

BRZA IDENTIFIKACIJA UZROČNIKA INFEKCIJA RESPIRATORNOG TRAKTA TOKOM PANDEMIJE KOVIDA 19 MULTIPLEKS PCR METODOM

Sanja Zornić¹, Ivana Petrović¹, Bojana Luković², Jelena Živadinović¹, Jelena Arsić³, Lazar Bezarević¹, Zorana Đorđević⁴

¹Univerzitetski klinički centar Kragujevac, Odsek za mikrobiologiju, Kragujevac

²Akademija strukovnih studija Beograd, Odsek visoka zdravstvena škola, Beograd

³Dom zdravlja Kragujevac, Kragujevac

⁴Univerzitetski klinički centar Kragujevac, Odsek za kontrolu bolničkih infekcija, Kragujevac

RAPID IDENTIFICATION OF ETIOLOGICAL AGENTS OF RESPIRATORY TRACT INFECTIONS DURING THE COVID-19 PANDEMIC USING THE MULTIPLEX-PCR METHOD

Sanja Zornić¹, Ivana Petrović¹, Bojana Luković², Jelena Živadinović¹, Jelena Arsić³, Lazar Bezarević¹, Zorana Djordjević⁴

¹University Clinical Center Kragujevac, Department of Microbiology, Kragujevac, Serbia

²Academy of Applied Studies Belgrade, College of Health Sciences, Belgrade, Serbia

³Health Center Kragujevac, Kragujevac, Serbia

⁴University Clinical Center Kragujevac, Department of Hospital Infection Control, Kragujevac, Serbia

SAŽETAK

Cilj. Većina respiratornih infekcija praćena je sličnim simptomima, pa je klinički teško odrediti njihovu etiologiju. Cilj ovog rada jeste da prikaže značaj molekularne dijagnostike u identifikaciji uzročnika respiratornih infekcija, posebno tokom kovida 19 (engl. COVID-19 – coronavirus disease 2019) pandemije.

Metode. U periodu od 1. januara do 1. avgusta 2022. godine automatizovanim multipleks PCR (engl. polymerase chain reaction) testovima pregledano je 849 uzoraka poreklom od pacijenata hospitalizovanih u Univerzitetskom kliničkom centru Kragujevac. Za 742 nazofaringealna brisa korišćen je test BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1. plus [identifikacija 19 virusa (uključujući i SARS-CoV-2) i četiri bakterije], a za 107 trahealnih aspirata korišćen je BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel [identifikacija 18 bakterija i devet virusa] (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Testovi su izvedeni po uputstvu proizvođača, a rezultat je bio dostupan za sat vremena.

Rezultati. BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1. plus testom u 582 (78,4%) uzorka identifikovan je bar jedan patogen. Najzastupljeniji su bili rinovirus (20,6%), SARS-CoV-2 (17,7%), influenza A (17,5%), respiratory syncytial virus (12,4%) i parainfluenza 3 (10,1%). Ostali virusi su ređe identifikovani, a u jednom uzorku pronađena je bakterija *Bordetella parapertussis*. BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel testom je iz 85 (79,4%) uzoraka detektovana najmanje jedna bakterija ili jedan virus. Najčešće bakterije bile su *Staphylococcus aureus* (42,4%), *Haemophilus influenzae* (41,2%), *Streptococcus pneumoniae* (36,5%), *Moraxella catarrhalis* (22,3%) i *Legionella pneumophila* (2,4%), dok su od virusa identifikovani rinovirus (36,5%), adenovirus (23,5%), influenza A (11,8%) kao i rod koronavirusa (4,7%).

Zaključak. Multipleks PCR testovi doprineli su pravovremenoj primeni terapijskih i epidemioloških mera, naročito prilikom sprečavanja širenja kovida 19 i suzbijanja legionarske bolesti.

ključne reči: infekcija respiratornog trakta; SARS-CoV-2; multipleks lančana reakcija polimerazom.

ABSTRACT

Objective. Most respiratory infections have similar symptoms, so it is clinically difficult to determine their etiology. This study aimed to show the importance of molecular diagnostics in identifying the etiological agent of respiratory infections, especially during the coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic.

Methods. A total of 849 samples from patients hospitalized at the University Clinical Center Kragujevac (from January 1 to August 1, 2022) were examined using automated multiplex-polymerase chain reaction (PCR) tests. The BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 test was used for 742 nasopharyngeal swabs [identification of 19 viruses (including SARS-CoV-2) and four bacteria], while the BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel was used [identification of 18 bacteria and nine viruses] (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France) for 107 tracheal aspirates. The tests were performed according to the manufacturer's instructions, and the results were available within an hour.

Results. In 582 (78.4%) samples, the BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus test identified at least one pathogen. The rhinovirus (20.6%), SARS-CoV-2 (17.7%), influenza A (17.5%), respiratory syncytial virus (12.4%), and parainfluenza 3 (10.1%) were the most common. Other viruses were found less frequently, and *Bordetella parapertussis* was detected in one sample. In 85 (79.4%) samples, the BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel test identified at least one bacterium or virus. The most prevalent bacteria were *Staphylococcus aureus* (42.4%), *Haemophilus influenzae* (41.2%), *Streptococcus pneumoniae* (36.5%), *Moraxella catarrhalis* (22.3%), and *Legionella pneumophila* (2.4%). Among viruses, rhinovirus (36.5%), adenovirus (23.5%), influenza A (11.8%), and the genus Coronavirus (4.7%), were detected.

Conclusion. Multiplex-PCR tests improved the implementation of therapeutic and epidemiological measures, preventing the spread of the COVID-19 infection and Legionnaires' disease.

Key words: respiratory tract infections; SARS-CoV-2; Multiplex Polymerase Chain Reaction.

UVOD

Akutne infekcije respiratornog trakta uglavnom imaju slične simptome, a većina ih je praćena povišenom temperaturom i kašljem (1). Bez osnovnih biohemijskih analiza teško je samo na osnovu kliničke slike utvrditi etiologiju uzročnika, što je bio poseban problem tokom pandemije kovida 19 (engl. COVID-19 – coronavirus disease 2019) (2). Za pacijente koji su zahtevali hitnu hospitalizaciju, bilo da su kao osnovnu bolest imali respiratornu infekciju, bilo da su hospitalizovani iz drugih razloga, bilo je jako važno u prvih nekoliko sati identifikovati uzročnika infekcije. Na većini klinika, dok se ne utvrdi da li je pacijent pozitivan na SARS-CoV-2 virus, otvarana su posebna odeljenja izolacije da bi se sprečilo širenje potencijalno smrtonosne infektivne bolesti, a to je značilo čekanje od nekoliko sati ili čak dana na trijažu i adekvatnu terapiju (3). Međutim, uvođenje brze molekularne dijagnostike u rutinski rad omogućilo je da trijaža pacijenata traje nepunih sat vremena od hospitalizacije (4). Cilj ovog rada jeste da prikaže značaj primene multipleks PCR (engl. polymerase chain reaction) testova u identifikaciji uzročnika respiratornih infekcija.

MATERIJAL I METODE

U ovom istraživanju pregledano je ukupno 849 uzoraka poreklom iz respiratornog trakta pacijenata hospitalizovanih u Univerzitetkom kliničkom centru Kragujevac, u periodu od 1. januara 2022. do 1. avgusta 2022. godine. U istraživanje su bili uključeni uzorci pacijenta uzeti u toku prva 24 h od hospitalizacije. Ukupno 742 nazofaringealna brisa pregledana su multipleks PCR testom BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1 plus), a za 107 trahealnih aspirata korišćen je BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel (Pneumonia Panel) test (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). Svi testovi su automatizovani, a PCR reakcija se događa unutar zatvorenog sistema. Testovi omogućavaju simultanu detekciju nukleinskih kiselina više vrsta virusa i bakterija. Obrada uzorka traje dva minuta, a rezultat se očitava za 40 minuta kod RP2.1 plus testa, odnosno za sat vremena kod Pneumonia Panel testa. RP2.1 plus test može da identifikuje nukleinske kiseline 19 virusa (uključujući i SARS-Cov-2), kao i četiri atipične bakterije (tabela 1), dok Pneumonia Panel detektuje 18 bakterija, devet virusa (uglavnom do nivoa roda) (tabela 1) kao i sedam gena rezistencije. Testovi su komercijalni, izvedeni prema uputstvu proizvođača. Utvrđena je učestalost izolacije pojedinih patogena za sve pregledane uzorke. Etički odbor UKC Kragujevac odobrio je ovo istraživanje odlukom broj 01/22-285 od 30. avgusta 2022. godine.

REZULTATI

Od ukupno 742 nazofaringealna brisa koja su pregledana RP2.1 plus testom, u 582 uzorka identifikovan je bar jedan virus ili bakterija. Jedina pronađena bakterija bila je *Bordetella parapertussis* u jednom uzorku (slika 1). Po dva virusa detektovana su u 51/582 uzorku, od kojih je šest istovremeno bilo pozitivno na influenza A i SARS-CoV-2 virus. Najzastupljeniji su bili rinovirus (120/582), SARS-CoV-2 (103/582), influenza A (101/582), respiratory syncytial virus (72/582), parainfluenza 3 (59/582), a zatim adenovirus (49/582) (Slika 1), dok su ostali virusi bili ređe zastupljeni (slika 1). Analizom učestalosti detekcije uzročnika respiratornih infekcija RP 2.1 plus testom zapaženo je da su se pojedini virusi češće pojavljivali u određenim mesecima, pa je tako SARS-CoV-2 najčešće bio detektovan u januaru (44/152) i februaru (19/63), a zatim u julu (19/56) (tabela 2). Influenza A/H3 najčešće je identifikovana u martu (39/111), dok je parainfluenza 3 bila češća u maju (20/71) i julu (19/56) u odnosu na ostale mesece (tabela 2). Više detalja prikazano je u tabeli 2. Ukupno 105 trahealnih aspirata pregledano je Pneumonia Panel testom, a od toga je u 85 uzoraka pronađena bar jedna bakterija ili jedan virus. Po dve bakterije su identifikovane iz 20/85 uzoraka, a iz 33/85 istovremeno jedna bakterija i najmanje jedan virus. Najčešće bakterije bile su *Staphylococcus aureus* (36/85), *Haemophilus influenzae* (35/85), *Streptococcus pneumoniae* (31/85) i *Moraxella catarrhalis* (19/85), a kod dva pacijenta *Legionella pneumophila* (2/85) (slika 2). Ovim testom su od virusa identifikovani rinovirus (31/85), adenovirus (20/85), influenza A (10/85), kao i rod koronavirusa (kod četiri pacijenta) (slika 2).

DISKUSIJA

Do pojave kovida 19 grip je predstavljao jednu od najozbiljnijih sezonskih, akutnih respiratornih infekcija, pa su se odjednom kliničari suočili s drugim respiratornim virusom, povezanim sa morbiditetom i mortalitetom većim od gripa (5, 6). Međutim, pošto i drugi respiratorni virusi, a i neke bakterije, na samom početku bolesti daju slične simptome, medicina se s pojavom pandemije kovida 19 suočila s problemom razlikovanja etioloških činilaca akutnih respiratornih bolesti (7). S obzirom na to da se molekularna dijagnostika pokazala kao najpreciznija i najbrža metoda, primena automatizovanih multipleks PCR testova otvara novo poglavlje u medicini, jer otkrivanje uzročnika respiratornih i drugih bolesti u najkraćem mogućem periodu omogućava primenu adekvatne terapije i trijažu pacijenata (8).

S pojavom pandemije kovida 19, ciljna sekvenca za SARS-CoV-2 uključena je u jedan od prvih automatizovanih multipleks PCR testova, BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2, pa je dijagnostika ovog

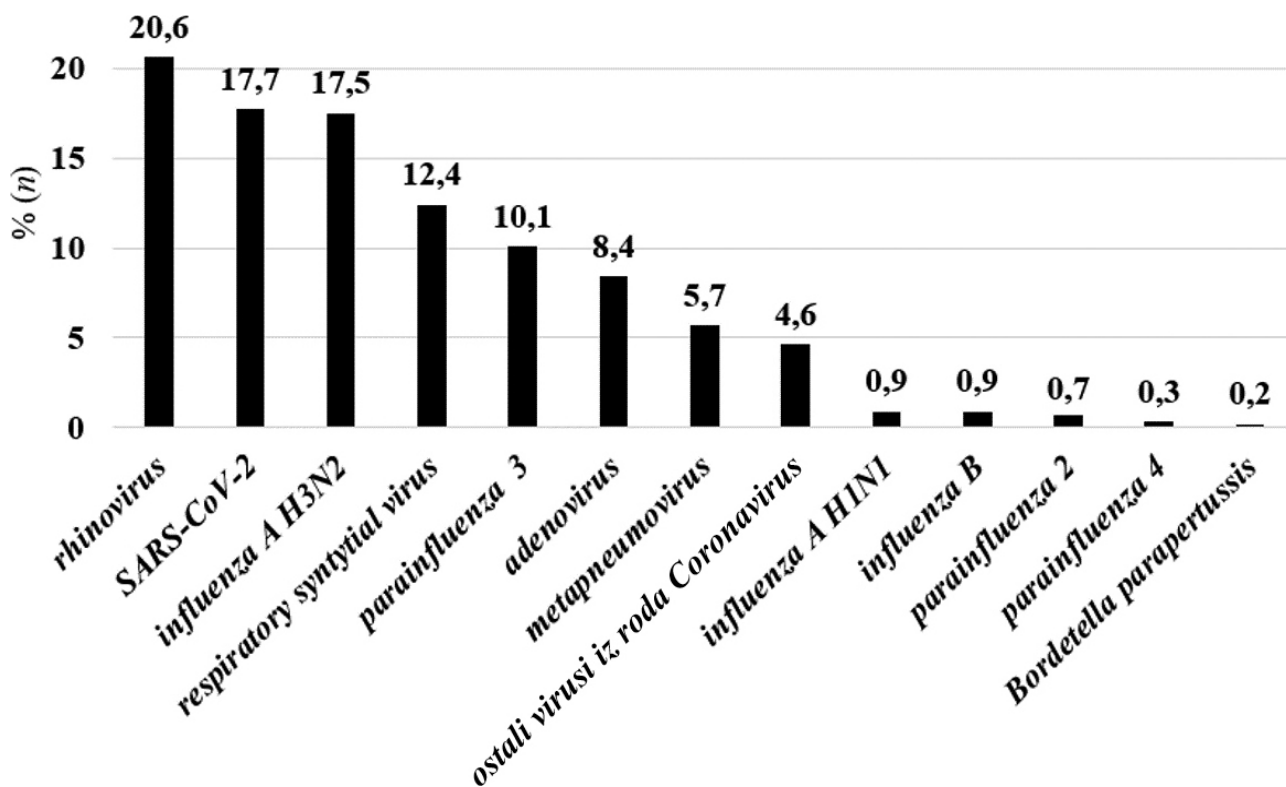
Tabela 1. Virusi i bakterije koji se mogu identifikovati multipleks PCR testovima, BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus i BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel

BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus	BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel
Bakterije	Bakterije
<i>Bordetella pertussis</i> <i>Bordetella parapertussis</i> <i>Chlamydophila pneumoniae</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex</i> <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae group</i> <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i>
Virusi	Virusi
Adenovirus Coronavirus 229E Coronavirus HKU1 Coronavirus OC43 Coronavirus NL63 Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Metapneumovirus Rhinovirus/Enterovirus Influenza A Influenza A/H1 Influenza A/H1-2009 Influenza A/H3 Influenza B Parainfluenza 1 Parainfluenza 2 Parainfluenza 3 Parainfluenza 4 Respiratory syncytial virus	Influenza A Influenza B Adenovirus Coronavirus Parainfluenza virus Respiratory Syncytial virus Rhinovirus/Enterovirus Metapneumovirus Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV)

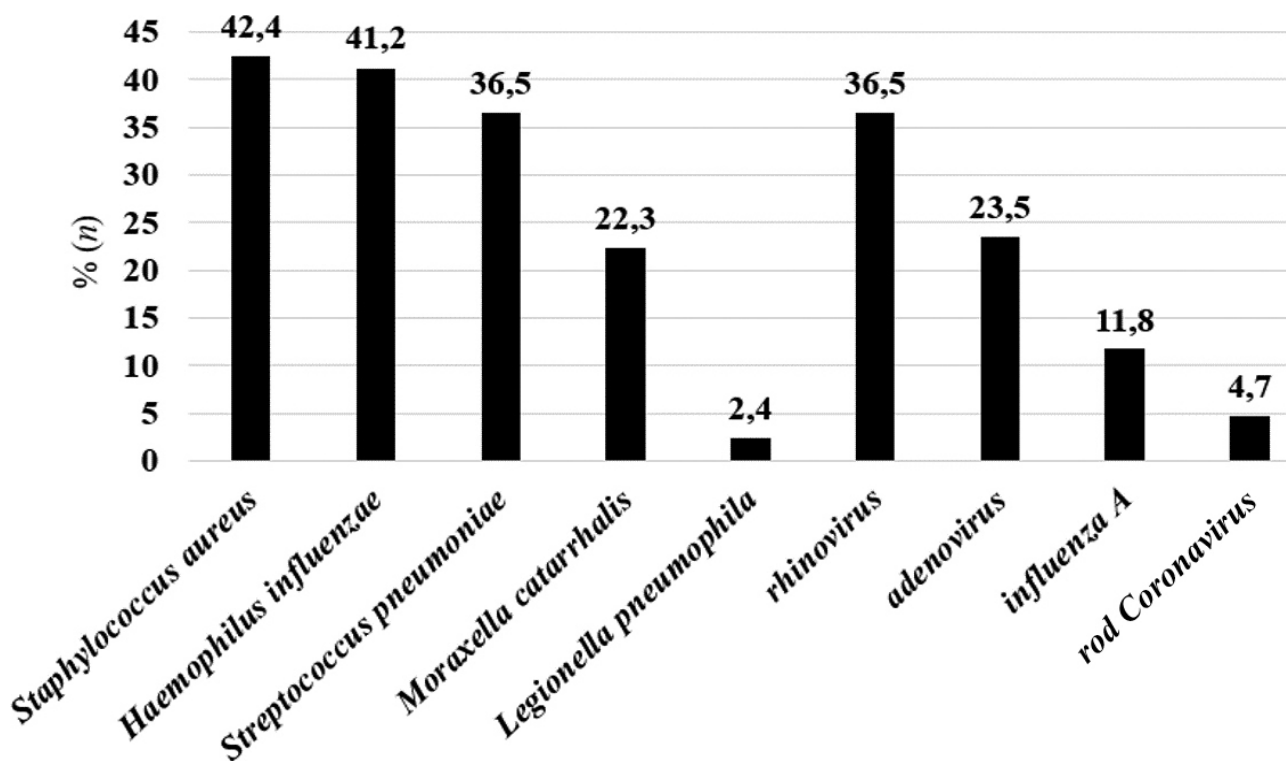
Tabela 2. Distribucija učestalosti detekcije uzročnika infekcija respiratornog trakta po mesecima, identifikovanih BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus testom (%)

Uzročnici	januar	februar	mart	april	maj	jun	jul
Rhinovirus	13,2	19,1	18,9	24,7	28,2	38,6	16,1
Respiratory syntyitial virus	18,4	6,3	10,8	11,8	11,3	6,8	12,5
SARS-CoV-2	28,9	30,2	5,4	8,2	4,2	11,4	33,9
Rod Coronavirus*	7,9	1,6	6,3	4,7	4,2	0	0
Influenza A H3N2	21,7	23,8	35,1	14,1	4,2		
Influenza A H1N1	0	0	0,9	2,4	2,8		
Influenza B	0	1,6	1,8	2,4	0	0	0
Parainfluenza 3	0	1,6	0	9,4	28,2	25,0	33,9
Parainfluenza 2	0	0	2,7	1,8	0	0	0
Parainfluenza 4	1,3	0	0	0	0	0	0
Metapneumovirus	2,6	6,3	7,2	12,9	8,5	0	0
Adenovirus	5,9	9,5	9,9	8,2	8,5	18,2	3,6
<i>Bordetella parapertussis</i>	0	0	0,9	0	0	0	0
n	152	63	111	85	71	44	56

n = ukupan broj detektovanih virusa u jednom mesecu; *rod Coronavirus: coronavirus 229E, coronavirus HKU1, coronavirus OC43, coronavirus NL63



Slika 1. Učestalost detekcije uzročnika infekcija respiratornog trakta u periodu od 1. januara do 1. avgusta 2022. godine, primenom BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus (RP2.1 plus) testa. % (n): procenat od ukupnog broja pozitivnih uzoraka testiranih RP2.1 plus testom (n = 582); ostali virusi iz roda Coronavirusa: coronavirus 229E, coronavirus HKU1, coronavirus OC43, coronavirus NL63.



Slika 2. Učestalost detekcije uzročnika infekcija respiratornog trakta u periodu od januara do avgusta 2022. godine, primenom BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel (Pneumonia Panel) testa. % (n): procenat od ukupnog broja pozitivnih uzoraka testiranih Pneumonia Panel testom (n = 85)

virusa podignuta na najviši nivo jer test po svojoj visokoj specifičnosti i senzitivnosti spada u vodeće molekularne testove (9). Svetsku javnost posebno je uznemirila pojava koinfekcije SARS-CoV-2 i influenza A virusa, što je u našoj ustanovi zabeleženo kod šest pacijenata, najviše zato što je primećeno da se klinička slika kovida 19 pogoršava kod pacijenata koji su istovremeno bili zaraženi virusom gripa (10), a RP2.1 plus test omogućio je brzu dijagnozu takve infekcije. Treba istaći da je većina istraživanja evaluacije efikasnosti multipleks PCR testova usmerena pre svega na tačnu i brzu dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa, a da su se istraživači manje bavili mogućnostima dijagnostike drugih virusnih infekcija (11–14). Studija sprovedena na tri velika geografska područja u SAD (Florida, Illinois i Njujork) pokazala je da su ovim testom najčešće detektovani SARS-CoV-2, rinovirus i adenovirus (11), dok je u ispitivanju sprovedenom na Tajvanu tek jedna desetina uzoraka bila pozitivna na SARS-CoV-2 (12), za razliku od naših rezultata gde je najčešće identifikovan SARS-CoV-2, a zatim rinovirus i adenovirus.

Slični rezultati dobijeni su istraživanjem u Rabatu (Moroko), gde je efikasnost detekcije SARS-CoV-2 bila 14,3% (13). Istraživanje sprovedeno u Pakistanu koje se baziralo na poređenju RP2.1 plus panela s druga dva PCR testa pokazalo je da je ovaj test najpouzdaniji za dijagnostiku SARS-CoV-2 (14). Naime, od 10 uzoraka koji su na Roche SARS-CoV-2 (Roche, Bazel) testu bili negativni, osam je bilo pozitivno na TaqPath™ kovid 19 (Thermo Fisher Scientific, Voltam, Masačusets) PCR testu, dok je svih 10 bilo pozitivno kada su testirani RP2.1 plus testom (14). U studiji koja se bavila evaluacijom efikasnosti ovog panela bez SARS-CoV-2 kao targeta, iz 2016. godine, a obuhvatila je tri velike državne bolnice u Ohaju, Juti i Illinoisu, pronađeno je da su najzastupljeniji virusi bili rinovirus, respiratory syncytial virus i adenovirus, slično našim rezultatima (15). Prema rezultatima ove studije, bilo je ukupno 63,3% pozitivnih testova što je za oko 15% manje nego kod nas (15). Interesantno je što je zahvaljujući ovom testu uočena i sezonska pojava pojedinih virusa. Na primer, visoka učestalost detekcije influenza A/H3 virusa u martu očekivana je za taj period godine na području Srbije, ali je ovo istraživanje pokazalo da i neki drugi virusi, koji se rutinski ne prate, imaju tendenciju sezonskog pojavljivanja, kao što je virus parainfluenza 3 koji je identifikovan u visokom procentu u maju i julu. Prema literaturi, virusi parainfluenza 1, 2 i 3 izazivaju čak 40% infekcija donjeg respiratornog trakta u pedijatrijskom uzrastu, tako da je praćenje njihove prevalencije od izuzetnog značaja (16). Učestalija detekcija SARS-CoV-2 u januaru i februaru a zatim u julu podudarila se sa talasima pandemije kovida 19.

Takođe, veliki značaj za brzu dijagnostiku respiratornih infekcija imala je i primena Pneumonia Panel testa. Evaluacija efikasnosti Pneumonia Panel testa sprovedena u različitim regionima pokazala je slične rezultate, pa su tako *S. aureus*, *H. influenzae* i *S. pneumoniae* bili najčešće detektovani patogeni na području Sent Luisa u Misuriju (17), dok su u ustanovi tercijarnog tipa u Francuskoj najčešći bili *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae* i *K. pneumoniae* (18), slično našim rezultatima, gde su najzastupljenije bakterije bile *S. pneumoniae*, *H. influenzae* i *S. aureus*, a od virusa influenza A, adenovirus i rinovirus.

Ovaj test je pokazao izuzetan značaj i za pravovremeno otkrivanje i sprečavanje širenja iznenadne pojave legionarske bolesti. Legionarsku bolest izaziva bakterija *L. pneumophila*, a najčešće se manifestuje kao pneumonija imunonekompetentnih osoba (sa nedovoljno razvijenim imunskim sistemom ili imunodeficijencijom), pušača i hroničnih bolesnika (19). Na ovu bakteriju se retko misli zato što se rutinski ne kultiviše, a pregled na nju se retko traži (19). Međutim, u našoj ustanovi je, prilikom pregleda trahealnog aspirata dva novorođenčeta sa kliničkom slikom teške pneumonije, Pneumonia Panel testom detektovana *L. pneumophila*. Brza molekularna dijagnostika omogućila je otkrivanje izvora infekcije, koji je u ovom slučaju bio sistem za grejanje tople vode, u porodilištu sekundarne zdravstvene ustanove, iz koje su novorođena deca transportovana u UKC Kragujevac (20). Uz saradnju mikrobiologa, epidemiologa i pedijataru kako naše ustanove, tako i ustanova na nivou Srbije, problem je vrlo brzo lociran i rešen, a širenje infekcije zaustavljeno (20).

U zaključku, multipleks PCR testovi doprineli su da se pravovremeno primene terapijske i epidemiološke mere i pokazali su se kao veoma efikasni u dijagnostici i sprečavanju širenja kovida 19, gripa, bakterijskih respiratornih infekcija, pa i u suzbijanju neočekivane pojave legionarske bolesti.

SKRAĆENICE

kovid 19 – COVID-19 – coronavirus disease 2019

PCR – polymerase chain reaction

Pneumonia Panel – BioFire-FilmArray-Pneumonia Panel

RP 2.1 plus – BioFire-FilmArray-Respiratory Panel 2.1 plus

UKC Kragujevac – Univerziteti klinički centar Kragujevac

LITERATURA

1. Murgia V, Manti S, Licari A, De Filippo M, Ciprandi G, Marsiglia GL. Upper respiratory tract infection-associated acute cough and the urge to cough: new insights for clinical practice. *Pediatr Allergy Immunol Pulmonol* 2020; 33: 3–11.

2. Kozinska A, Wegrzynska K, Komiazyk M, Walory J, Wasko I, Baraniak A. Viral etiological agent(s) of respiratory tract infections in symptomatic individuals during the second wave of COVID-19 pandemic: a single drive-thru mobile collection site study. *Pathogens* 2022; 11: 475.
3. Struyf T, Deeks JJ, Dinnes J, et al.; Cochrane COVID-19 Diagnostic Test Accuracy Group. Signs and symptoms to determine if a patient presenting in primary care or hospital outpatient settings has COVID-19 disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2020; 7: CD013665.
4. Huang HS, Tsai CL, Chang J, Hsu TC, Lin S, Lee CC. Multiplex PCR system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: systematic review and meta-analysis. *Clin Microbiol Infect* 2018; 24: 1055–63.
5. Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of respiratory viral infections. *Annu Rev Virol* 2020; 7: 83–101.
6. Solomon DA, Sherman AC, Kanjilal S. Influenza in the COVID-19 era. *JAMA* 2020; 324: 1342–3.
7. Tang HJ, Lai CC, Chao CM. Changing epidemiology of respiratory tract infection during COVID-19 pandemic. *Antibiotics* 2022; 11: 315.
8. Zacharioudakis IM, Zervou FN, Dubrovskaya Y, Inglima K, See B, Aguero-Rosenfeld M. Evaluation of a multiplex PCR panel for the microbiological diagnosis of pneumonia in hospitalized patients: experience from an academic medical center. *Int J Infect Dis* 2021; 104: 354–60.
9. Creager HM, Cabrera B, Schnaubelt A, et al. Clinical evaluation of the BioFire® Respiratory Panel 2.1 and detection of SARS-CoV-2. *J Clin Virol* 2020; 129: 104538.
10. Dao TL, Hoang VT, Colson P, Million M, Gautret P. Co-infection of SARS-CoV-2 and influenza viruses: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Virol Plus* 2021; 1: 100036.
11. Berry GJ, Zhen W, Smith E, et al. Multicenter evaluation of the BioFire Respiratory Panel 2.1 (RP2.1) for detection of SARS-CoV-2 in nasopharyngeal swab samples. *J Clin Microbiol* 2022; 60: e0006622.
12. Chang YC, Hsiao CT, Chen WL, Su YD, Hsueh PR. BioFire FilmArray respiratory panel RP2.1 for SARS-CoV-2 detection: the pitfalls. *J Infect* 2022; 85: e149–e151.
13. Tazi S, Kabbaj H, Zirar J, et al. Comparative performance evaluation of FilmArray BioFire RP2.1 and MAScIR 2.0 assays for SARS-CoV-2 detection. *Adv Virol* 2022; 2022: 4510900.
14. Mushtaq MZ, Shakoor S, Kanji A, et al. Discrepancy between PCR based SARS-CoV-2 tests suggests the need to re-evaluate diagnostic assays. *BMC Res Notes* 2021; 14: 316.
15. Leber AL, Everhart K, Daly JA, et al. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for detection of viruses and bacteria in nasopharyngeal swab samples. *J Clin Microbiol* 2018; 56: e01945–17.
16. Reed G, Jewett PH, Thompson J, Tollefson S, Wright PF. Epidemiology and clinical impact of parainfluenza virus infections in otherwise healthy infants and young children <5 years old. *J Infect Dis* 1997; 175: 807–13.
17. Webber DM, Wallace MA, Burnham CA, Anderson NW. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for detection of viral and bacterial pathogens in lower respiratory tract specimens in the setting of a tertiary care academic medical center. *J Clin Microbiol* 2020; 58: e00343–20.
18. Crémet L, Gaborit B, Bouras M, et al. Evaluation of the FilmArray Pneumonia Plus Panel for rapid diagnosis of hospital-acquired pneumonia in intensive care unit patients. *Front Microbiol* 2020; 11: 2080.
19. Puljiz M, Vukelić D. Dijagnoza i liječenje legionarske bolesti. *Infektol Glasn* 2021; 41: 93–103.
20. Djordjevic Z, Folic M, Petrovic I, et al. An outbreak of Legionnaires' disease in newborns in Serbia. *Paediatr Int Child Health* 2022; 42: 59–66.