

Original article

Evaluation of the BioFire FilmArray pneumonia panel for the detection of bacterial respiratory pathogens and antimicrobial resistance genes in endotracheal aspirate specimens

Wee Gyo Lee¹, Joon Kim¹, Seung Soo Shin², Ji Won Park²

Departments of ¹Laboratory Medicine, ²Pulmonary Medicine, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

기관지 폐포세척액에서 세균성 폐렴원인균과 항균제 내성 유전자 검출을 위한 BioFire FilmArray pneumonia panel의 성능 평가

이위교¹, 김준¹, 신승수², 박지원²

아주대학교 의과대학 ¹진단검사의학교실, ²호흡기내과교실

Abstract

Background: Rapid detection of the causative agents is essential for determining the appropriate treatment for patients with lower respiratory tract infections. We evaluated the performance of the BioFire FilmArray pneumonia panel (FA-PE; BioFire Diagnostics, USA) in the identification of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in endotracheal aspirate specimens.

Methods: A total of 43 non-duplicated endotracheal aspirates were included in this study. The performance of the FA-PE was assessed using the routine culture method as the reference standard.

Results: The FA-PE demonstrated 92.9% sensitivity and 79.3% specificity for the identification of 15 bacterial targets compared to routine bacterial culture. Four antimicrobial resistance genes in 43 specimens were detected by the FA-PE. The most frequently detected resistance genes were *mecA/C* and *SCCmec* in three specimens, followed by *CTX-M* in one specimen.

Conclusion: The FA-PE offers a rapid diagnostic method for lower respiratory tract infections. It may be useful at the early stage of pneumonia, before routine culture and antimicrobial susceptibility results are available.

Keywords: Lower respiratory infections, BioFire FilmArray pneumonia panel



OPEN ACCESS

pISSN : 2288-0585
eISSN : 2288-6850

Ann Clin Microbiol 2022 December, 25(4): 147-154
<https://doi.org/10.5145/ACM.2022.25.4.5>

Corresponding author

Wee Gyo Lee
E-mail: weegyo@ajou.ac.kr

Received: November 01, 2022

Revised: December 01, 2022

Accepted: December 08, 2022

© 2022 Korean Society of Clinical Microbiology.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

급성 세균성 하기도 감염은 전세계적으로 흔한 입원사유이고 환자의 치명율과 사망률에 큰 영향을 미친다[1]. 이러한 하기도 감염에서 신속한 병원균 검출은 맞춤 치료를 가능하게 하여 예후와 생존률 향상을 가능하게 하고, 불필요한 항균제 사용을 막을 수 있다[2]. 하지만 진단에 주로 이

용되는 기존의 배양법은 48시간 이상이 소요되므로 결과가 나오기 전까지는 경험적 항균제 치료가 불가피하다[3]. 신속한 분자진단적 방법을 이용하면 급성 세균성 하기도 감염의 원인을 빠르게 진단할 수 있어서 입원기간의 단축과 적절한 항균제의 신속한 투여가 가능하다[4,5].

BioFire FilmArray pneumonia panel (FA-PE; BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA)은 US FDA에서 승인된 제품으로 국내 식약처에서도 허가 완료된 제품으로 전자동 다중 핵산법을 이용하여 33종의 병원성 세균, 비정형 세균, 호흡기 바이러스 및 7개의 항균제 내성 유전자를 약 1시간 이내에 동시에 검출하는 검사법이다. 또한 세균의 경우 반정량적 핵산의 상대 존재비를 제공함으로써 감염 여부 판단에 도움을 줄 수 있다.

본 연구는 기관지 폐포세척액에서 세균성 폐렴원인균과 항균제 내성 유전자 검출을 위해 BioFire FilmArray pneumonia panel (이하 FA-PE로 기술)을 이용하여 기존 진단법과 비교하여 진단적 유용성을 평가하고자 수행되었다.

Materials and methods

연구 대상

2022년 5월부터 8월까지 수원 아주대병원에 폐렴으로 입원한 환자의 기관지 폐포세척액을 대상으로 하였다. 총 64명의 환자로부터 기관지 폐포세척액을 수집하여 기존의 배양 검사와 동시에 FA-PE 검사를 시행하였다.

배양법

검체 처리와 배양은 기존의 방법대로 시행하였다[6]. 검체는 혈액배지, 초코렛 배지 및 MacConkey 배지에 접종하여 35°C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배양된 배지는 18-24시간, 48시간에 판독 후 세균이 자라지 않았으면 음성으로 보고하였다. 세균이 자란 경우에는 VITEK MS system (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 동정하였다. 항균제 감수성 검사는 VITEK 2 system (bioMerieux)을 이용하여 검사하였다.

FilmArray FA-PE

FA-PE 검사는 FilmArray 2.0 과 FilmArray Torch 기기(BioFire Diagnostics, Salt Lake City, UT, USA)를 이용한 검사로 폐쇄된 pouch 내에서 시행되며 다중 핵산 증폭 후 endpoint melting curve analysis를 시행한다. FA-PE 검사는 제조사의 사용설명문에 준하여 시행하였다. 기관지 폐포세척액 200 μL를 추출용 시약이 들어있는 추출액 튜브에 넣고 섞은 뒤 진공포장이 잘 되어있는 BioFire FA-PE pouch에 주입하고 이를 기기에 장착시켜 소프트웨어를 이용하여 검사를 하였다. 검사소요시간은 약 1시간 이내였다. FA-PE 검사는 총 15개의 세균성 병원체 검사가 가능하며 *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *Enterobacter cloacae* complex, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella aerogenes*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* group, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Sterptococcus agalactiae*, *Sterptococcus pneumonia*, *Sterptococcus pyogenes*가 포함된다. 또한 7개의 내성유전자 검사가 가능하며 methicillin resistance

mecA/C and MREJ, extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M, carbapenemases NDM, IMP, OXA-48-like, KPC, VIM가 포함된다(Table 1). 세균 동정은 검체 1 mL 당 세균성 핵산의 유전자 복제수 (copies/mL) 10^4 , 10^5 , 10^6 , 혹은 10^7 이상을 보여주는 빈(bin)을 사용해서 반정량적으로 보고된다[7].

Table 1. BioFire FilmArray pneumonia panel detection target pathogens and antibacterial resistance genes

Category	Target
Bacteria (Semi-quantitative)	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i> <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
Atypical bacteria	
Viruses	Adenovirus Coronavirus Human Metapneumovirus Human Rhinovirus/Enterovirus Influenza A Influenza B Parainfluenza Virus Respiratory Syncytial Virus
Antimicrobial resistance genes	IMP KPC NDM OXA-48-like VIM
- Carbapenemases	
- ESBL	CTX-M
- Methicillin resistance	<i>mecA/C</i> and MREJ (MRSA)

Abbreviations: ESBL, extended-spectrum β -lactamase; MREJ, SCCmec right extremity junction; MRSA, methicillin-resistant *S. aureus*.

불일치 결과 검체의 확인검사

기준 배양검사와 FA-PE 검사 결과가 불일치한 검체에 대해서 원인 병원체 규명을 위하여 16S rRNA 염기서열 검사를 시행하였고, 16S rRNA 유전자 증폭을 위해 사용한 primer는 5'-TCGTCGG CAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNNGCWGCAG-3'와 5'-GTCTCGTGGCT CGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' 였다. *mecA* 유전자 확인을 위해서는 polymerase chain reaction (PCR)을 시행하였다. *mecA* PCR 방법은 다음과 같다[8]. 검체에서 분리된 순수 배양 집락을 대상으로 QuickGene DNA whool blood kit S (KURABO, Neyagawa, Osaka, Japan)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 사용된 primer는 5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3'와 5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTC-3'이다. PCR을 위하여 전반응액인 동결 건조액 PCR premix (Bioneer, Daejeon, Korea : Taq polymerase 1 unit, dNTP 250 μM, 10 mM Tris-HCl [pH 9.0], 30 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂)가 들어있는 0.5 mL 시험관에 실험 대상균주의 DNA 2 μL와 1 pmole 농도의 primer 1.5 μL를 넣었다. Gene Amp PCR system 9600 (Perkin Elmer Co., Norwalk, CA, USA)으로 94°C에서 1분간 predenaturation 한 후, 94°C로 30 초간 denaturation, 55°C로 30초간 annealing 및 72°C로 1분간 extension하는 cycle 을 40회 반복하고 final extension을 72°C로 5분간 1회 시행하였다. 최종 PCR 생산물은 2.0% agarose gel에서 전기영동 후 533 bp의 증폭산물로 확인하였다. *mecA* 유전자 음성대조 표준균주로는 *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922를 사용하였다.

자료 분석

전통적인 배양법과 FA-PE 검사의 결과를 병원균 동정과 항균제 내성 여부에 대하여 비교하였다. 전통적인 배양법을 기준으로 하여 FA-PE 검사 결과의 민감도와 특이도를 산출하였다.

Results

병원균 동정

총 수집된 검체 64개 중 검체 불충분, 중복 검체를 제외하고 검사를 진행한 검체는 54개였다. 검체 54개 중 FA-PE panel 검사에 포함되어있지 않은 *Candida*와 *Enterococcus* spp.가 배양된 경우와 바이러스가 배양된 경우 11개를 제외하고 본 연구에 최종적으로 포함된 대상은 43개였다. 그 중 양성 결과는 배양 14개(32.5%), FA-PE 19개(44.1%)였다(Table 2). 이 중 배양과 FA-PE가 동시 양성인 경우가 13개, 음성인 경우가 23개였다. 동일하게 양성인 경우 1가지 균만 배양된 경우가 8개였고 2 가지 균이 배양된 경우가 5개였다. 가장 흔한 균은 *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex, *S. pneumoniae*, methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA), *K. pneumoniae*로 각각 3개였고, 다음은 *P. aeruginosa* 2개, *E. coli*, *K. aerogenes*, *S. pyogenes*, methicillin-susceptible *S. aureus*가 각각 1개씩 분리되었다.

기준 배양법을 기준으로 하였을 때 FA-PE의 민감도는 92.9%였고 특이도는 79.3%였다(Table 3). 배양에서만 양성으로 나온 경우는 1개였고 *K. pneumoniae*가 few로 배양된 경우인데 FA-PE 검사상 음성으로 나왔다. FA-PE에서만 양성으로 나온 경우는 6개로 *H. influenza* 4개, *E. coli*, *K. pneumoniae* 1개, *K. pneumoniae* 1개였다. 이를 염기서열 분석 결과 *H. influenza* 1개만 확인되었고, 나머지의 경우는 호흡기 검체 특성상 검체 질(quality)의 문제로 염기서열 분석 결과를 얻기 힘들었다.

Table 2. Performance of the FilmArray pneumonia panel plus compared with the culture method

Pathogen	Culture (+)	Culture (+)	Culture (-)	Culture (-)
	FA-PE (+)	FA-PE (-)	FA-PE (+)	FA-PE (-)
Gram-positive bacteria				
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	0	0	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1	0	0	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	0	0	
Enterobacteriales				
<i>Escherichia coli</i>	1	0	1	
<i>Klebsiella aerogenes</i>	1	0	0	
<i>Klebsiella pneumonia</i> group	3	1	2	
Non-fermenter				
<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	3	0	0	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2	0	0	
Othergram-negative bacteria				
<i>Haemophilus influenzae</i>	0	0	4	
Total	18	1	7	23

Abbreviation: FA-PE, BioFire FilmArray pneumonia panel.

Table 3. Comparison of BioFire FilmArray pneumonia panel and culture in endotracheal aspirate specimens

Pathogen identification	Culture(+)	Culture(-)	Subtotal
FA-PE (+)	13	6	19
FA-PE (-)	1	23	24
Subtotal	14	29	43

Abbreviation: FA-PE, BioFire FilmArray pneumonia panel

항균제 내성 유전자 검출

총 4개의 항균제 내성 유전자가 FA-PE에서 검출되었는데 *mecA/C* with *SCCmec* right-extremity junction 유전자 3개와 *CTX-M* 1개였다. 4개 모두 항균제 감수성 검사 결과상 MRSA와 ESBL이었다. MRSA는 PCR 검사에서도 모두 *mecA* 유전자 양성으로 나왔다.

Discussion

급성 하기도 감염의 진단은 전통적인 배양과 항균제 감수성 검사에 의존해 왔다. 하지만 병의 위중도에 비해 검사시간이 적어도 48시간 이상 소요되어 그 동안 경험적 항균제 요법을 시행해오고 있는 실정이다[9]. 이에 여러가지 신속검사가 개발되어있기는 하나 임상에서 실제로 활용되는 경우는 드물었다[5,10]. 2021년 식품의약품안전처의 사용 승인을 받은 FA-PE 검사는 하기도 검체에서 세균, 바이러스 및 내성유전자를 동시에 신속하게 검출하는 분자진단검사법으로 폐렴을 일으키는 가장 흔한 원인 병원체의 33종을 동정할 수 있고 소요시간은 약 1시간 정도이다.

2019년 이 등[11]은 59 검체를 대상으로 하여 기존 배양법과 FA-PE검사를 비교한 연구를 수행하여 양성과 음성 일치율을 각각 90%와 97.4%로 보고하였고, 2020년 유 등[12]은 민감도와 특이도를 각각 98.5%와 76.5%로 보고하였다. 본 연구에서는 민감도와 특이도가 각각 92.9%와 79.3%로 유등의 결과와 유사하였다. 검사 소요 시간은 FA-PE는 평균 1시간 내외였고 기존 배양은 평균 48시간 내외로 소요되었다.

배양과 FA-PE에서 모두 양성으로 나온 경우에는 1개를 제외하고 FA-PE 검사 결과 상 세균수가 모두 10^5 - 10^7 으로 충분한 경우였고, 1개의 경우는 *S. pneumoniae*가 분리된 경우로 세균수는 10^4 이었고 이 경우 배양에서도 few로 배양된 경우였다.

본 연구에서 7 검체가 기존 배양법과 불일치 결과를 보였다. FA-PE에서만 양성이 나온 경우는 7 개 중 6개로 *H. influenza* 4개, *E. coli/K. pneumoniae*가 동시에 나온 1개, *K. pneumoniae* 1개였다. 이 중 가장 많은 경우가 *H. influenzae*로 기존 배양 검사에서는 배양되지 않았으나 FA-PE에서는 양성으로 나왔다. 가능한 설명으로는 검체 채취 전 사용한 항균제로 인한 *H. influenza* 균의 성장이 억제되었거나 사멸한 균의 핵산이 검출된 것으로 추정된다[4]. 이러한 결과는 이전 연구와도 일치한다[12]. 이는 위양성이라기보다는 세균수가 배양될 만큼 충분히 없었거나 균의 viability의 문제인 것으로 사료된다. 나머지 2개는 1개는 *E. coli*와 *K. pneumoniae*가 동시에 양성으로 나온 경우와 *K. pneumoniae*만 양성으로 나온 경우 각각 1개였다. FA-PE에서만 양성으로 나온 경우 모두 세균양이 10^4 으로 양이 적을 경우 기존 배양으로 배양되지 않는 경우가 있을 수 있다는 것을 알 수 있었다. 다만 불일치의 경우 시행한 16S rRNA 염기서열 검사에서 검체 질의 문제로 분석이 불가능하게 나와 확인을 할 수 없었던 것은 본 연구 설계 당시 간과한 부분으로 향후 연구에서는 이러한 점을 고려하여야 할 것으로 사료된다.

배양에서 자랐으나 FA-PE에서 음성이 나온 경우는 *K. pneumoniae*가 few로 배양된 경우인데 이 경우에 대하여 제조사를 통하여 재분석을 진행하였다. 그 결과 제조사는 *K. pneumoniae*가 2회 검사에서 모두 늦은 증폭이 있었으며, melting curve 또한 형성된 것을 확인하였으나 *K. pneumoniae*의 핵산존재량이 10^{35} copies/mL (FA-PE 검출한계치) 미만으로 값이 보고되어 검사 결과 상에는 음성으로 보고되었음을 확인하였다. 상기와 같이 세균수가 적은 경우 FA-PE나 배양한 경우에서만 양성으로 나오는 경우가 있어 FA-PE가 기존 배양검사를 대체할 수는 없고 두 검사를 상호보완적으로 사용하여야 한다고 생각된다.

본 연구에서 MRSA의 경우 모두 FA-PE에서 *mecA* 유전자 양성으로 나왔고 이는 배양과 항균제 감수성 검사와 100% 일치율을 보여서, 환자의 신속한 치료에 도움이 될 것으로 생각된다. 이러한 경우 경험적 항균제 요법에서 반코마이신으로 신속하게 화학요법을 변경함으로써 환자의 예후에 큰 도움이 될 것으로 기대된다.

급성 하기도 감염 진단에서 가장 중요한 것은 약제 선택에 대한 정보이므로 FA-PE 검사가 기존의 배양과 항균제 감수성 검사를 완전히 대체할 수는 없다. 또한 panel에 포함되지 않은 병원균이나 내성유전자의 존재도 고려사항이다. 항균제 내성은 급속히 나타나고 변이 또한 급격히 나타나므로 특정 유전자를 특정하여 검사하기는 어려움이 많다. 이러한 점이 분자생물학적 진단법이 기존의 배양 검사를 대체할 수 없는 이유이기도 하다. 또한 분자생물학적 진단법의 한계인 사멸한 세균 검출에 대한 문제점도 고려 사항이다. 하지만 FA-PE 검사의 신속성은 대부분의 하기도 감염 진단에서 큰 도움이 될 것이며 특히 MRSA의 경우는 더욱 그러한 것으로 사료된다. 그러므로 FA-PE를 이용한 급성 하기도 감염에 대한 신속한 진단은 불필요한 항균제 사용을 줄이고 입원기간을 단축시키는 효과가 있을 것으로 기대된다.

상기 결과로 볼 때 FA-PE 검사는 검사 소요 시간이 1시간 내외로 신속히 결과를 알 수 있을 뿐만 아니라 세균수가 적은 경우는 배양은 되지 않고 FA-PE에서만 양성으로 나오는 경우도 있어서 병원균 진단에 도움이 될 것으로 사료된다.

본 연구의 대상 건수는 43예로 적으나 모든 검체가 기관지 폐포세척액이므로 의미를 가진다고 생각되며 향후에는 좀더 많은 검체를 대상으로 연구가 진행되기를 바란다.

요약

배경: 하기도 감염에서 병원균에 대한 신속한 진단은 환자의 치료에 필수적이다. 저자들은 기관지 폐포세척액에서 병원성 세균과 항균제내성 유전자는 43개 검체를 대상으로 BioFire FilmArray pneumonia panel (FA-PE; BioFire Diagnostics, USA)의 수행능을 평가하고자 하였다.

방법: 총 43개의 기관지 폐포세척액을 대상으로 하였다. FA-PE의 수행능은 기존 배양법을 기준으로 평가하였다.

결과: FA-PE는 15개의 호흡기 병원균 동정에 있어서 기존 배양법과 비교하여 92.9%의 민감도와 79.3%의 특이도를 보였다. 항균제 내성 유전자는 43개 검체 중 4개를 검출하였으며 가장 흔한 유전자는 *mecA/C*로 3개였고 *CTX-M* 유전자가 1개 검출되었다.

결론: FA-PE 검사는 하기도 감염을 위한 신속한 진단법으로 향후 폐렴 환자를 조기 치료하는데 유용할 것으로 사료된다.

Ethics statement

This study was approved by the institutional review board of Ajou University Hospital (IRB No. SMP-2022-078). The board exempted the obtainment of informed consent.

Conflicts of interest

No potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

Funding

None.

References

1. GBD 2017 Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. Lancet 2018;392:1736-88.
2. Iregui M, Ward S, Sherman G, Fraser VJ, Kollef MH. Clinical importance of delays in the initiation of appropriate antibiotic treatment for ventilator-associated pneumonia. Chest 2002;122:262-8.
3. Prats E, Dorca J, Pujol M, Garcia L, Barreiro B, Verdaguer R. et al. Effects of antibiotics on protected specimen brush sampling in ventilator-associated pneumonia. Eur Respir J 2002;19:944-51.

4. Gadsby NJ, McHugh MP, Russell CD, Mark H, Conway Morris A, Laurendon IF, et al. Development of two real-time multiplex PCR assays for the detection and quantification of eight key bacterial pathogens in lower respiratory tract infections. *Clin Microbiol Infect* 2015;21:788.e1-13.
5. Papan C, Meyer-Buehn M, Laniado G, Nicolai T, Griese M, Huebner J. Assessment of the multiplex PCR-based assay Unyvero pneumonia application for detection of bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in children and neonates. *Infection* 2018;46:189-96.
6. Leber AL. Clinical microbiology procedures handbook, 4th ed. Washington, DC; ASM Press, 2016.
7. Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, Carroll A, Stone H, Akerele O, et al. Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray pneumonia/pneumonia plus panel for detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection. *J Clin Microbiol* 2020;58:e00128-20.
8. Rocchetti TT, Martins KB, Martins PYF, Oliveira RA, Mondelli AL, Fortaleza CMCB, et al. Detection of the *mecA* gene and identification of *Staphylococcus* directly from blood culture bottles by multiplex polymerase chain reaction. *Braz J Infect Dis* 2018;22:99-105.
9. Uzoamaka M, Ngozi O, Johnbull OS, Martin O. Bacterial etiology of lower respiratory tract infections and their antimicrobial susceptibility. *Am J Med Sci* 2017;354:471-5.
10. Ramanan P, Bryson AL, Binnicker M, Pritt BS, Patel R. Syndromic panel-based testing in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* 2018;31:e00024-17.
11. Lee SH, Ruan SY, Pan SC, Lee TF, Chien JY, Hsueh PR. Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. *J Microbiol Immunol Infect* 2019;52:920-8.
12. Yoo IY, Huh K, Shim HJ, Yun SA, Chung YN, Kang OK, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray pneumonia panel for rapid detection of respiratory bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in sputum and endotracheal aspirate specimens. *Int J Infect Dis* 2020;95:326-331.