), parainfluenza (n=8), metapneumovirus (n=3), adenovirus (n=3) y coronavirus (n=1).

En la Tabla III se muestra la relación entre el resultado del PP (copias/mL) y el cultivo cuantitativo/semicuantitativo (UFC/mL).

Tabla III. Relación entre cultivo cuantitativo/semicuantitativo (UFC/mL) y el obtenido por medio del panel de neumonía (copias/mL)

Resultado	n	%
Igual conteo por PP y QC	58	23
Mayor conteo por PP		
Una dilución más alta	75	30
Dos diluciones más altas	24	9,8
Tres diluciones más altas	17	6,9
Dos diluciones más altas por cultivo	3	1,1
PP (+) y QC (-)	72	28,9

PP: panel de neumonía.

QC: cultivo cuantitativo/semicuantitativo.

Los genes de resistencia fueron detectados en 63 agentes bacterianos por el PP, pero solo 30 fueron confirmados por métodos fenotípicos. La diferencia en las metodologías de detección fue estadísticamente significativa para CTX-M, para KPC y para todos los mecanismos combinados.

En la Tabla IV se presentan los resultados comparativos entre métodos fenotípicos de detección de mecanismos de resistencia y los del PP.

Tabla IV. Comparación de métodos para detección de mecanismos de resistencia

Mecanismo de resistencia	PP	Detección fenotípica	p
KPC	13	6	0,04
CTX-M	29	15	0,05
NDM	6	2	0,1
IMP	1	0	0,28
VIM	3	0	0,06
OXA	2	0	0,12
<i>mecA/C</i>	9	7	0,42
Total	63	30	<0,05

PP: panel de neumonía.

De los 194 episodios, el resultado podría haber conducido a cambios terapéuticos en 144/194 (74,2%) casos acorde a la conducta registrada que hubiera toma-

do el Servicio de Infectología de cada lugar; en 42/194 (21,6%) hubiera correspondido ampliar el espectro antimicrobiano y reducirlo en 102/194 (52,6%) casos.

Discusión y Conclusiones

El tratamiento inicial adecuado de la neumonía es crítico para reducir la mortalidad. También es importante evitar el uso innecesario de antibióticos de amplio espectro, de alto costo o tóxicos si se encuentran alternativas con menor impacto en todos estos aspectos y a las cuales el microorganismo es sensible y además dirigir específicamente el tratamiento contra ciertos patógenos (p. ej. *Legionella* spp., *Mycobacterium tuberculosis*, virus de influenza). Para ello es fundamental conocer la epidemiología local para el diseño de los tratamientos empíricos o bien contar con una técnica de diagnóstico rápida, sensible y específica (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29).

La neumonía adquirida en la comunidad se asocia principalmente a *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*, rinovirus, virus de influenza, metapneumovirus y actualmente también a SARS-CoV-2 y, la neumonía nosocomial, a *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *S. aureus* y enterobacterias, entre otros. Los factores asociados a la presencia de microorganismos multirresistentes incluyen especialmente el uso de antibióticos en los últimos 90 días, más de 5 días de hospitalización, shock séptico, falla respiratoria aguda o terapia de reemplazo renal, previos al desarrollo de neumonía asociada a respirador (3) (4) (5). No obstante, una forma más certera de confirmar inmediatamente la etiología y la presencia potencial de mecanismos de resistencia críticos es a través de métodos rápidos de biología molecular (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (17) (18).

En la neumonía de la comunidad la coloración de Gram del esputo puede guiar la terapia antimicrobiana inicial, si bien la especificidad es elevada (91-99%), la sensibilidad es solo entre moderada y baja (54-76%) y los valores son muy variables entre las diversas publicaciones y los distintos microorganismos (19) (20) (21). Por otro lado, hasta el 50% (6) de las muestras pueden ser de mala calidad, lo que también afecta a la especificidad del cultivo y de los métodos moleculares a menos que se trate de patógenos obligados o estrictos (p. ej. *M. tuberculosis*). En relación a la neumonía asociada a respirador, un metaanálisis de 21 estudios (22) demostró que la coloración de Gram de las diversas muestras respiratorias no era confiable para reducir esquemas antibióticos dado que presentaba una sensibilidad del 79% y una especificidad del 75%. Por otro lado, con los cultivos tradicionales se demora al menos 48-72 h en informar un resultado y algunos microorganismos re-

quieren más tiempo de incubación o medios especiales como *Bordetella pertussis* y *Legionella* spp. Las pruebas serológicas requieren la seroconversión, por lo que resultan tardías y sin utilidad para la toma de una conducta inmediata.

Aún en los casos de neumonía bacteriémica de la comunidad, la sensibilidad del cultivo de esputo para neumococo alcanza tan solo el 50% (39-76%) (8) (9) (10) y en la neumonía nosocomial la sensibilidad del cultivo del lavado broncoalveolar, del cepillo protegido y de las secreciones traqueales se encuentra en alrededor del 57% (IC95% 47-66%), 48% (IC95% 38-57%) y 75% (IC95% 58-88%) respectivamente (3). Algunos autores hallaron que si bien la probabilidad de adecuar el tratamiento antimicrobiano era mayor en base a los resultados y tiempos de los cultivos convencionales del lavado broncoalveolar, la mortalidad no cambiaba si el tratamiento empírico era inadecuado (23).

Cuando se plantea usar biología molecular, hay dos estrategias posibles, una de ellas es buscar un microorganismo particular y la otra usar una PCR múltiple tratando de identificar a la mayor cantidad posible de agentes etiológicos.

Con respecto a la primera, autores como Cercenado *et al.* (24) demostraron la utilidad de *Xpert MRSA/SA SSTI* (*Cepheid*, Sunnyvale, EE.UU.) para detectar *S. aureus* y la resistencia a metilicina en muestras respiratorias bajas con una sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de 99%, 72,2%, 90,7% y 96,3%, respectivamente, en comparación con el cultivo cuantitativo. La limitación de esta estrategia radica en que no detecta coinfecciones o infecciones secundarias. En la experiencia de estos autores, cuando se utilizó una PCR múltiple como el PP, en 50,8% de los episodios se detectó más de un microorganismo potencialmente neumopatógeno. Otros autores (8) (9) (18) (25) (26) también hallaron un porcentaje importante de coinfecciones tanto en neumonía de la comunidad como en la nosocomial usando esta metodología, lo que indica que la estrategia dirigida a detectar un solo microorganismo puede ser inadecuada y llevar a subestimar algunos agentes etiológicos que podrían conducir a cambios terapéuticos relevantes. Zhu *et al.* (25), en 257 pacientes con infección confirmada por SARS-CoV-2, encontraron con PCR múltiple un 94% (n=242) de coinfecciones principalmente con *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae* y *H. influenzae*, la mayoría de éstas ocurrían 1-4 días después de la infección por SARS-CoV-2 y se correlacionaban con mayor severidad del cuadro. Kreitmann *et al.* (26) también demostraron la utilidad del PP en pacientes con SARS-CoV-2: sobre 47 pacientes detectaron coinfecciones bacterianas en 27% (n:13); en 12 de estos casos con el PP y en uno solo con cultivo cuantitativo.

Varios autores hallaron una mayor cantidad de resultados positivos con diversas PCR en comparación con el cultivo de muestras de vías respiratorias bajas (8) (9)

(10) (14) (18) (27). Holter *et al.* (9) utilizaron una PCR cuantitativa para bacterias (punto de corte de 10⁵ UFC/mL) y cualitativa para virus y *Legionella* spp. a partir de muestras de esputo; sobre 267 pacientes con diagnóstico de neumonía de la comunidad hallaron al agente etiológico en 63% (n=167) de los casos y en 26% se documentaron coinfecciones, en 28% (n=75) se detectó una sola bacteria, en 15% (n=41) un solo virus y en 19% (n=51) virus con bacterias; las coinfecciones más frecuentes correspondieron a *S. pneumoniae* con virus de influenza o con rinovirus. Por otro lado, el diagnóstico convencional (cultivo, serología y antígeno urinario para neumococo y *L. pneumophila*) logró identificar al agente etiológico en el 48% de los casos y la PCR incrementó el diagnóstico en un 15% en total, con 5% de aumento con respecto a bacterias, 19% a virus y 16% en coinfecciones. Johanson *et al.* (10) sobre 128 pacientes con neumonía de la comunidad compararon el cultivo de esputo para neumococo con la detección del gen *ply* (neumolisina) realizando PCR en tiempo real y encontraron con esta metodología un 27% (n=34) de resultados positivos y 17/34 (50%) de éstos tenían cultivo negativo (el 82% con tratamiento antibiótico), en tanto que el cultivo fue positivo en 19 casos (15%) y 16 (84%) de éstos tenían PCR positiva. Stralin *et al.* (27) sobre 112 pacientes con neumonía de la comunidad documentaron la etiología por neumococo por medio del cultivo de esputo en 32% (n=36) en comparación con 53% (n=55) con PCR. Gadsby *et al.* (8) también analizaron pacientes con neumonía de la comunidad y obtuvieron resultados positivos con el cultivo de esputo para bacterias en el 39,3% (n=127) de los casos, en 81% (n=262) con PCR cualitativa y en 71% (n=231) con PCR cuantitativa (punto de corte 10⁵ UFC/mL), lo que indica la necesidad de usar esta última para diferenciar infección de colonización. Jamal *et al.* (18) usaron una PCR múltiple (*Cuaretis Unyvero*, EE.UU.) para el diagnóstico de neumonía nosocomial y sobre 49 pacientes en comparación con el cultivo, encontraron más de una bacteria en 27 (55%) con PCR y en 4 (8%) con cultivo. Este equipo también es capaz de detectar 22 genes de resistencia y llevó a cambios en el tratamiento empírico en 33 (67%) de los casos en 5-6 h. El tiempo para obtener un resultado fue de 4,3 h pero los resultados no fueron cuantitativos por lo que es posible que se haya sobreestimado la presencia de algunos colonizantes de las vías respiratorias superiores.

Las publicaciones previamente mencionadas coinciden con nuestros resultados en cuanto al incremento en la detección con distintas PCR múltiples en comparación con el cultivo bacteriano. Uno de los principales problemas para dilucidar las discrepancias entre distintos métodos es que no existe un "patrón de oro" para el diagnóstico de neumonía. Por esto podrían plantearse distintas posibilidades que van desde resultados falsamente positivos de la PCR hasta resultados falsamente negativos de los cultivos, debidos a una menor sensi-

bilidad de detección, a la pérdida de viabilidad de algunos aislados bacterianos, al enmascaramiento por otros agentes bacterianos colonizantes de crecimiento más rápido o más mucosos o a tratamientos antibióticos concomitantes. El médico deberá tomar una decisión en base a la gravedad del cuadro como así frente a los factores de riesgo y enfermedad de base que presente cada paciente particular en el momento del diagnóstico. La situación inversa, es decir que el cultivo sea positivo y la PCR negativa es mucho menos probable y se debe en su gran mayoría a microorganismos no incluidos en la base de datos de los equipos comerciales. En el PP, por ejemplo, no están considerados microorganismos como SARS-CoV-2, *M. tuberculosis*, *Pneumocystis jirovecii*, *Nocardia* spp., *Rhodococcus equi*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, hongos de micosis endémicas ni *Aspergillus* spp. En la experiencia de estos autores, con el PP se detectó significativamente mayor número de *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *S. aureus* y *S. agalactiae* y también, aunque no alcanzó a ser significativo, mayor número de *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa* y *K. oxytoca*. El principal microorganismo no detectado por el PP fue *S. maltophilia*, debido a que no se encuentra en la base de datos del sistema. Además, 4 aislados del complejo *A. baumannii* tampoco fueron detectados por el PP; esto último podría deberse a la diversidad de especies incluidas en ese complejo. Los recuentos obtenidos por el PP estuvieron entre 1 y 3 diluciones mayores que las del QC. Se debe considerar que con el PP se detectan copias/mL de un gen lo que podría corresponder a ADN de bacterias no viables por diversos motivos (conservación de la muestra, antibióticos, etc.) en tanto que el cultivo indica UFC/mL de bacterias viables.

También son coincidentes los presentes datos con los de otros autores (18) (29) en cuanto al impacto en el cambio terapéutico generado por el resultado rápido obtenido en 1 h a partir de las muestras respiratorias. Este impacto no solo se refiere a la identificación del microorganismo responsable del proceso infeccioso, sino también a la detección de mecanismos de resistencia crítica que podrían llevar al fracaso terapéutico de no mediar un cambio en la conducta médica. Nuevamente, se detectaron más agentes bacterianos con mecanismos de resistencia (principalmente CTX-M y carbapenemasas) por el PP que por métodos fenotípicos. Lo contrario no ocurrió, lo que implica que el PP podría ser una herramienta fundamental para reducir el espectro antibacteriano así como también para fundamentar el uso de esquemas de mayor espectro, costo y toxicidad frente a la detección de cepas multirresistentes. La discrepancia podría deberse a que los genes de resistencia podrían no estar expresados o bien a que la concentración inhibitoria mínima (CIM) obtenida *in vitro* podría corresponder a la categoría de sensibilidad, porque la cepa podría necesitar además de otros me-

canismos adicionales de resistencia como eflujo o impermeabilidad (bacilos gram negativos) para volverse resistente. En 2 casos se detectó la presencia del gen *mecA/C* pero el mismo no pudo ser confirmado fenotípicamente, lo que podría explicarse por la presencia de subpoblaciones o de resistencia heterogénea no detectada a partir del cultivo.

Otra ventaja que presenta el PP es la utilidad en la detección de microorganismos que habitualmente presentan dificultades para ser diagnosticados en muestras respiratorias como *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* y *L. pneumophila*; estos autores documentaron dos casos de legionelosis autóctonos, uno solo con antígeno urinario positivo, que llevaron a adecuar la terapia desde el comienzo. Shimada *et al.* (28) publicaron un metaanálisis de 30 estudios que usaron seis metodologías diferentes (caseras y comerciales) para la búsqueda de antígeno urinario y hallaron una sensibilidad del 74% y una especificidad del 99% para el serogrupo de *Legionella pneumophila*, en tanto que en una revisión sistemática de la literatura (38 estudios y 653 pacientes), Avni *et al.* (12) encontraron una sensibilidad del 97,4% y una especificidad del 98,6% con la PCR con un incremento en el diagnóstico del 18-30% con respecto al antígeno urinario.

El diagnóstico molecular si bien presenta alta sensibilidad y especificidad debe ser realizado e integrado con la microbiología tradicional porque por un lado la coloración de Gram permite, pese a su sensibilidad cuestionable, decidir a qué muestras, acorde a su calidad citológica, vale la pena hacer este tipo de examen y por otro lado, el cultivo es necesario para conocer la CIM del agente infeccioso y ajustar los tratamientos en función a los parámetros de pK-pD (29).

Las limitaciones del estudio fueron, en primer lugar que en la mayoría de los centros no se pudo corroborar la detección de agentes virales, *M. pneumoniae*, *L. pneumophila* ni de *C. pneumoniae* por un segundo método de PCR y en segundo lugar, hay que tener en cuenta a los microorganismos no incluidos en la base de datos y que fueron mencionados previamente.

El sistema de FilmArray® (BioFire, Salt Lake City, EE.UU.) con su PP presenta alta sensibilidad y especificidad en la identificación de microorganismos responsables de neumonía así como en la detección de genes de resistencia crítica y puede tener un importante impacto en la decisión sobre cambios terapéuticos cuando estos resultados son comunicados inmediatamente al programa de gerenciamiento racional de antibióticos (Antimicrobial Stewardship o PROA).

Fuentes de financiación

Los insumos correspondientes al PP fueron provistos por BioFire® (Salt Lake City, EE.UU.).

Conflictos de intereses

Rolando Soloaga se desempeña como asesor científico de *Biome-rioux* Argentina.

Correspondencia

Prof. Dr. ROLANDO SOLOAGA
Hospital Naval Pedro Mallo, Servicio de Microbiología,
Avenida Patricias Argentinas 351,
CABA, Argentina.
Dirección particular: Cátulo Castillo 2975, 5C,
C.P. 1261, CABA, Argentina.
Correo electrónico: rsoloaga@yahoo.com

Referencias bibliográficas

- Ewig S, Torres A. Community-acquired pneumonia as an emergency: time for an aggressive intervention to lower mortality. *Eur Respir J* 2011; 38: 253-60.
- Song JH, Thamlikitkul V, Hsueh PR. Clinical and economic burden of community-acquired pneumonia amongst adults in the Asia-Pacific region. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 108-17.
- Kalil A, Metersky M, Klompas J, Muscedere J, Sweeney D, Palmer L, *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. *Clin Infect Dis* 2016; 63 (5): 61-111.
- Wunderink R, Waterer G. Advances in the causes and management of community acquired pneumonia in adults. *BMJ* 2017; 358: j2471.
- Metlay JP, Waterer GW, Long AC, Anzueto A, Brozek J, Crothers K, *et al.*; on behalf of the American Thoracic Society and Infectious Diseases Society of America. 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* 2019; 200 (7): e45-e67.
- Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J* 2016; 48: 1764-78.
- Douglas IS. New diagnostic methods for pneumonia in the ICU. *Curr Opin Infect Dis* 2016; 29: 197-204.
- Gadsby NJ, Rusell CD, McHugh MP, Mark H, Morris AC, Laurenson IF, *et al.* Comprehensive molecular testing for respiratory pathogens in community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2016; 7: 817-23.
- Holter J, Muller F, Bjorng O, Sandal H, Marthinsen J, Jennum P, *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia and diagnostic yields of microbiological methods: a 3-year prospective study in Norway. *BMC Infect Dis* 2015; 15: 64.
- Johansson M, Kalin M, Giske C, Hedlund J. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 60: 255-61.
- Lee B, Hassan F, Jackson M, Selvarangan R. Impact of multiplex molecular assay turn-around-time on antibiotic utilization and clinical management of hospitalized children with acute respiratory tract infections. *J Clin Virol* 2019; 110: 11-6.
- Avni T, Bieber A, Green H, Steinmetz T, Leibovici L, Paul M. Diagnostic accuracy of PCR alone and compared to urinary antigen testing for detection of *Legionella* spp: a systematic review. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 401-12.
- Gadsby NJ, Helgason KO, Dickson EM, Mills JM, Lindsay DSJ, Edwards GF, *et al.*; ESCMID study group for molecular diagnostics; ESCMID study group for *Legionella* Infections. Molecular diagnosis of *Legionella* infections--Clinical utility of front-line screening as part of a pneumonia diagnostic algorithm. *J Infect* 2016; 72: 161-70.
- Dickson RP, Erb-Downward JR, Prescott HC, Martinez FJ, Curtis JL, Lama VN, *et al.* Analysis of culture-dependent versus culture-independent techniques for identification of bacteria in clinically obtained bronchoalveolar lavage fluid. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 3605-13.
- Lopardo H, Hernández C, Soloaga R. Diagnóstico microbiológico de las infecciones respiratorias. Apuntes de laboratorio. Buenos Aires: Laboratorios Britania; 1999.
- Pasterán F, Véliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E, *et al.* Evaluation of the Blue-Carba Test for rapid detection of carbapenemases in Gram-negative bacilli. *J Clin Microbiol* 2015; 53 (6): 1996-8.
- Kollef MH, Burnham CD. Ventilator-associated pneumonia: the role of emerging diagnostic technologies. *Semin Respir Crit Care Med* 2017; 38: 253-63.
- Jamal W, Roomi EA, Aziz LRA, Rotimia V. 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; 52 (7): 2487-92.
- Anevlavis S, Petroglou N, Tzavaras A, Maltezos E, Pneumatikos I, Froudarakis M, *et al.* A prospective study of the diagnostic utility of sputum Gram stain in pneumonia. *J Infect* 2009; 59: 83-9.
- Ogawa H, Kitsios GD, Iwata M, Terasawa T. Sputum Gram stain for bacterial pathogen diagnosis in community-acquired pneumonia: A systematic review and bayesian meta-analysis of diagnostic accuracy and yield. *Clin Infect Dis* 2020; 71 (3): 499-513.
- Del Rio-Pertuz G, Gutiérrez JF, Triana AJ, Molinares JL, Robledo-Solano AB, Meza JL, *et al.* Usefulness of sputum Gram stain for etiologic diagnosis in community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2019; 19: 403-14.
- O'Horo J, Thompson D, Safdar N. Is the Gram stain useful in the microbiologic diagnosis of VAP? A meta-analysis. *Clin Infect Dis* 2012; 55: 551-61.

23. Luna C, Vujacich P, Niederman M, Vay C, Gherardi C, Matera E, *et al.* Impact of the BAL data on the therapy and outcome of ventilator associated pneumonia. *Chest* 1997; 111 (3): 676-85.
24. Cercenado E, Marín M, Burillo A, Martín-Rabadán P, Rivera M, Bouza E. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract secretions from patients with suspected ventilator-associated pneumonia: evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA SSTI assay. *J Clin Microbiol* 2012; 50 (12): 4095-7.
25. Zhu X, Ge Y, Cui L, Wu T, Zhao K, Chen Y, *et al.* Co-infection with respiratory pathogens among COVID-2019 cases. *Virus Res* 2020 Aug; 285:198005.
26. Kreitmann L, Monard C, Dauwalder O, Simon M, Argaud L. Early bacterial co-infection in ARDS related to COVID-19. *Intensive Care Med* 2020 Sep; 46 (9): 1787-9.
27. Strålin K, Törnqvist E, Kaltoft M, Olcén P, Holmberg H. Etiologic diagnosis of adult bacterial pneumonia by culture and PCR applied to respiratory tract samples. *J Clin Microbiol* 2006; 44 (2): 643-5.
28. Shimada T, Noguchi Y, Jackson JL, Miyashita J, Hayashino Y, Kamiya T, *et al.* Systematic review and meta-analysis: urinary antigen tests for legionellosis. *Chest* 2009 Dec; 136 (6): 1576-85.
29. Dhesi Z, Enne V, O'Grady J, Gant V, Livermore D. Rapid and point-of-care testing in respiratory tract infections: an antibiotic guardian? *ACS Pharmacol Transl Sci* 2020; 3 (3): 401-17.

Recibido: 10 de septiembre de 2020

Aceptado: 26 de febrero de 2021