
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Rolul reacției de polimerizare în lanț efectuate în secția de terapie intensivă în diagnosticul pneumoniei nosocomiale

Doctorand **Andrei-Mihai Bălan**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Natalia Hagău**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	3
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	3
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	4
STUDIUL 1 Utilizarea POC-PCR în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială. O abordare pas-cu-pas în identificarea genelor de rezistență la antibiotice și a bacteriilor cauzatoare de pneumonie nosocomială.	5
STUDIUL 2 Necesitatea unui diagnostic rapid în managementul pneumoniei nosocomiale. Diferențe între pacienții cu pneumonie asociată ventilației mecanice cu și fără COVID-19. Este mortalitatea diferită?	6
DISCUȚII GENERALE	7
CONCLUZII GENERALE	8
ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE ALE TEZEI	8

Cuvinte cheie: pneumonie nosocomială, pneumonie asociată ventilației mecanice, pneumonie dobândită în spital, diagnostic molecular, PCR, VAP, COVID-19.

Introducere

În ciuda măsurilor de profilaxie implementate în ultimii ani, infecțiile nosocomiale continuă să prezinte o problemă reală de sănătate publică. Pneumonia nosocomială (PN) reprezintă una dintre cele mai frecvente infecții dobândite în mediul spitalicesc. În plus, prevalența în creștere a bacteriilor multi-rezistente la antibiotice, a condus la o adevărată provocare în tratamentul acestor infecții.

Precocitatea diagnosticului pneumoniei nosocomiale este unul dintre factorii care pot contribui la succesul tratamentului și la îmbunătățirea prognosticului mai ales la pacienții critici internați în secțiile de terapie intensivă.

Lucrarea de față își propune să valideze utilitatea unei tehnici moderne de diagnostic al pneumoniei nosocomiale prin identificarea bacteriilor și a genelor de rezistență la antibiotice utilizând reacția de polimerizare în lanț (polymerase chain reaction – PCR). În același timp într-un studiu complementar ne propunem să evaluăm impactul bolii COVID-19 asupra profilului etiologic bacterian și al mortalității la pacienții care au dezvoltat pneumonie asociată ventilației mecanice (VAP) în timpul internării în terapie intensivă, prin comparație cu pacienții critici care au dezvoltat VAP în perioada prepandemică subliniind și potențiala utilitate a dispozitivelor de tipul point-of-care (POC) PCR în managementul acestor pacienți.

Stadiul actual al cunoașterii

Incidența pneumoniei nosocomiale variază între 10 și 30%, în rândul pacienților internați în secțiile de terapie intensivă, cu o mortalitate consecutivă care poate ajunge până la 75%. Etiologia PN diferă de la regiune la regiune, cu predominanța bacteriilor Gram negative precum *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* și complexul *Acinetobacter baumannii* și într-un procent mai mic a celor Gram pozitive precum *Staphylococcus aureus* sensibil sau nu la metilicină (*Staphylococcus aureus* - SA / *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA).

Suspiciunea diagnostică este sugerată de apariția semnelor clinice sugestive unei infecții (febră, tuse cu expectorație sau exteriorizarea de secreții muco-purulente la nivelul sondei de intubație), colaborate cu modificări biologice precum creșterea numărului de leucocite, prezența hipoxemiei sau creșterea în dinamică a unor markeri biologici inflamatori/infecțioși precum proteina C reactivă sau procalcitonina, în prezența unor modificări imagistice sugestive pentru pneumonie.

Confirmarea diagnosticului de pneumonie este realizată clasic prin certificarea creșterii bacteriene pe medii de cultură, din probe recoltate prin mijloace specifice din tractul respirator inferior (aspiratul traheo-bronșic, broșajul bronșic protejat sau lavajul bronho-alveolar).

Identificarea bacteriană și emiterea unei antibiograme, se realizează de cele mai multe ori, după metodele clasice de laborator și anume întinderea mostrei pe plăci de

cultură îmbogățite cu diferite medii de creștere bacteriană, incubarea lor într-un mediu standard, identificarea bacteriană și ulterior emiterea unei antibiograme. Principalul dezavantaj al acestei metode este reprezentat de timpul necesar emiterii unui rezultat final care poate fi de până la 72 de ore. În tot acest timp pacientul primind un regim antibiotic empiric, care de multe ori poate fi ineficient, contribuind la creșterea morbidității și mortalității pacientului.

În ultimii ani, s-au dezvoltat multiple tehnici bazate pe reacția de polimerizare în lanț. Astfel, identificarea bacteriană și a genelor de rezistență la antibiotice a devenit posibilă prin utilizarea unor sisteme de tipul multiplex-PCR care detectează simultan mai multe gene specifice fiecărui agent etiologic în parte dar și gene care determină rezistența la antibiotice.

Comparativ cu utilizarea tehnicilor clasice de diagnostic, avansul tehnologic al sistemelor multiplex PCR permite un diagnostic precoce (în câteva ore) al etiologiei pneumoniei nosocomiale, lucru care conduce la scurtarea sau chiar evitarea antibioterapiei empirice.

Contribuția personală

Cercetarea doctorală și-a propus două obiective majore:

Primul obiectiv al acestei cercetări a fost evaluarea utilității unui sistem de diagnostic molecular bazat pe tehnica POC-PCR la pacienții cu pneumonie nosocomială din terapie intensivă în vederea adaptării precoce a antibioterapiei inițiale prin detectarea rapidă a genelor de rezistență la antibiotice și a unor bacterii cauzatoare de pneumonie.

Al doilea obiectiv a fost de a compara profilul clinic, epidemiologic, microbiologic, strategia terapeutică și mortalitatea la pacienții care au dezvoltat VAP în perioada pandemiei COVID-19 cu pacienții cu VAP din perioada prepandemică.

În mod complementar, ne-am propus printr-un studiu comparativ a două loturi distincte, să evidențiem avantajele în termen de eficiență diagnostică exprimate prin durata de timp necesară pentru identificarea bacteriană și a genelor de rezistență la antibiotice prin tehnica POC-PCR față de metoda clasică de laborator.

STUDIUL 1 Utilizarea POC-PCR în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială. O abordare pas-cu-pas în identificarea genelor de rezistență la antibiotice și a bacteriilor cauzatoare de pneumonie nosocomială.

Prin utilizarea tehnologiei POC-PCR care permite identificarea bacteriană (*MRSA/SA*) și a genelor de rezistență atât la vancomicină cât și la carbapenemi, într-un interval de timp scurt (comparativ cu tehnicile clasice de laborator), sunt create premisele unei antibioterapii inițiale precoce, cât mai potrivite, având potențialul de a contribui la reducerea mortalității și la îmbunătățirea prognosticului. Obiectivul principal al acestui studiu este de a evalua utilitatea acestei tehnici comparativ cu metoda clasică de laborator în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială. Totodată, secundar s-a evaluat modul în care această abordare poate fi folosită în ajustarea antibioterapiei empirice. S-au comparat două loturi de pacienți, unul în care au fost incluși 29 de pacienți cu pneumonie nosocomială (fie pneumonie dobândită în spital - HAP fie VAP) cu un lot de control în care au fost incluși 28 de pacienți care au fost supuși unei intervenții chirurgicale electivă sub anestezie generală și intubație oro-traheală.

Rezultatele studiului demonstrează capabilitatea ridicată de identificare a genelor de rezistență la antibiotice precum carbapenemii sau vancomicina, prin tehnica POC-PCR, arătând o sensibilitate și specificitate ridicate în raport cu metoda standard. Totodată testul de identificare a *Staphylococcus aureus* sensibil sau nu la meticilină a prezentat sensibilitate și specificitate foarte ridicate, demonstrând de asemenea o acuratețe mare. S-a demonstrat că aceste teste moleculare pot fi utilizate ca și ghid pentru schimbarea antibioterapiei empirice, având o acuratețe de 83% în precizarea corectă a schimbării antibioticului. Rezultatele acestor teste au fost validate cu aproape 2 zile mai repede decât cele provenite prin metoda clasică de laborator.

În urma acestui studiu am concluzionat că tehnica POC-PCR este utilă atât în identificarea rapidă a genelor de rezistență la principalele antibiotice utilizate în regimurile empirice cât și în identificarea directă a unor bacterii potențial cauzatoare de HAP sau VAP (precum *MRSA* sau *SA*). Rezultatele acestor teste ar putea fi utilizate în ajustarea antibioterapiei empirice putând conduce la scăderea ratei de antibioterapie empirică inadecvată și a morbi-mortalității pacienților critici care prezintă pneumonie nosocomială.

STUDIUL 2 Necesitatea unui diagnostic rapid în managementul pneumoniei nosocomiale. Diferențe între pacienții cu pneumonie asociată ventilației mecanice cu și fără COVID-19. Este mortalitatea diferită?

Incidența VAP în rândul pacienților COVID-19 a fost mai mare decât în perioada pre-pandemică, ajungând chiar până la 85%. Pacienții cu forme severe de COVID-19 care au dezvoltat ulterior VAP au prezentat o mortalitate ridicată de peste 50%. Mortalitatea poate fi estimată încă de la internarea în terapie intensivă, prin utilizarea unor scoruri specifice precum Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), Simplified acute physiology Score (SAPS II), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II) și Charlson Comorbidity Index.

Multe dintre episoadele de VAP apărute la pacienții din secțiile de terapie intensivă pot fi cauzate de bacterii multi-rezistente la antibiotice, ducând la o creștere a dificultății instituirii unei antibioterapii empirice adecvate. La pacienții cu VAP, antibioterapia inadecvată este un factor care poate duce la apariția complicațiilor și la creșterea mortalității. Pentru a obține o terapie antibiotică țintită într-un timp cât mai scurt, este necesară utilizarea unor tehnici de identificare bacteriană și a genelor de rezistență mult mai rapide decât cea uzuală (gold-standard).

În acest studiu s-a comparat mortalitatea pacienților care au dezvoltat VAP în perioada pre-pandemică cu cea a pacienților cu VAP din perioada pandemiei COVID-19. S-au folosit atât date brute de mortalitate dar și datele rezultate din calcularea scorurilor de predicție a mortalității precum SOFA, SAPS II, APACHE II și Charlson Comorbidity Index. Printre obiectivele secundare ale acestui studiu au fost evidențierea diferențelor dintre pacienții care au dezvoltat VAP în perioada pre-pandemică față de cei cu VAP din perioada pandemiei COVID-19 în ceea ce privește comorbiditățile acestora, durata de internare, de ventilație mecanică dar și cele legate de episodul infecțios respectiv etiologia acestuia și modul de abordare terapeutică. A fost comparat și timpul necesar identificării bacteriene și a genelor de rezistență la antibiotice prin metoda POC-PCR cu cel necesar mijloacelor clasice de laborator, subliniind necesitatea unei astfel de metode în situații speciale epidemiologice precum cea a pandemiei COVID-19.

S-au comparat 2 grupuri, ambele formate din 26 de pacienți care au dezvoltat VAP în cele două perioade diferite. Prin această comparație s-a constatat faptul că mortalitatea între cele două grupuri de studiu a fost similară, însă mai mulți pacienți au decedat în primele 28 zile de la internare din lotul VAP-COVID-19 față de pacienții cu VAP dar fără COVID-19. Valorile scorurilor de mortalitate au fost similare între cele două grupuri de studiu și de asemenea, s-a observat un trend ascendent, în ambele loturi, al scorurilor cuantificate la momentul externării respectiv al decesului față de momentul internării în secția de terapie intensivă. Scorul SOFA a prezentat o creștere în dinamică în mai multe momente din cadrul internării, creștere care ar putea fi utilizată și în ridicarea și susținerea diagnosticului de VAP. La pacienții cu VAP și COVID-19 agenții etiologici au

prezentat mai frecvent rezistență crescută la antibiotice. Factori precum expunerea mai frecventă la corticoterapie, tratament antisecretor gastric sau un timp mai îndelungat de ventilație non-invazivă premergător intubației oro-traheale ar putea duce la creșterea incidenței bacteriilor multi-rezistente implicate în VAP. Timpul de identificare bacteriană și de emisie a antibiogramelor prin metodele clasice a fost mai lung în perioada pandemiei, sugerând dificultatea prin care au trecut nu doar personalul din secțiile medicale ci și personalul din laboratoarele bacteriologice.

Tehnologia POC-PCR poate identifica gene de rezistență la antibiotice și unele bacterii cauzatoare de VAP precum *MRSA* sau *SA* într-un timp mult mai scurt față de tehnicile clasice, diferență de timp evidențiată și în cercetarea de față prin compararea a două loturi de pacienți cu VAP. Datorită acestui avantaj față de metoda gold-standard, POC-PCR poate fi utilă în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială mai ales în situații speciale, precum a fost cea a pandemiei COVID-19, unde timpul necesar laboratorului de bacteriologie pentru emiterea rezultatelor a fost mai crescut decât în mod normal, lăsând pacienții să primească un regim de antibioterapie empirică care de multe ori a fost inadecvat, crescând astfel mortalitatea acestora.

Discuții generale

Pentru a îmbunătăți prognosticul pacienților cu pneumonie nosocomială și a crește șansele ca antibioterapia să fie eficientă asupra agentului etiologic, încă de la instituirea ei, este necesară obținerea unei identificări bacteriene dar și a unui profil de rezistență la antibiotice într-un timp cât mai scurt de la momentul ridicării suspiciunii de diagnostic.

Sistemele bazate pe tehnologia POC-PCR pot fi utilizate cu succes în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială, având avantajul de a identifica ținte bacteriene și gene de rezistență la antibiotice într-un timp mult mai scurt față de metoda standard de laborator.

Pacienții cu forme severe de COVID-19 care au dezvoltat VAP au avut un risc mai mare de a dezvolta VAP cauzată de germeni multi-rezistenți în contextul în care au fost tratați cu corticosteroizi, antisecretoare gastrice și au necesitat perioade prelungite de ventilație non-invazivă.

Utilizarea metodei POC-PCR s-ar fi dovedit utilă la pacienții cu forme severe de boală COVID-19 care au dezvoltat VAP în perioada pandemiei COVID-19, în contextul în care laboratoarele de bacteriologie au necesitat un timp îndelungat, pentru emiterea antibiogramelor și a rezultatelor de identificare bacteriană.

Concluzii generale

Metoda POC-PCR demonstrează o sensibilitate și specificitate superioare metodelor clasice în identificarea bacteriană și a genelor de rezistență la antibiotice în mod particular la pacienții care au primit un regim antibiotic înainte de momentul testării. Această tehnică poate fi utilizată cu succes în managementul pacienților cu pneumonie nosocomială, putând anticipa modificarea regimului antibiotic înainte de primirea rezultatelor de laborator.

Perioada de timp necesară identificării bacteriene prin tehnica POC-PCR este astfel mult redusă față de tehnicile clasice, lucru ce poate fi exploatat și în situații speciale precum a fost cea a pandemiei COVID-19. În mod suplimentar tehnologia PCR permite identificarea genelor de rezistență la diferite clase de antibiotice.

Pacienții cu VAP din perioada pandemiei COVID-19 au prezentat mai frecvent infecții cu bacterii multi-rezistente la antibiotice, fapt ce a condus la o creștere a mortalității precoce (în primele 28 de zile de la internare). Se pare că această prevalență mare a bacteriilor multi-rezistente putea fi cauzată de expunerea pacienților la corticoterapie, medicație antisecretorie gastrică sau ventilație non-invazivă pe o durată de timp mai îndelungată. Cu toate acestea, mortalitatea generală a fost similară la categoriile de pacienți care au dezvoltat VAP în perioadele pandemiei COVID-19 și cea anterioară acesteia. Utilizarea scorurilor de severitate și mortalitate s-a dovedit utilă în predicția mortalității la pacienții cu VAP, deopotrivă la cei cu infecție COVID-19 dar și la cei fără COVID-19. Creșterea în dinamică a scorului SOFA poate sugera instalarea unui episod de VAP mai ales în contextul în care semnele clasice de pneumonie pot fi cauzate și de altă patologie, precum boala COVID-19.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Această cercetare doctorală în care se utilizează un sistem diagnostic de tip POC-PCR la pacienții critici cu PN se înscrie printre puținele realizate la nivel internațional și unică la nivel național.

Algoritmul propus este unul original și ar putea fi implementat și în practica curentă de management al pacienților cu pneumonie nosocomială. Rezultatele cercetării tezei sugerează importanța practică a utilizării metodei POC-PCR la pacienții critici cu PN și consecința acestei realități conduce în mod indubitabil la recomandarea fermă de implementare a tehnicii în practica curentă a diagnosticului precoce al acestei infecții.

Compararea în dinamică a scorurilor de mortalitate și a unor factori de risc pentru dezvoltarea infecțiilor cu bacterii multi-rezistente la pacienții cu VAP din perioada pandemică și din cea premergătoare ei, este de asemenea, un alt element de originalitate, această comparație nefiind sugerată de alte publicații.

SUMMARY OF DOCTORAL THESIS

The role of polymerase chain reaction conducted in the intensive care unit in the diagnosis of nosocomial pneumonia

Doctoral candidate **Andrei-Mihai Bălan**

Coordinator **Professor Natalia Hagău**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	11
THE CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	11
PERSONAL CONTRIBUTION	12
STUDY 1 The use of POC-PCR in managing patients with nosocomial pneumonia. A step-by-step approach in identifying antibiotic resistance genes and bacteria causing nosocomial pneumonia.	13
STUDY 2 The need for rapid diagnosis in the management of nosocomial pneumonia. Differences between patients with ventilator-associated pneumonia with and without COVID-19. Is the mortality different?	14
GENERAL DISCUSSIONS	15
GENERAL CONCLUSIONS	16
ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS OF THE THESIS	16

Keywords: nosocomial pneumonia, ventilator-associated pneumonia, hospital-acquired pneumonia, molecular diagnosis, PCR, VAP, COVID-19.

Introduction

Despite the prophylactic measures implemented in recent years, nosocomial infections continue to pose a real problem for public health. Nosocomial pneumonia (NP) is one of the most common infections acquired in the hospital environment. In addition, the increasing prevalence of multi-drug-resistant bacteria has led to a real challenge in treating these infections.

The promptness of diagnosing nosocomial pneumonia is one of the factors that can contribute to the success of treatment and to improving the prognosis, especially for critical patients admitted to intensive care units.

The present study aims to validate the usefulness of a modern diagnostic technique for nosocomial pneumonia by identifying bacteria and antibiotic resistance genes using polymerase chain reaction (PCR). At the same time, in a complementary study, we evaluated the impact of COVID-19 disease on bacterial etiological profile and mortality in patients who have developed ventilator-associated pneumonia (VAP) during their stay in intensive care, in comparison with critical patients who developed VAP in the pre-pandemic period, thereby emphasizing the potential utility of point-of-care (POC) PCR devices in managing these patients.

The current state of knowledge

The incidence of nosocomial pneumonia varies between 10 and 30% among patients admitted to intensive care units, with consequent mortality that can reach up to 75%. The etiology of NP varies from region to region, with a predominance of Gram-negative bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, and the *Acinetobacter baumannii* complex, and to a lesser extent Gram-positive bacteria such as methicillin-sensitive or resistant *Staphylococcus aureus* (SA / MRSA).

Diagnostic suspicion is suggested by the emergence of clinical signs indicative of an infection (fever, cough with expectoration, or the discharge of mucopurulent secretions at the level of the endotracheal tube), coupled with biological changes such as an increase in the number of leukocytes, the presence of hypoxemia, or the dynamic increase of inflammatory/infectious biological markers such as C-reactive protein or procalcitonin, in the presence of imaging changes suggestive of pneumonia.

Confirming the pneumonia diagnosis is traditionally done by proving bacterial growth on culture media from samples collected through specific means from the lower respiratory tract (tracheobronchial aspirate, protected brush specimen, or bronchoalveolar lavage).

Bacterial identification and issuance of antibiotic susceptibility testing are most often performed by classical laboratory methods, namely the spreading of the sample on culture plates enriched with different bacterial growth media, incubating them in a standard environment, identifying bacteria, and issuing an antibiogram. The main

disadvantage of this method is the time required to give a final result, which could be up to 72 hours. During this time, the patient is receiving an empirical antibiotic regimen, which often can be ineffective, contributing to increased patient morbidity and mortality.

Multiple techniques based on the polymerase chain reaction have been developed recently. Thus, the identification of bacteria and antibiotic-resistance genes has become possible through multiplex-PCR systems that simultaneously detect multiple genes specific to each etiological agent and genes that confer antibiotic resistance.

Compared to classical diagnostic techniques, the technological advancement of multiplex PCR systems allows for an early diagnosis (within a few hours) of the etiology of nosocomial pneumonia, which can lead to a reduction or even avoidance of empirical antibiotic therapy.

Personal Contribution

My doctoral research had two primary objectives:

The first goal of this research was to evaluate the utility of a molecular diagnostic system based on the POC-PCR technique in patients with nosocomial pneumonia in intensive care, aiming for early adaptation of the initial antibiotic therapy by rapidly detecting antibiotic resistance genes and bacteria that cause pneumonia.

The second objective was to compare the clinical, epidemiologic, microbiologic profile, therapeutic strategy, and mortality among patients who developed ventilator-associated pneumonia during the COVID-19 pandemic with those who developed VAP in the pre-pandemic period.

Additionally, through a comparative study of two distinct cohorts, we aimed to highlight the advantages in diagnostic efficiency expressed by the time needed to identify bacteria and antibiotic resistance genes using the POC-PCR technique versus the classic laboratory method.

STUDY 1 The use of POC-PCR in managing patients with nosocomial pneumonia. A step-by-step approach in identifying antibiotic resistance genes and bacteria causing nosocomial pneumonia.

With the use of POC-PCR technology that allows the identification of bacteria (*MRSA/SA*) and resistance genes both to vancomycin and carbapenems in a short timeframe (compared with classic laboratory techniques), there are created premises for an early and more appropriately tailored initial antibiotic therapy, with the potential to contribute to the reduction of mortality and improvement of prognosis. The main objective of this study is to evaluate the utility of this technique compared to the classic laboratory method in the management of patients with nosocomial pneumonia. The study secondarily evaluated how this approach can contribute to adjusting empirical antibiotic therapy. Two cohorts of patients were compared, including 29 patients with nosocomial pneumonia (either hospital-acquired pneumonia - HAP or VAP) and a control group that included 28 patients who underwent elective surgical intervention under general anesthesia and endotracheal intubation.

The study results demonstrate a high capability of the POC-PCR technique for identifying antibiotic resistance genes, such as those for carbapenems or vancomycin, showing high sensitivity and specificity compared to the standard method. The test for determining methicillin-sensitive or resistant *Staphylococcus aureus* (*MRSA/SA*) also showed high sensitivity and specificity, demonstrating high accuracy. It was proven that these molecular tests can be used as a guide to change empirical antibiotic therapy, with 83% accuracy in correctly predicting the change of antibiotic. The results of these tests were validated nearly two days earlier than those obtained by the classic laboratory method.

As a result of this study, we concluded that the POC-PCR technique is helpful for rapidly identifying resistance genes to the main antibiotics used in empirical regimens and directly identifying bacteria potentially causing HAP or VAP (such as *MRSA* or *SA*). The results of these tests could be used to adjust empirical antibiotic therapy, potentially leading to a decrease in the rate of inadequate empirical antibiotic therapy and the morbidity and mortality of critical patients who present with nosocomial pneumonia.

STUDY 2 The need for rapid diagnosis in the management of nosocomial pneumonia. Differences between patients with ventilator-associated pneumonia with and without COVID-19. Is the mortality different?

The incidence of ventilator-associated pneumonia among COVID-19 patients has been higher than in the pre-pandemic period, even reaching up to 85%. Patients with severe forms of COVID-19 who subsequently developed VAP have shown a high mortality rate of over 50%. Mortality can be estimated from admission to the intensive care unit by using specific scores such as the Sequential Organ Failure Assessment (SOFA), Simplified Acute Physiology Score (SAPS II), Acute Physiology and Chronic Health Evaluation (APACHE II), and the Charlson Comorbidity Index.

Many VAP episodes in intensive care unit patients can be caused by bacteria that are multi-resistant to antibiotics, leading to increased difficulty in establishing an appropriate empirical antibiotic therapy. In patients with VAP, inadequate antibiotic therapy is a factor that can lead to complications and an increase in mortality. To obtain targeted antibiotic therapy in the shortest time possible, it is necessary to use techniques for bacterial identification and resistance gene detection that are much faster than the conventional (gold-standard) methods.

In this study, the mortality of patients who developed ventilator-associated pneumonia during the pre-pandemic period was compared to the mortality of those with VAP in the COVID-19 pandemic period. Both raw mortality data and data from calculating mortality prediction scores such as SOFA, SAPS II, APACHE II, and Charlson Comorbidity Index were used. Among the secondary objectives of this study were to emphasize the differences between patients who developed VAP during the pre-pandemic period and those with VAP during the COVID-19 pandemic period regarding patient comorbidities, duration of hospitalization and mechanical ventilation, as well as those related to the infectious episode, such as etiology and therapeutic approach. The time required for bacterial identification and antibiotic resistance gene detection using the POC-PCR method was also compared to that of conventional laboratory methods, highlighting the necessity of such a method in special epidemiological situations like the COVID-19 pandemic.

Two groups were compared, both consisting of 26 patients who developed VAP in the two different periods. Through this comparison, it was found that the mortality between the two study groups was similar. However, more patients died within the first 28 days of hospitalization in the VAP-COVID-19 group compared to patients with VAP but without COVID-19. The mortality prediction scores were similar between the two groups, and an upward trend was observed in both groups in terms of scores measured at the time of discharge or death compared to the time of admission to the intensive care unit. The SOFA score showed a dynamic increase at multiple points during hospitalization,

which could be used in supporting the diagnosis of VAP. In patients with VAP and COVID-19, the etiological agents more frequently exhibited increased antibiotic resistance. Factors such as frequent exposure to corticosteroids, gastric antisecretory treatment, or prolonged non-invasive ventilation before endotracheal intubation may increase the incidence of multi-drug resistant bacteria involved in VAP. The time required for bacterial identification and antibiotic susceptibility testing using conventional methods was longer during the pandemic, suggesting the challenges faced not only by medical personnel but also by bacteriological laboratory staff.

Compared to conventional methods, POC-PCR technology can identify antibiotic resistance genes and some bacteria causing VAP, such as *MRSA* or *SA*, in a much shorter time. This time difference has been highlighted in this research by comparing two groups of VAP patients. Due to this advantage over the gold-standard method, POC-PCR can help manage patients with nosocomial pneumonia, especially in unique situations like the COVID-19 pandemic, where the time required by the bacteriological laboratory to issue results was longer than usual. This delay often led to patients receiving an empirical antibiotic therapy regimen that was inadequate, thereby increasing their mortality rate.

General discussions

To improve the prognosis of patients with nosocomial pneumonia and increase the chances of adequate antibiotic therapy, it is essential to obtain bacterial identification and antibiotic resistance profiling as soon as suspicion of diagnosis arises.

Systems based on POC-PCR technology can be successfully used to manage patients with nosocomial pneumonia, as they can identify bacterial targets and antibiotic-resistance genes in a much shorter time than standard laboratory methods.

Patients with severe forms of COVID-19 who develop VAP are at a higher risk of developing VAP caused by multidrug-resistant pathogens, mainly when they are treated with corticosteroids and gastric acid suppressants and require extended periods of non-invasive ventilation. These factors can contribute to an increased incidence of bacteria with antibiotic resistance involved in VAP.

The POC-PCR method would have been beneficial for patients with severe COVID-19 who developed VAP during the COVID-19 pandemic, especially considering the extended time required by bacteriology laboratories to issue antibiograms and results of bacterial identification.

General conclusions

The POC-PCR method demonstrates superior sensitivity and specificity compared to classical methods in bacterial identification and detection of antibiotic-resistance genes, particularly in patients who have received antibiotic treatment before testing. This technique can be successfully used in managing patients with nosocomial pneumonia, allowing for the anticipation of antibiotic regimen modification before receiving laboratory results.

The time required for bacterial identification using the POC-PCR technique is significantly reduced compared to classical methods, which can be advantageous in special situations such as the COVID-19 pandemic. Additionally, PCR technology enables the identification of resistance genes to various classes of antibiotics.

Patients with VAP during the COVID-19 pandemic have shown a higher prevalence of infections caused by multidrug-resistant bacteria, leading to an increase in early mortality (within the first 28 days of hospitalization). This high prevalence of multidrug-resistant bacteria appears to be associated with patient exposure to corticosteroid therapy, gastric acid antisecretory medication, or prolonged non-invasive ventilation. However, overall mortality was similar between patients who developed VAP during the COVID-19 pandemic and those who suffered from it before the pandemic. Using severity and mortality scores has proven helpful in predicting mortality in patients with VAP, both with and without COVID-19 infection. An increasing trend in the SOFA score may suggest the onset of VAP, especially when other conditions, such as COVID-19, can also cause classic signs of pneumonia.

The originality and innovative contributions of the thesis

This doctoral research, in which we utilized a POC-PCR diagnostic system in critically ill patients with nosocomial pneumonia, stands out as one of the few studies conducted internationally and is unique at the national level.

The proposed algorithm is original and has the potential to be implemented in current clinical practice for the management of patients with nosocomial pneumonia. The research results suggest the practical importance of using the POC-PCR method in critically ill patients with nosocomial pneumonia, leading to a strong recommendation for its implementation in the current practice of early diagnosis of this infection.

Another originality aspect of the thesis is the dynamic comparison of mortality scores and risk factors for developing multidrug-resistant bacterial infections in patients with VAP, both during the pandemic and the pre-pandemic period. Other publications do not suggest this comparison, making it a unique contribution to the field.