

Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

Texte d'expert

## 04 – Apport des explorations microbiologiques au diagnostic des infections des voies respiratoires basses

### Contribution of microbiological investigations to the diagnosis of lower respiratory tract infections

O. Leroy

*Service de réanimation médicale et maladies infectieuses, hôpital G.-Chatiliez, 135, rue du Président-Coty, 59208 Tourcoing, France*

Reçu le 2 juin 2006 ; accepté le 21 juillet 2006

Disponible sur internet le 13 novembre 2006

#### Résumé

Les critères usuels du diagnostic positif d'une pneumonie aiguë communautaire sont cliniques et radiologiques. La confirmation microbiologique de l'infection n'est donc pas nécessaire au diagnostic. Malgré la multiplicité des techniques microbiologiques actuellement disponibles, aucune n'a suffisamment de sensibilité et de spécificité pour influencer l'antibiothérapie initiale qui demeure donc le plus souvent probabiliste. En cas de documentation microbiologique positive, une adaptation secondaire du traitement peut toutefois être envisagée. Au cours des exacerbations aiguës des bronchopneumopathies chroniques obstructives, le seul examen utile est l'analyse cyto bactériologique des sécrétions bronchiques qui sera réalisée dans certaines circonstances (antibiothérapie antérieure, hospitalisation, échec du traitement probabiliste).

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

#### Abstract

The diagnosis of community-acquired pneumonia is usually based on clinical and radiological criteria. The identification of a causative organism is not required for the diagnosis. Although numerous microbiological techniques are available, their sensitivity and specificity are not high enough to guide first-line antimicrobial therapy. Consequently, this treatment remains most often empiric. If the causative organism is identified, the antimicrobial treatment is adapted. Sputum analysis may be proposed as a diagnostic tool for patients with an acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease, in specific cases (prior antibiotherapy, hospitalization, failure of the empiric antimicrobial treatment).

© 2006 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

*Mots clés* : Pneumonie communautaire ; Diagnostic microbiologique

*Keywords*: Community-acquired pneumonia; Bacteriological investigations

#### 1. Introduction

Les infections respiratoires basses de l'adulte peuvent correspondre à des tableaux cliniques très différents selon que l'infection touche le parenchyme pulmonaire ou l'arbre bronchique, selon l'état sous-jacent de ce dernier (sain, asthme, bronchite chronique, bronchiectasies, mucoviscidose...), selon

l'état immunitaire du patient et selon l'origine communautaire ou nosocomiale de l'infection.

Nos propos se limiteront tout d'abord aux patients immunocompétents. Seront donc exclus les patients présentant les critères usuels d'immunodépression [1] : corticothérapie par voie générale, traitement immunosuppresseur ou chimiothérapie dans les six mois, splénectomie, infection par le VIH avec CD4 inférieur à 200/mm<sup>3</sup> ou sida ou cachexie.

Ensuite, seuls deux grands tableaux cliniques seront évoqués : tout d'abord celui de la pneumonie aiguë d'origine

Adresse e-mail : [oleroy@ch-tourcoing.fr](mailto:oleroy@ch-tourcoing.fr) (O. Leroy).

communautaire, c'est-à-dire acquise en milieu extrahospitalier ou se révélant au cours des 48 premières heures du séjour hospitalier [2]. Puis celui de l'exacerbation des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO).

De nombreuses explorations complémentaires sont disponibles pour isoler l'agent causal d'une pneumonie aiguë communautaire (PAC). Bien évidemment, ne serait ce que pour des raisons logistiques et économiques, il est illusoire de penser qu'une recherche étiologique exhaustive s'avère nécessaire pour tous les patients souffrant d'une PAC.

Pour tenter de clarifier l'exposé, les points suivants seront successivement évoqués :

- analyse critique des examens microbiologiques disponibles ;
- indications selon le type de patients (ambulatoire, en médecine, en réanimation, en institution pour personnes âgées) et les situations (voyage, contexte épidémique) ;
- stratégie d'utilisation et modalités de réalisation en ville, à l'hôpital ;
- prospective : méthodes de diagnostic rapide.

Pour des raisons thérapeutiques évidentes, l'enquête microbiologique au cours d'une PAC a pendant de nombreuses années été exclusivement centrée sur la recherche d'agents bactériens. En l'absence d'antiviraux efficaces sur les virus à tropisme respiratoire, la recherche de ces pathogènes est longtemps apparue sans impact thérapeutique pratique et a peut-être été délaissée par les cliniciens.

Actuellement, les données se modifient avec d'une part la mise sur le marché de traitements antiviraux, et d'autre part, la reconnaissance accrue de la responsabilité de nombreux virus à l'origine d'infections du tractus respiratoire inférieur. Toutefois, le caractère récent de cette recherche d'agents viraux à l'origine de PAC fait que les techniques utilisées sont encore souvent du domaine de laboratoires hautement spécialisés.

Il nous est donc apparu plus aisé d'envisager dans les trois premiers chapitres de l'exposé uniquement le versant bactériologique du diagnostic des PAC. Le versant virologique sera uniquement envisagé dans le quatrième et dernier chapitre.

Pour les exacerbations des BPCO, nos propos seront très limités dans la mesure où il existe des recommandations consensuelles très récentes à propos du rôle des explorations microbiologiques.

## 2. Pneumonies aiguës communautaires : analyse critique des explorations microbiologiques disponibles

Avant toute chose, il importe de souligner le point suivant : Il n'existe pas de « gold standard » pour le diagnostic microbiologique d'une PAC. Ce point fondamental explique que, pour la plupart des techniques microbiologiques, les valeurs de sensibilité et de spécificité qui seront rapportées pourront être difficiles à comparer d'une étude à l'autre et seront, parfois, soumises à caution.

### 2.1. Examen cyto bactériologique de l'expectoration

Sur un échantillon de sécrétions trachéobronchiques obtenu par expectoration, de nombreuses techniques microbiologiques, plus ou moins complexes, peuvent être appliquées. Dans ce chapitre, seules les techniques simples que sont l'examen direct après coloration de Gram et la culture sur milieux usuels seront évoquées.

Cet examen cyto bactériologique simple, tel qu'il a été défini, revêt en fait de nombreux écueils. Tout d'abord, techniquement, il n'est pas toujours aisé d'obtenir une expectoration correcte, sans souillure par les sécrétions oropharyngées. Ensuite, il n'est pas simple microbiologiquement de différencier une colonisation des voies aériennes inférieures d'une infection parenchymateuse pulmonaire. Enfin, l'absence de standard diagnostique rend illusoire la comparaison d'études n'ayant pas utilisé la même référence pour chiffrer les valeurs de sensibilité et de spécificité.

Ces difficultés expliquent peut-être les variations considérables dans les résultats des diverses études à notre disposition et sûrement dans l'idée que chacun se fait de cet examen. Ainsi, à titre d'exemple, dans une méta-analyse publiée en 1996 et prenant en compte des données publiées entre 1966 et 1993, Reed et al. [3] notent que la sensibilité et la spécificité de l'examen direct du crachat pour le diagnostic des PAC à pneumocoque varient respectivement de 15 à 100 et de 11 à 100 %...

Avant d'être analysé et mis en culture, l'échantillon bactériologique doit être validé. Il faut, en effet, s'assurer qu'il s'agit bien d'un prélèvement issu du tractus respiratoire inférieur. Bien que les critères varient parfois d'une étude à l'autre, la plupart des auteurs considèrent que lorsqu'il y a moins de dix cellules épithéliales squameuses et plus de 25 leucocytes par champ à faible grossissement, l'échantillon est valide.

Cette validation ne semble pas toutefois facile comme en témoignent les résultats de l'étude de Cooper et al. [4]. Cinquante échantillons consécutifs de sécrétions trachéobronchiques (expectoration ou aspiration endotrachéale) ont donné lieu à une préparation sur lame en double exemplaire. Trois bactériologistes ont lu la lame initiale, sa copie, puis à nouveau l'original. Ainsi, 450 lectures ont été effectuées. Une concordance concernant le nombre de neutrophiles et de cellules épithéliales par champ a été complète dans respectivement 76 et 57 % des cas.

La difficulté de préparation de l'échantillon pour l'examen direct et la culture a également été soulignée. Nagendra et al. [5] ont évalué la reproductibilité de l'examen direct de l'expectoration et de la culture lors de l'élaboration de la lame et de la mise en culture. Dix échantillons d'expectoration ont été fournis pendant quatre mois par cinq centres hospitaliers. Chaque échantillon a donné lieu à une préparation technique par trois techniciens différents qui chacun préparait une lame pour l'examen direct et la culture. Pour être valides, les échantillons d'expectoration devaient contenir moins de 25 cellules épithéliales. Ainsi, 26 échantillons ont été considérés comme tels. Dans 56 % des cas, il existait des variations dans l'identification, par l'examen direct, d'au moins un des morphotypes bac-

tériens. De même, dans 38 % des cas, il a été constaté des variations dans le résultat des cultures pour au moins un des germes.

Le rôle de la quantification bactérienne dans la prise en compte du résultat de la culture doit être également discuté. Selon les recommandations usuelles françaises, un résultat positif ne doit être pris en compte que « s'il existe une culture pure d'un micro-organisme unique ou au moins  $10^7$  CFU/ml » [6]. Bien évidemment, une telle exigence n'est requise que si le pathogène isolé peut être un germe colonisant usuel des voies aériennes. Toutefois, il faut souligner que ce seuil bactérien n'est pas requis dans les recommandations usuelles nord-américaines ou britanniques. De même, dans la plupart des publications émanant d'équipes non françaises, la mise en évidence en culture d'un pathogène est considérée comme valide, quel que soit le nombre de colonies identifiées, dès lors que l'échantillon est microscopiquement valide. Enfin, malgré d'importantes recherches, je dois avouer mon incapacité à retrouver le travail princeps qui avait permis de fixer ce seuil de  $10^7$  CFU/ml comme étant celui en deçà duquel le résultat devait être considéré comme invalide.

Abstraction faite de ces problèmes d'interprétation, l'intérêt de l'examen direct et la culture de l'expectoration, en termes de résultat positif, semble hautement dépendant de la gravité de la pneumonie. Quatre publications récentes illustrent ce propos :

- Dans une série de 507 patients traités en ambulatoire, Marie et al. [7] notent que seuls 241 (47,5 %) patients ont pu bénéficier d'un tel examen. La culture s'est révélée positive dans 75 cas (31,1 %) ;
- Theerthakarai R et al. [8] ont étudié 74 patients, indemnes de comorbidités, présentant une PAC peu sévère. Aucun patient n'avait reçu d'antibiothérapie antérieure. Parmi eux, 53 présentaient les critères d'hospitalisation de l'American Thoracic Society et 21 auraient pu être traités en ville. Bien que tous les patients aient présenté des échantillons valides, l'examen direct s'est toujours révélé négatif et seules quatre cultures se sont révélées positives ;
- Cinq cent trente-trois patients non immunodéprimés hospitalisés pour PAC ont été étudiés par Roson et al. [9]. Une expectoration a été obtenue chez 343 (64 %) patients avec un examen valide dans 210 cas (61,2 %). L'examen direct s'est révélé positif avec un diagnostic microbiologique pré-somptif à 175 (80 %) reprises ;
- Garcia-Vasquez et al. [10] ont étudié 1669 patients hospitalisés pour une PAC. Parmi eux, 983 vont avoir un examen cytotuberculeux de l'expectoration (59 %) et 532 auront

un prélèvement valide. L'examen direct retrouvera un germe dominant dans 240 (45 %) échantillons. La culture de l'expectoration sera positive dans 207 (86 %) des 240 échantillons avec examen direct positif et dans 57 (19,5 %) des échantillons avec examen direct négatif.

Dans la plupart des cas, le pathogène retrouvé par l'examen direct et/ou la culture est le pneumocoque. Au vu des données de la littérature [9,11–14], les pourcentages de résultats positifs au cours des PAC à pneumocoque bactériémiques varient entre 20 et 69 % pour l'examen direct et entre 29 et 94 % pour la culture de l'expectoration (Tableau 1). Ces résultats pourraient apparaître à première vue relativement décevants. Toutefois, il s'agit le plus souvent de travaux anciens, comportant peu de patients et n'ayant pas toujours exclu les patients déjà sous antibiotiques au moment du prélèvement. Un travail récent de Musher et al. [15] relativise ces pourcentages bruts et fournit des résultats plus encourageants. Dans un collectif de 105 patients ayant une PAC à pneumocoque bactériémique, les auteurs ont étudié les fréquences de positivité de l'examen direct et de la culture de l'expectoration selon que cet examen était réalisé, valide et en fonction de la durée de l'éventuelle antibiothérapie instaurée avant que le prélèvement soit réalisé. Les critères de validité de l'échantillon étaient plus de dix polynucléaires/cellule épithéliale au grossissement  $\times 400$ . Trente-trois examens directs et 46 cultures se sont avérés positifs. En termes de pourcentage, globalement 31 % des patients avaient un examen direct positif. En fait, 80 % des patients ayant un examen valide et sans antibiothérapie au moment du prélèvement avaient un examen positif. De même, le pourcentage de culture positive passe d'une valeur globale de 44 % à une valeur de 93 % chez les patients avec examen valide et absence d'antibiothérapie antérieure (Tableau 2).

Ces données montrent que l'examen direct et la culture de l'expectoration dès lors qu'ils sont correctement effectués chez un patient sans antibiothérapie sont fréquemment positifs au cours des PAC à pneumocoque les plus graves, c'est-à-dire bactériémiques.

## 2.2. Hémocultures

Si l'on fait abstraction des problèmes d'interprétation liés aux résultats faussement positifs consécutifs à des souillures, l'hémoculture est usuellement reconnue comme une méthode diagnostique fiable et spécifique en pathologie infectieuse.

Tableau 1

Pourcentage d'isolement du pneumocoque par l'examen direct et la culture de l'expectoration au cours des PAC à pneumocoque bactériémiques [9,11–14]

	Année	Nombre de cas	Critères de validité de l'échantillon	Pourcentage de résultats positifs	
				Examen direct	Culture
[11]	1977	31	$\geq 5$ L et $\leq 1$ CES/CIH	50	94
[12]	1983	14	$\geq 25$ L et $\leq 10$ CES/CfG	43	36
[13]	1988	36	$\geq 25$ L et $\leq 10$ CES/CfG	69	78
[14]	1997	59	$\leq 10$ CES/CFG	20	29
[9]	2000	170	$\geq 25$ L et $\leq 10$ CES/CfG	35,4	-

L : leucocytes ; CES : cellules épithéliales squameuses. CIH : champ à immersion d'huile ; CfG : champ à faible grossissement ; CFG : champ à fort grossissement.

Tableau 2

Pourcentage d'isolement du pneumocoque par l'examen direct et la culture de l'expectoration au cours des PAC à pneumocoque bactériémiques [15]

	<i>n</i>	Examen direct positif (%)	Culture positive (%)
Population globale	105	31	44
Patients ayant eu un examen	74	45	62
Patients ayant un examen valide	58	57	79
<i>Au moment du prélèvement</i>			
Pas d'antibiotiques	15	80	93
Antibiothérapie inférieure ou égale à six heures	18	61	78
Antibiothérapie entre 6 et 24 heures	18	50	89
Antibiothérapie supérieure ou égale à 24 heures	7	14	29

*n* : nombre de patients.

Tableau 3

Fréquence de positivité de l'hémoculture au cours de la PAC [7,8,16–26]

	[7]	[16]	[8]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]	[23]	[24]	[25]	[26]
Lieu de prise en charge	Amb	Amb	Hosp	Hosp	Hosp	Hosp	Hosp	Hosp	ICU	ICU	ICU	ICU	ICU
Nombre de patients étudiés	507	721	74	1022	517	25805	116	209	299	92	206	112	132
Nombre de patients ayant eu des HC	419	289	74	760	517	25805	116	209	299	92	189	112	127
Nombre d'HC positives	7	6	0	43	34	1840	14	29	46	18	40	24	34
Pourcentage d'HC positives	1,7	2,1	0	5,7	6,6	7	12	13,9	15,4	19,6	21,1	21,4	26,7

HC : hémoculture ; Amb : ambulatoire ; Hosp : hospitalisation ; ICU : réanimation.

Dans le cadre de la pneumonie communautaire, de nombreuses études ont évalué la fréquence de positivité et, donc indirectement, la sensibilité de cet examen.

Celle-ci apparaît très dépendante du lieu de prise en charge du patient (Tableau 3) :

- chez les patients traités en ambulatoire, la fréquence de positivité de l'hémoculture est de l'ordre de 2 % [7,16] ;
- chez les patients hospitalisés, la fréquence de positivité de l'hémoculture varie, selon les études, entre 0 % et plus de 25 % [8,17–26]. Bien évidemment, il ne s'agit pas de patients présentant une pneumonie de gravité identique. Ainsi, dans le travail de Theerthakarai et al. [8] portant sur 74 patients, un tiers des patients auraient pu être traités en ambulatoire et les autres patients, même s'ils présentaient les critères d'hospitalisation de l'ATS, avaient une PAC non sévère. À l'inverse, dans l'étude de Moine et al. [26], il s'agissait de patients hospitalisés en réanimation. L'étude qui semble la plus significative est celle de Metersky et al. [19] qui porte sur plus de 25 000 patients et qui chiffre la fréquence de positivité de l'hémoculture chez les patients hospitalisés à 7 %.

La relation entre la gravité de la pneumonie, non plus appréciée par le lieu d'hospitalisation, mais par un élément objectif tel que le « pneumonia severity index » (PSI = score de Fine) a fait l'objet d'au moins deux études qui malheureusement apportent des résultats contradictoires. Une première étude, publiée en 2001 [17], portant sur 209 patients, retrouve une augmentation de la fréquence de positivité de l'hémoculture avec celle du risque de décès apprécié par la classe de risque établie selon le PSI initial. La seconde [21], portant sur 1022 patients dont 760 ont eu des hémocultures, publiée en 2003, ne retrouve aucune corrélation entre la classe de risque déterminée par le PSI et la fréquence de positivité de l'hémoculture (Tableau 4).

Signalons, enfin, que Metersky et al. [19], à partir d'une cohorte d'élaboration de 13 034 patients et d'une cohorte de validation de 12 771 patients ont isolé huit facteurs indépendants corrélés avec la survenue d'une bactériémie au cours d'une PAC. Ces facteurs, ainsi que leur odd ratio, dans les deux cohortes respectives, sont les suivants : antibiothérapie antérieure (OR = 0,5 et 0,5), atteinte hépatique (OR = 2,3 et 1,4), pression artérielle systolique inférieure à 90 mmHg (OR = 1,7 et 1,8), température inférieure à 35 °C ou supérieure ou égale à 40 °C (OR = 1,9 et 1,5), fréquence cardiaque supérieure ou égale 125/min (OR = 1,9 et 1,7), urée supérieure ou égale 30 mg/dl (11 mmol/l) (OR = 2,0 et 2,2), natrémie inférieure à 130 mmol/l (OR = 1,6 et 1,8), leucocytose inférieure à 5000 ou supérieure à 20 000/mm<sup>3</sup> (OR = 1,7 et 1,9).

### 2.3. Antigènes urinaires pneumococciques

Jusqu'à ces dernières années, la détection d'antigènes pneumococciques au niveau urinaire par les techniques telles que la contre-immunoelectrophorèse, l'agglutination sur latex, la coagglutination ou les tests enzymatiques s'était toujours avérée décevante. La sensibilité de ces techniques est usuellement inférieure à 50 %.

Récemment est apparu sur le marché un test immunochromatographique (Binax NOW<sup>®</sup>) capable de détecter un polysaccharide C de la paroi cellulaire, commun à tous les pneumocoques, et dont les résultats sont disponibles en 15 minutes.

Tableau 4

Relation entre la classe de risque (PSI) et la fréquence de positivité de l'hémoculture au cours des PAC [17,21]

Classe de risque selon le PSI initial	Pourcentage de positivité des HC	
	[17]	[21]
I	5,3	8,0
II	10,2	
III	10,3	6,2
IV	16,1	4,6
V	26,7	5,2

Tableau 5

Fréquence de positivité de la détection des antigènes urinaires pneumococciques par le test Binax NOW® au cours des PAC [27–32]

	PAC à <i>S. pneumoniae</i> certaine*		PAC à <i>S. pneumoniae</i> probable**		PAC non pneumococcique***		PAC sans étiologie retrouvée		Pas d'infection pulmonaire	
	Nombre de patients	Test positif	Nombre de patients	Test positif	Nombre de patients	Test positif	Nombre de patients	Test positif	Nombre de patients	Test positif
[27]	28	23 (82 %)	16	7 (44 %)	–	–	16	1	–	–
[28]	20	16 (80 %)	54	28 (52 %)	–	–	–	–	169	0
[29]	13	10 (77 %)	14	9 (64 %)	156	16 (10 %)	269	69 (26 %)	–	–
[30]	45	40 (89 %)	52	23 (44 %)	107	5 (5 %)	171	29 (17 %)	–	–
[31]	77	67 (87 %)	–	–	–	–	–	–	–	–
[32]	21	18 (86 %)	–	–	–	–	–	–	118	2

\* : hémocultures positives à *S. pneumoniae* ; \*\* : prélèvements respiratoires positifs (culture, examen direct, antigène pneumococcique) à *S. pneumoniae* ; \*\*\* : agent étiologique isolé.

Au vu de données récentes [27–32] (Tableau 5), la sensibilité de ce test semble dépendante de la sévérité de l'infection pneumococcique. En cas de pneumonie bactériémique, 77 à 89 % des patients ont un examen positif. En cas de pneumonie non bactériémique, seuls 44 à 64 % des patients ont un test positif. La spécificité du test apparaît excellente, voisine de 100 %. Il est, en effet, exceptionnel qu'un résultat positif soit constaté chez un patient indemne d'infection pulmonaire. Contrairement à ce qui est observé chez l'enfant [33,34], il semble que la colonisation oropharyngée par le pneumocoque soit rare chez l'adulte et ne soit donc pas à l'origine de faux résultats positifs [35].

Au vu de ces résultats, il est possible de penser que ce test permettrait un diagnostic rapide, en moins de 15 minutes, de près de 80 % des PAC pneumococciques bactériémiques et de près de 50 % des PAC pneumococciques non bactériémiques. À l'heure où se posent des questions concernant la prise en charge des PAC pneumococciques bactériémiques (mono- ou bithérapie ?) [36] et où la résistance du pneumocoque peut poser des problèmes, avoir à disposition une méthode de diagnostic rapide de la pneumonie pneumococcique serait loin d'être négligeable. Au vu des travaux de Marcos et al. [30], il est même possible de penser que la sensibilité du test pourrait être accrue par la concentration des urines au détriment toutefois d'une réponse un peu moins rapide.

Le caractère apparemment hautement spécifique de ce test pourrait également permettre une interprétation d'un résultat positif chez les patients ayant une pneumonie pour laquelle un pathogène autre que *Streptococcus pneumoniae* a été isolé et chez les patients pour lesquels la recherche étiologique est restée négative (Tableau 5). Dans le premier cas, cela pourrait vouloir dire qu'un *S. pneumoniae*, non isolé par les techniques traditionnelles, est associé au(x) pathogène(s) isolé(s) chez au moins 5 à 10 % des patients. Dans le second cas, cela pourrait signifier qu'au moins 15 à 25 % des PAC sans étiologie apparente sont d'origine pneumococcique.

Il convient bien sûr d'émettre quelques réserves, liées au caractère récent de ce test qui n'a pas encore fait ses preuves en routine et de répondre aux questions suivantes :

- quelle est la fréquence de positivité du test chez les patients présentant une BPCO, notamment en exacerbation ?

- Quelle est la durée de positivité du test au cours voire au décours d'une pneumonie ?

Murdoch et al. [35] ont étudié 97 patients BPCO, dont 49 présentaient une exacerbation aiguë et 48 une forme stable. Le test s'est révélé positif pour seulement trois patients, tous en exacerbation. Notons que les auteurs ont comparé chez ces patients le résultat du test avec l'éventuelle présence de pneumocoque au niveau d'un prélèvement nasopharyngé ou au niveau d'une expectoration. Seuls quatre des 98 patients avaient une telle présence (trois patients en exacerbation) et seul un avait un test positif. Les auteurs ont conclu à la faible incidence des tests positifs chez les patients BPCO.

La durée de positivité du test urinaire a été évaluée par Smith et al. [31] et Murdoch et al. [35]. Dans la première étude [31], prospective, portant sur 107 patients présentant une bactériémie à pneumocoque (77 avaient une pneumonie et 30 une bactériémie sans pneumonie), les auteurs ont répété pour 45 patients, ayant un test initial positif, le test au cours de la première semaine d'antibiothérapie (Tableau 6). À j7, 90 % des examens étaient encore positifs. Dans la seconde étude, Murdoch et al. [35] ont montré que 48 % des patients ayant un test initial positif avaient encore un test positif en moyenne six semaines après le début des symptômes. Le plus long délai de positivité observé a été de 89 jours. Ces données suggèrent deux commentaires, l'un positif, l'autre négatif. Le commentaire positif concerne la possibilité d'affirmer l'origine pneumococcique d'une pneumonie au cours de la première semaine du traitement antibiotique. Le commentaire négatif concerne les éventuels résultats faussement positifs chez les patients ayant déjà présenté une pneumonie pneumococcique au cours des quelques semaines (six semaines, voire plus) précédant l'épisode actuel. Le diagnostic de rechute ou de récurrence précoce d'une pneumonie pneumococcique ne peut donc être fondé sur cette technique.

Tableau 6

Durée de la détection des antigènes urinaires pneumococciques par le test Binax NOW® au cours des PAC pneumococciques [31]

Jour du test	Nombre de patients testés	Nombre de tests positifs	%
1	45	45	100
2	32	27	84
3	35	29	83
5	21	17	81
7	20	18	90

Ainsi, en résumé, ce test semble pouvoir permettre un diagnostic rapide des PAC pneumococciques, notamment celles associées avec une bactériémie. Non influencé par l'antibiothérapie antérieure ou en cours, il permet également un diagnostic étiologique « rétrospectif » chez les patients ayant des prélèvements usuels, fondés sur la culture, négatifs. Bien que ce test demeure longtemps positif, sa spécificité globalement élevée doit être soulignée. Ces données ne doivent pas toutefois faire perdre de vue, comme le souligne Pesola [37] que dans plus de 10 % des cas, les PAC ont une étiologie plurimicrobienne et qu'il n'est peut être pas raisonnable de focaliser l'antibiothérapie uniquement sur le pneumocoque en cas de test positif.

#### 2.4. Recherche d'antigènes urinaires de *Legionella pneumophila*

Depuis la découverte de la maladie en 1977, 48 espèces et 70 sérogroupes de *Legionella sp.* ont été décrits. *L. pneumophila* comporte 15 sérogroupes dont le plus fréquemment incriminé à l'origine des PAC est le séro groupe 1 [38].

Dans la littérature récente, au moins cinq revues ont été consacrées au diagnostic microbiologique de la légionellose [38–42]. Au vu de ces publications, il apparaît important de souligner les points suivants à propos de la recherche d'antigènes urinaires de *L. pneumophila*.

Environ 80 % des patients présentant une infection à *L. pneumophila* du séro groupe 1 excrètent au cours de leur maladie des antigènes au niveau urinaire. Cette excrétion apparaît un à trois jours après le début de la maladie et peut durer un an.

Initialement, la recherche d'antigènes urinaires se faisait par technique radio-immunologique. Celle-ci a été remplacée par une technique Elisa au milieu des années 1980. La concentration des urines par chauffage durant cinq minutes améliore la sensibilité de la technique et sa spécificité en éliminant les faux positifs liés à des antigènes d'autres bacilles à Gram négatif. Il existe également une technique immunochromatographique.

Les valeurs de sensibilité et de spécificité des techniques Elisa et immunochromatographique sont équivalentes. Ces valeurs sont cependant hautement dépendantes des techniques utilisées comme référence. Ainsi, en prenant pour référence la culture, la sensibilité globale de ce test est comprise entre 86 et 93 %. Avec d'autres méthodes pour référence, la sensibilité varie entre 53 et 70 %. La spécificité apparaît supérieure à 95 %. Les valeurs prédictives positives et négatives ont été évaluées respectivement à 86 et 95 %. Les valeurs globales de sensibilité sont également soumises à d'importantes variations pour d'autres raisons. Ainsi, il existe une corrélation entre la sévérité de l'infection et l'excrétion urinaire de *L. pneumophila* 1. En cas de formes peu sévères, seuls 40 à 53 % des patients ont des antigènes détectables alors qu'en cas de forme sévère, 88 à 100 % des patients ont une détection possible. De même, la sensibilité varie selon le mode d'acquisition de la légionellose : 94 % dans les formes du voyageur, 76 à 87 % dans les formes communautaires et 44 à 46 % dans les formes nosocomiales.

Ces données intéressantes ne doivent pas cependant cacher les limites de la méthode. Tout d'abord, il faut insister sur le fait que cette technique ne dépiste que les infections liées à *L. pneumophila* du séro groupe 1. La sensibilité de la méthode dépend donc hautement de la prévalence de ce séro groupe dans l'ensemble des cas de légionellose. Moins ce séro type sera prévalent, moins la technique sera sensible. Ensuite, il faut souligner que l'excrétion à la fois retardée par rapport au début de la maladie et prolongée pendant plusieurs semaines peut être à l'origine de faux résultats, négatifs et positifs. Au début de la maladie, il est fréquent que le test soit négatif. Il faudra donc savoir le répéter quelques jours plus tard. À l'inverse, le test demeure longtemps positif et il faudra éviter d'évoquer trop vite le diagnostic de récurrence.

Pour conclure, il semble important de rapporter les propos de Waterer et al. [39] qui estiment que la sensibilité de cette technique est trop faible pour qu'un clinicien puisse exclure formellement *Legionella spp.* à l'origine d'une pneumonie et qui pensent que cette recherche est très probablement peu coût-efficace.

#### 2.5. Analyses spécifiques des sécrétions respiratoires

À partir d'échantillons provenant du tractus respiratoire inférieur (expectoration, voire prélèvements endoscopiques) ou supérieur (prélèvement nasopharyngé), un certain nombre de techniques ont été mises au point pour le diagnostic des infections liées à des germes tels que *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* ou *Legionella spp.* Nous allons passer en revue pathogène par pathogène les avantages et les inconvénients de ces diverses techniques.

##### 2.5.1. Infections à *M. pneumoniae* [43,44]

Une culture peut être réalisée à partir d'échantillons du tractus respiratoire inférieur ou nasopharyngés. Elle est lente (de quelques jours à plusieurs semaines d'incubation), laborieuse et coûteuse (milieux hautement spécifiques, nombreuses manipulations). De plus, il est assez difficile d'en connaître les valeurs de sensibilité et de spécificité. En prenant pour référence la sérologie ou la PCR, la culture aurait une sensibilité de l'ordre de 60 %. Sa spécificité serait plus élevée, proche de 100 %. Toutefois, concernant cette dernière, il importe de souligner les points suivants :

- seulement, un peu plus de la moitié des patients avec culture positive présentent une multiplication par 4 du titre des anticorps en réaction de fixation du complément [45] ;
- environ 5,1 à 13,5 % des adultes sains sont porteurs de *M. pneumoniae* au niveau de la gorge [46] ;
- en raison de certains mycoplasmes commensaux, il est indispensable en plus de la culture de correctement identifier la nature du mycoplasme pour affirmer qu'il s'agit bien de *M. pneumoniae*. Cette dernière technique est coûteuse et complexe. Elle n'est disponible que dans des laboratoires spécialisés.

La culture à la recherche de *M. pneumoniae* dans les échantillons respiratoires est donc une technique hautement complexe, peu accessible, peu sensible et dont les résultats positifs sont difficiles à interpréter en dehors du contexte clinique. Pour toutes ces raisons, elle n'est pas recommandée en routine en tant que test diagnostique.

Il en va de même des techniques de détection rapide des antigènes de *M. pneumoniae* au niveau des échantillons respiratoires. Ces techniques (immunofluorescence directe, contre-immunoelectrophorèse, immunoblotting et technique immunoenzymatique) sont peu sensibles et peu spécifiques car elles réagissent également avec les autres mycoplasmes du tractus respiratoire. Elles ne sont donc pas considérées comme valides pour le diagnostic des infections respiratoires à *M. pneumoniae*.

### 2.5.2. Infections à *C. pneumoniae* [47,48]

*C. pneumoniae* est une bactérie intracellulaire obligatoire. La technique de culture est complexe. Toutefois, il s'agit de la seule méthode capable de démontrer la viabilité d'un pathogène, sa sensibilité aux antibiotiques, ses caractéristiques microbiologiques et son évolution sous traitement. Les prélèvements sur lesquels la culture peut être réalisée sont les écouvillons naso- ou oropharyngés, les expectorations, les LBA et les biopsies pulmonaires. La sensibilité et la spécificité de la culture sont mal connues. Il faut cependant savoir que des cultures positives sur des échantillons prélevés au niveau des voies aériennes supérieures ont déjà été rapportées chez des patients asymptomatiques.

### 2.5.3. Infections à *L. pneumophila* [38–40]

La culture demeure l'examen de référence pour le diagnostic des légionelloses. Celle-ci peut s'effectuer sur des échantillons issus d'expectoration, d'aspiration endotrachéale, de lavage bronchoalvéolaire (LBA) ou de biopsie pulmonaire. La spécificité de la culture est élevée, voire absolue. La sensibilité est en revanche faible, notamment pour les raisons suivantes :

- environ 25 à 75 % des patients atteints de légionellose n'expectorent pas. Il n'y a donc pas de matériel à étudier ;
- les techniques usuelles de validation des crachats qui éliminent les échantillons contenant trop de cellules épithéliales squameuses et/ou pas assez de leucocytes passent à côté d'environ deux tiers des échantillons contenant des *Legionella* spp. Il faut savoir que ce pathogène n'est jamais un colonisant de l'arbre respiratoire et que tous les échantillons doivent être analysés ;
- la culture est lente et nécessite d'une part des milieux spéciaux et d'autre part l'inhibition des autres pathogènes. Le milieu *buffered charcoal yeast extract* (BCYE) est à la base du milieu de culture idéal pour les *Legionella* sp.

Ainsi, en prenant pour référence les données sérologiques, la sensibilité diagnostique de la culture se situerait de façon optimale aux alentours de 60 %. Elle apparaît toutefois, pour les raisons que nous venons de citer, souvent inférieure à 10 %

[49–51]. En prenant pour référence l'immunofluorescence directe sur les crachats, la sensibilité de la culture atteint dans une étude 61 % [52]. Cependant, dans des séries où le diagnostic de légionellose est fait sur des arguments sérologiques ou sur la présence d'antigène urinaire, les cultures sont négatives chez 33 à 66 % des patients présentant une recherche positive par immunofluorescence [53–55].

En conclusion, la plupart des experts soulignent la faible utilité diagnostique de la culture pour le diagnostic de légionellose en raison de la faible sensibilité de la méthode et du délai nécessaire à l'obtention du résultat.

À partir d'échantillons respiratoires, il est également possible d'effectuer une recherche de *Legionella* spp par la technique d'immunofluorescence directe par anticorps. Il s'agit d'une technique délicate à réaliser, ce qui est une source d'erreur potentiellement fréquente. Les limites immédiates de la technique sont au nombre de deux. La première concerne les échantillons analysés. Bien évidemment si le patient n'expectore pas, il n'y a pas de matériel analysable et il faudra alors réaliser soit une aspiration endotrachéale soit un prélèvement endoscopique. La seconde concerne les anticorps utilisés. Ceux-ci sont spécifiques du sérotype de *Legionella*. La sensibilité de la méthode dépendra donc du ou des sérotypes recherchés et de la fréquence respective des différents sérotypes incriminés en clinique humaine. La sensibilité de cette technique dépend aussi de la méthode de référence utilisée. En référence à la culture, la sensibilité est comprise entre 33 et 68 %. Par rapport à la sérologie, elle est de l'ordre de 50 %. En prenant en compte toutes les modalités diagnostiques (culture, antigène urinaire, sérologie), elle est également de l'ordre de 50 %. En prenant pour référence ces trois méthodes diagnostiques, la spécificité est proche de 100 %. Il faut toutefois signaler que des faux positifs par contamination par des pathogènes tels que *Pseudomonas fluorescens* ou *Haemophilus influenzae* ont été rapportés. Cela est plus fréquent lorsque des anticorps polyvalents sont utilisés. Ainsi, il faut retenir de l'immunofluorescence directe qu'il s'agit d'une méthode spécifique dont la sensibilité est proche de 50 % chez les patients pouvant fournir un échantillon respiratoire. De plus, bien que cette technique procure des résultats rapides, elle ne peut être réalisée que par des laboratoires très spécialisés.

## 2.6. Explorations sérologiques

Les méthodes sérologiques ont longtemps été les seules techniques à même d'évoquer la responsabilité étiologique d'agents tels que *Chlamydia* spp, *Mycoplasma* spp et *Legionella* spp. Nous envisagerons, pathogène par pathogène, les diverses techniques disponibles.

### 2.6.1. Infections à *L. pneumophila* [38–40]

Les méthodes sérologiques représentent encore actuellement la méthode de diagnostic la plus communément utilisée. Différentes techniques ont été décrites : immunofluorescence indirecte, agglutination sur latex, micro-Elisa, contre-immunoelectrophorèse ou microagglutination. En Europe, le test rapide de microagglutination est largement utilisé. Le test

de référence serait toutefois plutôt représenté par l'immunofluorescence indirecte [41].

La sensibilité diagnostique de ces méthodes varie selon le test utilisé, la méthode de référence et selon le séro-groupe de *Legionella* incriminé. Ainsi, globalement, la sensibilité varie dans les séries entre 41 et 75 %. Elle serait plus élevée avec le test de microagglutination (80 %) et lorsque qu'il s'agit d'un séro-groupe 1–4 (75–80 %). Les points suivants permettent éventuellement de comprendre ces différences et fixent les limites de la technique sérologique :

- le temps requis pour une séroconversion excède parfois plusieurs semaines. Si environ 80 % des patients développent des anticorps au cours des quatre premières semaines de la maladie, certains patients ne font leur séroconversion qu'après deux mois ou plus. Il est donc nécessaire d'attendre un long délai de plusieurs semaines pour recueillir l'échantillon de convalescence nécessaire à l'affirmation de la séroconversion ;
- les infections liées à des *Legionella* spp autre que *L. pneumophila* ne donnent une séroconversion que dans moins d'une fois sur deux.

Concernant la spécificité de la sérologie, les points suivants doivent être mis en exergue :

- chez près de 33 % des patients, la présence d'anticorps est encore détectable 48 mois après le début de la maladie ;
- la prévalence d'anticorps anti-*Legionella* dans la population générale est élevée ;
- la détermination de la classe d'anticorps apparus (IgM versus IgG) n'est pas utile car le délai d'apparition des uns et des autres, et l'intensité de la réaction immunitaire varient d'un patient à un autre ;
- des faux positifs ont été observés au cours de PAC liées à un pathogène autre que *Legionella* spp et au cours de bactériémie. Ainsi en cas d'infection à *Mycoplasma* spp, *H. influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* ou *Chlamydia psittaci*, de faux résultats positifs ont été enregistrés. Toutefois, une distinction entre faux positif et co-infection demeure toujours délicate.

Ces faits soulignent la non-pertinence diagnostique d'un seul taux élevé d'anticorps. Le travail de Plouffe et al. est à ce titre tout à fait exemplaire [56]. Il démontre qu'un seul titre supérieur à 1/256 ne différencie pas les patients avec une légionellose de ceux ayant une PAC d'autre étiologie. Soixante-huit patients avec une légionellose certaine et 636 patients avec une PAC mais sans culture positive ni séroconversion ont été étudiés. Un taux d'anticorps initial supérieur à 1/256 est retrouvé chez 10 % des légionelloses prouvées versus 6 % chez les autres ( $p > 0,05$ ).

Au terme de cette revue, il apparaît clairement que le séro-diagnostic est plus un outil épidémiologique qu'une technique utile pour le diagnostic et le traitement initial d'un patient souffrant de PAC.

Pour terminer, il apparaît important de souligner que des experts français [42] ont récemment suggéré que le diagnostic de légionellose probable pouvait être retenu devant un titre unique d'anticorps supérieur à 1/256. Cette suggestion va à l'encontre des données colligées plus haut et notamment de celles rapportées par Plouffe et al.

#### 2.6.2. Infections à *Chlamydia* spp. [47,48,57]

L'isolement de *C. pneumoniae* étant délicat, le diagnostic de ces infections repose usuellement sur la sérologie. Différentes techniques sont disponibles : micro-immunofluorescence, réaction de fixation du complément, réaction immunoenzymatique. Toutefois, la méthode de micro-immunofluorescence est la méthode sérologique de choix.

Outre le fait que le délai de résultat soit long (en cas de primo-infection, la réponse IgM apparaît en trois semaines. La réponse IgG apparaît en six à huit semaines), cette technique a de nombreuses limites : la méthodologie n'est pas standardisée, l'interprétation des résultats est subjective et, enfin, la présence chez les sujets sains d'une séropositivité résiduelle, voire celle d'un seul titre élevé d'IgG chez des sujets âgés ou BPCO sans signe apparent d'infection rend délicate l'interprétation d'un seul taux d'anticorps.

Il est donc actuellement proposé comme critères d'infection aiguë uniquement la séroconversion des IgG avec une multiplication par 4 du taux ou un taux unique d'IgM supérieur ou égal à 16.

Comme pour *C. pneumoniae*, le diagnostic d'une infection due à *C. psittaci* repose sur soit sur une séroconversion avec multiplication du taux des anticorps par 4 en réaction de fixation du complément ou en micro-immunofluorescence, soit sur un titre d'IgM supérieur ou égal à 16 en micro-immunofluorescence.

#### 2.6.3. Infections à *M. pneumoniae* [43,44]

En raison du manque de sensibilité et de la complexité de la culture, la sérologie a longtemps représenté la méthode de référence pour le diagnostic des infections à *M. pneumoniae*. Historiquement, la réaction de fixation de complément a été la première utilisée. Ont ensuite été proposées les techniques suivantes : immunofluorescence indirecte, agglutination sur microparticules et méthodes immunoenzymatiques.

Avant d'envisager les valeurs respectives de sensibilité et de spécificité de ces diverses techniques sérologiques, il convient de savoir qu'elles auront d'importantes limites pour les simples raisons suivantes :

- les IgG ne sont généralement pas détectables durant la première semaine de la maladie. Elles atteignent un pic cinq semaines après le début de la maladie ;
- les IgM apparaissent la première semaine de la maladie et atteignent un pic au cours de la troisième semaine. Toutefois, chez l'adulte, la production d'IgM est inconstante. De plus, sérologiquement, il est difficile de différencier les IgM

Tableau 7  
Valeurs diagnostiques des différents tests sérologiques au cours des PAC à *M. pneumoniae*. Comparaison avec la PCR [58]

Technique	Sensibilité (%)	Spécificité (%)	VPP (%)	VPN (%)
Fixation du complément	65	97	87	89
Réaction d'agglutination (SerodiaMycoII)	65	88	63	88
<i>Tests immunoenzymatiques</i>				
AniLabsystems®	77	92	75	93
Biotest®	52	95	73	86
Diagnosys®	58	94	75	87
ImmunoCard®	48	79	38	85
ImmunoWell®	35	96	73	82
Novum®	71	49	31	84
Platelia®	52	98	89	86
Ridascreen®	35	100	100	83
Serion classic®	48	95	75	86
SeroMP®	71	88	65	92
Virotech®	45	96	78	84

liées à une infection à *M. pneumoniae* des IgM liées à une infection due à d'autres mycoplasmes.

De plus, il faut ajouter que la technique d'immunofluorescence indirecte a pour limites d'être d'interprétation subjective et de nécessiter un microscope à fluorescence.

Un travail récent de Beersma et al. [58] a comparé 11 tests immunoenzymatiques disponibles, la méthode de fixation du complément et celle d'agglutination sur microparticules avec la PCR comme référence. Pour cela, les auteurs ont testé 46 sérums provenant de patients avec une PCR positive et 96 sérums dits « témoins » provenant de patients avec soit une PCR négative ( $n = 33$ ) soit une infection bactériologiquement prouvée à un pathogène autre que *M. pneumoniae*. Les résultats (Tableau 7) démontrent que malheureusement les tests sérologiques sont d'inégale valeur et que même les meilleurs n'ont pas une sensibilité qui atteint 80 %.

## 2.7. Explorations invasives

Différentes techniques invasives ont été évaluées pour le diagnostic microbiologique des PAC. Il s'agit notamment de la ponction transtrachéale, de la ponction transpariétale et des endoscopies bronchiques avec simple fibroaspiration, brossage distal protégé et/ou lavage bronchoalvéolaire (LBA).

Les deux premières méthodes avaient été développées pour s'affranchir de la contamination oropharyngée. En raison de son caractère trop invasif, la ponction transtrachéale est tombée en désuétude. La seconde est encore utilisée par quelques cliniciens.

Une revue récente de la littérature a fait le point sur cette technique [59]. La ponction transthoracique s'effectue, sans anesthésie, dans la zone de condensation pulmonaire repérée par une radiographie thoracique face et profil. Environ 0,5 ml de liquide est aspiré pour analyse. Les données obtenues chez les sujets ou animaux sains suggèrent que le tissu pulmonaire sain comporte rarement assez de pathogènes pour produire une culture significative à partir d'une ponction transthoracique. La

spécificité de la technique apparaît donc très élevée. Les faux positifs peuvent avoir trois origines :

- contamination du prélèvement lors de la ponction. Celle-ci ne devrait pas dépasser ce qui est observé avec les hémocultures soit environ 1 à 3 % de contamination ;
- détection d'une infection sanguine par piqûre vasculaire. En cas de pneumonie, le fait de savoir si le pathogène provient du sang ou du poumon ne semble pas avoir d'intérêt ;
- culture d'une bactérie de surinfection. Il ne s'agit pas à proprement parler de faux positifs et ces données bactériologiques doivent être prises en compte pour le traitement des patients.

La sensibilité de la technique est difficile à évaluer dans la mesure où il n'y a pas de technique de référence... Chez l'adulte, l'étude de 19 publications rapportées entre 1911 et 1999 et compilant 2432 patients montre que la ponction isole un ou plusieurs pathogènes dans 47 % des cas. D'une étude à l'autre, il existe une grande variation de résultats qui semble être expliquée par l'âge différent des patients étudiés, leur origine géographique disparate et, enfin, leur accessibilité aux soins très différente. En prenant pour référence les hémocultures, il est possible de chiffrer la sensibilité de la ponction transpariétale. À partir de 13 études publiées entre 1923 et 1999, les auteurs estiment la sensibilité de l'aspiration à 74 %. Les auteurs estiment que la fréquence du diagnostic étiologique passe de 17 % avec des hémocultures isolées à 48 % lorsque la ponction est ajoutée aux hémocultures. En dehors de problèmes techniques, les faux négatifs des cultures des liquides obtenus par ponction semblent essentiellement liés à une antibiothérapie antérieure. La réalisation de PCR sur ces prélèvements devrait faire disparaître cet écueil.

Les complications sont représentées par le décès ( $< 0,1\%$ ), le pneumothorax (3,3 %) et les hémorragies pulmonaires sévères ( $< 0,1\%$ ). Cette technique semble donc contre-indiquée en cas de troubles de l'hémostase (TP  $< 50\%$  ou thrombopénie  $< 70\ 000/\text{mm}^3$ ). De même, une hypoxie sévère rendant impossible une apnée de deux secondes, une hypertension artérielle pulmonaire primitive (HTAP) ou une BPCO avec bulles d'emphysème contre-indiquent généralement cette technique.

Au terme de leur revue, les auteurs suggèrent que la ponction transthoracique pourrait être utile en cas d'échec du traitement initial, en cas de surinfection nosocomiale et, enfin, en cas de suspicion de tuberculose avec analyse négative de l'examen direct du crachat ou des tubages gastriques.

L'endoscopie bronchique permet de réaliser une fibroaspiration, un brossage distal protégé et/ou un LBA. La fibroaspiration n'apparaît pas supérieure à l'examen cyto bactériologique usuel des expectorations dans la mesure où la contamination par la flore oropharyngée est fréquente. Elle n'est donc potentiellement utile que chez les patients incapables d'expectorer. Les techniques endoscopiques avec brossage et/ou LBA permettent un recueil distal de sécrétions bronchiques avec un

risque moindre de contamination oropharyngée. Celles-ci seront cultivées et une quantification bactérienne sera obtenue en cas de culture positive. Le seuil de  $10^3$  CFU/ml est considéré comme cliniquement pertinent pour la brosse. Pour le LBA, le seuil de significativité de la culture varie entre  $10^3$  et  $10^5$  CFU/ml selon les études [60].

Les prélèvements endoscopiques ont dans la littérature été utilisés dans deux indications majeures chez les patients non immunodéprimés : le diagnostic microbiologique initial de la PAC et la gestion de l'échec du traitement initial.

Les principales études consacrées au diagnostic primitif bactériologique de la PAC ont été les suivantes :

- dès 1993, Jimenez et al. [61] ont, dans une cohorte de 40 patients, comparé les performances du brossage avec celles du LBA. La brosse s'est avérée positive dans 28 cas (70 %). La concordance entre les deux techniques s'est avérée bonne ;
- en 1994, dans une série de 132 patients présentant une pneumonie sévère, Moine et al. [26] ont étudié les performances diagnostiques de nombreuses techniques. La brosse réalisée chez 50 patients s'est révélée positive dans 33 % des cas. L'aspiration bronchique distale simple réalisée chez 67 patients a été positive dans 61 % des cas ;
- Vives et al. [62] ont étudié 193 patients hospitalisés pour une PAC. La rentabilité diagnostique de la brosse a été de 60 % et celle du LBA de 59 % ;
- enfin, Rodriguez et al. [63] ont étudié l'impact d'un LBA, réalisé dans le service des urgences, sur la prise en charge thérapeutique et le pronostic de 26 patients hospitalisés pour une PAC. Les patients ont été randomisés pour bénéficier soit d'un LBA ( $n = 12$ ), soit d'une approche diagnostique non invasive ( $n = 14$ ). Dans le premier cas, un pathogène causal a été identifié dans dix cas, alors que seuls quatre des 14 patients sans LBA ont eu un diagnostic microbiologique précis. Les modifications thérapeutiques ont été globalement plus fréquentes chez les patients avec LBA, sans toutefois de réduction significative du spectre antibactérien, ni impact sur la mortalité finale (50 % dans le groupe LBA versus 42,9 %).

Pour conclure sur l'intérêt des techniques endoscopiques avec brossage distal protégé et/ou LBA pour le diagnostic microbiologique des PAC, il nous paraît important de rapporter les propos de Marquette et Tonnel [60] : « Même si le LBA peut être réalisé, en unité de réanimation, chez le patient sévèrement hypoxique, le risque de la technique n'est pas contrebalancé par un bénéfice suffisant dans le cadre des PAC tout-venant. Chez le patient dont la sévérité nécessite une intubation et une ventilation assistée, il est à notre sens déraisonnable de proposer un brossage, la sonde d'intubation offrant un accès direct permettant l'aspiration de sécrétions ».

Les techniques endoscopiques ont également été proposées pour guider la conduite thérapeutique en cas d'échec du traitement initial. Les résultats retrouvés dans la littérature [64–67]

Tableau 8

Résultats microbiologiques obtenus par explorations endoscopiques au cours de PAC en échec du traitement initial [64–67]

	Nombre d'examen réalisés	Nombre d'examen microbiologiques positifs
[64]	17 brossages distaux protégés	2
[65]	35 LBA	7
[66]	12 brossages distaux protégés 10 LBA	5 4
[67]	52 LBA et brossages distaux protégés	20

sont assez décevants dans la mesure où la culture obtenue par endoscopie est peu fréquemment positive (Tableau 8).

### 3. Indications selon le type de patients (ambulatoire, en médecine, en réanimation, en institution pour personne âgée) et les situations (voyage, contexte épidémique)

Envisager que les indications des explorations à visée microbiologique puissent être différentes selon le type de patients et/ou les situations épidémiologiques revient à penser qu'il existe peut-être des différences étiologiques selon la gravité de la PAC (ou le lieu d'hospitalisation du patient souffrant de cette infection) et des éléments anamnestiques, cliniques ou radiologiques en faveur d'une étiologie particulière. Ces deux questions seront envisagées tour à tour. Le cas particulier des PAC du sujet âgé sera évoqué séparément avec l'étude de l'impact potentiel de l'âge puis celui du lieu de vie (institution versus domicile) sur l'étiologie. Enfin, nous verrons si le contexte épidémique et le lieu géographique où a été acquise la PAC peuvent orienter le clinicien vers certaines étiologies particulières.

#### 3.1. Relation entre le lieu de prise en charge d'une pneumonie et son étiologie

En 2002, Woodhead [68] a publié une compilation de 41 études étiologiques prospectives réalisées en Europe. La répartition des différents agents pathogènes causals de la pneumonie communautaire selon le lieu de prise en charge du patient est résumée dans le Tableau 9. Aussi intéressants que soient ces résultats, il ne faut pas perdre de vue que ces études sont très probablement hétérogènes avec des investigations étiologiques et de critères d'hospitalisation variables d'une étude à l'autre.

Il nous est donc apparu important de rapporter les rares études comparant, sur le même site et avec les mêmes méthodes de recherche étiologique, les divers patients (Tableau 10). Watanathum et al. [69] ont comparé 98 patients traités en ambulatoire avec 147 patients hospitalisés pour une PAC. Parmi ces derniers, 49 étaient admis en réanimation. Les infections liées à *M. pneumoniae* et à *C. pneumoniae* étaient significativement plus fréquentes chez les patients ambulatoires alors que celles dues aux bacilles à Gram négatif étaient plus fréquentes chez les patients hospitalisés. Ruiz et al. ont réalisé deux travaux

Tableau 9  
Étiologie des PAC selon le lieu de prise en charge. Données de la littérature [68]

Agents causals	PAC traitée en ambulatoire (%)	PAC hospitalisée (%)	PAC admise en réanimation (%)
Non identifié	49,8	43,8	41,5
<i>S. pneumoniae</i>	19,3	25,9	21,7
<i>S. aureus</i>	0,2	1,4	7,6
<i>H. influenzae</i>	3,3	4,0	5,1
<i>M. catarrhalis</i>	0,5	2,5	-
Entérobactéries à Gram -	0,4	2,7	7,5
<i>Legionella</i> spp.	1,9	4,9	7,9
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	11,1	7,5	2
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	8	7	-
<i>Chlamydia psittaci</i>	1,5	1,9	1,3
<i>Coxiella burnetii</i>	0,9	0,8	0,2
Virus	11,7	10,9	5,1
Autres pathogènes	1,6	2,2	7,4

étudiant l'éventuelle relation entre l'agent étiologique et la présentation clinique du patient :

- dans le premier travail [70], portant sur 395 patients hospitalisés pour une PAC, ils ont montré en analyse multivariée que les PAC sévères, admises en réanimation, étaient significativement associées avec des agents étiologiques tels que *S. pneumoniae* (OR = 2,5) ou les bacilles à Gram négatif (entérobactéries, *P. aeruginosa* ; OR = 2,5) ;
- dans le second travail [71], ils ont apparié 89 patients admis en réanimation pour une PAC avec autant de patients hospitalisés pour une PAC, en dehors d'un service de réanimation. Il n'existait aucune différence étiologique significative entre les deux populations (Tableau 10).

Tableau 10  
Étiologie des PAC selon le lieu de prise en charge. Études comparatives [69,71]

	[69]		[71]	
	Ambulatoires	Hospitalisées	Admises en réanimation	Hospitalisées hors réanimation
Nombre de patients	98	147	89	89
Agent causal				
Non identifié	24 (24,5 %)	42 (28,6 %)	42 (47 %)	46 (51,7 %)
<i>S. pneumoniae</i>	13 (13,3 %)	33 (22,4 %)	21 (23,6 %)	17 (19,1 %)
<i>S. aureus</i>	-	5 (3,4 %)	2 (2,2 %)	3 (3,4 %)
<i>H. influenzae</i>	1 (1 %)	4 (2,7 %)	5 (5,6 %)	9 (10,1 %)
<i>M. catarrhalis</i>	-	-	3 (3,4 %)	1 (1,1 %)
Entérobactéries à Gram négatif	-	17 (11,6 %)*	5 (5,6 %)	3 (3,4 %)
<i>Legionella</i> spp.	8 (8,2 %)	8 (5,4 %)	2 (2,2 %)	4 (4,5 %)
<i>M. pneumoniae</i>	29 (29,6 %)	10 (6,8 %)*	3 (3,4 %)	2 (2,2 %)
<i>C. pneumoniae</i>	36 (36,7 %)	24 (16,3 %)*	6 (6,7 %)	3 (3,4 %)
Autres	0	13 (8,8 %)	13 (14,7 %)	8 (9,0 %)

\*  $p < 0,05$ .

Tableau 11  
Étiologie des PAC selon le « pneumonia severity index » initial [72]

Classe de risque selon le PSI initial	Total	I	II	III	IV	V	<i>p</i>
Nombre de patients	533	51	62	117	198	105	
Agent causal							
<i>S. pneumoniae</i>	135 (25,3 %)	16 (31,4 %)	6 (9,7 %)	32 (27,4 %)	48 (24,2 %)	33 (31,4 %)	0,02
<i>H. influenzae</i>	34 (6,4 %)	2	2	7	20	3	0,08
Entérobactéries à Gram négatif	10 (1,9 %)	0	1	3	2	4	-
<i>Legionella</i> spp.	35 (6,5 %)	5	3	7	12	8	0,8
<i>M. pneumoniae</i> ou <i>C. pneumoniae</i> ou <i>C. psittaci</i> ou <i>Coxiella burnetii</i>	32 (6,0 %)	5 (10 %)	8 (12,9 %)	6 (5,1 %)	6 (3,0 %)	7 (6,7 %)	0,04

Enfin, il apparaît utile de rapporter le travail de Roson et al. [72]. Dans un collectif de 533 patients hospitalisés, les données étiologiques ont été analysées selon la sévérité de la PAC appréciée par le *pneumonia severity index* (Tableau 11). Bien que les auteurs n'aient pas réalisé de tests statistiques sur ces données, un calcul rapide du  $\chi^2$  montre que l'incidence de *S. pneumoniae* et celle des pathogènes intracellulaires varient significativement selon les classes de PSI. Concernant le pneumocoque, même si la différence entre les classes est significative, elle apparaît difficile à interpréter... C'est plus simple pour les agents pathogènes intracellulaires dont la fréquence est plus élevée en cas de PAC avec un *pneumonia severity index* bas.

En résumé, l'aspect étiologique d'une PAC varie selon sa sévérité et par conséquent son lieu de prise en charge. Dans les formes ambulatoires, les agents intracellulaires tels que les mycoplasmes et les chlamydiae sont significativement plus fréquemment en cause que dans les PAC nécessitant une hospitalisation. Parmi ces dernières, il ne semble exister aucune différence entre les PAC sévères admises en réanimation et celles traitées hors réanimation.

### 3.2. Arguments anamnestiques, cliniques ou radiologiques en faveur d'une étiologie particulière

Comme cela a été récemment souligné par un groupe de travail [73], « aucun signe clinique ou radiologique n'a de valeur discriminante suffisante pour préciser, sur ces seuls arguments, le micro-organisme en cause ». Ce point clairement établi ne sera donc pas revu.

Tableau 12  
Relation entre les comorbidités et l'étiologie des PAC [70]

Comorbidités/Étiologie	Odds ratio	Intervalle de confiance 95 %	p
Âge inférieur à 60 ans			
Bactéries atypiques	2,3	1,1–4,8	0,02
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	5,4	1,7–16,8	0,004
Aucune comorbidité			
Virus ou bactéries atypiques	1,9	1,03–3,3	0,03
Tabagisme actif			
<i>Legionella</i> spp.	3,2	1,1–9,5	0,03
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	5,6	1,7–19,6	0,002
Pathologie pulmonaire sous-jacente			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1,7	1,0–3,1	0,04
Entérobactéries à Gram négatif + <i>P. aeruginosa</i>	3,1	1,2–8,5	0,009
<i>P. aeruginosa</i>	6,3	1,3–59,8	0,007
Pathologie hépatique			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3,9	1,7–9,1	0,0003
Alcoolisme			0,005
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2,6	1,2–5,6	
Bactéries atypiques	3,5	1,5–8,1	0,003
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	7,7	2,4–24,9	0,0006

L'influence du terrain sous-jacent sur l'étiologie semble moins connue. Au vu de données récentes, il semble intéressant de rapporter quelques éléments qui peuvent cependant sembler être en contradiction avec les données précédemment évoquées. Ainsi, concernant les PAC dues à *C. pneumoniae*, les travaux de Marrie et al. [74] et Socan et al. [75] suggèrent un lien entre cette étiologie et un âge élevé, une acquisition en institution et une insuffisance cardiaque congestive. Les infections dues à *L. pneumophila* surviendraient plutôt chez des patients sains, mais alcooliques [49,76]. Enfin, l'insuffisance cardiaque chronique sous-jacente serait plus en faveur d'une pneumonie virale que d'une pneumonie à pneumocoque [77]. Le travail le plus abouti sur ce sujet est celui de Ruiz [70]. À partir d'un collectif de 395 patients, cet auteur a pu retrouver certaines relations entre le terrain sous-jacent et l'étiologie (Tableau 12). Bien évidemment, ces résultats sont intéressants pour une enquête étiologique ciblée. Toutefois, on peut se demander ce qui se passe lorsque les comorbidités se cumulent : qu'en est-il chez un alcoolique, fumeur, bronchopathe, de 55 ans ?

### 3.3. Influence de l'âge et du lieu d'acquisition de la PAC

Dans deux publications récentes [78,79], les auteurs ont compilé les données de la littérature à propos des agents étiologiques de la pneumonie du sujet âgé de plus de 65 ans et de celle acquise en institution (Tableau 13). Les résultats sont déconcertants tant les variations de la fréquence d'isolement des divers pathogènes causals sont importantes.

Les nombreuses revues consacrées à la pneumonie du sujet âgé arrivent à des conclusions similaires, à savoir que l'aspect étiologique des PAC du sujet âgé est mal connu [80–83]. Cette ignorance est particulièrement nette dans le cas des pneumonies acquises en institution. Le rôle potentiellement majeur joué par les bacilles à Gram négatif dans ces pneumonies a

Tableau 13  
Étiologie des PAC du sujet âgé et des PAC acquises en milieu institutionnalisé [78,79]

	Pneumonie acquise en ville [78] (%)	Pneumonie acquise en institution [78] (%)	Pneumonie acquise en institution [79] (%)
<i>S. pneumoniae</i>	5–58	4–30	0–39
<i>S. aureus</i>	0–7	0–4	0–33
<i>H. influenzae</i>	2–14	0–2	0–22
<i>M. catarrhalis</i>	0–4	2–3	0–5
<i>E. coli</i>	1–7	0–2	} 0–55
<i>K. pneumoniae</i>	0–4	4–6	
<i>P. aeruginosa</i>	1–5	0–4	
<i>L. pneumophila</i>	0–15	0–1	
<i>C. pneumoniae</i>	0–28	0–18	0–6
<i>Coxiella burnetii</i>	0–6	–	–
<i>M. pneumoniae</i>	1–13	1	0–1

été souligné par une grande étude portant sur plus de 600 000 patients [84]. Toutefois, ce résultat est soumis à caution dans la mesure où il est difficile chez de tels patients de différencier colonisation et infection. Comme le souligne Marrie [81], la colonisation oropharyngée par des bacilles à Gram négatif croît avec l'âge et est particulièrement fréquente chez les patients institutionnalisés. Les prélèvements usuels de crachats sont donc potentiellement à l'origine de résultats bactériologiques erronés.

Comme précédemment, il nous est donc apparu important de rapporter les rares études comparant, sur le même site et avec les mêmes méthodes de recherche étiologique, les patients selon leur âge et selon le lieu d'acquisition de la pneumonie.

Deux études, l'une portant sur des patients hospitalisés pour une pneumonie acquise en ville [85] et l'autre sur des patients admis en réanimation pour une pneumonie acquise en ville [86], ont comparé les données étiologiques obtenues selon l'âge des patients (Tableau 14). Concernant les bactéries usuelles, aucune différence majeure n'apparaît entre les patients âgés de plus de 65 ans, voire de plus de 75 ans et les patients plus jeunes. Les bactéries dites atypiques sont en revanche, peut-être plus fréquentes chez les sujets les plus jeunes. Ce dernier point a d'ailleurs été souligné par Ruiz et al. [70] qui ont montré qu'un âge inférieur à 60 ans était significativement corrélé

Tableau 14  
Étiologie des PAC selon l'âge des patients. Études comparatives [85,86]

Âge des patients (ans)	PAC acquises en ville et hospitalisées [85]		PAC acquises en ville et hospitalisées en réanimation [86]	
	< 75	≥ 75	< 65	≥ 65
Nombre de patients	155	112	227	278
<i>S. pneumoniae</i> (%)	52	43	28,6	25,7
<i>S. aureus</i> (%)	1	2	11,9	14,0
<i>H. influenzae</i> (%)	7	8	11,0	9,7
<i>M. catarrhalis</i> (%)	0,6	4	2,6	4,3
<i>E. coli</i> (%)	} 1,9	} 0,9	4,4	5,4
<i>K. pneumoniae</i> (%)			–	–
<i>P. aeruginosa</i> (%)			1,3	2,5
<i>L. pneumophila</i> (%)			5	0,9
<i>C. pneumoniae</i> (%)	13	13	1,3	1,4
<i>Coxiella burnetii</i> (%)	1	0	0,4	0
<i>M. pneumoniae</i> (%)	5	0,9	0,8	0

Tableau 15  
Étiologie des PAC selon le lieu d'acquisition. Études comparatives [87,88]

	[87]		[88]	
	Acquisition en ville	Acquisition en institution	Acquisition en ville	Acquisition en institution
Nombre de patients	44	22	57	47
<i>S. pneumoniae</i> (%)	43	55	14	9
<i>S. aureus</i> (%)	2,3	0	7	29 <sup>a</sup>
<i>H. influenzae</i> (%)	11	0	7	2
<i>M. catarrhalis</i> (%)	2,3	4,6	4	2
<i>E. coli</i> (%)	–	–	7	2
<i>K. pneumoniae</i> (%)	–	–	4	6
<i>P. aeruginosa</i> (%)	–	–	2	4
<i>L. pneumophila</i> (%)	2,3	0	9	0
<i>C. pneumoniae</i> (%)	16	18	2	0

<sup>a</sup> Dont 21 % de souches résistantes à la méthicilline.

avec l'isolement en tant qu'agent causal d'une bactérie atypique (OR = 2,3) et tout particulièrement de *M. pneumoniae* (OR = 5,4).

La comparaison de l'aspect étiologique des pneumonies acquises en institution avec celles acquises en ville a fait l'objet de deux études (Tableau 15). Dans la première, réalisée en Angleterre [87], les patients ayant acquis une pneumonie en institution ont été appariés avec des patients du même âge ayant acquis leur infection en ville. Aucune différence d'étiologie n'a été retrouvée entre les deux populations. Dans la seconde, réalisée aux USA [88], les patients admis en réanimation pour une pneumonie sévère acquise en institution ont bénéficié d'une recherche étiologique exhaustive comprenant un LBA protégé. *Staphylococcus aureus* est l'agent dominant des pneumonies acquises en institution avec un pourcentage non négligeable de souches résistantes à la méthicilline.

Bien évidemment, ces travaux sont difficilement comparables dans la mesure où ils n'ont pas été réalisés dans le même pays, n'ont pas utilisé la même méthodologie diagnostique et n'ont pas étudié des patients de gravité comparable. Toutefois, ils mettent en exergue un problème majeur qui est celui de la définition même de la pneumonie acquise en institution. Il paraît en effet « audacieux » d'inclure sous le même vocable toutes les pneumonies acquises au sein d'une collectivité de personnes âgées. Cette nuance indispensable à faire entre les différentes pneumonies acquises par le sujet âgé en dehors de son domicile est le préalable incontournable à une conduite diagnostique rationnelle. Dans la plupart des conférences d'experts telles que celles proposées récemment par les nord-américains et les britanniques [57,89,90], la pneumonie acquise en institution est considérée comme une pneumonie communautaire et doit donc être prise en charge en tant que telle. Dans leurs recommandations de 2000, les experts de l'Infectious Diseases Society of America [91] avaient toutefois rappelé que seules pouvaient être considérées comme communautaires les pneumonies acquises en ville ou survenant au cours des 15 premiers jours d'un séjour dans une institution de long séjour. Enfin, pour certains auteurs [92] les pneumonies acquises dans les unités de long séjour devraient à l'inverse être considérées comme nosocomiales et donc être prises en charge différemment des pneumonies communautaires. Comme on peut le voir, la situation demeure confuse. Un travail récent d'El Sohl et al. [93] pourrait apporter un début de solution. À

partir de l'étude de 88 patients admis en réanimation pour une pneumonie sévère acquise en institution, cet auteur a pu construire un algorithme évaluant le risque qu'un germe résistant (*S. aureus* résistant à la méthicilline ou *P. aeruginosa*) soit incriminé en tant qu'agent causal de la pneumonie. Ce risque est majeur (90 %) chez les patients ayant eu une antibiothérapie antérieure (plus de trois jours de traitement au cours des six mois précédant la pneumonie) et une autonomie limitée (score ADL > 12,5). À l'inverse, le risque est nul chez les patients autonomes sans antibiothérapie antérieure.

### 3.4. Influence du contexte épidémiologique (voyage, épidémie)

Dans certaines circonstances, le lieu d'acquisition de la PAC ou le contexte épidémiologique doivent inciter le clinicien à évoquer certaines étiologies spécifiques ou plus fréquentes qu'à l'ordinaire [89–91]. Ces circonstances, en fait assez nombreuses, sont rapportées dans le Tableau 16.

### 3.5. En résumé

Selon le lieu de prise en charge de la PAC, sa gravité, le terrain sous-jacent, voire le lieu d'acquisition, le spectre étiologique d'une PAC peut avoir quelques particularités. Toutefois, chez un patient donné, il n'existe aucun élément suffisamment pertinent pour exclure une quelconque étiologie...

## 4. Stratégie d'utilisation et modalités de réalisation des diverses techniques microbiologiques

Dans ce chapitre, il aurait pu être envisagé de passer en revue, pathogène par pathogène, les examens microbiologiques les plus à même d'affirmer leur responsabilité en tant qu'agent causal d'une PAC. Cet exercice apparaît toutefois plus fastidieux qu'utile.

Il semble préférable d'envisager la stratégie d'utilisation des diverses techniques microbiologiques sous un angle plus général pour tenter de répondre aux questions suivantes :

- quel est l'impact d'une recherche étiologique sur le pronostic des patients ?

Tableau 16  
Conditions épidémiologiques spécifiquement associées avec certains agents pathogènes au cours des PAC [89–91]

	Agents pathogènes spécifiques
<b>Lieu géographique d'acquisition</b>	
Pays du pourtour méditerranéen	<i>Legionella</i> spp.
Région nord-ouest de l'Espagne, Canada	<i>Coxiella burnetii</i>
Afrique du Sud	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Italie	Entérobactéries à Gram négatif
Région sud ouest des États-Unis	Coccidio-idiomycose
<b>Situation épidémique</b>	
Épidémie grippale	Virus influenza
Épidémie de légionellose	<i>Legionella</i> spp.
<b>Contacts avec animaux</b>	
Chauve-souris	<i>Histoplasma capsulatum</i>
Oiseaux	<i>Chlamydia psittaci</i> , <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Cryptococcus neoformans</i>
Lapins	<i>Francisella tularensis</i>
Animaux de la ferme	<i>Coxiella burnetii</i>

- Quel est l'impact pronostique de l'antibiothérapie ?
- Quel est l'impact d'une donnée microbiologique positive sur la prise en charge des patients ?

Une fois les éléments de réponse obtenus, les modalités pratiques, quotidiennes, d'utilisation des explorations microbiologiques seront abordées.

#### 4.1. Impact des recherches étiologiques sur le pronostic des patients avec une PAC

Il n'existe que peu de travaux dans la littérature sur ce sujet. Ils sont toutefois unanimes : la réalisation d'explorations microbiologiques et la connaissance de l'agent causal n'ont aucun impact pronostique significatif.

Deux études ont été réalisées chez des patients hospitalisés pour une PAC [94,95]. Dans la première, les auteurs ont rétrospectivement évalué l'impact d'un diagnostic microbiologique positif dans une cohorte de 482 patients ayant bénéficié d'une analyse de l'expectoration, d'hémocultures et d'une analyse sérologique à la recherche de *M. pneumoniae* et des virus respiratoires [94]. Les patients soumis à cette enquête étiologique ont, trois mois après l'épisode pneumonique, une mortalité plus faible que ceux sans enquête étiologique réalisée (9 versus 24 % ;  $p = 0,001$ ). Toutefois, cette différence semble plutôt liée à un terrain sous-jacent moins altéré qu'à l'enquête étiologique proprement dite. Concernant le pronostic immédiat, aucune différence n'a été retrouvée entre les patients avec et sans diagnostic étiologique précis. Dans la seconde étude, van der Eerden et al. [95] ont comparé l'impact de deux démarches thérapeutiques : la première correspondait à une antibiothérapie probabiliste fondée sur les recommandations usuelles, la seconde à une antibiothérapie ciblée fondée sur les données des explorations microbiologiques. Les taux de mortalité étaient identiques dans les deux groupes (14 versus 13 %, respectivement).

Rello et al. ont étudié 106 patients admis en réanimation pour une PAC sévère [24]. Un diagnostic microbiologique pré-

cis a été fait pour 57,3 % des patients au prix d'explorations multiples y compris invasives. La mortalité a été de 26,4 % chez les patients avec diagnostic étiologique établi et de 19,5 % chez les patients sans diagnostic étiologique. Sanyal et al. [96] ont étudié 54 patients avec une PAC sévère. Tous les patients ont bénéficié d'hémocultures et d'une analyse de l'expectoration. Parmi eux, 14 patients en échec thérapeutique à la 24<sup>e</sup> heure ont bénéficié d'une modification du traitement antibiotique, soit empirique ( $n = 11$ ), soit fondée sur les données des explorations microbiologiques ( $n = 3$ ). La mortalité a été la même dans les deux groupes (7/11 versus 2/3).

Enfin, El Solh et al. [67] ont étudié 52 patients présentant une PAC et admis en réanimation pour un échec du traitement instauré dans l'institution où ils séjournaient. Tous les patients ont bénéficié d'explorations étiologiques multiples, y compris invasives. Dans 20 cas, les explorations se sont révélées positives. La mortalité globale dans ce collectif de 52 patients a été de 42 %. Elle n'était pas différente selon que les explorations avaient (50 %) ou non (39 %) isolé un agent étiologique précis.

#### 4.2. Impact pronostique de l'antibiothérapie

Les données concernant l'impact pronostique de l'antibiothérapie n'existent que pour les PAC nécessitant une hospitalisation. Il n'existe à notre connaissance aucune donnée à propos des PAC traitées en ambulatoire. Bien que les définitions utilisées ne soient pas toujours identiques et que les études soient peu nombreuses et parfois discordantes, le rôle délétère d'une antibiothérapie inadaptée aux germe(s) causal(s) apparaît très probable :

- Roson et al. [97] ont montré dans un collectif de 1383 patients hospitalisés pour une PAC qu'une antibiothérapie inadaptée était, en analyse multivariée, significativement associée avec un échec précoce (OR = 2,51). Cet échec précoce était lui-même associé avec une mortalité accrue (27 versus 4 % ;  $p < ,001$ ) ;
- pour les patients admis en réanimation, Torres et al. [23] ont montré qu'une antibiothérapie inadéquate entraînait un accroissement de la mortalité (60 versus 7 %). De même, il a été démontré qu'un traitement antibiotique inefficace à la 72<sup>e</sup> heure était significativement associé avec une mortalité accrue (OR = 4,71) [22] ;
- l'impact de l'antibiothérapie initiale sur le pronostic des PAC à pneumocoque bactériémiques est discuté. Yu et al. [98] ont colligé dans une étude internationale, prospective, 844 cas de bactériémies à pneumocoque. Pour les patients traités par une pénicilline ou une céphalosporine de troisième génération, telle que céfotaxime ou ceftriaxone, la résistance du pneumocoque à ces antibiotiques n'entraînait pas, au 14<sup>e</sup> jour, de surmortalité significative. À l'inverse, Lujan et al. [99] ont montré dans un collectif de 100 patients avec une PAC à pneumocoque bactériémique qu'une antibiothérapie inefficace in vitro sur le pneumocoque était associée avec une surmortalité (50 versus 14 % ;  $p = 0,016$ ). Cette antibiothérapie inefficace (OR = 27,3)

était l'un des quatre facteurs indépendants de mauvais pronostic.

Le rôle pronostique du délai d'instauration de l'antibiothérapie par rapport à l'admission hospitalière du patient a été évalué dans deux études. Dans la première, réalisée par Meehan et al. [100] chez 14 069 patients de plus de 65 ans hospitalisés pour une PAC, il a été démontré qu'une antibiothérapie administrée dans les huit premières heures suivant l'hospitalisation diminuait significativement la mortalité à 30 jours (OR = 0,85 ; 95 % IC = 0,75–0,96) par rapport à une antibiothérapie plus tardive. Dans la seconde [101], Houck et al. ont étudié 18 209 patients âgés de plus de 65 ans hospitalisés pour une PAC. Dans le groupe des 13 771 patients n'ayant pas reçu d'antibiothérapie préalable en ambulatoire, une antibiothérapie instaurée dans les quatre heures suivant l'admission était associée avec une diminution de la mortalité hospitalière (AOR = 0,85 ; 95 % IC = 0,74–0,98) et de la mortalité à 30 jours (AOR = 0,85 ; 95 % IC = 0,76–0,95) par rapport à un traitement plus tardif. Ces diminutions de mortalité étaient observées autant chez les patients peu sévères (classes de risque du score PSI II et III) que chez les patients sévères (classes de risque PSI IV et V).

L'impact pronostique de la nature même du traitement antibiotique instauré a fait l'objet d'un certain nombre d'études. Une revue réalisée en 2003 par Oosterheert et al. [102] avait retrouvé, parmi 135 publications effectuées entre 1997 et 2003, huit études significatives. Dans six d'entre elles, il apparaissait qu'un traitement empirique par une quinolone ou par une association  $\beta$ -lactamine + macrolide, comparé avec un traitement par une  $\beta$ -lactamine seule, était associé avec une réduction de la mortalité. Dans un souci de clarté, il nous est apparu important de rapporter seulement quelques-unes de ces huit études, auxquelles s'ajoutent quelques publications plus récentes, en différenciant le cas général des PAC de celui des PAC à pneumocoque.

Parmi les travaux sélectionnés par Oosterheert et al. [102], l'étude la plus significative est peut-être celle de Gleason et al. [103]. Dans un collectif de 12 945 patients de plus de 65 ans hospitalisés, les auteurs ont montré qu'en référence au traitement par une céphalosporine de troisième génération sans activité anti-*Pseudomonas* utilisée en monothérapie, un traitement par une telle céphalosporine combinée avec un macrolide ou une quinolone en monothérapie était associé avec une diminution significative de la mortalité à 30 jours.

Deux études non prises en compte par Oosterheert et al. en raison de leur publication postérieure apportent des résultats similaires :

- Brown et al. [104] ont étudié 44 814 patients hospitalisés pour une PAC, en dehors d'un service de réanimation. La mortalité à 30 jours était significativement diminuée lorsqu'une  $\beta$ -lactamine n'était pas utilisée seule mais en association avec un macrolide (Tableau 17) ;
- Marrie et al. [105] ont étudié 3043 patients. Une antibiothérapie par la lévofloxacine est apparue comme un élément

Tableau 17  
Mortalité à 30 jours des PAC selon le traitement antibiotique initial,  $\beta$ -lactamine versus  $\beta$ -lactamine + macrolide [104]

	Monothérapie	Bithérapie	<i>p</i>
<i>Ceftriaxone</i>			< 0,0001
Nombre de patients	8884	9605	
Mortalité	6,31 %	2,76 %	
<i>Autres céphalosporines</i>			< 0,0001
Nombre de patients	8729	7175	
Mortalité	5,11 %	2,16 %	
<i>Pénicillines</i>			< 0,0001
Nombre de patients	3130	1420	
Mortalité	8,15 %	2,46 %	

significativement associé avec une diminution de la mortalité (AOR = 0,46 ;  $p < 0,001$ ) ;

Dans la revue d'Oosterheert et al. [102], deux publications concernaient les PAC à pneumocoque. Il s'y ajoute actuellement une troisième confirmant les résultats des premières, à savoir qu'une monothérapie n'est peut-être pas le traitement le plus efficace de ces PAC :

- Waterer et al. [106] ont étudié 225 patients avec une PAC à pneumocoque bactériémique. Parmi eux, 99 patients ont reçu une monothérapie efficace et 102 ont reçu une bithérapie efficace. La mortalité chez les patients traités en monothérapie était significativement plus élevée (18,2 versus 6,9 %). En analyse multivariée avec ajustement sur le score de sévérité Apache II, la monothérapie était associée avec une nette surmortalité (AOR = 6,2) ;
- dans l'étude de Martinez et al. [107], portant sur 409 patients avec une pneumonie à pneumocoque bactériémique, 238 patients ont été traités par une  $\beta$ -lactamine associée avec un macrolide et 171 ont reçu une  $\beta$ -lactamine seule. En analyse multivariée, l'utilisation d'un traitement associant  $\beta$ -lactamine et macrolide est apparue comme un élément indépendant du pronostic avec une diminution de la mortalité (OR = 0,4 ;  $p = 0,03$ ) ;
- le troisième travail, émanant de l'International Pneumococcal Study Group [108], est une analyse rétrospective de 844 patients présentant une bactériémie à pneumocoque. La mortalité, évaluée au 14<sup>e</sup> jour, était globalement identique chez les patients traités en monothérapie (11,5 %) et chez ceux traités par une bithérapie (10,4 %). Toutefois, chez les patients les plus graves, une association d'antibiotiques entraînait une réduction significative de la mortalité (23,4 versus 55,3 % ;  $p = 0,0015$ ). De même, une bithérapie efficace diminuait, par rapport à une monothérapie efficace, la mortalité (19,4 versus 60 % ;  $p = 0,0006$ ).

Bien évidemment, l'ensemble de ces résultats concernant l'impact pronostique de l'antibiothérapie au cours des PAC sont discutables dans la mesure où aucun d'entre eux n'a été obtenu par une étude prospective, randomisée, en double insu... Toutefois, il ne semble pas interdit de dire que le pronostic d'une PAC hospitalisée peut être amélioré par une antibiothérapie prescrite sans délai (moins de huit heures, voire

moins de quatre heures après l'admission). Celle-ci se devra d'être immédiatement efficace. Cette efficacité passe obligatoirement par l'usage d'une antibiothérapie active in vitro sur le ou les pathogène(s) causal(s). De plus, l'intérêt pronostique majeur d'une antibiothérapie efficace à la fois sur les bactéries usuelles et les germes intracellulaires, voire d'une bithérapie effective sur le pneumocoque est actuellement fortement suggéré par les études à notre disposition.

#### 4.3. Impact d'une donnée microbiologique sur la prise en charge des patients

L'impact d'une donnée microbiologique sur la conduite thérapeutique peut être évalué par les réponses aux deux questions suivantes :

- combien de fois les explorations microbiologiques sont elles positives et donc utiles à la conduite thérapeutique ?
- Que font les cliniciens des résultats microbiologiques ?

Au vu de la littérature, l'impact global des explorations microbiologiques apparaît faible pour les patients ambulatoires et l'ensemble des patients hospitalisés. Il apparaît nettement supérieur pour les patients admis en réanimation :

- Campbell et al. [16] ont étudié 289 patients traités en ambulatoire après qu'ils aient bénéficié, lors de leur passage dans un service d'urgence, d'hémoculture(s). Celles-ci se sont révélées positives à six reprises (2,1 %) [*S. pneumoniae*  $n = 4$ , *Escherichia coli*  $n = 2$ ]. Le traitement n'a été modifié qu'à deux reprises, soit une modification induite par les hémocultures chez ces patients de 0,69 % (2/289) ;
- Ewig et al. [109] ont évalué l'impact du diagnostic microbiologique chez 93 patients dont 69 avaient déjà reçu une antibiothérapie avant l'hospitalisation. Dans 19 cas, les explorations (hémocultures  $n = 50$ , enquête sérologique  $n = 52$ , LBA  $n = 20$ ) se sont avérées positives. À six reprises seulement (6,4 %), dont quatre fois pour un germe résistant, est survenue une modification du traitement antibiotique ;
- Lidman et al. [94] ont étudié 605 patients hospitalisés pour une PAC. Parmi eux, 482 ont bénéficié d'une étude sérologique et/ou d'hémoculture et/ou d'une analyse des expectorations. Un diagnostic microbiologique positif a été obtenu chez 132 patients. Toutefois, il n'a conduit à une antibiothérapie spécifiquement dirigée à l'encontre du pathogène retrouvé que dans 16 cas, soit chez 3,3 % des patients ;
- les patients admis en réanimation ont été étudiés par Rello et al. [24]. Deux cent quatre patients ont bénéficié d'une exploration microbiologique exhaustive. Celle-ci s'est globalement révélée positive pour 57,3 % des patients (hémocultures 40/189, sérologie 8/73, antigénurie *Legionella* spp 12/64, brosse 16/62, analyse de l'expectoration 24/54, LBA 14/41, ponction pleurale 10/40). Ces résultats microbiologiques ont conduit dans 41,6 % des cas à une modification de

l'antibiothérapie initiale. Il s'agissait à 11 reprises (5,4 %) d'une adaptation rendue nécessaire par l'isolement d'un germe résistant au traitement initial et à 65 reprises (31,8 %) d'une simplification du traitement.

L'impact des explorations microbiologiques, telles que l'analyse cyto bactériologique des expectorations et les hémocultures évaluées individuellement, est encore plus faible :

- l'analyse de l'expectoration a été prospectivement évaluée par Ewig et al. [110] chez 116 patients. Seuls 42 ont été capables d'expectorer et seuls 23 (20 % des patients et 55 % des analyses) échantillons étaient corrects. L'analyse se révélera positive dans dix cas et seul un résultat pouvait être considéré comme utile pour la conduite de l'antibiothérapie ;
- Chasalani et al. [18] ont étudié 517 patients, hospitalisés pour une PAC, ayant bénéficié de deux hémocultures avant l'antibiothérapie. Celles-ci se sont révélées positives à 59 reprises. Pour 25 patients, il s'agissait de souillures. Pour 34 patients (6,6 %), elles ont été considérées comme réellement positives. Les pathogènes identifiés étaient *S. pneumoniae* ( $n = 29$ ), *H. influenzae* ( $n = 3$ ), *Streptococcus pyogenes* ( $n = 1$ ) et *E. coli* ( $n = 1$ ). Une modification thérapeutique a été induite par ces résultats dans sept cas. Toutefois, une seule fois, le traitement initial était inadéquat ;
- dans un travail réalisé dans 19 centres hospitaliers canadiens, Campbell et al. [21] ont évalué les conséquences cliniques d'une hémoculture positive sur la prise en charge des patients hospitalisés pour une PAC. Parmi 1022 patients, 43 (5,7 %) avaient un résultat positif. En termes de prise en charge, cela a conduit les cliniciens à réduire le spectre antibactérien du traitement dix fois et 13 fois à l'élargir. Dans 20 cas, aucune modification n'a été entreprise. Toutefois, seules 0,4 % des hémocultures prélevées ont réellement conduit à une modification thérapeutique indispensable pour le patient. De plus, à 25 reprises, le traitement a été modifié ou non modifié en contradiction avec le résultat des hémocultures... ;
- le cas particulier des PAC à pneumocoque bactériémiques a été évalué par Waterer [111] dans un collectif de 74 patients. Après connaissance du résultat d'hémoculture(s) positive(s), les cliniciens ont modifié le traitement dans 31 cas. Toutefois, la résistance du pneumocoque au traitement initial empirique n'était présente qu'à deux reprises. Il faut également noter que parmi les 35 patients recevant une bithérapie couvrant les intracellulaires, seuls 13 patients (37,1 %) ont vu leur bithérapie stoppée par la présence d'une hémoculture positive à pneumocoque.

#### 4.4. Modalités pratiques de réalisation des explorations microbiologiques au cours de la PAC

Avant d'envisager les modalités pratiques de réalisation des explorations microbiologiques au cours des PAC, il faut

d'emblée insister sur le fait que seul l'intérêt individuel immédiat du patient sera pris en compte dans ce chapitre.

Bien évidemment, les connaissances épidémiologiques globales sont importantes pour la prise en charge d'un patient. Personne ne peut nier l'intérêt des travaux évaluant, par exemple, l'évolution de la sensibilité du pneumocoque. Toutefois, aussi importantes que soient ces données, elles ne peuvent justifier une recherche étiologique exhaustive pour tous les patients souffrant de PAC. De telles explorations exhaustives devraient peut être se limiter aux patients admis dans des centres pilotes dont les caractéristiques restent à définir.

Les points suivants seront donc successivement envisagés :

- limites et intérêts individuels du diagnostic microbiologique ;
- analyse critique des recommandations de sociétés savantes étrangères ;
- propositions personnelles.

#### 4.4.1. Limites et intérêts individuels du diagnostic microbiologique

Pour définir au mieux ces points, il faut répondre aux trois questions suivantes.

La première question concerne le diagnostic même de la PAC : le diagnostic étiologique est-il nécessaire au diagnostic positif de PAC ? Même si l'isolement d'un pathogène par une technique spécifique peut conforter le diagnostic, le critère microbiologique ne fait pas partie des critères diagnostiques usuellement requis.

La deuxième question est celle de savoir si une donnée étiologique pourrait guider le traitement antibiotique initial. Ainsi que nous l'avons vu précédemment, le pronostic d'une PAC peut être aggravé par une antibiothérapie tardive et inadéquate. Comme la symptomatologie clinique, le tableau radiologique et les données anamnestiques sont incapables de prédire avec suffisamment de sensibilité et de spécificité l'étiologie de la PAC, le traitement probabiliste initial ne pourra être fondé que sur des considérations épidémiologiques générales, voire sur d'éventuels examens microbiologiques dont le résultat peut être obtenu en quelques heures. Dans l'état actuel des techniques, il n'y a que peu d'examens à même de fournir un résultat rapide. Bien évidemment, il ne s'agit pas des hémocultures et encore moins des techniques sérologiques. Certaines méthodes complexes (immunofluorescence par exemple) de recherche des pathogènes au niveau des sécrétions respiratoires fournissent théoriquement des résultats rapides. Malheureusement, ces techniques n'étant disponibles que dans des laboratoires spécialisés, il est évident que le délai d'obtention du résultat est loin d'être aussi rapide qu'annoncé. Ainsi, il n'existe que trois examens capables de fournir un résultat rapide. Il s'agit de l'examen direct des expectorations et de la recherche d'antigènes pneumococciques ou de *L. pneumophila* type 1 dans les urines. Ces examens ont toutefois d'importantes limites : premièrement, ils ne peuvent souvent incriminer que deux des pathogènes causals potentiels, *S. pneumoniae* et

*L. pneumophila*. Deuxièmement, même en cas de positivité, il ne faut pas perdre de vue que leur spécificité est loin d'être absolue et que dans un certain nombre de cas, la PAC a une étiologie plurimicrobienne. Il est donc peut-être déraisonnable de focaliser l'antibiothérapie sur le seul pathogène isolé. Les experts de l'ATS [89] insistent d'ailleurs sur le fait que l'examen direct de l'expectoration ne devra pas être utilisé pour diminuer la largeur du spectre antibactérien du traitement empirique mais, au contraire, pour l'élargir si un pathogène, non couvert par le traitement empirique usuel, est suspecté. Enfin, en cas de négativité, leur sensibilité est trop faible pour exclure définitivement *S. pneumoniae* et *L. pneumophila*. Comme on peut le voir, il ne semble donc pas exister réellement d'explorations microbiologiques capables de guider utilement l'antibiothérapie initiale.

La troisième question concerne l'impact du diagnostic microbiologique sur l'adaptation éventuelle de l'antibiothérapie après 48 à 72 heures d'administration. À ce moment-là, le clinicien dispose d'une part de paramètres cliniques, biologiques et radiologiques permettant d'évaluer l'efficacité du traitement et, d'autre part, du résultat de certaines explorations microbiologiques telles que les cultures des expectorations ou sécrétions trachéobronchiques et telles que les hémocultures. Sans entrer dans le détail des critères d'évaluation, quatre situations sont envisageables :

- le traitement est un succès et les explorations microbiologiques sont négatives. Il est logique de penser que le traitement ne sera pas modifié ;
- le traitement est un succès et les explorations microbiologiques isolent un pathogène précis. La question est alors la suivante : faut-il modifier l'antibiothérapie sur la foi de cette donnée microbiologique avec notamment réduction du spectre antibactérien selon la sensibilité du pathogène isolé. Plusieurs éléments semblent devoir être pris en compte. Tout d'abord, il faut dire qu'il n'existe pas de techniques microbiologiques suffisamment rapides pour infirmer en 48 à 72 heures la responsabilité d'un pathogène tel que *L. pneumophila*, *C. pneumoniae* ou *M. pneumoniae*. Comme, par ailleurs, les données de la littérature soulignent le bénéfice thérapeutique d'une antibiothérapie incluant à la fois une  $\beta$ -lactamine et un macrolide, il semble déraisonnable de stopper un traitement efficace sur ces pathogènes sur la seule foi de l'isolement d'une autre bactérie usuelle. Ensuite, concernant le pneumocoque, certaines données récentes suggèrent qu'une bithérapie efficace est bénéfique en cas de bactériémie. Ainsi, en cas d'hémocultures positives à pneumocoque, le bien-fondé d'une simplification du traitement n'est pas certain. Ces données expliquent peut-être les résultats de la littérature où l'adaptation du traitement aux données microbiologiques est loin d'être la règle [21,111] ;
- le traitement est un échec et les données microbiologiques permettent d'incriminer un pathogène résistant au traitement initial empirique. Bien évidemment, le traitement sera adapté. Malheureusement, il est probable que ce retard à

l'instauration d'un traitement adéquat ait des conséquences délétères irrémédiables [97,99] ;

- le traitement est un échec et les données microbiologiques initiales sont négatives. Il se pose le problème de nouvelles explorations microbiologiques, notamment invasives. Malgré la logique de cette démarche, il semble malheureusement qu'un diagnostic étiologique tardif ne modifie pas le pronostic sévère observé dans ces circonstances [67].

Comme, on peut le constater, les contraintes de l'antibiothérapie au cours de la PAC sont telles que la place laissée aux explorations microbiologiques dans la prise en charge globale d'un patient avec PAC pourrait dans l'état actuel des techniques être minimale.

#### 4.4.2. Analyse critique des recommandations de sociétés savantes étrangères

Depuis 2000, diverses sociétés américaines (Infectious Disease Society of America, American Thoracic Society) [89, 91,112] et anglaises (British Thoracic Society) [90,113] ont émis des recommandations concernant les explorations microbiologiques à réaliser chez un patient présentant une PAC. Elles sont schématisées dans le Tableau 18.

Comme on peut le voir, aucun bilan étiologique n'apparaît indispensable pour les patients traités en ambulatoire. Pour les patients hospitalisés, en dehors des services de réanimation, le bilan proposé varie d'une recommandation à l'autre. Les experts américains proposent tous des hémocultures. Ils sont plus nuancés vis-à-vis de l'analyse cyto-bactériologique des expectorations. Les recommandations récentes font état de l'intérêt de la recherche des antigènes urinaires pneumococques. Les recommandations britanniques sont simplifiées à l'extrême puisque les experts suggèrent que les hémocultures puissent ne pas être utiles et que l'analyse de l'expectoration n'est utile que chez les patients indemnes de toute antibiothérapie antérieure. Pour les patients admis en réanimation, le bilan proposé est plus complet avec hémocultures, analyse cyto-bactériologique des expectorations et recherche d'antigè-

nes urinaires de *L. pneumophila* et de pneumocoque. Vis-à-vis des sérologies et des explorations invasives endoscopiques les avis semblent partagés.

#### 4.4.3. Propositions personnelles

Tout d'abord, il apparaît indispensable de différencier les pneumonies acquises au domicile des pneumonies acquises en milieu institutionnalisé.

Pour les pneumonies acquises en ville, en dehors d'une institution :

- il apparaît inutile de proposer un quelconque bilan pour les patients traités en ambulatoire ;
- pour les patients hospitalisés en dehors d'un service de réanimation, les propositions minimalistes britanniques sont séduisantes. Il est en effet clair que les hémocultures, en raison de leur faible fréquence de positivité et de leur résultat tardif, ne sont que peu contributives à la prise en charge thérapeutique initiale. Il en va de même pour l'analyse cyto-bactériologique des expectorations. Dans un contexte épidémique évocateur, la recherche d'antigènes urinaires de *L. pneumophila* apparaît cependant indispensable ;
- en cas de pneumonie admise en réanimation, la recherche d'antigènes urinaires de pneumocoque pourrait être utile dans la mesure où, positive, elle pourrait être le témoin initial d'une bactériémie. Un tel résultat pourrait, de fait, conduire à la mise en route d'une bithérapie antipneumococcique efficace. De même, la recherche d'antigènes urinaires de *L. pneumophila* pourrait conduire à l'instauration d'un traitement adéquat d'une légionellose grave. Les hémocultures seraient intéressantes, ne serait ce que pour stopper une bithérapie initiale en cas de négativité. Enfin, l'analyse cyto-bactériologique des sécrétions trachéobronchiques prélevées lors de l'intubation, chez les patients nécessitant une ventilation mécanique, apparaît utile et semble pouvoir remplacer les prélèvements endoscopiques. Pour les patients non ventilés, l'obtention d'une expectoration permettant une analyse correcte apparaît plus illusoire. De même, la place de

Tableau 18

Explorations microbiologiques recommandées au cours des PAC par les principales sociétés savantes étrangères [89–91,112,113]

	IDSA 2000 [91]	IDSA 2003 [112]	ATS 2001 [89]	BTS 2001 et 2004 [90,113]
Patient ambulatoire	Examen direct et culture de l'expectoration optionnels	Examen direct et culture de l'expectoration optionnels	Aucune exploration Analyse de l'expectoration inutile	Pas d'exploration obligatoire, mais : analyse de l'expectoration si échec ; étude sérologique si épidémie
Patient hospitalisé	Deux hémocultures Examen direct et culture de l'expectoration	Deux hémocultures Examen direct et culture de l'expectoration AG urinaire pneumocoque	Deux hémocultures ± Examen direct et culture de l'expectoration Pas d'études sérologiques	Hémocultures non obligatoires Analyse de l'expectoration si échec ou pas d'antibiothérapie antérieure
Patient admis en réanimation	Deux hémocultures Examen direct et culture de l'expectoration Recherche légionellose Prélèvements sérologiques en attente	Deux hémocultures Examen direct et culture de l'expectoration Recherche légionellose Prélèvements sérologiques en attente AG urinaire pneumocoque	Deux hémocultures ± Examen direct et culture de l'expectoration AG urinaire <i>L. pneumophila</i> Examens endoscopiques (?) Pas d'études sérologiques	Hémocultures Analyse de l'expectoration AG urinaire pneumocoque AG urinaire <i>L. pneumophila</i>

l'endoscopie est difficile à imaginer tant cette technique peut être délétère chez un patient en détresse respiratoire...

Pour les patients ayant acquis leur pneumonie en institution, notre méconnaissance est grande et il ne semble pas opportun de proposer une conduite diagnostique schématique. Il importe avant tout de mieux définir cette pathologie qui sera tantôt une vraie pneumonie communautaire, alors prise en charge comme telle, tantôt une vraie pneumonie nosocomiale, alors prise en charge de façon totalement différente.

## 5. Prospective : méthodes de diagnostic rapide

### 5.1. Infections virales

De très nombreux virus peuvent être à l'origine d'infections respiratoires. Plus de 200 virus, antigéniquement distincts, appartenant aux familles des paramyxovirus, orthomyxovirus, picornavirus, coronavirus, adénovirus et herpes virus ont été incriminés comme agents causaux d'infections respiratoires, sporadiques ou épidémiques, chez l'enfant, l'adolescent et l'adulte [114]. Schématiquement, il était fréquemment admis que les rhinovirus, coronavirus et adénovirus étaient plutôt responsables d'infections respiratoires hautes et que les virus influenza, para-influenza et respiratoire syncytial (VRS) donnaient plutôt des infections respiratoires basses [115]. De même, il était fréquemment suggéré que certains virus touchaient plutôt certains terrains (VRS et enfant, VZV et immunodéprimé...). Ces distinctions sont en fait très arbitraires et il est actuellement démontré que tous ces virus peuvent être responsables d'infections respiratoires inférieures chez l'adulte immunocompétent [116–119]. Le problème est encore compliqué par les découvertes récentes de nouveaux virus (coronavirus et SARS, virus influenza A[H5N1] et grippe aviaire, métapneumovirus humain) capables de provoquer des atteintes respiratoires inférieures, souvent gravissimes [120–123].

Jusqu'à ces dernières années, affirmer l'origine virale d'une infection pulmonaire communautaire n'était ni aisé ni utile :

- les cliniciens ne disposaient d'aucune technique de diagnostic rapide puisque seules la culture virale et la sérologie étaient employées. La détection des virus par la culture nécessite plusieurs jours d'incubation, en moyenne quatre jours pour les virus influenza, six jours pour les VRS et de 4 à 15 jours pour un adénovirus. Les techniques de détec-

tion accélérée (recherche d'antigènes viraux) en culture raccourcissent cependant de quelques jours le délai de reconnaissance du virus. Pour la sérologie, il est obligatoire d'avoir un second sérum, prélevé au moins dix jours après le premier, pour parler de séroconversion significative. La détection d'anticorps IgM sur le premier sérum est rarement possible avec la réaction de fixation du complément et celle d'inhibition de l'hémagglutination ;

- aucun traitement antiviral efficace, voire dénué de toute toxicité, n'était disponible.

Actuellement, la situation se modifie pour de nombreuses raisons :

- il existe sur le marché des molécules antivirales à la fois efficaces et à la toxicité acceptable [124] ;
- l'affirmation rapide d'un diagnostic virologique permet de diminuer la durée de séjour, le coût de l'hospitalisation, de rationaliser l'usage des antibactériens et, surtout, d'améliorer le pronostic des patients hospitalisés pour une pathologie respiratoire [125] ;
- enfin, un diagnostic précoce d'infection virale permet, par les mesures globales d'hygiène, de diminuer le risque épidémique inhérent à certains virus. Le cas le plus commun est celui du virus grippal. Bien évidemment, le risque dû aux nouveaux virus (SARS, grippe aviaire) est également patent.

L'ensemble de ces données souligne l'importance d'un diagnostic virologique rapide. Il existe actuellement deux méthodes potentiellement capables de fournir un résultat rapide. La première recherche dans un échantillon respiratoire un antigène viral par une technique immunologique. La seconde identifie dans un échantillon respiratoire un fragment du génome viral par une technique d'amplification génique : *polymerase chain reaction* (PCR). Pour la plupart des virus à tropisme respiratoire, ces deux méthodes sont disponibles.

#### 5.1.1. Recherche d'antigène viral

La méthode d'immunofluorescence directe permet en principe un diagnostic rapide en 1,5 à 2 heures. Commercialement, il existe de nombreux anticorps monoclonaux capables d'identifier individuellement ou collectivement des virus tels que le VRS, les virus para-influenza 1, 2 et 3, les adénovirus, et les virus influenza A et B [125–129]. La comparaison de cette

Tableau 19

Comparaison de la technique d'immunofluorescence directe avec la culture cellulaire pour le diagnostic des infections virales au cours des PAC [125,127,129]

	[125]		[127]		[129]		
	Sens. (%)	Spé. (%)	Sens (%)	Spé. (%)	Culture+ IFD+	Culture + IFD-	Culture- IFD+
VRS	100	100	81,9	98	18	5	55
Influenza A	90	100	80,4	98,7	34	14	2
Influenza B	14,3	100	57,1	100	7	4	0
Para-influenza	–	–	66,7	100	2	2	0
Adenovirus	0	100	55,6	100	3	6	0

Sens. : sensibilité ; Spé. : spécificité ; IFD : immunofluorescence directe.

technique avec la culture virale fournit des résultats intéressants (Tableau 19). Ceux-ci peuvent être exprimés en tant que sensibilité ou spécificité de la méthode par rapport à la culture prise pour référence ou en tant que résultats bruts de l'un et de l'autre. Il apparaît que la technique d'immunofluorescence est équivalente, voire supérieure à la culture cellulaire pour le diagnostic des infections à VRS et à influenza A. Pour les influenza B, les para-influenza et les adénovirus, la sensibilité de la méthode est faible et incompatible avec un usage clinique significatif. Outre ces problèmes de sensibilité, cette technique d'immunofluorescence est limitée par le fait qu'elle nécessite l'expertise d'un laboratoire de virologie.

Cela souligne l'intérêt des tests utilisant des techniques d'immunoenzymologie, d'immunochromatographie ou d'immunoanalyse optique. Ils sont réalisables dans un laboratoire d'analyse médicale usuel voire même au lit du patient par le médecin traitant à partir d'échantillons obtenus par écouvillonnage ou aspiration nasopharyngée.

Il existe actuellement différents tests capables d'identifier le VRS, le virus grippal A (nucléoprotéine 153) ou les virus grippaux A et B sans distinction (nucléoprotéine B) :

- concernant le VRS, le test Directigen RSV<sup>®</sup> a une sensibilité de 86 % et une spécificité de 93,1 % en prenant la culture pour référence [130] ;
- pour les virus influenza A et B, les tests disponibles en France sont au nombre de cinq : Quick vue<sup>®</sup>, Now flu A et Now flu B<sup>®</sup>, Directigen A+B<sup>®</sup>, Flu OIA<sup>®</sup> et Influenza A/B test<sup>®</sup>. Par comparaison avec la culture cellulaire, leurs performances sont équivalentes pour la détection du virus A, avec une sensibilité et une spécificité satisfaisantes. En revanche, en début d'épidémie ou pour l'isolement du virus B, ces tests sont moins performants. Il existe dans la littérature, un certain nombre de travaux ayant comparé ces tests avec soit la culture cellulaire, soit l'immunofluorescence directe [131–136]. La plupart de ces travaux ont été réalisés sur des échantillons de population comportant à la fois des enfants et des adultes. Les résultats (Tableau 20) montrent

que la sensibilité de ces tests rapides est de l'ordre de 50–60 % avec une spécificité supérieure à 90 %.

### 5.1.2. Recherche de génome viral

Les progrès récents des méthodes du diagnostic moléculaire, telles que la PCR, permettent d'imaginer que la plupart des agents viraux responsables d'infections respiratoires basses puissent être rapidement identifiés. Il importe toutefois de signaler d'emblée que ces techniques, ainsi que l'interprétation des nombreuses études réalisées sur le sujet, ont d'importantes limites. Tout d'abord, il s'agit de techniques complexes qui ne sont disponibles que dans des laboratoires spécialisés. Ainsi, même si elles peuvent potentiellement fournir un résultat rapide en quelques heures, elles ne sont pas d'une disponibilité aisée d'une part et d'autre part, même dans les laboratoires de pointe, elles ne sont pas toujours accessibles 24 heures sur 24. Ensuite, bon nombre d'études ont été réalisées avec des techniques « maison » ce qui rend les résultats parfois difficilement comparables d'un travail à un autre. Enfin, comme toujours, l'absence de « gold standard » diagnostique rend aléatoire les valeurs de sensibilité et de spécificité rapportées [137]. Quoi qu'il en soit, pour certains virus, comme les picornavirus, les hantavirus ou les coronavirus, il n'existe pas de technique d'immunofluorescence directe permettant leur dépistage rapide dans des échantillons cliniques. La PCR apparaît donc comme l'un des seuls moyens de diagnostic rapide.

Un travail réalisé par Johnston et al. [138] a ainsi montré, dans une population essentiellement pédiatrique, que la PCR permettait d'identifier un picornavirus trois fois plus souvent que la culture. Pour les coronavirus, l'émergence du SRAS soulignait l'importance du diagnostic microbiologique rapide. La littérature revue par Murdoch [137] permet de souligner les points suivants. Pendant les deux premières semaines de la maladie, la mise en évidence du virus par PCR est la méthode la plus sensible, tandis que la sérologie devient la méthode privilégiée de détection dans la phase de convalescence. Différentes techniques de PCR ont été mises au point. Le virus peut être détecté au niveau d'échantillons respiratoires supérieurs

Tableau 20  
Comparaison des tests de diagnostic rapide de la grippe avec la culture virale et/ou l'immunofluorescence directe [131–136]

Référence	Test rapide	Technique de référence	Nombre d'échantillons	Population	Nombre de tests positifs			Nombre de tests négatifs	Sensibilité globale (%)	Spécificité globale (%)
					Influenza A	Influenza B	Total			
[131]	FLU OIA	Culture	145	–	–	–	21/44	89/101	48	88
		IFD	145	–	–	–	29/36	105/109	81	96
[132]	FLU OIA	Culture	215	2 mois à	–	–	–	–	46,3	90,8
		IFD	215	83 ans	–	–	–	–	64,4	86,1
[133]	Directigen Flu A+B	Culture	160	93 Enfants 67 Adultes	34/41	17/33	51/74	86/86	68,9	100
[134]	Directigen Flu A+B	Culture	250	200 Enfants Adultes	22/22	28/32	50/54	186/196	92,5	94,9
[135]	Directigen Flu A+B	IFD	152	Adultes	–	–	16/31	121/121	51,6	100
[136]	Now Flu A et Now Flu B	Culture	91	50 Enfants 39 Adultes	16/31	15/28	31/59	28/30	52,5	93,3
[136]	Directigen Flu A+B	Culture	91	50 Enfants 39 Adultes	19/31	14/28	33/59	30/30	55,9	100

IFD : immunofluorescence directe.

ou inférieurs ainsi qu’au niveau des urines ou des selles. Pendant les cinq premiers jours de la maladie, la positivité de la PCR chez les patients qui auront un SRAS sérologiquement prouvé est au niveau de l’expectoration, des aspirations nasopharyngées, des écouvillons de gorge ou de nez, des selles et de l’urine respectivement de 56, 30, 28, 20 et 0 %. Plus tard, l’acide ribonucléique (ARN) viral sera plus facilement détecté au niveau des selles. En optimisant les techniques de PCR, il est possible d’avoir au cours des trois premiers jours de la maladie une sensibilité diagnostique de 80 %. De même, pour le virus de la grippe aviaire, la technique de PCR, réalisée sur des échantillons pharyngés plutôt que nasaux, apparaît comme étant la technique offrant la plus grande sensibilité pour un diagnostic précoce [123].

Pour les virus plus usuels, tels que le VRS, les virus influenza A et B, les virus para-influenzae, le rôle de la PCR peut apparaître d’emblée moins primordial dans la mesure où il existe d’autres techniques de diagnostic rapide. Il n’en est pas moins intéressant. Dès 1992, Paton et al. [139] avaient montré que, par comparaison avec la culture virale et/ou la technique immunoenzymatique, la PCR réalisée sur des échantillons prélevés par aspiration nasopharyngée avait pour le diagnostic des infections respiratoires à VRS de l’enfant une sensibilité de 94,6 % et une spécificité supérieure à 97 %. Chez l’adulte, le diagnostic d’infection à VRS est habituellement difficile. Dans le travail de Falsey et al. [140] portant sur l’analyse de 1112 prélèvements nasaux, la sensibilité et la spécificité diagnostiques de la PCR sont respectivement de 73 et 99 %. Concernant les virus influenza A et B, les données de la littérature [132, 141–145] démontrent que la PCR a des performances diagnostiques proches, voire identiques, à celles de la culture cellulaire (Tableau 21). Ces résultats concernant les performances diagnostiques de la PCR, en cas d’infection respiratoire à VRS ou

virus influenza, sont intéressants. Toutefois, comme il n’existe pas de signes cliniques spécifiques de ces infections virales, on imagine mal les cliniciens demander un seul et unique test diagnostique. De plus, comme il apparaît délicat de demander plusieurs PCR dès lors que seul un diagnostic d’infection virale, sans précision, est évoqué, la technique recherchant un seul virus à la fois a des limites évidentes. Ce dernier point souligne l’intérêt des PCR multiples capables de réaliser un véritable « screening » des virus à tropisme respiratoire les plus usuels.

Divers travaux, comparant une PCR capable de détecter simultanément les principaux virus respiratoires (virus influenza A et B, VRS A et B, virus para-influenza 1, 2, 3, 4) avec la culture virale et/ou l’immunofluorescence directe, ont été publiés [146–148]. Il est assez difficile d’évoquer des chiffres de sensibilité et de spécificité dans la mesure où la PCR détecte généralement plus de virus que les autres techniques (Tableau 22). Soit il s’agit de vrais résultats positifs et on doit alors parler de sensibilité supérieure à celle des autres techniques, soit il s’agit de faux résultats positifs et alors il faut évoquer une faible spécificité. À l’heure actuelle, il semble impossible de trancher en faveur de l’une ou l’autre des deux hypothèses.

5.2. Infections bactériennes

Nous avons largement passé en revue dans les chapitres précédents les divers examens permettant l’isolement des bactéries causales des PAC. Il importe toutefois d’évoquer le rôle que peut ou que pourrait jouer la technique de PCR pour le diagnostic bactériologique de ces infections. Deux revues récentes de la littérature, réalisées par Murdoch [137,149] ont fait le point sur l’intérêt de cette technique pour le diagnostic des

Tableau 21  
Sensibilité et spécificité de la PCR pour le diagnostic des infections à virus influenza A et B [132,141–145]

	Nombre d'échantillons	Population	Virus influenza A		Virus influenza B	
			Sensibilité (%)	Spécificité (%)	Sensibilité (%)	Spécificité (%)
[132]	215	Enfants et adultes	95,4	86,6	92,9	98,5
[141]	342	Enfants	92,6	ND	ND	ND
[142]	81	Enfants	95	98	ND	ND
[143]	150	Enfants et adultes	93	ND	ND	ND
[144]	238	Enfants et adultes	95,3	100	ND	ND
[145]	370	ND	100	91,1	95,7	98,7

ND : non déterminé.

Tableau 22  
Comparaison des PCR virales multiples avec la culture et/ou l’immunofluorescence directe pour le diagnostic des infections virales au cours des PAC [146–148]

Virus	VRS A	VRS B	Inf A	Inf B	PIV1	PIV2	PIV3	PIV4	
PCR/culture [146]									
+/+	41	20	39	ND					
+/-	9	11	10						
-/+	1	0	2						
PCR/culture et/ou IFD [147]									
+/+			1	6	1	0	0	0	ND
+/-			0	7	1	0	0	1	
-/+									
PCR+/culture+ [148]			0	0	0	0	0	0	
	66/58		8/3	2/2	4/2	1/0	3/2	3/0	

Inf A = virus influenza A ; Inf B = virus influenza B ; PIV = virus parainfluenza

infections bactériennes au cours des PAC. Celui-ci semble être double : d'une part, cette technique peut identifier des pathogènes pour lesquels la culture *in vitro* est impossible, insensible, complexe ou longue. D'autre part, elle est indépendante, à l'opposé des cultures, de la viabilité du pathogène causal. La sensibilité ne semble donc pas influencée par une éventuelle antibiothérapie antérieure. Parmi les désavantages et/ou limites actuelles, il faut citer :

- l'absence d'étude possible de la sensibilité du pathogène identifié ;
- la difficulté à évaluer, en l'absence de « gold standard » diagnostique, la sensibilité et de la spécificité de la PCR. Il faut toutefois insister sur les points suivants :
  - la présence dans les échantillons étudiés d'inhibiteurs, dont la nature est souvent inconnue, peut diminuer la sensibilité de la méthode ;
  - à l'inverse, la spécificité de la technique est grandement influencée par son incapacité à différencier contamination, colonisation et infection ;
- l'absence fréquente de PCR commerciales rend la validité des résultats hautement dépendante des techniques utilisées par le laboratoire qui les produit. Cela est à l'origine d'un manque de reproductibilité des résultats, ce qui rend la comparaison interlaboratoire difficile ;
- la sensibilité de la PCR dépend de la nature des échantillons étudiés.

Selon les données actuelles, la PCR pourrait être appliquée pour la recherche de nombreuses bactéries (Tableau 23).

La technique de PCR a ainsi été évaluée pour le diagnostic des PAC dues à *L. pneumophila*, *M. pneumoniae*, *Chlamydia* spp et *Coxiella burnetii*. Bien que cela apparaisse d'emblée moins utile et, en contradiction avec nos propos précédents, la PCR a également été évaluée pour le diagnostic des infections à pneumocoque...

### 5.2.1. Rôle de la PCR pour le diagnostic des infections pneumococques

Un certain nombre de travaux ont été consacrés à l'étude de la technique de PCR pour le diagnostic des PAC à pneumo-

coque. Malheureusement, il est très difficile de savoir quelle peut être la sensibilité ou la spécificité d'une telle technique en raison du manque patent de référence diagnostique. De plus, la spécificité de la pneumolysine dépistée par la PCR ne semble pas absolue. Les gènes codant la pneumolysine ont été retrouvés chez d'autres streptocoques tels que le *S. mitis*. Par conséquent, la spécificité de la technique pourrait être faible. Selon Murdoch [137] la sensibilité de la PCR réalisée sur des échantillons sanguins (sang total, plasma, sérum) serait chez l'adulte comprise entre 29 et 100 %, en prenant pour référence les hémocultures et entre 26 et 88 % si on inclut dans la définition de la pneumonie à pneumocoque les patients avec une expectoration positive à pneumocoque. Peu d'études ont évalué la validité de la PCR au niveau d'échantillons respiratoires. Il est toutefois clair que la PCR, réalisée sur des échantillons issus de l'expectoration ou d'un prélèvement de gorge, est incapable de différencier une infection d'une colonisation. La technique de PCR appliquée au niveau du liquide pleural [150] ou d'un échantillon obtenu par ponction transpariétale [151] serait plus intéressante. Dans le premier cas, les auteurs ont évalué la sensibilité à 78 % et la spécificité à 93 %. Dans le second cas, la sensibilité est de 91,3 % et la spécificité de 83,3 %.

Dans le Tableau 24, sont rapportés quelques résultats d'études significatives [150–155]. Ces données montrent bien que même en se limitant aux PAC avec hémoculture(s) positive(s), la fréquence de positivité de la PCR réalisée sur le sérum varie considérablement d'une étude à l'autre. Quant à l'interprétation des résultats positifs de la PCR chez les patients ayant des cultures négatives, on peut tout autant évoquer une faible spécificité de la méthode qu'une meilleure sensibilité de celle-ci...

### 5.2.2. Rôle de la PCR pour le diagnostic des infections à *L. pneumophila*

Une grande variété de techniques de PCR ont été évaluées pour la recherche des *Legionella* spp. Quand elles sont appliquées sur des échantillons respiratoires, elles apparaissent aussi sensibles voire plus sensibles que la culture. Chez les patients incapables d'expectorer, ce qui est fréquent au cours de la légionellose, le recours à des prélèvements tels que le LBA

Tableau 23  
Agents bactériens pouvant être identifiés par la technique de PCR au cours des PAC [149]

Pathogènes	Cible recherchée par la PCR	Échantillons étudiés	Commentaires
<i>S. pneumoniae</i>	Pneumolysine, autolysine	Expectoration, sérum, plasma, leucocytes, urines, ponction trans-pariétale, prélèvement de gorge	Impossibilité de distinguer colonisation et infection sur les échantillons respiratoires. Sensibilité variable sur les échantillons sanguins
<i>M. pneumoniae</i>	16S rRNA, ATPase opéron, P1adhésion	Expectoration, prélèvement nasopharyngé, prélèvement de gorge, LBA, ponction trans-pariétale	Plus sensible que la culture Prélèvement de gorge = échantillon préféré
<i>Legionella</i> spp.	5S rRNA, 16 S rRNA, <i>mip</i>	Expectoration, LBA, aspiration endotrachéale, sérum, leucocytes, urine, prélèvement de gorge	Au moins aussi sensible que la culture sur les échantillons respiratoires. À évaluer sur les échantillons non respiratoires
<i>C. pneumoniae</i>	16SrRNA, MOMP, 53 kDa protéine, 60 kDa protéine, 16 S-23S spacer rRNA	Expectoration, prélèvement nasopharyngé, prélèvement de gorge, LBA,	Plus sensible que la culture
<i>C. psittaci</i>	MOMP, 16S rRNA, <i>gseA</i>	Expectoration, sang, prélèvement de gorge, tissu pulmonaire	Non évalué

Tableau 24  
 Diagnostic des PAC à pneumocoque par la PCR [150–155]

Études	Milieux de réalisation PCR	Référence	PCR+/référence+	PCR+/référence–
[150]	Liquide pleural	Hémoculture, cultures de l'expectoration ou du liquide pleural ou PCR sur sérum	7/9	3/24
[151]	Produit de ponction trans-pariétale	Hémoculture, cultures liquide pleural ou de ponction trans-pariétale	21/23	11/66
[152]	Sérum	Hémoculture	4/5	34/35
[153]	Sang complet	Hémoculture	8/11	ND
		Hémoculture, cultures de l'expectoration ou de liquide pleural	14/24	14/44
[154]	Sérum	Hémoculture	16/46	0/15
[155]	Plasma	Hémoculture	5/21	ND
		Culture de l'expectoration	2/61	ND
[155]	Expectoration	Hémoculture	14/15	ND
		Culture de l'expectoration	58/59	ND
[155]	Échantillon pharyngé	Hémoculture	17/20	ND
		Culture de l'expectoration	41/58	ND
[155]	Urines	Hémoculture	1/17	ND
		Culture de l'expectoration	2/50	ND

est nécessaire. Les résultats de la PCR sur de tels échantillons sont excellents : Jonas D et al. [156] ont étudié 256 LBA et ont comparé les résultats de la culture avec ceux de la PCR. Dans huit cas, la culture du LBA était positive à *L. pneumophila*. Tous ces patients avaient également une PCR positive. Dans six cas, la PCR sur des LBA provenant de quatre patients était positive alors que la culture était négative. Pour les 242 autres LBA, la culture et la PCR étaient négatives. Les auteurs concluent à la grande sensibilité de la détection dans le LBA de *Legionella* spp. et à sa grande spécificité.

Ces données ont incité les scientifiques à rechercher d'autres milieux où appliquer les techniques de PCR. Malheureusement, les résultats sont décevants. Ainsi, au niveau de l'urine, la sensibilité de la PCR varie entre 30 et 86 %. De même, au niveau du sérum, la sensibilité de la PCR varie entre 30 et 80 %. Les données concernant la sensibilité au niveau d'échantillons provenant de prélèvements de gorge sont actuellement peu nombreuses.

### 5.2.3. Rôle de la PCR pour le diagnostic des infections à *M. pneumoniae*

Les nombreuses études évaluant l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des PAC à *M. pneumoniae* ont été récemment colligées par Daxboeck et al. [44]. Selon ces auteurs, cette technique s'avérerait plus sensible que toutes les autres méthodes diagnostiques. Toutefois, la PCR pourrait poser des problèmes de spécificité. En effet, plusieurs études ont retrouvé un manque de corrélation entre une PCR positive et la réponse immunitaire avec apparition d'anticorps. Bien que cette discordance apparente soit également connue pour la culture et la sérologie [157], elle demande réflexion. Plusieurs explications à cette discordance entre culture ou PCR positives et absence d'anticorps ont été avancées :

- la première correspond au fait que la présence de *M. pneumoniae* au niveau du tractus respiratoire n'est pas obligatoirement associée avec une symptomatologie clinique [46] ;
- la deuxième correspond au fait que la réponse immunitaire est retardée et que la présence de *M. pneumoniae* peut au cours de la maladie précéder l'élévation des anticorps...

Malgré cela, les auteurs considèrent qu'une PCR positive associée avec un tableau clinico-radiologique de PAC doit conduire à instaurer un traitement efficace sur *M. pneumoniae*. Cette technique de PCR peut s'appliquer sur des échantillons issus du tractus respiratoire inférieur mais aussi sur des échantillons provenant d'un écouvillonnage pharyngé. Ce dernier point est tout particulièrement intéressant car il exonère le clinicien des difficultés éventuelles de prélèvement. Avant de considérer cette technique comme étant celle devant faire référence, il convient toutefois de standardiser les protocoles de prélèvements et de comparer les très nombreuses techniques actuellement employées.

### 5.2.4. Rôle de la PCR pour le diagnostic des infections à *Chlamydia* spp. [137]

Bien que la PCR apparaisse pour certains experts au moins aussi sensible que la culture [158], il semble assez difficile de se faire une idée précise de l'intérêt de cette technique pour de nombreuses raisons : les résultats des différentes études sont souvent contradictoires. L'absence de standardisation de la technique rend difficile la comparaison entre les différentes publications. Enfin, l'absence de « gold standard » rend difficile l'évaluation de la sensibilité et de la spécificité.

Le travail de Verkooyen et al. [159] illustre parfaitement ce dernier point. Les auteurs ont étudié 156 patients avec une PAC nécessitant une hospitalisation. La PCR a été réalisée soit sur un prélèvement nasopharyngé, soit sur un prélèvement de gorge soit sur un LBA. Vingt-trois patients avaient une évaluation sérologique compatible avec le diagnostic d'infection à *C. pneumoniae*. Neuf de ces patients avaient une PCR positive. À l'inverse, 22 patients avaient une PCR positive avec une sérologie négative. Bien évidemment, il est difficile de savoir si la PCR est plus sensible que la sérologie ou, à l'inverse, moins spécifique... Enfin, actuellement, il est difficile de savoir quel est le meilleur site de prélèvement pour rechercher par PCR une infection à *C. pneumoniae*.

Signalons enfin qu'il n'existe que peu de données sur l'intérêt de la PCR pour le diagnostic des infections à *Chlamydia psittaci*.

### 5.2.5. Rôle de la PCR pour le diagnostic des infections à *Coxiella burnetii*

Le diagnostic de ces infections repose usuellement sur des techniques sérologiques [160]. L'immunofluorescence est la technique de référence. Il semble toutefois que les techniques de PCR puissent également être appliquées pour le diagnostic de cette infection [161]. Une publication récente [162] suggère même que deux techniques de PCR soient associées (PCR et PCR nichée) pour accroître la sensibilité et la spécificité de la méthode.

### 5.2.6. Rôle des PCR multiples

Comme précédemment avec les virus, avoir à disposition une technique de PCR multiple capable d'identifier à la fois *M. pneumoniae* et/ou *C. pneumoniae* et/ou *L. pneumophila* pourrait être très utile. Quelques études [163–165] portant sur un faible nombre de patients, montrent des résultats intéressants dans la mesure où la technique de PCR apparaît au moins aussi performante que la sérologie en termes de sensibilité (Tableau 25).

### 5.3. Dans le futur

Dans un futur assez proche, la PCR qui est encore une technique d'exception, pourrait devenir un examen incontournable pour le diagnostic rapide des PAC. Deux publications récentes, l'une consacrée aussi bien aux patients ambulatoires qu'aux patients hospitalisés [166] et l'autre consacrée aux patients admis en réanimation pour une PAC sévère [167] laissent entrevoir le rôle que pourraient jouer les techniques de biologie

Tableau 25

Résultats des PCR multiples *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila* comparées avec les données sérologiques [163–165]

Agents pathogènes	<i>M. pneumoniae</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>L. pneumophila</i>
[163]			
PCR+ et sérologie+	9	8	4
PCR+ et sérologie–	0	0	2
PCR– et sérologie+	2	0	1
[164]			
PCR+ et sérologie+	3	1	10
PCR+ et sérologie–	-	-	-
PCR– et sérologie+	4	-	1
[165]			
PCR+ et sérologie+	10	14	8
PCR+ et sérologie–	6	2	4
PCR– et sérologie+	0	1	0

Tableau 26

Amélioration du diagnostic étiologique global des PAC par la technique de PCR [166,167]

Pathogènes identifiés	PAC sévère [167]		PAC ambulatoire ou hospitalisée [166]	
	Diagnostic conventionnel	Diagnostic moléculaire	Diagnostic conventionnel	Diagnostic moléculaire
<i>Legionella</i> spp.	ND	ND	2	6
<i>M. pneumoniae</i>	ND	ND	5	10
Virus influenza A	1	7	8	9
Virus influenza B	0	1	ND	ND
Virus para-influenza	0	2	ND	ND
VRS	0	2	ND	ND
Coronavirus	0	0	0	14
Rhinovirus	ND	ND	2	18
Adenovirus	0	2	ND	ND

moléculaire dans l'amélioration des performances du diagnostic microbiologique des PAC (Tableau 26).

Dans un futur plus éloigné, il faut évoquer le rôle potentiel des techniques de diagnostic par « micropuces ». Ces techniques sont, dans l'absolu, capables de dépister dans le même temps de très nombreux agents pathogènes et d'évaluer l'interaction entre l'hôte et le pathogène [168]. Toutefois, à notre connaissance, il n'existe pas encore actuellement de données précises concernant l'intérêt pratique de ces méthodes en pathologie infectieuse bronchopulmonaire usuelle.

## 6. Exacerbation aiguë des bronchopneumopathies chroniques obstructives (BPCO)

Les agents bactériens et viraux incriminés au cours des exacerbations aiguës de BPCO sont très nombreux. Dans le Tableau 27, quelques résultats d'études récentes ont été rapportés [169–172]. Bien évidemment, ces données sont très loin d'être exhaustives. Leur seul but était de montrer d'une part que tous les pathogènes incriminés au cours des PAC l'ont aussi été au cours des exacerbations aiguës de BPCO et d'autre part que la responsabilité respective des différents pathogènes dépend de la méthode diagnostique utilisée.

Les recommandations récentes de prise en charge émanant de la Société de pneumologie de langue française (SPLF), de l'Afssaps et des sociétés européennes et américaines (ATS/ERS) sont claires et assez unanimes. Le seul examen à visée microbiologique proposé est l'examen cytotabériologique des sécrétions trachéobronchiques. Ses indications et ses modalités de réalisation varient peu d'une recommandation à l'autre :

- en 1997, la SPLF [173] soulignait que les prélèvements microbiologiques bronchiques ne devaient être réalisés qu'en cas de suspicion ou de risque d'infection bronchique à germes résistants aux antibiotiques usuels (malades porteurs de dystrophies bronchiques et/ou en échec d'antibiothérapie probabiliste). Les prélèvements seront alors effectués soit de façon protégée perfibroscopique soit de façon moins fiable par fibroaspiration ou par ECBC ;
- les recommandations de l'Afssaps [1] en juillet 2001 soulignaient que l'examen cytotabériologique de l'expectoration n'est pas recommandé en routine. Cet examen n'est indiqué que dans certaines situations d'échec. Il doit alors comprendre un examen direct avec coloration de Gram et culture ;

Tableau 27  
Agents infectieux incriminés au cours des exacerbations de BPCO [169–172]

	[169]	[170]	[171]	[172]
Techniques employées	Brosse, LBA, AET, sérologie	ECBC	ECBC ou AET	Sérologie
Nombre de patients	50	91	86	240
Pathogènes isolés				
Agents viraux	ND	ND	ND	
Virus influenza A				9,6 %
Virus influenza B				6,3 %
Virus para-influenza				26,6 %
Adénovirus				8,3 %
VRS				6,7 %
Au moins un de ces virus				48,8 %
Agents bactériens				
<i>S. pneumoniae</i>	12 %	16 %	20 %	20 %
<i>H. influenza</i>	32 %	35 %	24 %	4,2 %
<i>M. catarrhalis</i>	12 %	14 %	6 %	3,8 %
Au moins une de ces bactéries	–	–	–	24,2 %
<i>S. aureus</i>	0	0	7 %	–
<i>E. coli</i>	0	12 %	3 %	–
<i>P. mirabilis</i>	3 %	7 %	4 %	–
<i>S. marcescens</i>	3 %	2 %	–	–
<i>E. cloacae</i>	6 %	–	6 %	–
<i>Pseudomonas</i> spp.	26 %	25 %	24 %	–
<i>S. maltophilia</i>	6 %	–	–	–
Agents bactériens « atypiques »	ND	ND	ND	
<i>L. pneumophila</i>				16,7 %
<i>M. pneumoniae</i>				14,2 %
<i>C. burnetii</i>				0,4 %
Au moins une de ces bactéries				30,0 %

ECBC : examen cytotabériologique des expectorations ; AET : aspiration endotrachéale ; LBA : lavage bronchoalvéolaire.

- enfin, en 2004, les experts de l'ATS/ERS [174] proposaient la réalisation d'un ECBC chez tous les patients hospitalisés pour l'épisode d'exacerbation aiguë de BPCO. Pour les patients pris en charge en ambulatoire, cet examen ne sera réalisé que chez les patients ayant eu une antibiothérapie antérieure récente.

## Références

- [1] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : exacerbations de bronchite chronique. 2001.
- [2] Agence française de sécurité Sanitaire des produits de santé. Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : infections respiratoires basses de l'adulte. 2003.
- [3] Reed WW, Byrd GS, Gates Jr. RH, Howard RS, Weaver MJ. Sputum Gram's stain in community-acquired pneumococcal pneumonia. A meta-analysis. *West J Med* 1996;165:197–204.
- [4] Cooper GM, Jones JJ, Arbiqwe JC, Flowerdew GJ, Forward KR. Intra and intertechnologist variability in the quality assessment of respiratory tract specimens. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2000;37:231–5.
- [5] Nagendra S, Bourbeau P, Brecher S, Dunne M, LaRocco M, Doern G. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. *J Clin Microbiol* 2001;39:2344–7.
- [6] Huchon G, Chidiac C, Delaval P, Leophonte P, Mouton Y, Roche N, et al. Conduite à tenir devant une infection respiratoire basse communautaire de l'adulte. *Rev Mal Respir* 1999;16:224–33.
- [7] Marrie TJ, Poulin-Costello M, Beecroft MD, Herman-Gnjidic Z. Etiology of community-acquired pneumonia treated in an ambulatory setting. *Respir Med* 2005;99:60–5.
- [8] Theerthakarai R, El-Halees W, Ismail M, Solis RA, Khan MA. Nonvalue of the initial microbiological studies in the management of nonsevere community-acquired pneumonia. *Chest* 2001;119:181–4.
- [9] Roson B, Carratala J, Verdaguier R, Dorca J, Manresa F, Gudiol F. Prospective study of the usefulness of sputum Gram stain in the initial approach to community-acquired pneumonia requiring hospitalization. *Clin Infect Dis* 2000;31:869–74.
- [10] Garcia-Vazquez E, Marcos MA, Mensa J, de Roux A, Puig J, Font C, et al. Assessment of the usefulness of sputum culture for diagnosis of community-acquired pneumonia using the PORT predictive scoring system. *Arch Intern Med* 2004;164:1807–11.
- [11] Drew WL. Value of sputum culture in diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1977;6:62–5.
- [12] Guzzetta P, Toews GB, Robertson KJ, Pierce AK. Rapid diagnosis of community-acquired bacterial pneumonia. *Am Rev Respir Dis* 1983;128:461–4.
- [13] Gleckman R, DeVita J, Hibert D, Pelletier C, Martin R. Sputum gram stain assessment in community-acquired bacteremic pneumonia. *J Clin Microbiol* 1988;26:846–9.
- [14] Watanakunakorn C, Bailey TA. Adult bacteremic pneumococcal pneumonia in a community teaching hospital, 1992-1996: a detailed analysis of 108 cases. *Arch Intern Med* 1997;157:1965–71.
- [15] Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004;39:165–9.
- [16] Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Ackroyd-Stolarz S, Dickinson G. Utility of blood cultures in the management of adults with community acquired pneumonia discharged from the emergency department. *Emerg Med J* 2003;20:521–3.
- [17] Waterer GW, Wunderink RG. The influence of the severity of community-acquired pneumonia on the usefulness of blood cultures. *Respir Med* 2001;95:78–82.
- [18] Chalasani NP, Valdecanas MA, Gopal AK, McGowan Jr. JE, Jurado RL. Clinical utility of blood cultures in adult patients with community-acquired pneumonia without defined underlying risks. *Chest* 1995;108:932–6.

- [19] Metersky ML, Ma A, Bratzler DW, Houck PM. Predicting bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:342–7.
- [20] Levy M, Dromer F, Brion N, Leturdu F, Carbon C. Community-acquired pneumonia. Importance of initial noninvasive bacteriologic and radiographic investigations. *Chest* 1988;93:43–8.
- [21] Campbell SG, Marrie TJ, Anstey R, Dickinson G, Ackroyd-Stolarz S. The contribution of blood cultures to the clinical management of adult patients admitted to the hospital with community-acquired pneumonia: a prospective observational study. *Chest* 2003;123:1142–50.
- [22] Leroy O, Santre C, Beuscart C, Georges H, Guery B, Jacquier JM, et al. A five-year study of severe community-acquired pneumonia with emphasis on prognosis in patients admitted to an intensive care unit. *Intensive Care Med* 1995;21:24–31.
- [23] Torres A, Serra-Batlles J, Ferrer A, Jimenez P, Celis R, Cobo E, et al. Severe community-acquired pneumonia. Epidemiology and prognostic factors. *Am Rev Respir Dis* 1991;144:312–8.
- [24] Rello J, Bodi M, Mariscal D, Navarro M, Diaz E, Gallego M, et al. Microbiological testing and outcome of patients with severe community-acquired pneumonia. *Chest* 2003;123:174–80.
- [25] Paganin F, Lilienthal F, Bourdin A, Lugagne N, Tixier F, Genin R, et al. Severe community-acquired pneumonia: assessment of microbial aetiology as mortality factor. *Eur Respir J* 2004;24:779–85.
- [26] Moine P, Vercken JB, Chevret S, Chastang C, Gajdos P. Severe community-acquired pneumonia. Etiology, epidemiology, and prognosis factors. French Study Group for Community-Acquired Pneumonia in the Intensive Care Unit. *Chest* 1994;105:1487–95.
- [27] Dominguez J, Gali N, Blanco S, Pedrosa P, Prat C, Matas L, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay in urine samples. *Chest* 2001;119:243–9.
- [28] Murdoch DR, Laing RT, Mills GD, Karalus NC, Town GI, Mirrett S, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in urine samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2001;39:3495–8.
- [29] Gutierrez F, Masia M, Rodriguez JC, Ayelo A, Soldan B, Cebrian L, et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis* 2003;36:286–92.
- [30] Marcos MA, Jimenez de Anta MT, de la Bellacasa JP, Gonzalez J, Martinez E, Garcia E, et al. Rapid urinary antigen test for diagnosis of pneumococcal community-acquired pneumonia in adults. *Eur Respir J* 2003;21:209–14.
- [31] Smith MD, Derrington P, Evans R, Creek M, Morris R, Dance DA, et al. Rapid diagnosis of bacteremic pneumococcal infections in adults by using the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test: a prospective, controlled clinical evaluation. *J Clin Microbiol* 2003;41:2810–3.
- [32] Honoré S, Trillard M, Ould-Hocine Z, Lesprit P, Deforges L, Legrand P. Contribution of urinary pneumococcal antigen detection combined with the research of *Legionella* antigen for diagnosis of pneumonia in hospitalized patients. *Pathol Biol* 2004;52:429–33.
- [33] Dowell SF, Garman RL, Liu G, Levine OS, Yang YH. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2001;32:824–5.
- [34] Hamer DH, Egas J, Estrella B, MacLeod WB, Griffiths JK, Sempertegui F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis* 2002;34:1025–8.
- [35] Murdoch DR, Laing RT, Cook JM. The NOW *S. pneumoniae* urinary antigen test positivity rate 6 weeks after pneumonia onset and among patients with COPD. *Clin Infect Dis* 2003;37:153–4.
- [36] Weiss K, Tillotson GS. The controversy of combination vs monotherapy in the treatment of hospitalized community-acquired pneumonia. *Chest* 2005;128:940–6.
- [37] Pesola GR. The urinary antigen test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Chest* 2001;119:9–11.
- [38] Den Boer JW, Yzerman EPF. Diagnosis of *Legionella* infection in legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23:871–8.
- [39] Waterer GW, Baselski VS, Wunderink RG. *Legionella* and community-acquired pneumonia: a review of current diagnostic tests from a clinician's viewpoint. *Am J Med* 2001;110:41–4.
- [40] Fields BS, Benson RF, Besser RE. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002;15:506–26.
- [41] Jarraud S, Girardo P, Reyrolle M, Forey F, Etienne J. Current biological assessment of Legionellosis. *Med Mal Infect* 2004;34(Suppl 1):7–9.
- [42] Benhamou D, Bru JP, Chidiac C, Etienne J, Léophonte P, Marty N, et al. Société de pneumologie de langue française (SPLF); Société de pathologie Infectieuse de langue française (SPILF); centre national de référence sur les légionelles. Legionnaire's disease: definition, diagnosis and treatment. *Med Mal Infect* 2005;35:1–5.
- [43] Waites KB, Talkington DF. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev* 2004;17:697–728.
- [44] Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:263–73.
- [45] Grayston JT, Foy HM, Kenny C. The epidemiology of mycoplasma infections of the respiratory tract. In: Hayflick L, editor. *The mycoplasmales and L phase of bacteria*. Amsterdam: North Holland; 1969. p. 651–82.
- [46] Gnärpe J, Lundback A, Gnärpe H, Sundelof B. Comparison of nasopharyngeal and throat swabs for the detection of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by polymerase chain reaction. *Scand J Infect Dis* 1997;104(Suppl):11–2.
- [47] Hammerschlag MR. Current status of laboratory diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* and *Chlamydia psittaci*. *Clin Microbiol Newsl* 2001;23:107–11.
- [48] Dowell SF, Peeling RW, Boman J, Carlone GM, Fields BS, Guarner J, et al. *C. pneumoniae* Workshop Participants. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention (USA) and the Laboratory Centre for Disease Control (Canada). *Clin Infect Dis* 2001;33:492–503.
- [49] Sopena N, Sabria-Leal M, Pedro-Botet ML, Padilla E, Dominguez J, Morera J, et al. Comparative study of the clinical presentation of *Legionella pneumoniae* and other community-acquired pneumonias. *Chest* 1998;113:1195–200.
- [50] Blanquer J, Blanquer R, Borrás R, Nauffal D, Morales P, Menendez R, et al. Aetiology of community acquired pneumonia in Valencia, Spain: a multicentre prospective study. *Thorax* 1991;46:508–11.
- [51] Bates JH, Campbell GD, Barron AL, McCracken GA, Morgan PN, Moses EB, et al. Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized patients. *Chest* 1992;101:1005–12.
- [52] Steele TW. Legionnaires' disease in South Australia, 1979–1988. *Med J Aust* 1989;151:322–8.
- [53] Zuravleff JJ, Yu VL, Shonnard JW, Davis BK, Rihs JD. Diagnosis of legionnaires' disease. An update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture. *JAMA* 1983;250:1981–5.
- [54] Saravolatz LD, Russell G, Cvitkovich D. Direct immunofluorescence in the diagnosis of legionnaires' disease. *Chest* 1981;79:566–70.
- [55] Ruf B, Schürmann D, Horbach I, Fehrenbach FJ, Pohle HD. Prevalence and diagnosis of *Legionella pneumoniae*: a 3-year prospective study with emphasis on application of urinary antigen detection. *J Infect Dis* 1990;162:1341–8.
- [56] Plouffe JF, File Jr. TM, Breiman RF, Hackman BA, Salstrom SJ, Marston BJ, et al. Reevaluation of the definition of legionnaires' disease: use of the urinary antigen assay. Community Based Pneumonia Incidence Study Group. *Clin Infect Dis* 1995;20:1286–91.
- [57] Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File Jr. TM, Musher DM, Whitney C. Infectious Diseases Society of America. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis* 2003;37:1405–33.
- [58] Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas EC, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the "gold standard". *J Clin Microbiol* 2005;43:2277–85.
- [59] Scott JAG, Hall AJ. The value and complications of percutaneous trans-thoracic lung aspiration for the etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Chest* 1999;116:1716–32.

- [60] Marquette CH, Tonnel AB. Apport et limites des techniques endoscopiques pour le diagnostic des pneumonies bactériennes communautaires. In: Léoponte P, Mouton Y, editors. Repères sur les infections bronchopulmonaires, 3e Edition. PIL; 2001. p. 161–9.
- [61] Jimenez P, Saldias F, Meneses M, Silva ME, Wilson MG, Oth L. Diagnostic fiberoptic bronchoscopy in patients with community-acquired pneumonia. Comparison between bronchoalveolar lavage and telescoping plugged catheter cultures. *Chest* 1993;103:1023–7.
- [62] Vives L, Biel P, Maler G, Labonne F, Lecoules N, Dufour M, et al. Acute community-acquired pneumonia of moderate and grave severity investigated by bronchoscopy. Analysis of 193 cases hospitalized in a general hospital. *Rev Mal Respir* 1996;13:175–82.
- [63] Rodriguez RM, Fancher ML, Phelps M, Hawkins K, Johnson J, Stacks K, et al. An emergency department-based randomized trial of nonbronchoscopic bronchoalveolar lavage for early pathogen identification in severe community-acquired pneumonia. *Ann Emerg Med* 2001;38:357–63.
- [64] Ortqvist A, Kalin M, Lejdebom L, Lundberg B. Diagnostic fiberoptic bronchoscopy and protected brush culture in patients with community-acquired pneumonia. *Chest* 1990;97:576–82.
- [65] Feinsilver SH, Fein AM, Niederman MS, Schultz DE, Faegenburg DH. Utility of fiberoptic bronchoscopy in nonresolving pneumonia. *Chest* 1990;98:1322–6.
- [66] Arancibia F, Ewig S, Martinez JA, Ruiz M, Bauer T, Marcos MA, et al. Antimicrobial treatment failures in patients with community-acquired pneumonia: causes and prognostic implications. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:154–60.
- [67] El-Solh AA, Aquilina AT, Dhillon RS, Ramadan F, Nowak P, Davies J. Impact of invasive strategy on management of antimicrobial treatment failure in institutionalized older people with severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166:1038–43.
- [68] Woodhead M. Community-acquired pneumonia in Europe: causative pathogens and resistance patterns. *Eur Respir J* 2002;36(Suppl):20–7.
- [69] Wattanatham A, Chaoprasong C, Nunthapisud P, Chantaratchada S, Limpairojn N, Jatakanon A, et al. Community-acquired pneumonia in southeast Asia: the microbial differences between ambulatory and hospitalized patients. *Chest* 2003;123:1512–9.
- [70] Ruiz M, Ewig S, Marcos MA, Martinez JA, Arancibia F, Mensa J, et al. Etiology of community-acquired pneumonia: impact of age, comorbidity, and severity. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:397–405.
- [71] Ruiz M, Ewig S, Torres A, Arancibia F, Marco F, Mensa J, et al. Severe community-acquired pneumonia. Risk factors and follow-up epidemiology. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:923–9.
- [72] Roson B, Carratala J, Dorca J, Casanova A, Manresa F, Gudiol F. Etiology, reasons for hospitalization, risk classes, and outcomes of community-acquired pneumonia in patients hospitalized on the basis of conventional admission criteria. *Clin Infect Dis* 2001;33:158–65.
- [73] Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Recommandations de bonne pratique. Antibiothérapie par voie générale en pratique courante : infections ORL et respiratoires basses. Mise à jour. 1999.
- [74] Marrie TJ, Peeling RW, Reid T, De Carolis E, Canadian Community-Acquired Pneumonia Investigators. Chlamydia species as a cause of community-acquired pneumonia in Canada. *Eur Respir J* 2003;21:779–84.
- [75] Socan M, Kosmelj K, Marinic-Fiser N, Vidmar L. A prediction model for community-acquired *Chlamydia pneumoniae* pneumonia in hospitalized patients. *Infection* 2004;32:204–9.
- [76] Sopena N, Pedro-Botet ML, Sabria M, Garcia-Pares D, Reynaga E, Garcia-Nunez M. Comparative study of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila* or *Chlamydia pneumoniae*. *Scand J Infect Dis* 2004;36:330–4.
- [77] de Roux A, Marcos MA, Garcia E, Mensa J, Ewig S, Lode H, et al. Viral community-acquired pneumonia in nonimmunocompromised adults. *Chest* 2004;125:1343–51.
- [78] Janssens JP, Krause KH. Pneumonia in the very old. *Lancet Infect Dis* 2004;4:112–24.
- [79] Muder RR. Pneumonia in residents of long-term care facilities: epidemiology, etiology, management, and prevention. *Am J Med* 1998;105:319–30.
- [80] Fein AM. Pneumonia in the elderly: overview of diagnostic and therapeutic approaches. *Clin Infect Dis* 1999;28:726–9.
- [81] Marrie TJ. Community-acquired pneumonia in the elderly. *Clin Infect Dis* 2000;31:1066–78.
- [82] Mylotte JM. Nursing home-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2002;35:1205–11.
- [83] Loeb M. Pneumonia in older persons. *Clin Infect Dis* 2003;37:1335–9.
- [84] Kaplan V, Angus DC, Griffin MF, Clermont G, Scott Watson R, Linde-Zwirble WT. Hospitalized community-acquired pneumonia in the elderly: age—and sex-related patterns of care and outcome in the United States. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:766–72.
- [85] Lim WS, Macfarlane JT, Boswell TC, Harrison TG, Rose D, Leinonen M, et al. Study of community acquired pneumonia aetiology (SCAPA) in adults admitted to hospital: implications for management guidelines. *Thorax* 2001;56:296–301.
- [86] Leroy O, Bosquet C, Vandebussche C, Coffinier C, Georges H, Guery B, et al. Community-acquired pneumonia in the intensive care unit: epidemiological and prognosis data in older people. *J Am Geriatr Soc* 1999;47:539–46.
- [87] Lim WS, Macfarlane JT. A prospective comparison of nursing home acquired pneumonia with community acquired pneumonia. *Eur Respir J* 2001;18:362–8.
- [88] El-Solh AA, Sikka P, Ramadan F, Davies J. Etiology of severe pneumonia in the very elderly. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:645–51.
- [89] Niederman MS, Mandell LA, Anzueto A, Bass JB, Broughton WA, Campbell GD, et al. American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with community-acquired pneumonia. Diagnosis, assessment of severity, antimicrobial therapy, and prevention. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1730–54.
- [90] British Thoracic Society Standards of Care Committee. BTS Guidelines for the Management of Community Acquired Pneumonia in Adults. *Thorax* 2001;56(Suppl 4):1–64.
- [91] Bartlett JG, Dowell SF, Mandell LA, File Jr. TM, Musher DM, Fine MJ. Practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in adults. Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2000;31:347–82.
- [92] Balaguera HU, Mir J, Craven DE. Nosocomial or healthcare facility-related pneumonia in adults. *Curr Infect Dis Rep* 2000;2:215–23.
- [93] El Solh AA, Pietrantonio C, Bhat A, Bhora M, Berbari E. Indicators of potentially drug-resistant bacteria in severe nursing home-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2004;39:474–80.
- [94] Lidman C, Burman LG, Lagergren A, Ortqvist A. Limited value of routine microbiological diagnostics in patients hospitalized for community-acquired pneumonia. *Scand J Infect Dis* 2002;34:873–9.
- [95] Van der Eerden MM, Vlasploder F, de Graaff CS, Groot T, Bronsveld W, Jansen HM, et al. Comparison between pathogen directed antibiotic treatment and empirical broad spectrum antibiotic treatment in patients with community acquired pneumonia: a prospective randomised study. *Thorax* 2005;60:672–8.
- [96] Sanyal S, Smith PR, Saha AC, Gupta S, Berkowitz L, Homel P. Initial microbiologic studies did not affect outcome in adults hospitalized with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:346–8.
- [97] Roson B, Carratala J, Fernandez-Sabe N, Tubau F, Manresa F, Gudiol F. Causes and factors associated with early failure in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 2004;164:502–8.
- [98] Yu VL, Chiou CC, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, Morris AJ, et al. International Pneumococcal Study Group. An international prospective study of pneumococcal bacteremia: correlation with in vitro resistance, antibiotics administered, and clinical outcome. *Clin Infect Dis* 2003;37:230–7.
- [99] Lujan M, Gallego M, Fontanals D, Mariscal D, Rello J. Prospective observational study of bacteremic pneumococcal pneumonia: Effect of discordant therapy on mortality. *Crit Care Med* 2004;32:625–31.
- [100] Meehan TP, Fine MJ, Krumholz HM, Scinto JD, Galusha DH, Mockalis JT, et al. Quality of care, process, and outcomes in elderly patients with pneumonia. *JAMA* 1997;278:2080–4.

- [101] Houck PM, Bratzler DW, Nsa W, Ma A, Bartlett JG. Timing of antibiotic administration and outcomes for Medicare patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Arch Intern Med* 2004;164:637–44.
- [102] Oosterheert JJ, Bonten MJ, Hak E, Schneider MM, Hoepelman IM. How good is the evidence for the recommended empirical antimicrobial treatment of patients hospitalized because of community-acquired pneumonia? A systematic review. *J Antimicrob Chemother* 2003;52:555–63.
- [103] Gleason PP, Meehan TP, Fine JM, Galusha DH, Fine MJ. Associations between initial antimicrobial therapy and medical outcomes for hospitalized elderly patients with pneumonia. *Arch Intern Med* 1999;159:2562–72.
- [104] Brown RB, Iannini P, Gross P, Kunkel M. Impact of initial antibiotic choice on clinical outcomes in community-acquired pneumonia: analysis of a hospital claims-made database. *Chest* 2003;123:1503–11.
- [105] Marrie TJ, Wu L. Factors influencing in-hospital mortality in community-acquired pneumonia. A prospective study of patients not initially admitted to the ICU. *Chest* 2005;127:1260–70.
- [106] Waterer GW, Somes GW, Wunderink RG. Monotherapy may be suboptimal for severe bacteremic pneumococcal pneumonia. *Arch Intern Med* 2001;161:1837–42.
- [107] Martinez JA, Horcajada JP, Almela M, Marco F, Soriano A, Garcia E, et al. Addition of a macrolide to a  $\beta$ -lactam-based empirical antibiotic regimen is associated with lower in-hospital mortality for patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003;36:389–95.
- [108] Baddour LM, Yu VL, Klugman KP, Feldman C, Ortqvist A, Rello J, et al. International Pneumococcal Study Group. Combination antibiotic therapy lowers mortality among severely ill patients with pneumococcal bacteremia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:440–4.
- [109] Ewig S, Bauer T, Hasper E, Marklein G, Kubini R, Luderitz B. Value of routine microbial investigation in community-acquired pneumonia treated in a tertiary care centre. *Respiration (Herrlisheim)* 1996;63:164–9.
- [110] Ewig S, Schlochtermeyer M, Goke N, Niederman MS. Applying sputum as a diagnostic tool in pneumonia: limited yield, minimal impact on treatment decisions. *Chest* 2002;121:1486–92.
- [111] Waterer GW, Jennings SG, Wunderink RG. The impact of blood cultures on antibiotic therapy in pneumococcal pneumonia. *Chest* 1999;116:1278–81.
- [112] Mandell LA, Bartlett JG, Dowell SF, File Jr. TM, Musher DM, Whitney C. Infectious Diseases Society of America. Update of practice guidelines for the management of community-acquired pneumonia in immunocompetent adults. *Clin Infect Dis* 2003;37:1405–33.
- [113] Macfarlane JT, Boldy D. 2004 update of BTS pneumonia guidelines: what's new? *Thorax* 2004;59:364–6.
- [114] Mackie PL. The classification of viruses infecting the respiratory tract. *Paediatr Respir Rev* 2003;4:84–90.
- [115] Louie JK, Hacker JK, Gonzales R, Mark J, Maselli JH, Yagi S, et al. Characterization of viral agents causing acute respiratory infection in a San Francisco University Medical Center Clinic during the influenza season. *Clin Infect Dis* 2005;41:822–8.
- [116] Han LL, Alexander JP, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus pneumonia among the elderly: an assessment of disease burden. *J Infect Dis* 1999;179:25–30.
- [117] Falsey AR, Walsh EE, Hayden FG. Rhinovirus and coronavirus infection-associated hospitalizations among older adults. *J Infect Dis* 2002;185:1338–41.
- [118] Frangides CY, Pneumatikos I. Varicella-zoster virus pneumonia in adults: report of 14 cases and review of the literature. *Eur J Intern Med* 2004;15:364–70.
- [119] Falsey AR, Hennessey PA, Formica MA, Cox C, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N Engl J Med* 2005;352:1749–59.
- [120] Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330–4.
- [121] Peiris JS, Lai ST, Poon LL, Guan Y, Yam LY, Lim W, et al. SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 2003;361:1319–25.
- [122] Hamelin ME, Cote S, Laforge J, Lampron N, Bourbeau J, Weiss K, et al. Human metapneumovirus infection in adults with community-acquired pneumonia and exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Infect Dis* 2005;41:498–502.
- [123] The Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med* 2005;353:1374–85.
- [124] Snell NJ. New treatments for viral respiratory tract infections—opportunities and problems. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:251–9.
- [125] Barenfanger J, Drake C, Leon N, Mueller T, Trout T. Clinical and financial benefits of rapid detection of respiratory viruses: an outcomes study. *J Clin Microbiol* 2000;38:2824–8.
- [126] Reina J, Munar M, Blanco I. Evaluation of a direct immunofluorescence assay, dot-blot enzyme immunoassay, and shell vial culture in the diagnosis of lower respiratory tract infections caused by influenza A virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;25:143–5.
- [127] Doing KM, Jerkofsky MA, Dow EG, Jellison JA. Use of fluorescent-antibody staining of cytocentrifuge-prepared smears in combination with cell culture for direct detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 1998;36:2112–4.
- [128] Landry ML, Ferguson D. Simultaneous respiratory screen for rapid detection of multiple respiratory viruses in clinical specimens by immunofluorescence staining. *J Clin Microbiol* 2000;38:708–11.
- [129] Dunn JJ, Woolstenhulme RD, Langer J, Carroll KC. Sensitivity of respiratory virus culture when screening with R-mix fresh cells. *J Clin Microbiol* 2004;42:79–82.
- [130] Ribes JA, Seabolt JP, Overman SB. Performance characteristics of VIDAS and directigen respiratory syncytial virus (RSV) antigen detection assays and culture for the identification of RSV in respiratory specimens. *J Clin Microbiol* 2002;40:1818–20.
- [131] Hindiyeh M, Goulding C, Morgan H, Kenyon B, Langer J, Fox L, et al. Evaluation of BioStar FLU OIA assay for rapid detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2000;17:119–26.
- [132] Heermann B, Larsson C, Zwegyberg BW. Simultaneous detection and typing of influenza viruses A and B by a nested reverse transcription-PCR: comparison to virus isolation and antigen detection by immunofluorescence and optical immunoassay (FLU OIA). *J Clin Microbiol* 2001;39:134–8.
- [133] Reina J, Padilla E, Alonso F, Ruiz De Gopegui E, Munar M, Mari M. Evaluation of a new dot blot enzyme immunoassay (directigen flu A+B) for simultaneous and differential detection of influenza A and B virus antigens from respiratory samples. *J Clin Microbiol* 2002;40:3515–7.
- [134] Chan KH, Maldeis N, Pope W, Yup A, Ozinskas A, Gill J, et al. Evaluation of the Directigen Flu A+B test for rapid diagnosis of influenza virus type A and B infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:1675–80.
- [135] Landry ML, Ferguson D. Suboptimal detection of influenza virus in adults by the Directigen Flu A+B enzyme immunoassay and correlation of results with the number of antigen-positive cells detected by cytoplasmic immunofluorescence. *J Clin Microbiol* 2003;41:3407–9.
- [136] Landry ML, Cohen S, Ferguson D. Comparison of Binax NOW<sup>®</sup> and Directigen for rapid detection of influenza A and B. *J Clin Virol* 2004;31:113–5.
- [137] Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *APMIS* 2004;112:713–27.
- [138] Johnston SL, Sanderson G, Pattemore PK, Smith S, Bardin PG, Bruce CB, et al. Use of polymerase chain reaction for diagnosis of picornavirus infection in subjects with and without respiratory symptoms. *J Clin Microbiol* 1993;31:1111–7.
- [139] Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harris RJ. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *J Clin Microbiol* 1992;30:901–4.
- [140] Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection: Comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *J Clin Microbiol* 2002;40:817–20.
- [141] Claas EC, van Milaan AJ, Sprenger MJ, Ruiten-Stuiver M, Arron GI, Rothbarth PH, et al. Prospective application of reverse transcriptase polymerase chain reaction for diagnosing influenza infections in respi-

- ratory samples from a children's hospital. *J Clin Microbiol* 1993;31:2218–21.
- [142] Atmar RL, Baxter BD, Dominguez EA, Taber LH. Comparison of reverse transcription-PCR with tissue culture and other rapid diagnostic assays for detection of type A influenza virus. *J Clin Microbiol* 1996;34:2604–6.
- [143] Steininger C, Kundi M, Aberle SW, Aberle JH, Popow-Kraupp T. Effectiveness of reverse transcription-PCR, virus isolation, and enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of influenza A virus infection in different age groups. *J Clin Microbiol* 2002;40:2051–6.
- [144] Habib-Bein NF, Beckwith 3rd WH, Mayo D, Landry ML. Comparison of SmartCycler real-time reverse transcription-PCR assay in a public health laboratory with direct immunofluorescence and cell culture assays in a medical center for detection of influenza A virus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3597–601.
- [145] Hindiyeh M, Levy V, Azar R, Varsano N, Regev L, Shalev Y, et al. Evaluation of a multiplex real-time reverse transcriptase PCR assay for detection and differentiation of influenza viruses A and B during the 2001–2002 influenza season in Israel. *J Clin Microbiol* 2005;43:589–95.
- [146] Kehl SC, Henrickson KJ, Hua W, Fan J. Evaluation of the Hexaplex assay for detection of respiratory viruses in children. *J Clin Microbiol* 2001;39:1696–701.
- [147] Liolios L, Jenney A, Spelman D, Kotsimbos T, Catton M, Wesselingh S. Comparison of a multiplex reverse transcription-PCR-enzyme hybridization assay with conventional viral culture and immunofluorescence techniques for the detection of seven viral respiratory pathogens. *J Clin Microbiol* 2001;39:2779–83.
- [148] Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564–9.
- [149] Murdoch DR. Nucleic acid amplification tests for the diagnosis of pneumonia. *Clin Infect Dis* 2003;36:1162–70.
- [150] Falguera M, Lopez A, Nogues A, Porcel JM, Rubio-Caballero M. Evaluation of the polymerase chain reaction method for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in pleural fluid samples. *Chest* 2002;122:2212–6.
- [151] Garcia A, Roson B, Perez JL, Verdaguer R, Dorca J, Carratala J, et al. Usefulness of PCR and antigen latex agglutination test with samples obtained by transthoracic needle aspiration for diagnosis of pneumococcal pneumonia. *J Clin Microbiol* 1999;37:709–14.
- [152] Menendez R, Cordoba J, de La Cuadra P, Cremades MJ, Lopez-Hontagas JL, Salavert M, et al. Value of the polymerase chain reaction assay in noninvasive respiratory samples for diagnosis of community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1868–73.
- [153] Lorente ML, Falguera M, Nogues A, Gonzalez AR, Merino MT, Caballero MR. Diagnosis of pneumococcal pneumonia by polymerase chain reaction (PCR) in whole blood: a prospective clinical study. *Thorax* 2000;55:133–7.
- [154] Dominguez J, Gali N, Matas L, Pedroso P, Blanco S, Gimenez M, et al. PCR detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in serum samples for pneumococcal pneumonia diagnosis. *Clin Microbiol Infect* 2001;7:164–6.
- [155] Murdoch DR, Anderson TP, Beynon KA, Chua A, Fleming AM, Laing RT, et al. Evaluation of a PCR assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* in respiratory and nonrespiratory samples from adults with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2003;41:63–6.
- [156] Jonas D, Rosenbaum A, Weyrich S, Bhakdi S. Enzyme-linked immunoassay for detection of PCR-amplified DNA of legionellae in bronchoalveolar fluid. *J Clin Microbiol* 1995;33:1247–52.
- [157] Kenny GE, Kaiser GG, Cooney MK, Foy HM. Diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia: sensitivities and specificities of serology with lipid antigen and isolation of the organism on soy peptone medium for identification of infections. *J Clin Microbiol* 1990;28:2087–93.
- [158] Boman J, Gaydos CA, Quinn TC. Molecular diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 1999;37:3791–9.
- [159] Verkooyen RP, Willemse D, Hiep-van Casteren SC, Joulandan SA, Snijder RJ, van den Bosch JM, et al. Evaluation of PCR, culture, and serology for diagnosis of *Chlamydia pneumoniae* respiratory infections. *J Clin Microbiol* 1998;36:2301–7.
- [160] La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol* 1997;35:2715–27.
- [161] Fenollar F, Raoult D. Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. *APMIS* 2004;112:785–807.
- [162] Ogawa M, Setiyono A, Sato K, Cai Y, Shiga S, Kishimoto T. Evaluation of PCR and nested PCR assays currently used for detection of *Coxiella burnetii* in Japan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2004;35:852–5.
- [163] Tong CY, Donnelly C, Harvey G, Sillis M. Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Chlamydia psittaci* in respiratory samples. *J Clin Pathol* 1999;52:257–63.
- [164] Welti M, Jatton K, Altwegg M, Sahli R, Wenger A, Bille J. Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* and *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract secretions. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003;45:85–95.
- [165] Miyashita N, Saito A, Kohno S, Yamaguchi K, Watanabe A, Oda H, et al. CAP Study Group. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. *Respir Med* 2004;98:542–50.
- [166] Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden WC, Graffelman AW, van den Broek PJ, Claas EC. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 2005;41:345–51.
- [167] Legoff J, Guerot E, Ndjoyi-Mbiguino A, Matta M, Si-Mohamed A, Gutmann L, et al. High prevalence of respiratory viral infections in patients hospitalized in an intensive care unit for acute respiratory infections as detected by nucleic acid-based assays. *J Clin Microbiol* 2005;43:455–7.
- [168] Bryant PA, Venter D, Robins-Browne R, Curtis N. Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 2004;4:100–11.
- [169] Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M, et al. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:1498–505.
- [170] Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. Study Group of Bacterial Infection in COPD. *Chest* 1999;116:40–6.
- [171] Ferrer M, Ioanas M, Arancibia F, Marco MA, de la Bellacasa JP, Torres A. Microbial airway colonization is associated with noninvasive ventilation failure in exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease. *Crit Care Med* 2005;33:2003–9.
- [172] Lieberman D, Lieberman D, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Hoffman S, Ohana B, et al. Infectious etiologies in acute exacerbation of COPD. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2001;40:95–102.
- [173] Société de pneumologie de langue française. Recommandations pour la prise en charge des bronchopneumopathies chroniques obstructives. *Rev Mal Respir* 1997;14(Suppl 2):1–92.
- [174] Celli BR, MacNee W, ATS/ERS Task Force. Standards for the diagnosis and treatment of patients with COPD: a summary of the ATS/ERS position paper. *Eur Respir J* 2004;23:932–46.