

Influencia de un panel molecular de reacción de polimerasa en cadena múltiple en el diagnóstico o descarte de neumonía asociada a ventilación mecánica en una cohorte chilena de pacientes críticos con COVID-19

Influence of a multiple polymerase chain reaction panel on the diagnosis or discard of ventilator-associated pneumonia in a Chilean COVID-19 critical patients cohort

Martín F. Lasso Barreto¹, Pablo A Cartes¹, Alfredo M Villagrán¹, Katherine Alcota¹, Juan S Giraldo¹ y Carolina Ruiz¹

¹Complejo Asistencial Dr. Sótero Del Río. Santiago, Chile.

Los autores declaran no tener conflictos de interés con el presente trabajo.
Financiamiento parcial por BioMarieux Chile Laboratories.

Recibido: 18 de octubre de 2021 / Aceptado: 9 de junio de 2022

Resumen

Introducción: La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAVM) es frecuente en pacientes críticos con COVID-19. Su diagnóstico precoz es fundamental para su pronóstico. **Objetivo:** Demostrar la utilidad del panel FilmArray Pneumo (PFA-P) en la confirmación o descarte de NAVM en estos pacientes. **Métodos:** Estudio retrospectivo de 71 pacientes críticos con COVID-19 con sospecha de NAVM en quienes se realizó cultivos y PFA-P para confirmación diagnóstica. Se describen las características clínicas, microbiología y mortalidad. Se define la validez y seguridad de PFA-P. **Resultados:** El uso de FAP-P y cultivos descartó NAVM en 29 pacientes (40,8%). En 41 pacientes se confirmó NAVM y la mortalidad a 30 días fue 48,8%. Se estudiaron 48 muestras, los cultivos fueron positivos en 30 (62,5%) y se detectaron 33 bacterias, PFA-P detectó 32 de estas 33 bacterias; 37 bacterias fueron detectadas exclusivamente por PFA-P. Las bacterias prevalentes fueron *Klebsiella pneumoniae* (31,4%) *Pseudomonas aeruginosa* (21,4%) y *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (14,2%). La sensibilidad, especificidad, valor predictor positivo y valor predictor negativo de PFA-P con respecto a cultivos fue 96,9%, 92,5%, 46,4% y 99,8, respectivamente. Un paciente tuvo NAVM por *Burkholderia cepacia* bacteria no detectada por FAP-P. **Conclusiones:** La FAP-P es una técnica molecular eficaz para descartar y diagnosticar la NAVM permitiendo una suspensión rápida de los antimicrobianos o un tratamiento dirigido temprano.

Palabras clave: neumonía asociada a ventilación mecánica; COVID-19; antimicrobiano; panel molecular; diagnóstico.

Abstract

Background: Ventilator-associated pneumonia (VAP) is frequent in critical COVID-19 patients. Its early diagnosis is essential for its prognosis. **Aim:** To demonstrate the usefulness of the FilmArray Pneumo panel (FAP-P) in confirming or ruling out VAP in these patients. **Methods:** Retrospective study of 71 critical COVID-19 patients with suspected VAP in whom cultures and FAP-P were performed for diagnostic confirmation. Clinical characteristics, microbiology and mortality are described. The validity and safety of FAP-P is defined. **Results:** The use of FAP-P and cultures ruled out VAP in 29 patients (40.8%). In 41 patients, VAP was confirmed and the 30-day mortality was 48.8%. Forty-eight samples were studied, the cultures were positive in 30 (62.5%) and 33 bacteria were detected, FAP-P detected 32 of these 33 bacteria; 37 bacteria were exclusively detected by PFA-P. The most prevalent bacteria were *Klebsiella pneumoniae* (31.4%), *Pseudomonas aeruginosa* (21.4%) and *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* (14.2%). The sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value of FAP-P with respect to cultures were 96.9%, 92.5%, 46.4% and 99.8%, respectively. One patient had VAP due to *Burkholderia cepacia* bacteria not detected by FAP-P. **Conclusions:** FAP-P is an effective molecular technique to rule out and diagnose VAP, allowing rapid suspension of antibiotics or early targeted treatment.

Keywords: ventilator associated pneumonia; COVID-19; antibiotic; molecular panel; diagnosis.

Correspondencia a:

Martín Lasso Barreto
mlasso45@gmail.com

Introducción

La pandemia de COVID-19 durante los años 2020 y 2021 trajo consigo un gran incremento en la demanda de camas críticas, aumentando el número de pacientes en ventilación mecánica invasiva (VMI) con hospitalizaciones prolongadas en el contexto de personas adultas mayores con comorbilidades importantes como diabetes mellitus, obesidad, enfermedades cardíacas, enfermedades pulmonares o inmunosupresión de diversos orígenes, en quienes las complicaciones infecciosas aumentaron con notoria frecuencia con la emergencia, además, de bacterias multirresistentes^{1,2}.

Aunque estudios recientes de pacientes con COVID-19 sugieren que la coinfección bacteriana inicial es un problema poco frecuente, estos estudios no están específicamente dirigidos al paciente crítico^{3,4}. Los pacientes hospitalizados por COVID-19 tienen entre 1,2 y 7% de probabilidades de tener una infección bacteriana pulmonar asociada en el momento de su ingreso y esta frecuencia aumenta a 14% cuando los pacientes ingresan en la unidad de cuidados intensivos (UCI)^{5,6}. Por otro lado, aquellos pacientes que adquieren una infección bacteriana dentro del hospital en el contexto de COVID-19 tienen alrededor de 50% de probabilidad de morir durante el período de hospitalización; dos tercios de estas infecciones ocurren en pacientes críticos con una mortalidad cercana a 65%⁷.

La neumonía asociada a ventilación mecánica (NAV-M) es la infección nosocomial más común en el paciente de cuidados críticos con COVID-19^{7,8}; sin embargo, existe la probabilidad de que sea sobre-diagnosticada dada las similitudes clínicas de estas dos infecciones, por lo que la confirmación diagnóstica de NAVM en términos de su manejo eficiente, investigación clínica y vigilancia requieren una base microbiológica^{9,10,11}.

En este sentido, las técnicas de biología molecular que detectan múltiples patógenos son cada vez más accesibles y pueden ser especialmente útiles en áreas críticas donde el diagnóstico temprano es esencial para establecer un tratamiento antimicrobiano dirigido y reducir potencialmente el uso de antibioterapia innecesaria¹². El panel FilmArray Pneumonia® (PFA-P) BIOFIRE-bioMérieux es un ensayo de reacción de polimerasa en cadena (RPC) múltiple, que permite la detección rápida, en aproximadamente 80 minutos, de una amplia gama de patógenos clínicamente relevantes y un número limitado, pero importante, de genes de resistencia microbiana en muestras de vías respiratorias inferiores obtenidas por aspirado endotraqueal (AET) o lavado bronquioalveolar (LBA), y que se postula como una herramienta útil en el diagnóstico precoz de NAVM.

Presentamos nuestra experiencia con una cohorte retrospectiva de pacientes con COVID-19 y sospecha de NAVM ingresados en la UCI de nuestro hospital,

cuyo agente microbiológico se buscó utilizando PFA-P concomitantemente con métodos convencionales de tinción y cultivo. El objetivo es determinar el beneficio del uso del PFA-P como herramienta para el diagnóstico precoz de NAVM y con ello proyectar su eventual utilidad en el inicio, cambio o suspensión del tratamiento antimicrobiano, lo que podría influir sobre el tiempo de hospitalización y VMI. También se busca determinar la certeza diagnóstica de esta técnica molecular mediante su validación y seguridad con respecto al cultivo convencional como estándar de oro.

Métodos

Población de estudio

Estudio realizado en la UCI del Hospital “Dr. Sótero Del Río”, un centro de salud pública con 854 camas, ubicado en la zona sureste de Santiago de Chile. Nuestra UCI cuenta con 45 camas médico-quirúrgicas y es atendida por un equipo multidisciplinario.

Se obtuvo información retrospectiva en nuestra intranet de los registros clínicos y de laboratorio electrónicos de una cohorte de 71 pacientes críticos con COVID-19 con probable NAVM que se habían realizado cultivos respiratorios concomitantes y PFA-P para su diagnóstico. El período de revisión abarca del 1 de abril al 30 de noviembre de 2020 (8 meses). El diagnóstico de NAVM se realizó en pacientes en VMI durante más de dos días y que cumplieran con tres criterios basados en las últimas definiciones del Centro Europeo para el Control de Enfermedades¹³.

Diagnóstico

La presencia del síndrome respiratorio agudo severo por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) se confirmó mediante una prueba de RPC con hisopo nasofaríngeo positivo en 69 pacientes, además un paciente tuvo una RPC indeterminada y otro paciente tuvo dos pruebas de RPC negativas. Sin embargo, en ambos casos tenían una presentación clínica y un TAC tórax compatibles con infección por virus SARS-CoV-2, descartándose también la presencia de un agente infeccioso diferente al inicio de su hospitalización.

En todos los pacientes de esta cohorte, se obtuvo un total de una a dos muestras respiratorias por AET o por LBA. Para AET, se aplicó la técnica descrita por el Grupo Canadiense de Ensayos de Cuidados Críticos¹⁴, utilizando un catéter de succión estéril y una trampa de succión. Si no se obtuvo una muestra satisfactoria, se instilaron 3 a 5 ml de solución salina estéril al 0,9% y el material de recuperación se colocó en botellas estériles. El LBA se realizó de acuerdo con las recomendaciones de la Sociedad Americana de Tórax¹⁵ con un broncoscopio estéril desechable (AmbuScope4TM). Mediante tomografía computarizada de tórax se identificó previamente el parén-

quima pulmonar diana, luego se insertó el broncoscopio en el bronquio segmentario y se instilaron 100 cc de solución salina al 0,9% (5 alícuotas de 20 cc) recuperando más de 50% del material, el que se colocó en botellas estériles. Las muestras de AET y LBA se etiquetaron y fueron enviadas inmediatamente al laboratorio de microbiología para tinción de Gram, cultivo y PFA-P.

Técnicas de microbiología

Estudio de cultivo y susceptibilidad in vitro

Todas las muestras se procesaron según los estándares microbiológicos en uso¹⁶, se sometieron a tinción de Gram y cultivos cuantitativos en placas de agar sangre de cordero al 5%, chocolate y MacConkey, y se incubaron a 35°C en una atmósfera aeróbica enriquecida con CO₂ al 5%, hasta 48 horas.

Las placas se revisaron a las 24 horas de incubación y, en ausencia de desarrollo microbiológico, se realizó una lectura final a las 48 horas. Los microorganismos en crecimiento significativo se identificaron principalmente mediante espectrometría de masas de tiempo de migración de ionización / desorción láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), Biotyper Microflex Bruker®. Las pruebas de susceptibilidad microbiana se realizaron utilizando microdilución automatizada Becton Dickinson Phoenix M50® y/o difusión en disco Kirby-Bauer, de acuerdo con las recomendaciones de CLSI vigentes en el momento del estudio¹⁷.

Para la detección de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), se aplicó la prueba de difusión en disco y para la búsqueda de carbapenemasas, se aplicó CarbaBlue y/o el método de inactivación de carbapenemasas modificado de acuerdo con CLSI¹⁶ con ensayo inmunocromatográfico rápido (NG-test Carba5, NG Biotech®). Para la determinación de *Staphylococcus* spp resistente a meticilina (oxacilina), se aplicó un disco de cefoxitina (FOX) u OXA, de acuerdo con los requisitos de CLSI¹⁷.

Estudio molecular con PFA-P

El panel PFA-P es un ensayo de RPC múltiple que permite la detección semicuantitativa a concentraciones de 10⁴, 10⁵, 10⁶ y $\geq 10^7$ copias/mL de ácidos nucleicos bacterianos de los siguientes microorganismos: complejo *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*, complejo *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, grupo *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. También permite la detección de los siguientes genes de resistencia a los antimicrobianos: mecA/C y MREJ, CTX-M, KPC, NDM, OXA-48-like, VIM e IMP.

Además, detecta cualitativamente tres bacterias atípicas: *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* y *Mycoplasma pneumoniae* y ocho virus respiratorios comunes: adenovirus, coronavirus (no SARS-CoV-2), metapneumovirus humano, rinovirus/enterovirus humano, influenza A, influenza B, virus parainfluenza y virus respiratorio sincicial.

Paralelamente al estudio microbiológico tradicional, cada muestra se procesó con PFA-P según las instrucciones del fabricante (BioFire, Biomérieux®).

Posteriormente, se compararon los resultados obtenidos de las dos rutas de trabajo tanto para la detección de microorganismos como para la resistencia bacteriana.

Ética

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Servicio de Salud Metropolitano Sur-Oriente de Santiago de Chile. Dada su naturaleza retrospectiva y que no se realizó otra práctica que la atención estándar, no se requirió el consentimiento informado. No se exponen nombres o números de documentos de identidad para mantener la privacidad de los participantes.

Análisis estadístico

Se informan estadísticas descriptivas de las características generales y clínicas, como la evolución, las complicaciones y los genes de resistencia de todos los pacientes incluidos en el estudio. Las medidas de posición se informaron para las variables continuas debido a su distribución no simétrica; se informaron las frecuencias absolutas y relativas para las variables categóricas. Los conjuntos de variables mencionados se compararon entre pacientes con diagnóstico de NAVM para aquellos pacientes que fallecieron frente a los que no fallecieron en 30 días mediante la prueba de χ^2 o la prueba de Mann-Whitney en el caso de las variables cuantitativas, debido a su distribución no simétrica. Para los resultados de la PFA-P se calcularon la sensibilidad, la especificidad y los valores predictores, considerando el cultivo convencional como estándar de oro. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa Stata Statistical Software, 13 SE (StataCorp., College Station, TX, EE. UU.).

Resultados

Durante el período de estudio se aplicó PFA-P y cultivos bacterianos en 81 muestras respiratorias de 71 pacientes. Se obtuvieron muestras respiratorias por LBA en 34 ocasiones y por AET en 47. En 32 muestras (39,5% del total de muestras tomadas) de 29 pacientes (40,8% de la cohorte), tanto el cultivo convencional como el PFA-P resultaron negativos, lo que permitió descartar el diagnóstico de NAVM para estos eventos. En el cultivo de una muestra respiratoria de un paciente se identificó

Burkholderia cepacia - bacteria no incluida en el PFA-P- por lo que el paciente correspondiente a ese cultivo no fue incluido en el análisis.

Del total de 71 pacientes, 41 fueron confirmados con al menos un episodio de NAVM, y siete de estos pacientes tuvieron hasta dos episodios de NAVM durante el período de estudio, llegando a un total de 48 eventos de NAVM. El perfil clínico y la evolución de estos 41 pacientes con NAVM confirmada microbiológicamente se muestran en la Tabla 1.

Entre las 48 muestras de pacientes con NAVM detectamos 70 bacterias, tanto por cultivo clásico como por PFA-P, con la siguiente relación de muestras y número de patógenos detectados: 32 con uno, 11 con dos, cuatro con tres y uno con cuatro, respectivamente.

Un total de 30 cultivos fueron positivos (62,5%), en los que se identificaron las siguientes 33 bacterias: *K. pneumoniae* (n = 15), *P. aeruginosa* (n = 9), *A. baumannii-calcoaceticus* (n = 5), *S. aureus* (n = 2), *S. marcescens* (n = 1) y *S. agalactiae* (n = 1). En las mismas 30 muestras

Tabla 1. Características clínicas, evolución y complicaciones de 41 pacientes COVID-19 con NAVM confirmada microbiológicamente de acuerdo a mortalidad a los 30 días desde su diagnóstico

Característica	Vivos* n = 21	Fallecidos* n = 20	p
Promedio de edad, años (RIC)	54 (48-56)	50 (41,5-61)	0,958 ^a
≥ 55 años, N° (%)	10 (47,6%)	9 (45,0%)	0,867 ^b
Sexo masculino, N° (%)	16 (76,22%)	14 (70,0%)	0,655 ^b
Morbilidades, N° (%)			
Hipertensión arterial	11 (52,4%)	10 (50,0%)	0,879
Diabetes mellitus	11 (52,4%)	8 (40,0%)	0,427 ^b
Obesidad	7 (33,3%)	3 (15,0%)	0,172 ^b
Insuficiencia cardíaca	0	4 (20,0%)	0,031 ^b
Falla renal	0	3 (15,0%)	0,300 ^b
Enfermedad pulmonar	0	1 (5,0%)	0,065 ^b
Tabaquismo	2 (9,5%)	3 (15,0%)	0,592 ^b
Días de hospitalización, mediana (RIC)			
Tiempo total de hospitalización	48 (32-61)	26,5 (21-34,5)	0,001 ^a
Días entre RPC (+) e ingreso UCI	2 (0-4)	1,5 (0-9)	0,573 ^a
Días UCI	23 (16-37)	19,5 (14-23)	0,245 ^a
Días de VMI previo a NAVM	8 (4-13)	6 (1-9,5)	0,182 ^a
Total días en VMI	21 (17-37)	20 (15-26)	0,200 ^a
Laboratorio de ingreso, mediana (RIC)			
Leucocitos x céls/L	10,2 (8,6-13,4)	14,6 (10-17,3)	0,123 ^a
Linfocitos x céls/L	0,8 (0,6-1,1)	0,8 (0,7-1,3)	0,330 ^a
Proteína C reactiva mg/L	206,4 (136,1-231,9)	211,9 (79,2-295,3)	0,834 ^a
Gravedad de la enfermedad			
SOFA** mediana (RIC)	10 (9-10)	10 (9-13)	0,247 ^a
Posición prono, N° (%)	19 (90,5%)	16 (80,0%)	0,343 ^b
ECMO***, N° (%)	2 (9,5%)	2 (10,0%)	0,959 ^b
Uso de fármacos vasoactivos	18 (85,7%)	18 (90,0%)	0,675 ^b
Terapia de reemplazo renal	3 (14,3%)	6 (30,0%)	0,224 ^b
Embolia pulmonar	2 (9,5%)	3 (15,0%)	0,592 ^b
Coagulopatía	0	3 (15,0%)	0,065 ^b
Accidente cerebro-vascular	0	2 (10,0%)	0,137 ^b
Tratamiento antimicrobiano			
Tratamiento pre-NAVM, N° (%)	21 (100%)	18 (90,0%)	0,137 ^b
Tiempo antibioterapia pre-NAVM mediana días (RIC)	6 (3-7)	4,5 (2-7)	0,392 ^a
Modificación de antibioterapia con resultado de cultivos y PFA-P, N° (%)	19 (90,5%)	16 (80,0%)	0,343 ^b
Tiempo de nuevo antimicrobiano, mediana, días (RIC)	7 (6-10)	8 (7-10)	0,710 ^a
Hemocultivo positivo concomitante con el mismo microorganismo detectado en NAVM. N° (%)	1 (4,8%)	2 (10,0%)	0,359 ^b

^aMann-Whitney test; ^btest χ^2 . *En 7 pacientes que tuvieron dos eventos de NAVM, la sobrevida fue medida desde el primer evento de NAVM. UCI: Unidad de Cuidado Crítico, VMI: ventilación mecánica invasiva, SOFA: sepsis-related organ failure assessment, ECMO: extra-corporeal membrane oxygenation, PFA-P: panel filmarray pneumo.

con cultivos positivos, PFA-P detectó previamente 32 de las 33 bacterias identificadas. La excepción fue una cepa de *K. pneumoniae* de una muestra de AET con un recuento de 500.000 ufc/mL, detectada sólo en cultivo.

Además, entre las mismas 48 muestras de pacientes con NAVM, se detectaron 37 bacterias exclusivamente por PFA-P (n = 34 muestras) y que no fueron posteriormente detectadas por cultivo convencional, correspondiendo a los siguientes agentes: *K. pneumoniae* (n = 8), *P. aeruginosa* (n = 6), *E. coli* (n = 6), *A. calcoaceticus-baumannii* (n = 5), *S. aureus* (n = 4), *H. influenzae* (n = 3), *S. marcescens*

(n = 2), *E. cloacae* (n = 1), *K. aerogenes* (n = 1) y *K. oxytoca* (n = 1). Al comparar la PFA-P con los cultivos convencionales, las tres bacterias más comúnmente detectadas fueron: *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *A. calcoaceticus-baumannii*, demostrándose una sensibilidad que osciló entre 93,3 y 100% y una especificidad que osciló entre 75,8 y 88,4% para estos tres agentes. De igual forma para todos los agentes aislados, la sensibilidad, especificidad, valor predictor positivo y valor predictor negativo para PFA-P respecto a los cultivos fueron 96,9%, 92,5%, 46,4% y 99,8%, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Validación (sensibilidad y especificidad) y seguridad (valor predictor positivo y negativo) de los resultados de panel FilmArray Pneumo (PFA-P), considerando los cultivos convencionales como estándar de oro (n: 48 muestras de 41 pacientes con COVID-19 y NAVM confirmada)

PFA-P (bacterias individuales)	Cultivo convencional		Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
	Positivo	Negativo	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)	(IC 95%)
<i>K. pneumoniae</i>						
Positivo	14	8	93,3	75,8	63,6	96,2
Negativo	1	25	(80,7-105,9)	(61,1-90,4)	(43,5-83,7)	(88,7-103,5)
<i>P. aeruginosa</i>						
Positivo	9	6	100	84,6	60	100
Negativo	0	33	(100-100)	(73,3-95,9)	(35,2-84,8)	(100-100)
<i>A. baumannii</i>						
Positivo	5	5	100	88,4	50	100
Negativo	0	38	(46,3-98,1)	(74,1-95,6)	(20,1-79,8)	(88,6-99,8)
<i>S. marcescens</i>						
Positivo	1	2	100	95,7	33,3	100
Negativo	0	45	(100-100)	(89,9-101,5)	(20,0-86,7)	(100-100)
<i>E. coli</i>						
Positivo	0	6	-	87,5	-	100
Negativo	0	42		(78,1-96,8)		(100-100)
<i>H. influenzae</i>						
Positivo	0	3	-	93,7	-	100
Negativo	0	45		(86,9-100,6)		(100-100)
<i>E. cloacae</i>						
Positivo	0	1	-	97,9	-	100
Negativo	0	47		(93,9-101,9)		(100-100)
<i>K. oxytoca</i>						
Positivo	0	1	-	97,9	-	100
Negativo	0	47		(93,9-101,9)		(100-100)
<i>K. aerogenes</i>						
Positivo	0	1	-	97,9	-	100
Negativo	0	47		(93,9-101,9)		(100-100)
<i>S. aureus</i>						
Positivo	2	4	100	91,3	33,3	100
Negativo	0	42	(100-100)	(83,2-99,4)	(4,4-71,1)	(100-100)
<i>S. agalactiae</i>						
Positivo	1	0	100	100	100	100
Negativo	0	47	(100-100)	(100-100)	(100-100)	(100-100)
Filmarray Pneumo (total de bacterias)						
Positivo	32	37	96,9	92,5	46,4	99,8
Negativo	1	458	(91,1-102,8)	(90,2-94,8)	(34,6-58,1)	(99,3-100,2)

VPP: valor predictor positivo, VPN: valor predictor negativo.

De las 32 bacterias detectadas por PFA-P y que crecieron en los cultivos, 22 (68,75%) registraron $\geq 10^6$ copias/mL de ácidos nucleicos bacterianos. En contraste, entre las 37 bacterias detectadas por la FAP-P y que no crecieron en los cultivos, 31 (83,7%) tenían $\leq 10^5$ copias/mL de ácidos nucleicos bacterianos (Figura 1). La tendencia no cambió si la muestra correspondía a LBA o AET (Figura 2).

Se detectó un total de 34 genes de resistencia en 19 muestras, incluidos CTX-M (n = 18), KPC (n = 5), NDM (n = 9) y *mecA* / C & MREJ (n = 2).

No hubo casos en los que en el antibiograma se detectara resistencia asociada a BLEE, carbapenemasas o metilicina, y que no fuera detectada previamente por PFA-P. Además, el PFA-P no detectó otros agentes

virales ni bacterias atípicas en esta cohorte de pacientes. Todos los informes PFA-P se comunicaron a los médicos tratantes dentro de las dos horas posteriores al envío de las muestras al laboratorio de microbiología.

Finalmente, la presencia de un PFA-P positivo para bacterias o genes de resistencia concomitantemente con un crecimiento bacteriano negativo y/o ausencia de gen de resistencia detectado en el cultivo convencional se relacionó con un cambio en el régimen antimicrobiano ajustado a los resultados de PFA-P en 26 veces en 23 pacientes, 12 de los cuales sobrevivieron 30 días después de ser diagnosticados de NAVM. El perfil de estos 23 pacientes, sus respectivos cultivos y tratamiento se muestran en la Tabla 3.

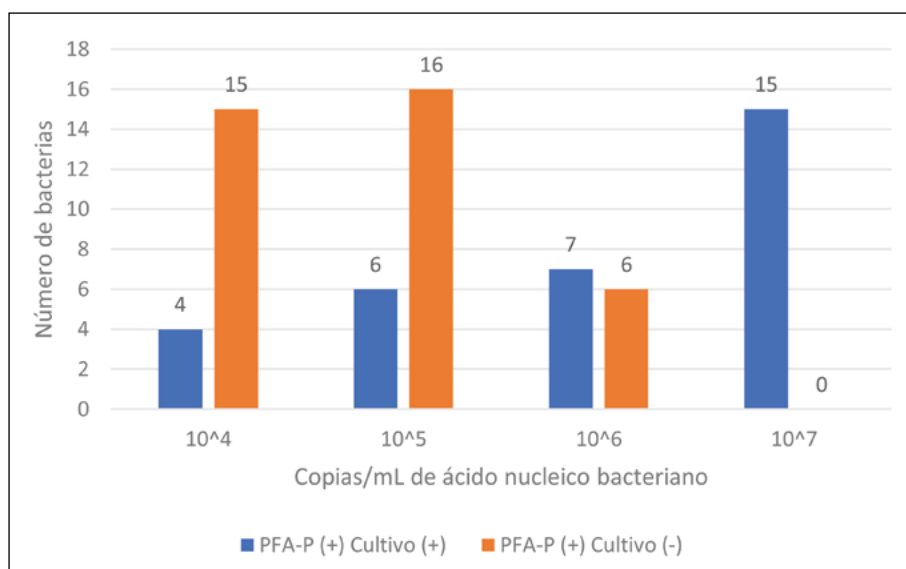


Figura 1. Sesenta y nueve bacterias detectadas en 48 muestras respiratorias por el panel FilmArray Pneumo (FAP-P) expresadas en copias/mL de ácido nucleico bacteriano y relación con cultivos positivos o negativos. No se incluye una muestra de AET con FAP-P negativo y cultivo positivo para *K. pneumoniae*.

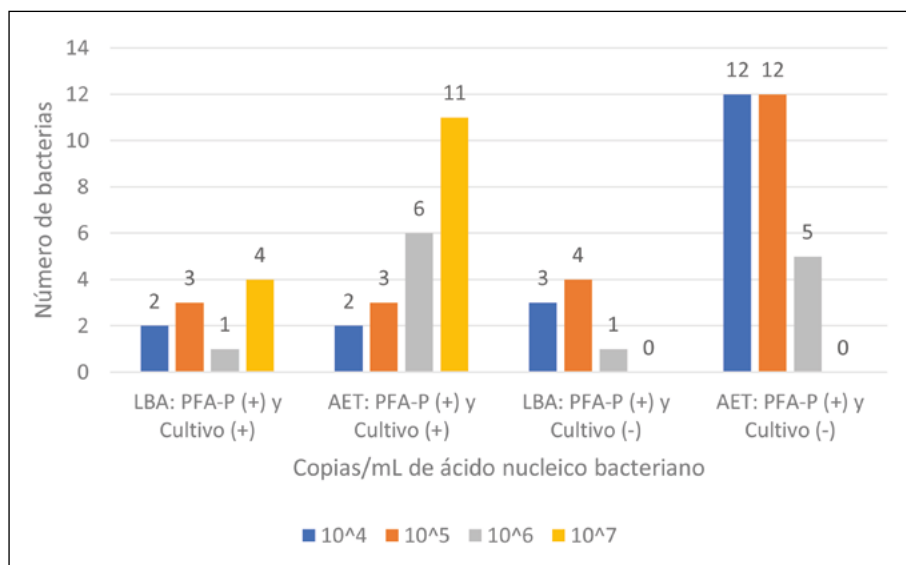


Figura 2. Sesenta y nueve bacterias detectadas por el panel FilmArray Pneumo (FAP-P) de muestras respiratorias de lavado bronquioalveolar (BAL) [n: 15] y endotraqueales (ETA) [n: 33] expresadas en copias/mL de ácido nucleico bacteriano. Relacionado con cultivos positivos o negativos. No se incluye una muestra de AET con PFA-P negativo y cultivo positivo para *K. pneumoniae*.

Tabla 3. Perfil de 23 pacientes con COVID-19 y NAVM en quienes se modificó el tratamiento antimicrobiano debido a bacteria detectadas exclusivamente en el panel FilmArray (FAP) y que tenían concomitantemente cultivos negativos o positivos a otras bacterias distintas a las halladas en FAP

Sexo Edad	Días Hos	Días VMI	SOFA	PRONO ECMO	Vivo 30 día post NAVM	ATB Prevía (d)	ATB Dirigido (d)	Tipo de Muestra	Cultivo y FAP	Solo FAP
M/56	45	19	12	Sí No	Sí	AMP SUL 4	MER 10	AET	(-)	KPN, SMA, ECO
M/61	21	21	12	Sí No	No	AZT 1	AMP-SUL 10	AET	(-)	SAMS HIN
M/37	44	44	13	Sí Sí	No	CTZ AVB 12	COL 7	LBA	KPN CTX-M NDM	ACBA KPC
M/51	20	19	10	Sí No	Sí	CTZ AZT 7	IMP 10	AET	(-)	SMA
M/36	22	8	6	No No	Sí	AMP SUL 7	IMP 5	AET	PAE	KPN-CTX-M/ECO
F/33	37	23	10	Sí No	No	AMP SUL 7	VAN/COL 7	AET	SAMR mecAC MREJ	ACBA ECOL CTX-M
M/42	12	11	10	Sí No	No	AMP SUL 2	VAN 7	AET	(-)	SAU
M/31	134	33	10	Sí No	Sí	VAN PIP-TAZ 7	IMI 7	AET	(-)	KPN
M/42	27	16	8	Sí No	Sí	VAN PIP-TAZ 8	LIN 7	AET	SAU	mecA/C-MREJ
M/15	23	15	7	Sí No	No	VAN PIP-TAZ 5	LIN/MERO 12	AET	(-)	KPN
M/70	24	15	10	Sí No	No	PIP-TAZ 2	VAN / IMI 7	AET	(-)	KAE
F/49	26	17	9	Sí No	No	VAN IMP 3	CIP 2	AET	(-)	ECOL
F/55	72	49	10	Sí No	Sí	IMP 7	CFZ/AVB 7	AET	ACBA, KPN, CTX-M	ECLO, PAE, KPC
M/50	41	26	10	Sí No	No	IMP 9	LIN, CFZ 7	LBA	(-)	PAE
F/45	61	47	11	Sí No	Sí	AMP SUL 6	COL 14	AET	(-)	ACBA, PAE
F/58	28	13	16	No No	No	CFZ 1	MER COL 8	AET	PAE	KPN CTX-M NDM
M/47	44	39	11	Sí Sí	Sí	VAN IMP 7	IMP 16*	LBA	(-)	KPN
M/64	32	9	10	Sí No	Sí	IMP 3	VAN COL MER 7	AET	KPN CTX-M KPC	ACBA SAU
F/72	28	27	9	Sí No	No	VAN 4	CFZ 7	LBA	(-)	PAE
M/49	43	42	17	Sí Sí	Sí	VAN IMP 3	PIP TAZ 3	AET	(-)	ECOL
M/48	6	6	8	Sí No	Sí	AMP SUL 5	PIP TAZ 2	AET	(-)	KOXY
F/55	57	21	12	Sí No	Sí	AMP SUL 3	COL 11	LBA	(-)	ACBA
F/27	27	26	10	Sí No	No	AMP SUL 2	MER COL 4	LBA	ACBA.	KPN CTX-M NDM

ACBA: *Acinetobacter baumannii*, VMI: ventilación mecánica invasiva, SOFA: *Sequential Organ Failure Assessment*, ATB: antibioterapia. AMP SUL: ampicilina/sulbactam, AZT: azitromicina, CTZ AVB: ceftazidima/avibactam, CTZ: ceftazidima, VAN: vancomicina, PIP-TAZO: piperacilina/tazobactam, MER: meropenem. COL: colistin, IMI: imipenem, LIN: linezolid, CIP: ciprofloxacina, KPN: *Klebsiella pneumoniae*, SMA: *Serratia marcescens*, ECO: *Escherichia coli*, SAMS: *Staphylococcus aureus* multi sensible, HIN: *Haemophilus influenzae*, SAMR: *Staphylococcus aureus* MR, PAE: *Pseudomonas aeruginosa*. SAU: *Staphylococcus aureus*. KAE: *Klebsiella aerogenes*, KOXY: *Klebsiella oxytoca*, CTX-M, KPC, NDM, mecA/C-MREJ: genes de resistencia.

Discusión

La experiencia de estos dos últimos años, 2020 y 2021, ha dejado claro que los pacientes graves con COVID-19 que requirieron VMI y tienen factores de riesgo evolucionan frecuentemente a deterioro con hospitalización en áreas críticas y VMI prolongada más allá del período habitual, Lahera y cols.¹⁸, muestran un tiempo de VMI de dos semanas de media en una cohorte chilena de pacientes críticos con COVID-19 publicada por nuestro hospital y que duplica el tiempo medio habitual categorizando a estos pacientes como estancias prolongadas en VMI¹⁹. En nuestra cohorte, el tiempo medio de hospitalización fue cercano a 40 días y el tiempo de VMI fue de aproximadamente tres semanas. En esta situación, las infecciones nosocomiales y, en particular la NAVM, juegan un papel protagónico en el pronóstico de estos pacientes. Una de las primeras series publicadas sobre 41 pacientes críticos con COVID-19 muestra que 31% de ellos desarrollaron NAVM⁷, en contraste con un estudio en el Reino Unido con una cohorte de 81 pacientes con COVID-19 en VMI; el 100% de ellos desarrolló al menos un evento de NAVM después de 35 días de seguimiento, a diferencia de un grupo de pacientes control sin COVID-19 en VMI, que durante el mismo período tuvieron una incidencia de NAVM de 30%⁸. En consecuencia, uno de los principales retos de los pacientes gravemente enfermos con COVID-19 en VMI, es evitar la NAVM y, si se produce, saber diagnosticarla y tratarla lo más tempranamente posible.

El uso prematuro y a veces excesivo de la terapia antimicrobiana en pacientes críticamente enfermos con COVID-19 representa una práctica extendida en todo el mundo; dentro de las 24 horas posteriores al ingreso en la UCI, de 94 a 97% de los pacientes ya habrán iniciado una antibioterapia^{8,20}. En nuestra cohorte, 95,7% de los pacientes había recibido tratamiento con antimicrobianos durante aproximadamente una semana antes de su ingreso en la UCI. Este uso excesivo de antimicrobianos, especialmente cefalosporinas de tercera generación indicadas como primera opción empírica en pacientes con neumonía²¹, está directamente relacionado con el aumento de β -lactamasas y la aparición de agentes multirresistentes^{22,23}.

En este escenario, el diagnóstico rápido y preciso de una infección bacteriana que complica la neumonía por SARS CoV-2 es de suma relevancia. En nuestro estudio fue importante la asertividad para ordenar la PFA-P y su implementación como una herramienta para definir rápidamente la presencia de NAVM; esta prueba diagnóstica fue solicitada 82 veces y fue positiva en 49 ocasiones (59,7%), demostrando la presencia de 69 patógenos bacterianos.

También es muy destacable que el reporte del PFA-P lo recibieran los equipos tratantes en un período menor

a dos horas, a diferencia de los cultivos convencionales cuya información definitiva no se puede obtener antes de las 48 horas, latencia en el tiempo que puede relacionarse con riesgo de una antibioterapia inicial inadecuada lo cual es ampliamente reconocido como un factor que influye en la mortalidad de los pacientes críticos con NAVM²⁴. Las últimas directrices de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América (IDSA) para el manejo de la neumonía adquirida en el hospital y NAVM²⁵ describen como indicador de rendimiento de los métodos clásicos de cultivo cuantitativo en muestras AET un punto de corte de $\geq 10^5$ ufc/mL con una sensibilidad de 76% y una especificidad de 75% para el diagnóstico de NAVM, teniendo en cuenta que estos valores pueden mejorar si la muestra es tomada por LBA donde la sensibilidad es de 80% y la especificidad de 82% para un valor $\geq 10^4$ ufc/mL. Como PFA-P es una técnica molecular semicuantitativa, no existen equivalentes exactos que equiparen los cultivos convencionales; por lo tanto, un resultado de PFA-P con 10^4 copias/mL de ácido nucleico bacteriano podría ser equivalente a 10.000 o 90.000 ufc/mL de una bacteria aislada en un cultivo. El análisis clínico, las pruebas de laboratorio y las imágenes deben contribuir a definir si la presencia de ácido nucleico bacteriano demostrada por PFA-P corresponde a una bacteria invasora mientras se espera el resultado de los cultivos.

Por otro lado, los hemocultivos no suelen alcanzar más de 15% de positividad, pero sí reflejan la gravedad de la NAVM, como una condición potencialmente mortal²⁶. En nuestra serie, los hemocultivos permitieron detectar las mismas bacterias asociadas a NAVM en sólo tres pacientes (7,3%).

Si consideramos que la NAVM es una de las infecciones adquiridas en UCI más frecuentes²⁶, el perfil bacteriológico de la NAVM en nuestro estudio fue diferente al mostrado en el último informe oficial del sistema nacional de vigilancia de Chile²⁷; las variaciones de frecuencia observadas para las cuatro bacterias más frecuentes en nuestro estudio relacionadas con este informe nacional fueron las siguientes: *K. pneumoniae*: 32,9 vs 21,6%, *P. aeruginosa*: 21,4 vs 24,6%, *A. baumannii*: 14,3 vs 9,8%, y *S. aureus*: 8,56 vs 21,2%, respectivamente.

El rendimiento de la PFA-P en nuestro trabajo es comparable a cultivos convencionales (considerados el estándar de oro) y alcanzó una especificidad y sensibilidad muy alta pero con un valor predictor positivo de 46%, lo que se asocia al riesgo de considerar patógenos inactivos o colonizadores como patógenos activos, especialmente al pensar que casi 22% de las muestras (15 de 69) tuvieron 10^4 copias/mL de ácido nucleico bacteriano con cultivo negativo y que de estas muestras, 12 se obtuvieron por AET.

Sin embargo, la gran fortaleza de la PFA-P representa su valor predictor negativo, lo que coloca a esta técnica

molecular como muy valiosa a la hora de decidir si limitar o suspender aquellos antimicrobianos indicados en forma empírica, situación que en nuestra cohorte sucedió en 40% de los casos, proyectando esta técnica diagnóstica como una herramienta muy útil en los programas de control de antimicrobianos^{28,29}. En el caso particular del paciente crítico con COVID-19, la presencia de un PFA-P negativo permitiría establecer con mayor precocidad y certeza la influencia de otros fenómenos no infecciosos como los síndromes inmuno-inflamatorios desencadenados por SARS CoV-2 o complicaciones como la embolia pulmonar³⁰ u otras infecciones como por ejemplo las debidas a hongos filamentosos³¹ como causa del síndrome febril y la insuficiencia respiratoria persistente que inicialmente se interpretó como una NAVM bacteriana. Creemos que para todas estas situaciones es imperativo que PFA-P sea un complemento a la información que brindan los cultivos convencionales^{32,33}.

Finalmente, es importante mencionar que no se identificó bacterias atípicas (*Legionella* sp, *Mycoplasma* sp o *Chlamydophila* sp) por PFA-P, lo que nos lleva a poner en discusión la probable futilidad del uso de agentes antimicrobianos como azitromicina o levofloxacina en los regímenes antimicrobianos empíricos cuando se sospecha una infección bacteriana en pacientes con COVID-19 grave.

Las debilidades de este estudio tienen que ver con su carácter retrospectivo, realizarse en un centro único

con escaso número de pacientes, que las muestras se obtuvieron con dos técnicas diferentes y la existencia de varios factores de confusión relacionados con el diagnóstico de infecciones respiratorias en pacientes críticamente enfermos con COVID-19³⁴. No se dispuso tampoco durante todo el tiempo del estudio de PFA-P, básicamente por falta de recurso económico, existiendo periodos de intermitencia donde no se pudo registrar pacientes con NAVM lo que eventualmente influiría en la estimación del rendimiento de la técnica. Por otro lado, las fortalezas de este estudio están relacionadas con demostrar la potencial utilidad de una técnica de diagnóstico molecular para limitar y ajustar el uso de antimicrobianos en un hospital público de escasos recursos y, además, con ampliar el conocimiento sobre su uso en la práctica diaria en pacientes críticos.

Es evidente, por último, la necesidad de estudios más amplios, aleatorizados y controlados para determinar el verdadero valor de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico de NAVM.

Agradecimientos: Los autores agradecen a la Dra. Karla Yohannessen por la revisión del estudio y su análisis estadístico.

Dataset: Lasso, Martín (2021), "FAP-P VAP Chile", Mendeley Data, V1, doi:10.17632/smvbm47n3z.1.

Referencias bibliográficas

- 1.- Gallo Marin B, Aghagholi G, Lavine K, Yang L, Siff E, Chiang S, et al. Predictors of COVID-19 severity: a literature review. *Rev Med Virol.* 2021; 31: 1-10. <https://doi.org/10.1002/rmv.2146>.
- 2.- Cantón R, Gijón D, Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care.* 2020; 26: 433-41. <https://doi.org/10.1097/MCC.0000000000000755>.
- 3.- García-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Martínez JM, Soriano A, Rico V, et al. Incidence of coinfections and superinfections in hospitalized patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clin Microbiol Infect.* 2020; 27: 83-8. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.041>.
- 4.- Rawson T M, Moore L S P, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, et al. Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clin Infect Dis.* 2020; 71: 2459-68. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa530>.
- 5.- Karaba S M, Jones G, Helsel T, Leigh Smith L, Avery R, Dzintars K, et al. Prevalence of co-infection at the time of hospital admission in COVID-19 patients, a multicenter study. *Open Forum Infect Dis.* 2021; 8 ofaa578 <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa578>
- 6.- Lansbury L, Lim B, Baskaran V, Lim W S. Co-infections in people with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *J Infect.* 2020; 81: 266-75 <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.05.046>
- 7.- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet.* 2020; 395: 497-506 [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- 8.- Maes M, Higginson E, Pereira-Dias J, Curran M, Parmar S, Khokhar F, et al. Ventilator-associated pneumonia in critically ill patients with COVID-19. *Crit Care* 2021; 25: 25 <https://doi.org/10.1186/s13054-021-03460-5>
- 9.- Centers for Disease Control (CDC). Pneumonia (ventilator-associated [VAP] and nonventilator-associated pneumonia [PNEU]) event. (accessed 20 May 2021) <https://www.cdc.gov/nhsn/pdfs/pscmanual/6pscvapcurrent.pdf>
- 10.- Torres A, Niederman M S, Chastre J, Ewig S, Fernández-Vandellos P, Hanberger H, 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; 50(3): 1700582. <https://doi.org/10.1183/13993003.00582-2017>
- 11.- Kalil A C, Metersky M L, Klompas M, Muscedere J, Sweeney D A, Palmer L B, 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): e61-e111. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw353>
- 12.- Arulkumaran N, Routledge M, Schlebusch S, Lipman J, Conway M A. Antimicrobial-associated harm in critical care: a narrative

- review. *Intensive Care Med.* 2020; 46: 225-35. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05929-3>
- 13.- Plachouras D, Lepape A, Suetens C. ECDC definitions and methods for the surveillance of healthcare-associated infections in intensive care units. *Intensive Care Med.* 2018; 44(12): 2216-8. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5113-0>
 - 14.- Canadian Critical Care Trials Group. A randomized trial of diagnostic techniques for ventilator-associated pneumonia. *N Engl J Med.* 2006; 355: 2619-30. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa052904>
 - 15.- Meyer K C, Raghu G, Baughman R P, Brown K K, Costabel U, du Bois R M, et al. An official American Thoracic Society clinical practice guideline: the clinical utility of bronchoalveolar lavage cellular analysis in interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 185: 1004-14. <https://doi.org/10.1164/rccm.201202-0320st>
 - 16.- Leber A L. Clinical microbiology procedures handbook. 4th ed. American Society for Microbiology 2016. <http://dx.doi.org/10.1128/9781555818814>
 - 17.- Wayne P A. Clinical and Laboratory Standards Institute CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. CLSI supplement M100.2020. <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
 - 18.- Lahera T, Ruiz C, Aquevedo A, Cotoras P, Uribe J, Montenegro C. Reporte de los primeros 50 pacientes con COVID-19 en ventilación mecánica hospitalizados en la Unidad de Cuidados Intensivos del Complejo Asistencial "Dr Sótero Del Río". *Rev Med Chile* 2020; 148: 1725-33. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rmc/v148n12/0717-6163-rmc-148-12-1725.pdf>
 - 19.- Santana-Cabrera L, Lorenzo-Torrent R, Sánchez-Palacios M, Martín Santana J D, Hernández J R. Pronóstico de los pacientes médicos según la duración de su estancia en la unidad de cuidados intensivos. *Med Intensiva.* 2014; 38(2): 126-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.medin.2013.06.004>
 - 20.- Li J, Wang J, Yang Y, Cai P, Cao J, Cai X, et al. Etiology and antimicrobial resistance of secondary bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective analysis. *Antimicrob Resist Infect Control* 2020; 9: 153: 1-7 <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00819-1>
 - 21.- Porto A P M, Goossens H, Versporten A, Costa SF; Brazilian Global-PPS Working Group. Global point prevalence survey of antimicrobial consumption in Brazilian hospitals. *J Hosp Infect.* 2020; 104(2): 165-71. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.10.016>
 - 22.- Mella S, Riedel G, Twele L, Domínguez M, Bello H González G. La conexión neumocócica. *Rev Chil Infectol* 2013; 30 (1): 74-9. <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v30n1/art12.pdf>
 - 23.- Niehus R, van Kleef E, Mo Y, Turlej-Rogacka A, Lammens C, Carmeli Y, et al. Quantifying antibiotic impact on within-patient dynamics of extended-spectrum beta-lactamase resistance. *eLife* 2020; 9: e49206. <https://doi.org/10.7554/eLife.49206>
 - 24.- Kuti E L, Patel A A, Coleman C I. Impact of inappropriate antibiotic therapy on mortality in patients with ventilator-associated pneumonia and blood stream infection: a meta-analysis. *J Crit Care.* 2008; 23: 91-100. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2007.08.007>
 - 25.- Kalil A, Metersky M L, Klompas M, Muscedere J, Sweeney D A, Palmer L B, et al. Executive summary: 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): 575-82. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw504>
 - 26.- Papazian L, Klompas, Luyt C E. Ventilator-associated pneumonia in adults: a narrative review. *Intensive Care Med* 2020; 46(5): 888-906 <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05980-0>
 - 27.- Otaíza F, Orsini M, Pohlenz M. Informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención de salud 2018. Programa de Control de IAAS. Departamento de Calidad y Seguridad de la Atención. Ministerio de Salud de Chile 2018. Spanish (accessed 22 May 2021) <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/08/INFORME-DE-VIGILANCIA-DE-IAAS-2018.pdf>
 - 28.- Furukawa D, Kim B, Jeng A. Real-life utilization of BioFire® Filmarray® pneumonia panel as an antibiotic stewardship tool. *Infect Dis (Lond).* 2021; 53(4): 308-13 <https://doi.org/10.1080/23744235.2020.1866774>
 - 29.- Zilahi G, McMahon M A, Povoia P, Martin-Loeches I. Duration of antibiotic therapy in the intensive care unit. *J Thorac Dis* 2016; 8(12): 3774-80. <http://doi.org/10.21037/jtd.2016.12.89>
 - 30.- Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med* 2021; 27: 601-15. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z>
 - 31.- Lai C C, Yu W L. COVID-19 associated with pulmonary aspergillosis: A literature review. *J Microbiol Immun Infect* 2021; 54: 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2020.09.004>
 - 32.- Verroken A, Scohy A, Gérard L, Wittebole X, Collienne C, Laterre P F. Co-infections in COVID-19 critically ill and antibiotic management: a prospective cohort analysis. *Crit Care.* 2020; 24: 410 <https://doi.org/10.1186/s13054-020-03135-7>
 - 33.- Caméléna F, Moy A-C, Dudoignon E, Poncin T, Deniau B, Guillemet L, et al. Performance of a multiplex polymerase chain reaction panel for identifying bacterial pathogens causing pneumonia in critically ill patients with COVID-19. *Diag Microbiol Infect Dis* 2020 Aug 21; 99 (1) 115183. <http://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115183>
 - 34.- Revzin M V, Raza S, Warshawsky R, D'Agostino C, Srivastava N C, Bader A S, et al. Multisystem imaging manifestations of COVID-19, Part 1: viral pathogenesis and pulmonary and vascular system complications. *RadioGraphics* 2020; 40: 1574-99 <https://doi.org/10.1148/rg.2020200149>