



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.



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com



SÉRIE « MICROBIOLOGIE ET PATHOLOGIE RESPIRATOIRE INFECTIEUSE »
Coordonnée par C. Godet et C. Girault

Description et place des techniques bactériologiques dans la prise en charge des infections pulmonaires



Description and role of bacteriological techniques in the management of lung infections

S. Dahyot*, L. Lemee, M. Pestel-Caron

UNIROUEN, GRAM EA2656, laboratoire de bactériologie, CHU de Rouen, Normandie université, 76000 Rouen, France

Reçu le 1^{er} mars 2016 ; accepté le 28 juillet 2016
Disponible sur Internet le 5 juillet 2017

MOTS CLÉS

Diagnostic
bactériologique ;
Pneumopathie ;
Prélèvements
respiratoires ;
Sérologie ;
PCR

Résumé Les pneumopathies aiguës recouvrent des contextes cliniques variés et les étiologies bactériennes impliquées le sont tout autant. Aucun outil microbiologique n'est 100 % sensible ni 100 % spécifique et malgré les investigations, plus de 30 % des pneumopathies restent sans étiologie identifiée. Si aucun prélèvement n'est indiqué pour les patients traités en ambulatoire, les prélèvements respiratoires non invasifs sont à privilégier pour les pneumopathies aiguës hospitalisées (communautaires ou associées aux soins), tandis que les prélèvements invasifs sont indiqués en seconde ligne pour les pneumopathies aiguës communautaires en réanimation, et en première ligne pour les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé. La culture microbiologique garde une place importante, à condition que le malade soit prélevé avant instauration de l'antibiothérapie. Certains contextes peuvent justifier le recours aux hémocultures, à la recherche d'antigènes urinaires ou aux sérologies. Les PCR rendent déjà service au quotidien mais l'avenir à court terme appartient probablement aux panels moléculaires multiplex capables de détecter de nombreux micro-organismes en quelques heures, surtout dans les pneumopathies communautaires sévères de réanimation et les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé. Le séquençage nucléotidique haut débit révolutionnera bientôt le diagnostic microbiologique, en pneumologie comme dans les autres domaines de l'infectiologie.

© 2017 SPLF. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Sandrine.Dahyot@chu-rouen.fr (S. Dahyot).

KEYWORDS

Microbiological diagnosis;
Pneumonia;
Respiratory sampling;
Diagnostic serology;
PCR

Summary Acute pneumonias occur in a variety of clinical settings and accurate identification of bacterial causes is extremely important. No microbiological tool is either 100 % sensitive or 100 % specific, and despite investigations, aetiology remains unanswered in more than 30 % of pneumonia. No sample may be necessary for patients treated as outpatients, non invasive respiratory specimens are preferred in hospitalised individuals (community or healthcare associated), while invasive specimens are used as second line for community acquired pneumonia (CAP) in intensive care, and in the first line where pneumonia occurs in immunosuppressed patients. Bacterial cultures have an important place, if the sample is taken before the introduction of antibiotic therapy. Some contexts may justify the use of blood cultures, testing for urinary antigens or serology. PCR is already becoming available as a daily service but the short-term future probably belongs to molecular multiplex panels capable of detecting many microorganisms within hours, especially in severe CAP resuscitation and in pneumonia in the immunosuppressed. High-throughput sequencing nucleotide techniques will soon revolutionize microbiological diagnosis in respiratory medicine, as in other areas of infectious diseases.

© 2017 SPLF. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Introduction

Les infections bronchopulmonaires sont des infections fréquentes, qui touchent tous les terrains et que l'on peut classer en différentes catégories :

- les pneumopathies aiguës communautaires (PAC), survenant en milieu extra-hospitalier ou dans les 48 premières heures d'un séjour hospitalier : pneumopathie franche lobaire aiguë (PFLA), pneumopathie « atypique » ;
- les pneumopathies associées aux soins/nosocomiales, constituées à 80 % de pneumonies aiguës acquises sous ventilation mécanique (PAVM) [1] ;
- les pneumopathies aiguës du sujet immunodéprimé.

Les pneumopathies aiguës sont définies comme une atteinte infectieuse du parenchyme pulmonaire. L'incidence des PAC est estimée à environ 600 000 cas par an en France, dont 15 % sont hospitalisés [2]. Les PAC sont potentiellement graves et peuvent engager le pronostic vital. Les pneumopathies associées aux soins représentent la deuxième cause des infections hospitalières et la première cause en termes de mortalité. Ce sont des pathologies fréquentes (8 à 28 % des malades sous ventilateur) [1] et graves (24 à 50 % de mortalité) [3].

Les microorganismes responsables de ces infections sont variés : bactéries, virus ou champignons. L'étiologie bactérienne des pneumopathies est variable en fonction du contexte communautaire ou nosocomial, de l'âge et du terrain du patient (immunodépression). Les PAC ont comme principales étiologies *Streptococcus pneumoniae* ou pneumocoque (responsable de près de la moitié des PFLA), *Haemophilus influenzae*, les germes intracellulaires agents des pneumopathies dites « atypiques » (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*), *Moraxella catarrhalis* et *Staphylococcus aureus* (notamment dans un contexte de grippe) [4]. Les bactéries anaérobies strictes peuvent être retrouvées au cours des pneumopathies d'inhalation (coma, fausse route...).

Les étiologies des PAVM varient selon le caractère précoce de leur survenue (< 5 jours d'intubation) ou tardif (> 5 jours). Elles sont plus volontiers dues à *Staphylococcus aureus* et

à des bacilles à gram négatif (entérobactéries [*Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp., etc.], *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*...). Les espèces isolées au cours des PAVM tardives sont plus fréquemment résistantes aux antibiotiques [1,5].

Les étiologies des pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé diffèrent selon le type de déficit immunitaire, humoral (germes capsulés tels *S. pneumoniae* et *H. influenzae*) ou cellulaire (mycobactéries, *Nocardia* sp., etc.) [6].

Le diagnostic de pneumopathie aiguë repose sur un faisceau d'arguments : cliniques (toux, dyspnée, douleur thoracique, fièvre, râles crépitants à l'auscultation...), radiologiques (images lobaires, infiltrat interstitiel...) et microbiologiques. La mise en évidence du pathogène peut être faite directement au niveau de l'arbre respiratoire, ou grâce à des prélèvements tels que l'hémoculture, l'antigénurie ou la sérologie. Les stratégies diagnostiques varient selon le type de pneumopathie.

- Les principales bactéries responsables de pneumopathies aiguës communautaires (PAC) sont *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, les germes intracellulaires des pneumopathies « atypiques » (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia psittaci*, *Coxiella burnetii*), *Moraxella catarrhalis* et *Staphylococcus aureus* ;
- Les pneumopathies aiguës sous ventilation mécanique (PAVM) sont plus volontiers dues à *Staphylococcus aureus* et à des bacilles à gram négatif, les germes isolés au cours des PAVM tardives étant souvent résistants aux antibiotiques ;
- Chez l'immunodéprimé, les germes varient selon le type de déficit immunitaire, humoral (germes capsulés tels *S. pneumoniae* et *H. influenzae*) ou cellulaire (mycobactéries, *Nocardia* sp., etc.).

Les prélèvements pour culture classique

Les prélèvements bronchopulmonaires

L'écueil majeur des prélèvements des voies respiratoires basses en bactériologie est la contamination par la flore oropharyngée. Ainsi, une attention extrême doit être portée aux conditions de recueil de ces prélèvements afin de minimiser la contamination salivaire (qui risque de diluer la flore pathogène et de la contaminer par des bactéries commensales) et une culture quantitative doit être effectuée. La recherche de certaines bactéries ne s'effectue que sur demande spécifique du clinicien du fait de la nécessité d'une culture prolongée sur milieu spécifique (*L. pneumophila*, *Nocardia* sp., *Mycobacterium tuberculosis*) ou d'une recherche par biologie moléculaire (*C. pneumoniae*, *M. pneumoniae*).

Le recueil des prélèvements respiratoires s'effectue dans un récipient stérile, acheminé rapidement au laboratoire (idéalement en moins de 2 heures), afin d'éviter la prolifération des bactéries de la flore commensale et la diminution de viabilité du pneumocoque [7]. Idéalement, ce recueil s'effectue avant tout traitement antibiotique.

- Certaines bactéries ne sont recherchées que sur demande spécifique du clinicien : *L. pneumophila*, *Nocardia* sp., *Mycobacterium tuberculosis*. La recherche par biologie moléculaire concerne *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae*.
- Pour tous les prélèvements bronchopulmonaires, le résultat de la coloration de gram est rapide et sa valeur prédictive positive est bonne, mais sa sensibilité dépasse difficilement 50 %, notamment pour le pneumocoque.
- Les résultats de la culture sont disponibles en 24 à 48 h pour les principales espèces bactériennes, sauf pour *Legionella* sp., *Nocardia* sp., actinomycètes et mycobactéries, qui nécessitent des délais d'incubation prolongés.

Les prélèvements non protégés

Examen cytobactériologique des crachats

L'examen cytobactériologique des crachats (ECBC) présente l'avantage d'être non invasif, mais il reste cependant rarement contributif et source d'erreur, sa facilité d'exécution entraînant dans plus de 50 % des cas un prélèvement contaminé par la salive [7]. Afin d'éviter cette contamination, il doit être réalisé le matin au réveil, après un rinçage buccodentaire à l'eau distillée stérile et lors d'un effort de toux (aidé au besoin d'une kinésithérapie).

Avant ensemencement, un examen microscopique est effectué après coloration de May-Grünwald-Giemsa afin d'évaluer le nombre de cellules épithéliales et de leucocytes par champ microscopique au faible grossissement. D'après les critères de Bartlett, Murray et Washington, un prélèvement optimal doit contenir moins de 10 cellules épithéliales et plus de 25 polynucléaires par champ [7]. Un prélèvement contenant plus de 25 cellules épithéliales par champ est considéré comme contaminé par la salive et ne sera donc pas ensemencé. Il est à noter que ces critères ne doivent

pas être pris en compte pour le diagnostic des infections à *Legionella* sp. et à mycobactéries.

La deuxième étape est l'examen direct après coloration de gram afin de distinguer les flores mixtes des flores monomorphes, sachant que la présence de bactéries à l'intérieur des polynucléaires constitue un critère d'infection. L'ensemencement s'effectue ensuite de manière quantitative après fluidification du prélèvement et dilutions, et les milieux de cultures sont incubés 48 heures. Le seuil de significativité est de 10^7 UFC/mL [7].

L'interprétation de l'ECBC reste cependant délicate. En effet, certaines bactéries sont considérées comme d'origine salivaire et ne doivent généralement pas être prises en compte : streptocoques commensaux (*viridans*), staphylocoques à coagulase négative, *Neisseria* commensales, *Haemophilus non influenzae*. D'autres espèces comme *S. pneumoniae*, *H. influenzae* et *S. aureus* peuvent être responsables d'infections pleuropulmonaires mais peuvent également être présentes à l'état commensal dans l'oropharynx. En revanche, la mise en évidence de pathogènes obligatoires comme *L. pneumophila* ou *M. tuberculosis* signe le diagnostic car il n'existe pas de portage de ces bactéries. Ainsi, l'interprétation du résultat final tiendra compte du nombre de cellules épithéliales et de polynucléaires, de la coloration de gram et de la culture au seuil de significativité.

Des variations considérables sont retrouvées dans la littérature quant aux performances de l'examen direct et de la culture de l'ECBC. Pour exemple, d'après une méta-analyse menée en 1996, la sensibilité de l'examen direct varie de 15 à 100 % et la spécificité de 11 à 100 % dans le diagnostic des PAC à pneumocoque [8]. Ces variations sont liées à l'absence de standard diagnostique, aux différents critères d'acceptabilité de l'échantillon et aux problèmes de reproductibilité de l'examen direct et de la culture semi-quantitative [9]. Mis à part ces problèmes d'interprétation, les performances semblent hautement dépendantes de la gravité de la pneumopathie et de l'antibiothérapie introduite au préalable. D'après l'étude de Musher et al., l'expectoration a une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic des PAC si elle est réalisée correctement, chez un malade sans antibiotiques et d'autant plus que la PAC à pneumocoque est grave, c'est-à-dire bactériémique (sensibilité de la culture de l'expectoration atteignant alors 80 %) [10].

- L'examen cytobactériologique des crachats est non invasif mais a peu de valeur diagnostique et reste entaché de nombreuses erreurs, avec plus de 50 % de contaminations par la salive. Le protocole de recueil doit être strict.
- Après ensemencement, la durée de l'incubation est de 48 heures et le seuil de significativité est de 10^7 UFC/mL.
- L'interprétation reste délicate car certaines bactéries d'origine salivaire ne sont pas pathogènes et d'autres peuvent être commensales mais provoquer aussi des infections pleuropulmonaires. Certains germes sont des pathogènes obligatoires comme *L. pneumophila* ou *M. tuberculosis*.

- L'interprétation du résultat final tient compte du nombre de cellules épithéliales et de polynucléaires, de la coloration de gram et de la culture au seuil de significativité.
- La valeur rapportée de l'examen direct et de la culture de l'ECBC est très variable selon les études. Elle dépend aussi de la gravité de la pneumopathie et de l'antibiothérapie préalable.

Aspiration endotrachéale

L'aspiration endotrachéale des sécrétions bronchopulmonaires est une alternative chez les patients intubés ou trachéotomisés qui n'expectorent pas et chez lesquels des techniques invasives sont contre-indiquées. Elle est fréquemment réalisée en réanimation chez le patient intubé-ventilé, à l'aveugle lors d'aspiration des sécrétions bronchopulmonaires par la sonde d'intubation.

Cependant, de même que pour l'ECBC, le risque de contamination par la flore salivaire reste important, auquel s'associe une contamination fréquente par la flore commensale qui colonise les sondes d'intubation. Ainsi, une évaluation du nombre de cellules épithéliales et de polynucléaires par champ permettra d'évaluer la qualité du prélèvement, et seuls les prélèvements de bonne qualité seront ensemencés. Le seuil de significativité est de 10^5 UFC/mL.

Les cultures quantitatives issues des aspirations endotrachéales sont reproductibles et peuvent être utiles au diagnostic des PAVM [1,5,11].

- L'aspiration des sécrétions bronchopulmonaires est une alternative chez le patient intubé ou trachéotomisé, quand les techniques invasives sont contre-indiquées. Elle est souvent réalisée à l'aveugle via la sonde d'intubation.
- Mais le risque de contamination par la flore salivaire et la flore commensale des sondes d'intubation reste important.
- On évalue la qualité du prélèvement par le compte du nombre de cellules épithéliales et de polynucléaires par champ, et seuls les prélèvements de bonne qualité seront ensemencés. Le seuil de significativité est de 10^5 UFC/mL.

Lavage bronchoalvéolaire

Le lavage bronchoalvéolaire (LBA) est effectué sous endoscopie et est donc invasif. Il consiste à injecter, puis à ré-aspirer du sérum physiologique via un fibroscope placé dans une bronche sous-segmentaire (de 3^e ou 4^e génération). Des échantillons de 50 mL de sérum physiologique (à 37°C) sont instillés en 4 à 6 fois, puis récupérés par aspiration, permettant de recueillir entre 20 et 60 % de la quantité injectée. Le LBA se compose de deux fractions : une bronchique qui doit être éliminée (50 mL) et une alvéolaire (150–200 mL). Il présente l'avantage d'explorer un vaste territoire pulmonaire, les bronchioles distales et jusqu'à 100 millions d'alvéoles.

Le prélèvement est ensemencé par culture quantitative et une coloration de gram est effectuée sur le culot de centrifugation. Le seuil de significativité est de 10^4 UFC/mL. Il est largement utilisé pour documenter les infections pulmonaires chez le sujet immunodéprimé, associé à certaines recherches particulières telles que *Legionella* sp., *Nocardia* sp., actinomycètes et mycobactéries.

Dans la littérature, la sensibilité de la culture du LBA varie de 42 à 93 %, avec une moyenne de 73 % et la spécificité de 45 à 100 % avec une moyenne de 82 %, cette variabilité pouvant être expliquée par des caractéristiques différentes des populations étudiées, par l'administration préalable d'antibiotiques et en fonction du test de référence utilisé [12].

Une variante du LBA est le « mini-lavage » (mini-LBA), pour lequel un volume de seulement 20 mL est instillé à l'aveugle afin de recueillir 2 à 3 mL. Cette technique trouve sa place chez les patients instables. Sa sensibilité varie de 63 à 100 % et sa spécificité de 66 à 96 % [12].

- Très utilisé pour documenter les infections pulmonaires chez le sujet immunodéprimé ou pour certaines recherches particulières (*Legionella*, *Nocardia*, actinomycètes et mycobactéries), le lavage bronchoalvéolaire explore les bronchioles distales et jusqu'à 100 millions d'alvéoles.
- Le prélèvement est ensemencé pour culture quantitative et une coloration de gram est effectuée sur le culot de centrifugation. Son seuil de significativité est de 10^4 UFC/mL.
- La sensibilité de la culture du lavage bronchoalvéolaire varie de 42 à 93 % et sa spécificité de 45 à 100 %.
- Le mini-lavage, employé chez les patients instables, utilise un faible volume d'instillation. Sa sensibilité varie de 63 à 100 % et sa spécificité de 66 à 96 %.

Les prélèvements bronchopulmonaires protégés

Brossage télescopique protégé

Ce prélèvement invasif s'effectue sous fibroscopie. La référence demeure le dispositif de Wimberley [13], constitué d'une brosse protégée par un double cathéter obturé par un bouchon de polyéthylène glycol, évitant ainsi une contamination du prélèvement par la flore de l'oropharynx lors du passage des voies aériennes supérieures. Ce dispositif est glissé au travers du fibroscope et est dirigé dans une petite bronche de 4^e ordre, au niveau du territoire pulmonaire radiologiquement suspect. Le cathéter interne est alors poussé, expulsant le bouchon et permettant d'avancer la brosse de quelques centimètres, pour réaliser le prélèvement. Le volume recueilli est de 1 à 10 µL. Le cathéter interne est ensuite désinfecté par de l'alcool à 90°C, puis l'extrémité distale de la brosse interne est sectionnée avec des ciseaux stériles et recueillie dans 1 mL de liquide (eau physiologique tamponnée stérile ou liquide de Ringer) que l'on agite sur place au lit du malade (agitation mécanique de type vortex) pendant 2 minutes.

Au laboratoire, une culture quantitative est effectuée, ainsi qu'un examen direct par coloration de gram. Le seuil de significativité est de 10^3 UFC/mL, pouvant être abaissé à $5 \cdot 10^2$ UFC/mL chez les patients sous antibiotiques. D'après la littérature, la sensibilité médiane est de 67 % (environ 30 % de faux-négatifs) et la spécificité de 95 % [12], mais ces deux paramètres varient beaucoup selon les études et la reproductibilité de l'examen est mauvaise [7].

- Le brossage télescopique protégé est un examen invasif effectué sous fibroscopie. On effectue une culture quantitative et un examen direct par coloration de gram du prélèvement.
- Le seuil de significativité de la culture est de 10^3 UFC/mL, pouvant être abaissé à $5 \cdot 10^2$ UFC/mL chez les patients sous antibiotiques.
- Sa sensibilité médiane est de 67 % (environ 30 % de faux-négatifs) et sa spécificité de 95 %, mais la reproductibilité de l'examen est mauvaise.

Prélèvement bronchique distal protégé

Le prélèvement bronchique distal protégé (PBDP) constitue une variante de la technique précédente. L'introduction d'un double cathéter protégé se fait à l'aveugle, sans fibroscopie, rendant plus difficile le contrôle de sa bonne réalisation [14]. Un volume de 1 mL est injecté et ré-aspiré à la seringue. L'extrémité du cathéter est sectionnée aseptiquement et placée dans un tube stérile. Le seuil de significativité est de 10^3 UFC/mL. Il est à réserver aux patients intubés et ventilés. L'intérêt de ce prélèvement est qu'il est plus simple de réalisation, moins coûteux et moins générateur d'effets secondaires que le brossage protégé. De plus, il présente des performances diagnostiques quasi-équivalentes et d'après une étude possède même une meilleure sensibilité [15,16].

- Le prélèvement bronchique distal protégé, plus simple, moins coûteux et plus sûr que le brossage protégé utilise un double cathéter protégé introduit sans fibroscopie chez les patients intubés et ventilés.
- Le seuil de significativité est également de 10^3 UFC/mL et ses performances diagnostiques seraient quasi-équivalentes au brossage télescopique protégé.

Pour ces différents prélèvements bronchopulmonaires, le résultat de la coloration de gram est obtenu dans un délai court (généralement moins d'une heure après l'arrivée au laboratoire) ; sa valeur prédictive positive peut être bonne, même pour les prélèvements non protégés, mais sa sensibilité dépasse difficilement 50 %, notamment pour le pneumocoque [17]. Les résultats de la culture sont, eux, disponibles en 24 à 48 heures pour les principales espèces bactériennes, autres que *Legionella* sp., *Nocardia* sp., actinomycètes et mycobactéries, qui nécessitent des délais d'incubation prolongés.

Hémocultures

Les hémocultures ont une bonne spécificité mais une faible sensibilité. Dans le cadre des PAC, de nombreuses études ont été menées afin d'analyser le taux de positivité des hémocultures, évaluant ainsi indirectement la sensibilité de cet examen. Ce taux varie beaucoup d'une étude à l'autre, selon qu'il s'agisse de PAC traitées en ambulatoire ou hospitalisées, selon les critères de gravité et en fonction de l'agent pathogène en cause (taux de positivité plus important pour le pneumocoque que pour *H. influenzae* ou *P. aeruginosa* par exemple) [10]. L'étude de Metersky et al. a évalué la fréquence de positivité chez les patients hospitalisés à 7 % et a recensé des facteurs indépendants corrélés avec la survenue d'une bactériémie tels qu'un traitement antibiotique récent, une pathologie hépatique ou encore certaines anomalies biologiques ou signes cliniques [18]. Une autre étude portant sur 386 PAC hospitalisées a montré que les hémocultures étaient positives dans seulement 4,4 % des cas, concluant que cet examen ne devait être indiqué que dans les formes graves [19]. Les hémocultures trouvent donc leur intérêt chez le patient immunodéprimé et au cours des PAC sévères hospitalisées mais probablement selon certains critères cliniques et biologiques. Il est important de rappeler que la quantité totale de sang inoculée est essentielle à la sensibilité de cet examen (le volume optimal chez l'adulte étant de 40 à 60 mL, soit un total de 4 à 6 flacons correctement remplis) [20].

- Les hémocultures sont très spécifiques mais peu sensibles.
- Dans le cadre des pneumopathies aiguës communautaires, le taux de positivité varie selon que la pneumopathie est traitée en ambulatoire ou à l'hôpital, selon les critères de gravité et en fonction de l'agent pathogène. Ce taux de positivité est faible (inférieur à 7 %) et certains ne proposent le recours à cet examen que dans les formes graves.
- Les hémocultures sont utiles chez le patient immunodéprimé et au cours des pneumopathies aiguës sévères hospitalisées.
- La quantité totale de sang inoculée est essentielle à la sensibilité de cet examen, le volume optimal chez l'adulte étant de 40 à 60 mL par ponction.

Liquide pleural

Un épanchement pleural est associé à une pneumopathie dans 20 à 40 % des cas [7]. Ce prélèvement est d'une faible sensibilité mais d'une grande spécificité [21] du fait de l'absence de flore commensale. Il est particulièrement adapté à la recherche d'agents infectieux par biologie moléculaire.

Les tests de diagnostic rapide urinaires

Le pronostic d'une pneumopathie pouvant être aggravé par une antibiothérapie tardive et inadéquate [22], il apparaît pertinent de disposer rapidement de données étiologiques

pour guider le traitement antibiotique initial ou adapter l'antibiothérapie entre la 48^e et la 72^e heure.

Les tests de diagnostic rapide (TDR) consistent en la mise en évidence d'antigènes solubles bactériens urinaires par immunochromatographie sur membrane. Ils sont réalisés à partir d'un prélèvement facile à obtenir, sont simples à réaliser au laboratoire et ont l'avantage de fournir des résultats très rapidement (dans les 15 à 30 minutes) mais leur spécificité n'est pas absolue et leur sensibilité bien inférieure à 100 % ne permet pas d'exclure définitivement l'étiologie. Par ailleurs, ce sont des tests qualitatifs qui ne ciblent que deux pathogènes alors qu'un certain nombre de PAC ont une étiologie plurimicrobienne [23,24]. Enfin, le prix de ces tests unitaires reste élevé, de l'ordre de 10 à 15 Euros par test.

TDR *Legionella* sp.

Les antigènes urinaires de *Legionella* apparaissent dans les urines dès les premiers jours de l'infection (en 1 à 4 jours) et restent détectables 3 à 8 semaines, voire un an chez certains patients immunodéprimés [25]. Ils peuvent être détectés même après la mise en route d'un traitement antibiotique adapté [26,27]. Ce test ne permet donc pas de dater l'infection ; de même, un test positif ne signifie pas un échec thérapeutique.

L'inconvénient majeur de ce TDR est lié au fait que les tests actuellement commercialisés en France ne détectent que les antigènes lipopolysaccharidiques de *L. pneumophila* de sérotype 1 (Lp1). Même si celui-ci est responsable de plus de 90 % des légionelloses [22,26], un résultat négatif n'élimine donc pas le diagnostic. Cependant, un test non commercialisé en France détectant en plus le sérotype 6 (X/pectTM *Legionella*, Oxoid, Royaume-Uni) est sur le marché mais non encore approuvé par la Food and Drug Administration tandis qu'un autre test utilisant un antigène immunodominant (une lipoprotéine associée au peptidoglycane) commun au genre *Legionella*, donc sensé détecter toutes les espèces et sérotypes, est en cours d'évaluation [26].

La détection des antigènes urinaires de *Legionella* est recommandée par de nombreuses sociétés savantes du fait de la grande spécificité (> 95 %) des tests commercialisés actuellement mais celle-ci varie selon les kits (99 % pour les meilleurs [26,27]). Ainsi, la positivité de ce test entre dans la définition des cas confirmés de légionellose.

La sensibilité des TDR *Legionella* varie entre 70 et 90 % [26] mais peut être significativement améliorée (environ 10 %) par une concentration préalable des urines [27]. La sensibilité est liée à la sévérité clinique et trouvée plus élevée pour les cas communautaires ou liés aux voyages que pour les cas nosocomiaux (sensibilité alors proche de 50 %).

TDR pneumocoque

Ce test repose sur la détection d'un acide teichoïque pariétal commun à toutes les souches de *S. pneumoniae* (BinaxNOW[®] ICT, Alere, Waltham, États-Unis).

D'après plusieurs méta-analyses récentes [28–31], la sensibilité de ce TDR est dépendante de la sévérité de l'infection, de l'ordre de 74–75 % (variant de 77 à 92 % pour les PAC bactériémiques et de 44 à 78 % pour les formes non bactériémiques) tandis que sa spécificité varie de 94 [29] à 97,2 % [30]. Saïd et al. [28] ont montré de plus

une diminution de sensibilité de 26 % en cas de traitement antibiotique instauré préalablement à la réalisation du test. Par ailleurs, des résultats faussement positifs peuvent être observés, les uns du fait de réactions croisées observées avec d'autres espèces de streptocoques partageant ce même antigène (*Streptococcus mitis* en particulier) et les autres en cas de colonisation nasopharyngée asymptomatique, d'infections antérieures, de vaccination récente contre le pneumocoque ou encore chez les patients atteints d'exacerbation de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) [32]. De plus, l'excrétion urinaire d'acide teichoïque persiste chez 40 [29] à 53 % [33] des patients pendant plus d'un mois après une infection pneumococcique. Les valeurs prédictives négative et positive de ce test sont, de ce fait, médiocres. Il n'est ainsi recommandé que pour les pneumopathies sévères de l'adulte où sa valeur prédictive positive est la meilleure [7]. De nouveaux tests ont été récemment commercialisés mais peu de données sont disponibles sur leurs performances en dehors de celles des fournisseurs.

- Les tests de diagnostic rapide urinaires consistent en la détection d'antigènes solubles bactériens urinaires. Leurs avantages sont la facilité du prélèvement, leur simplicité technique et la rapidité des résultats. Ce sont des tests qualitatifs et leur coût est relativement élevé.
- Les antigènes urinaires de *Legionella* apparaissent dès les premiers jours de l'infection et restent détectables 3 à 8 semaines. Les tests actuellement commercialisés sont très spécifiques et permettent de confirmer l'existence d'une légionellose. Leur sensibilité, liée à la sévérité clinique, est plus élevée pour les cas communautaires que nosocomiaux et varie entre 70 et 90 %.
- La sensibilité des dosages des antigènes urinaires du pneumocoque est de l'ordre de 74–75 % et dépend de la sévérité de l'infection, tandis que sa spécificité varie de 94 à 97,2 %. La sensibilité est moindre chez le patient traité par antibiotiques. Des faux-positifs peuvent être observés et les valeurs prédictives négative et positive de ce test sont médiocres.

Apports de la biologie moléculaire dans les infections des voies aériennes basses

La biologie moléculaire (on entend souvent par là en pratique la caractérisation d'un ADN bactérien à partir d'un prélèvement clinique) complète généralement la bactériologie traditionnelle (isolement des bactéries par culture) lorsque les germes recherchés sont difficilement ou trop lentement cultivables, ou rendus non cultivables par une antibiothérapie préalable.

Elle trouve sa place actuellement dans les infections respiratoires à *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, voire *Legionella* sp. Elle a bien sûr aussi une place de choix en virologie (notamment pour le virus respiratoire syncytial [VRS] et les virus grippaux), pour la détection de *Pneumocystis jiroveci* et *M. tuberculosis*, pour lequel on peut

même coupler à la détection du génome de la bactérie une détection simultanée des mutations responsables de la résistance à la rifampicine. Mais surtout la microbiologie moléculaire est en pleine évolution, avec la commercialisation récente et la diffusion à très court terme de techniques d'amplification multiplex permettant la détection simultanée (en seulement quelques heures) de plus d'une vingtaine de virus et de plusieurs bactéries à tropisme respiratoire, et l'arrivée plutôt à moyen terme d'applications cliniques des techniques de séquençage nouvelle génération qui permettront d'avoir accès à l'ensemble du microbiome des voies aériennes d'un patient et donc d'en corréliser certaines modifications avec un tableau clinique particulier.

L'actuel : les PCR en temps réel monospécifiques

À ce jour, et dans la plupart des hôpitaux, si on excepte *M. tuberculosis*, la bactériologie moléculaire des infections respiratoires basses se limite à la détection spécifique, par PCR en temps réel, de *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*, et éventuellement de *Legionella* sp. [34–37]. La détection d'ADN de pneumocoque présente peu d'intérêt, du fait d'alternatives possibles (culture et recherche d'antigènes urinaires) et de la difficulté d'interprétation d'une PCR positive à cause de colonisations fréquentes, surtout chez l'enfant. La généralisation de techniques de PCR réellement quantitatives validées pourraient toutefois changer la donne. Exceptionnellement, en cas d'épanchement pleural ponctionné, la PCR pneumocoque retrouve toute son utilité, ainsi que la PCR dite universelle (PCR-séquençage de l'ADNr16S) dans des cas plus compliqués, du fait de l'absence de flore commensale.

Pour *M. pneumoniae*, la PCR présente un intérêt pour toutes les PAC hospitalisées (adultes et surtout enfants) et les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé [35]. Chez les enfants, la sérologie (avec surtout la caractérisation d'IgM anti-*M. pneumoniae*) a un bon rendement mais est souvent rétrospective. Cependant, notamment à cause d'un portage asymptomatique non rare chez l'enfant, il est recommandé d'associer PCR et sérologie pour obtenir un meilleur compromis entre sensibilité et spécificité [38]. La PCR est réalisable dans la journée, ou en moins de 24 h. Le rendement semble équivalent sur LBA et sur expectoration ou aspiration pharyngée [39,40].

Pour *C. pneumoniae*, la supériorité de la PCR sur la sérologie est encore plus évidente, mais les pneumopathies aiguës à *C. pneumoniae* semblent être devenues très rares en France [41].

Pour *L. pneumophila*, la majorité des diagnostics en France sont réalisés par la détection d'antigènes urinaires spécifiques. Comme écrit plus haut, ces tests ont une bonne sensibilité, mais ne détectent pour l'instant que Lp1 (90 % des cas diagnostiqués en France). La plupart des PCR publiées ou commercialisées détectent, d'une part, spécifiquement *L. pneumophila*, et d'autre part, *Legionella* sp. (donc toutes les autres espèces de légionelles) et ont d'excellentes sensibilité et spécificité [42]. Ces PCR sont réalisables théoriquement en moins de 24 h, sur tout type de prélèvement respiratoire mais sont encore actuellement trop peu utilisées. Elles auraient l'avantage d'identifier les cas de légionelloses à *L. pneumophila* séro-groupe non 1,

voire à *Legionella* autres que *L. pneumophila* [43] et de généraliser davantage le recours au prélèvement respiratoire, indispensable en cas de légionellose avérée pour isoler la souche et permettre une enquête épidémiologique.

Actuellement, les autres PCR utilisables en routine ont des applications plus anecdotiques (par exemple détection de *S. aureus*, des gènes *mecA* ou *mecC* codant la résistance à l'oxacilline et du gène *lpx* codant la leucocidine de Panton-Valentine en cas de suspicion de pneumopathie aiguë nécrosante). Il existe cependant actuellement une technique de PCR rapide, presque complètement automatisée, qui permet de rechercher en moins de 2 heures (délai théorique) la présence d'ADN de *S. aureus*, sensible (SAMS) ou résistant à l'oxacilline (SAMR), dans des prélèvements respiratoires de patients présentant une pneumopathie acquise sous ventilation. Dans ces conditions, les valeurs prédictives négatives, sur LBA ou PBDP, sont respectivement de 99,7 % et 99,8 % pour SAMS et SAMR [44,45].

- Le recours à une PCR en temps réel se limite à *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *M. tuberculosis* et éventuellement *Legionella*.
- La PCR pour le pneumocoque présente peu d'intérêt, sauf pour les prélèvements des épanchements pleuraux.
- Pour *M. pneumoniae*, la PCR est utile pour toutes les PAC hospitalisées et les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé. Chez l'enfant, on recommande d'associer PCR et sérologie pour obtenir un meilleur compromis entre sensibilité et spécificité.
- Pour *C. pneumoniae*, la PCR est supérieure à la sérologie mais les pneumopathies aiguës à *C. pneumoniae* semblent être devenues très rares en France.
- Pour *L. pneumophila*, le diagnostic repose souvent sur la détection d'antigènes urinaires spécifiques et la PCR, qui permet de détecter tous les sérogroupes de *Legionella* et pas uniquement Lp1, est actuellement trop peu utilisée.
- La PCR permet de détecter l'ADN de *S. aureus* sensible (SAMS) ou résistant à l'oxacilline (SAMR), dans des prélèvements respiratoires au cours de pneumopathies acquises sous ventilation.

Le futur immédiat : les panels multiplex et l'approche syndromique

Déjà implantés ou en cours d'implantation dans la plupart des CHU et certains centres hospitaliers français, les panels multiplex vont potentiellement révolutionner le diagnostic étiologique des PAC sévères de réanimation et des pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé. Ces panels reposent soit sur des technologies actuelles (extraction des acides nucléiques, puis PCR en temps réel multiplex « manuelles ») [46], soit sur des technologies plus innovantes et complètement automatisées (extraction des acides nucléiques, suivie de PCR multiplex automatisées sans intervention humaine entre les deux) [47]. Dans le premier cas, le coût reste relativement « abordable » (40 à

Tableau 1 Exemples (liste non exhaustive) de panels moléculaires respiratoires récemment commercialisés.

Pathogènes ciblés	FTD respiratory pathogens 33 [®] (<i>Fast-track diagnostics</i>)	Respiratory pathogens panel (RPP) [®] (Theradiag)	FilmArray [®] RP panel (BioMérieux)
Adenovirus	X	X	X
Bocavirus	X	X	
Coronavirus NL63	X	X	X
Coronavirus 229E	X	X	X
Coronavirus OC43	X	X	X
Coronavirus HKU1	X	X	X
Cytomegalovirus	X		
Enterovirus	X	X	X
Metapneumovirus humain A/B	X	X	X
Parechovirus	X		
Rhinovirus	X	X	X
Virus grippe A	X	X ^a	X ^a
Virus grippe B	X	X	X
Virus grippe C	X		
Virus parainfluenza 1	X	X	X
Virus parainfluenza 2	X	X	X
Virus parainfluenza 3	X	X	X
Virus parainfluenza 4	X	X	X
Virus respiratoire syncytial A/B	X	X ^b	X
<i>Bordetella</i> sp.	X		X ^d
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	X	X	X
<i>Haemophilus influenzae</i>	X		
<i>Haemophilus influenzae</i> sérotype B	X		
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	X		
<i>Legionella</i> sp.	X	X ^c	
<i>Moraxella catarrhalis</i>	X		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	X	X	X
<i>Salmonella</i> sp.	X		
<i>Staphylococcus aureus</i>	X		
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	X		
<i>Pneumocystis jiroveci</i>	X		

^a Distinction en plus des sous-types H1, H3, H1N1(2009).
^b Distinction des sous-types A et B.
^c Détection uniquement de *L. pneumophila*.
^d Détection uniquement *B. pertussis*.

50 Euros par patient, contre environ 5 Euros cependant pour une PCR en temps réel classique, monospécifique), mais le test nécessite l'investissement d'un personnel technique spécialisé en biologie moléculaire. Dans le second cas, le coût devient très important (150 à 200 Euros par patient) mais le temps technique est réduit au minimum (parfois seulement quelques minutes) et pourrait même permettre l'implantation de cette technologie dans une structure d'urgence de type *point of care* au lit du malade [48]. La liste des microorganismes recherchés par ces panels varie en fonction des tests et des fabricants mais peut comporter plus d'une vingtaine de virus et plusieurs bactéries à tropisme respiratoire. Le **Tableau 1** présente à titre d'exemple la liste des microorganismes recherchés par certains des panels actuellement commercialisés.

La sensibilité et la spécificité atteinte par ces panels pour chaque cible est globalement excellente pour les virus et comparable aux tests moléculaires commercialisés pour chacune des cibles isolément [49,50]. L'addition dans ces

différents panels respiratoires de cibles bactériennes est beaucoup plus récente et les données de sensibilité et de spécificité sont encore quasi-inexistantes. Le principal résultat issu des évaluations de ces panels est la fréquence importante des co-infections identifiées (aussi bien virus-virus que bactéries-virus), sans que pour l'instant la signification clinique ou pronostique de ces co-infections ne soit clairement établie [51].

Les principaux avantages de ces panels moléculaires respiratoires pour le patient semblent être surtout la disponibilité simultanée de tous les résultats (contrairement aux stratégies par strates de recherches successives encore les plus répandues actuellement), permettant une meilleure ré-évaluation des décisions cliniques initiales, notamment pour une utilisation plus pertinente des antimicrobiens (antibiotiques et antigrippaux) et pour la mise en place rapide de mesures de lutte contre la diffusion d'infections nosocomiales (grippe, VRS...) [52]. Les autres avantages seraient la réduction des explorations

paracliniques complémentaires, une réduction des durées d'hospitalisation, l'identification de co-infections ayant des conséquences pronostiques et thérapeutiques, une amélioration importante des connaissances épidémiologiques qui pourraient avoir des conséquences collectives, au-delà du patient lui-même, et enfin une simplification de la démarche diagnostique avec un seul prélèvement respiratoire à réaliser [52].

Les inconvénients de ces panels syndromiques, outre leur coût élevé, résident peut-être dans la définition même des listes de pathogènes recherchés, en grande partie guidées par des objectifs économiques et techniques, parfois au détriment de leur pertinence clinique : *Bordetella pertussis* est souvent recherché au sein de ces panels alors qu'à part peut-être chez le petit nourrisson, le tableau clinique d'une coqueluche est assez éloigné d'une pneumopathie aiguë. On trouve aussi, dans certains panels à visée « pneumopathies aiguës », *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, des entérobactéries qui correspondent beaucoup plus à des profils de BPCO, alors que pour l'instant quasiment aucun de ces panels ne comporte *P. jiroveci*. Ces panels génèrent aussi beaucoup de résultats positifs « inattendus », pour des pathogènes surtout viraux, peu recherchés en routine (coronavirus...) et des infections doubles voire triples dont la signification peut laisser actuellement nombre de cliniciens... et de microbiologistes perplexes ! Cependant, l'accumulation de ces données nouvelles peut faire progresser de façon très importante nos connaissances épidémiologiques en matière d'infections respiratoires basses.

Ces panels ne permettent actuellement pas la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. La mise en culture des prélèvements reste donc indispensable, même si à terme la PCR multiplex pourrait être utilisée en première ligne comme *screening* afin de ne réaliser des cultures spécifiques que sur orientation des résultats moléculaires.

- Les panels multiplex reposent volontiers sur des technologies innovantes, complètement automatisées. La liste des microorganismes recherchés varie selon les tests et les fabricants, mais peut comporter plus d'une vingtaine de virus et plusieurs bactéries à tropisme respiratoire.
- La sensibilité et la spécificité de ces panels est globalement excellente pour les virus, mais on manque actuellement de données pour les bactéries.
- Le principal intérêt de ces panels moléculaires respiratoires est la disponibilité simultanée de tous les résultats, permettant une meilleure réévaluation des décisions cliniques initiales et une mise en place rapide de mesures de lutte contre la diffusion d'infections nosocomiales (grippe, VRS...).
- Les inconvénients de ces panels, outre leur coût élevé, sont la définition même des listes de pathogènes recherchés, en grande partie guidées par des objectifs économiques et techniques, parfois au détriment de leur pertinence clinique, le grand nombre de résultats positifs pour des pathogènes peu recherchés en routine et la détection d'infections doubles voire triples difficiles à interpréter.

- Ces panels ne permettent pas la détermination de la sensibilité aux antibiotiques et les cultures restent indispensables.

Le futur à 5–10 ans : séquençage nouvelle génération pour étude en routine du microbiote respiratoire

L'un des écueils du séquençage traditionnel par la méthode de Sanger (en vigueur dans de nombreux laboratoires de microbiologie depuis la fin des années 1990) est l'impossibilité de résoudre des mélanges de microorganismes (mélanges de séquences nucléotidiques) sans recourir à des techniques lourdes, inutilisables en laboratoire de diagnostic microbiologique clinique. Cette technique de séquençage ne donne, par ailleurs, aucune visibilité à des séquences minoritaires (par exemple issues de microorganismes sous représentés dans une flore polymicrobienne). Ainsi, via un séquençage traditionnel (de l'ADNr16S en pratique bactériologique), on ne peut identifier qu'une infection mono-microbienne dans un prélèvement biologique normalement stérile. Cela rend tout de même service devant une endocardite à hémocultures négatives, par exemple, ou devant une pleuropneumopathie extrêmement sévère à *Legionella bozemanii*, germe identifié grâce à un tel séquençage à partir d'une ponction pleurale (donnée personnelle).

Les technologies de séquençage de nouvelle génération permettent d'accéder à la séquence de pratiquement chaque molécule d'ADN (ou d'ARN) présente dans un échantillon qui, par ailleurs, peut contenir des millions de ces molécules d'ADN. Il est possible bio-informatiquement de faire ensuite la liste de toutes les séquences présentes initialement, puis de les regrouper par homologies, c'est-à-dire par microorganismes, si on a analysé un échantillon comportant un mélange de différents microorganismes. Il est donc possible d'établir la liste des germes constituant une flore complexe et même de donner une idée de leurs quantités respectives. Ainsi, on pourra obtenir en quelques heures la composition du microbiote respiratoire d'un patient à partir d'un prélèvement pharyngé, d'une expectoration ou d'un LBA [53–55].

Les applications pratiques de ce type de tests ne concerneront probablement pas les PAC, sévères ou non, hospitalisées ou non, mais plutôt les pneumopathies de l'immunodéprimé (pour identifier des germes que les cliniciens n'avaient pas évoqués sous l'angle du diagnostic ciblé ou par panel) et le contexte des exacerbations de BPCO, de dilatation des bronches ou au cours de la mucoviscidose. De nombreux travaux de recherche bactériocliniques sont en effet en cours pour relier les modifications qualitatives et quantitatives du microbiote respiratoire des patients au déclenchement des exacerbations [54,56,57]. Il est donc tout à fait possible que cela aboutisse à des tests diagnostiques qui permettront de mieux cibler ou prévenir ces exacerbations.

- L'un des écueils du séquençage traditionnel est l'impossibilité de résoudre des mélanges de microorganismes et l'absence de visibilité de séquences minoritaires.
- Les technologies de séquençage de nouvelle génération permettent d'accéder à la séquence de pratiquement chaque molécule d'ADN (ou d'ARN) présente dans un échantillon, puis d'en faire la liste et de les regrouper par microorganismes.
- On pourra ainsi obtenir en quelques heures la composition du microbiote respiratoire d'un patient à partir d'un prélèvement pharyngé, d'une expectoration ou d'un LBA.
- En pratique, ces tests ne concerneront probablement pas les PAC mais plutôt les pneumopathies de l'immunodéprimé, les exacerbations de BPCO, de dilatation des bronches ou au cours de la mucoviscidose.

Sérologies bactériennes

Longtemps, les explorations sérologiques ont constitué les tests microbiologiques les plus simples à réaliser pour évoquer des étiologies telles que *L. pneumophila*, *Chlamydia* sp. et *M. pneumoniae* malgré leur faible rendement diagnostique, la nécessité d'obtenir des paires de sérologies et leur contribution tardive voire rétrospective au diagnostic. Aujourd'hui, la place de ces tests est très restreinte, principalement limitée aux études épidémiologiques du fait de l'avènement des techniques de biologie moléculaire.

Sérologie *Legionella* sp.

Comme Lp1 est le sérotype le plus fréquemment responsable des légionelloses en Europe [22,26], la place de la sérologie s'est considérablement réduite au fil des ans depuis la commercialisation du TDR *Legionella*. Cependant, si le laboratoire n'a pas mis en place une détection de *Legionella* par PCR, cette approche diagnostique garde un intérêt, associée à la mise en culture d'un prélèvement respiratoire, quand le TDR est négatif alors que la suspicion clinique reste forte. En effet, d'autres espèces telle que *Legionella longbeachae* peuvent être pathogènes chez l'immunodéprimé [27] mais aussi chez des patients originaires d'autres contrées (Australie [58] ou Thaïlande par exemple [59]).

Il est recommandé de réaliser un prélèvement sanguin dès les premiers jours de la maladie, puis un second après 3 à 6 semaines d'évolution. La spécificité des tests varie entre 95 et 100 % [26] même s'il existe des réactions croisées au sein du genre *Legionella* et avec d'autres pathogènes, respiratoires ou non. Par ailleurs, la sensibilité de ces tests sérologiques est faible, de l'ordre de 40 à 80 %.

La sérologie *Legionella* est plus un outil épidémiologique qu'une approche utile au diagnostic et à la prise en charge thérapeutique d'une pneumopathie. Elle n'a sa place :

- qu'en cas de TDR négatif et d'une PCR sur un prélèvement respiratoire non réalisable ou négative ;

- chez un patient suspect de légionellose nosocomiale du fait de la faible sensibilité des TDR chez ces patients [27].

Sérologie *Mycoplasma pneumoniae*

Le diagnostic sérologique des infections à *M. pneumoniae* nécessite, pour afficher la meilleure sensibilité, deux sérums, l'un prélevé en phase aiguë de l'infection (apparition des IgM lors de la 1^{re} semaine avec un pic attendu lors de la 3^e), le second entre la 2^e et la 4^e semaine (pic des IgG généralement observé lors de la 5^e semaine). La recherche d'IgM est très utile chez l'enfant ; en revanche, la production des IgM est inconstante chez l'adulte [60]. Aussi, la multiplication par 4 du titre des IgG est-elle proposée comme critère d'infection aiguë [9]. Il faut, par ailleurs, noter que les performances des tests sérologiques commercialisés sont inégales et que la sensibilité de ces tests atteint au plus 80 % [61]. Pour pallier à ce problème et aider à la distinction entre colonisation et infection, l'utilisation combinée de la PCR avec la sérologie peut être proposée, en particulier chez les enfants [62].

Sérologie *Chlamydia* sp.

L'intérêt du sérodiagnostic des infections respiratoires à *C. pneumoniae* est limité par la cinétique lente des anticorps (idéalement attendre 2 mois pour le 2^e sérum), la persistance prolongée des IgG en plateau et son manque de spécificité [63].

Même si certains [64] rapportent que *C. pneumoniae* pourrait représenter 6 à 22 % des étiologies des PAC de l'immunocompétent selon les localisations géographiques, des études récentes montrent que la prévalence de ces infections serait beaucoup plus faible (< 1,5 %) [41]. Cette diminution ou disparition de *C. pneumoniae* des étiologies bactériennes des infections respiratoires hospitalisées est peut être liée à un changement des caractéristiques épidémiologiques de l'infection ou à un défaut de sensibilité et de spécificité des techniques diagnostiques utilisées [41,63]. Devant l'absence actuelle de définition microbiologique de l'infection, le diagnostic sérologique semble pouvoir être abandonné au profit de la recherche directe par PCR, en association avec *M. pneumoniae* [63].

Dans la définition des cas certains d'infection à *Chlamydia psittaci* figure, à côté d'une recherche directe positive par PCR, une séroconversion ou une augmentation de 4 fois du titre des IgG avec ou sans IgM entre deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle [63]. Seuls 10 cas de psittacose ont été déclarés à Santé Publique France par le Centre national de référence des infections à *Chlamydia* en 2014 [41].

- La place de la sérologie infectieuse est actuellement très restreinte, principalement limitée aux études épidémiologiques du fait de l'avènement des techniques de biologie moléculaire.
- La sérologie *Legionella* n'a sa place qu'en cas de négativité du test de diagnostic rapide ou d'indisponibilité ou de négativité d'une PCR sur un prélèvement respiratoire.

- Le diagnostic sérologique des infections à *M. pneumoniae* nécessite un prélèvement à la phase de l'infection, puis entre la 2^e et la 4^e semaine. La sensibilité des sérologies atteint au plus 80 % et on peut proposer l'utilisation combinée de la PCR pour pallier cette difficulté.
- Le diagnostic sérologique des infections à *C. pneumoniae* semble pouvoir être abandonné au profit de la recherche directe par PCR, en association avec *M. pneumoniae*.
- Le diagnostic positif d'infection à *Chlamydia psittaci* repose sur la PCR et la constatation d'une séroconversion ou d'une augmentation de 4 fois du titre des IgG avec ou sans IgM entre deux prélèvements espacés de 15 jours.

Stratégie diagnostique microbiologique

Le **Tableau 2** résume les principales options du diagnostic bactériologique en fonction du contexte clinique.

Comme vu précédemment, de nombreuses explorations complémentaires existent pour mettre en évidence l'agent bactérien causal d'une infection pulmonaire. Cependant, pour des raisons logistiques et économiques, il apparaît illusoire de penser qu'une recherche exhaustive s'avère possible et même nécessaire dans tous les cas. Il apparaît donc indispensable de cibler le contexte au cours duquel une documentation sera nécessaire et quels seront les prélèvements adaptés et les techniques à utiliser, tout en connaissant leurs limites.

Tableau 2 Investigations bactériologiques minimales actuellement disponibles en fonction du type de pneumopathie.

Caractéristiques de la pneumopathie	Investigations bactériologiques d'emblée ^{a,b}	Investigations bactériologiques secondaires ^{a,b}
PAC non hospitalisées PAC sévères hospitalisées (hors réanimation)	Aucune Hémoculture (avant antibiothérapie si possible) Expectoration pour examen direct et culture (avant antibiothérapie si possible) Urines pour antigénurie légionelle si contexte évocateur Réévaluation à 48–72 h	<i>Si pas d'étiologie à ce stade et évolution insuffisamment favorable</i> Antigénurie pneumocoque PCR <i>M. pneumoniae</i> et <i>C. pneumoniae</i> , voire <i>Legionella</i>
PAC sévères hospitalisées en réanimation	Hémoculture (avant antibiothérapie si possible) Sécrétions bronchiques (aspiration endotrachéale ou PBDP) pour examen direct et culture (avant antibiothérapie si possible) + PCR, <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , voire <i>L. pneumophila</i> et <i>Legionella</i> sp. Urines pour antigénurie légionelle et pneumocoque	
Pneumopathies aiguës associées aux soins	Priorité à la bactériologie traditionnelle (culture), car germes faciles à cultiver et potentiellement multirésistants Hémoculture Expectoration, PBDP Voire prélèvements plus invasifs (brosse, LBA)	
Pneumopathies aiguës sous ventilation mécanique	Priorité à la bactériologie traditionnelle (culture), car germes faciles à cultiver et potentiellement multirésistants Hémoculture Aspiration sécrétions hautes (trachéales), PBDP Voire prélèvements plus invasifs (brosse, LBA) Selon disponibilité : PCR <i>S. aureus</i> et gène <i>mec</i> sur prélèvement respiratoire (type Gene Xpert®)	
Pneumopathies aiguës de l'immunosupprimé	Hémoculture (avant antibiothérapie si possible) Expectoration (ou sécrétions bronchiques si intubation) possible, mais le LBA est le prélèvement de référence pour examen direct et culture (avant antibiothérapie si possible) + PCR, <i>M. pneumoniae</i> , <i>C. pneumoniae</i> , voire <i>L. pneumophila</i> et <i>Legionella</i> sp. + recherche de mycobactéries Urines pour antigénurie légionelle et pneumocoque	Si épanchement pleural ponctionnable, grande valeur pour PCR pneumocoque et surtout PCR « universelle » (ADNr16S)

^a Ne sont présentées ici que les investigations bactériologiques ; les aspects virologiques et parasitomycologiques font l'objet d'autres chapitres.

^b Discussion bactériologiste/clinicien pour tout cas « atypique ».

Les pneumopathies aiguës communautaires sévères

Concernant les PAC, la sévérité doit être en premier lieu déterminée par l'utilisation de scores, basés sur des facteurs cliniques et des comorbidités associées, comme le score de Fine (*Pneumonia severity index* [PSI]) ou le CRB 65 [65]. Ces scores détermineront si la prise en charge peut se faire en ambulatoire ou en hospitalisation.

Conformément aux recommandations actuelles et à la littérature [1,9,66], les PAC non sévères (ayant des critères PSI I et II de faible gravité) ne nécessitent pas de documentation microbiologique. En effet, les tests diagnostiques présentent des performances discutables, les traitements empiriques sont habituellement efficaces et même si une documentation est obtenue, il n'est pas certain que la désescalade soit indiquée.

En revanche, la recherche étiologique des PAC sévères hospitalisées, présentant des critères de gravité (PSI III et IV), est encouragée afin de mieux cibler le pathogène en cause. En dehors de la réanimation, cette documentation s'effectue par un ECBC et des hémocultures. La recherche d'antigènes urinaires de pneumocoque et de légionelle n'est pas recommandée d'emblée. Cependant, la recherche des antigènes urinaires de légionelle peut se justifier chez les malades présentant des symptômes évocateurs de légionellose, ou présentant une instabilité hémodynamique et/ou une hypoxémie, ou en situation épidémique. En l'absence de documentation et d'évolution suffisamment favorable à 48–72 h, des PCR *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*, voire *Legionella* sp. peuvent être demandées, ainsi que les antigénuries pneumocoque et légionelle (si non demandée[s] initialement).

Concernant les patients hospitalisés en réanimation, sont recommandés en première intention des prélèvements non invasifs : aspirations endotrachéales, ou de préférence un PBDP qui, sans être dirigé, sera moins contaminé par la flore oropharyngée que l'aspiration endotrachéale. Ces prélèvements ont une bonne sensibilité et donc une bonne valeur prédictive négative ; ils sont plus simples et plus rapides à réaliser que les prélèvements invasifs (LBA et brosse protégée) et pourront donc plus souvent être réalisés avant instauration de l'antibiothérapie (condition primordiale pour augmenter la probabilité de documenter). Dans les cas de contamination par une flore oropharyngée abondante, qui générerait l'identification d'une bactérie pathogène, des prélèvements invasifs peuvent être secondairement nécessaires en fonction de l'état clinique du patient : LBA ou brosse protégée. Une bactériologie quantitative et des PCR *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* et *Legionella* seront réalisées à partir de ces prélèvements. On prélèvera également rapidement (avant antibiothérapie) des hémocultures (avec moins de 10 % de rendement étiologique mais une grande spécificité, notamment pour le pneumocoque) puis des urines pour recherche d'antigènes de pneumocoque (en tenant compte du manque de sensibilité) et de légionelle. Cette stratégie applicable aux PAC sévères hospitalisées en réanimation sera sûrement très vite partiellement remaniée par la généralisation de l'utilisation des panels moléculaires multiplex ; sauf que les premiers d'entre eux à s'implanter dans les laboratoires, les plus automatisés, permettront un diagnostic rapide d'étiologies

virales (surtout virus grippaux, VRS...), de légionelle (voire *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*) mais ne détecteront pas, au moins dans un premier temps, des bactéries classiques de PAC sévères comme le pneumocoque, *H. influenzae*, voire *S. aureus*. Il faudra au début garder une approche classique complémentaire, de bactériologie standard et/ou de PCR ciblées.

- La sévérité des pneumopathies aiguës communautaires est évaluée par des scores basés sur des facteurs cliniques et les comorbidités associées (scores de Fine [PSI] ou CRB 65). Une recherche étiologique s'impose dans les pneumopathies communautaires sévères hospitalisées (PSI III et IV), par ECBC et hémocultures.
- La recherche d'antigènes urinaires de pneumocoque et de légionelle n'est pas systématique mais la recherche des antigènes urinaires de légionelle est justifiée en présence de symptômes évocateurs de légionellose, d'instabilité hémodynamique, d'hypoxémie et/ou en situation épidémique.
- En l'absence de documentation et si l'évolution n'est pas suffisamment favorable à 48–72 h, on recommande des PCR *M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*, voire *Legionella* sp. ainsi que les antigénuries pneumocoque et légionelle.
- En réanimation, il est recommandé en première intention des prélèvements non invasifs : aspiration endotrachéale ou PBDP. Le LBA ou la brosse protégée s'imposent en cas de contamination par une flore oropharyngée abondante, pour bactériologie quantitative et PCR *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* et *Legionella*. Les hémocultures sont recommandées ainsi que la recherche d'antigènes de pneumocoque et de légionelle.

Les pneumopathies acquises sous ventilation mécanique

Le diagnostic de PAVM n'est pas aisé et repose sur plusieurs arguments cliniques et radiologiques, mais dont les performances diagnostiques sont insuffisantes et nécessitent l'adjonction de critères microbiologiques. L'identification du germe en cause est essentielle afin d'adapter au mieux l'antibiothérapie (qui doit être initialement à large spectre au vu de la prévalence élevée de germes multirésistants dans ce contexte), permettant ainsi de raccourcir la durée d'utilisation d'antibiotiques à large spectre chez tous les patients présentant une PAVM (désescalade) et de minimiser au maximum l'émergence de bactéries multirésistantes au sein des unités de réanimation.

De nombreuses controverses opposent les stratégies « non invasives », recommandant la réalisation de prélèvements effectués le plus souvent à l'aveugle (aspiration endotrachéale ou PBDP) [67], aux stratégies « invasives », recommandant des prélèvements sous fibroscopie bronchique (brossage protégé et LBA) [68]. Comme les techniques bronchoscopiques présentent les inconvénients d'un coût élevé, sont de réalisation plus longue et peuvent être

délétères chez des patients hypoxémiques [15], le diagnostic étiologique des PAVM repose souvent en pratique sur l'analyse d'une aspiration endotrachéale ou de préférence d'un PBDP (du fait d'une moindre flore commensale associée). Plusieurs études ont en effet démontré que les prélèvements invasifs et non invasifs avaient des valeurs diagnostiques et des impacts comparables en termes de mortalité, de consommation d'antibiotiques, ou encore de durée d'intubation [69–76]. Au sein des unités de réanimation, des algorithmes décisionnels doivent définir une stratégie diagnostique et de traitement antibiotique initial, en tenant compte des contraintes logistiques et organisationnelles. Quel que soit le prélèvement effectué, c'est la plupart du temps la bactériologie classique (culture quantitative et antibiogramme) qui apportera la solution : les germes habituellement en cause dans ce contexte se cultivent facilement (sauf antibiothérapie préalable) et sont volontiers multirésistants, d'où la nécessité d'obtenir une souche et de faire un antibiogramme. La biologie moléculaire aide peu : en fonction de la disponibilité locale, une recherche ciblée d'ADN de *S. aureus* et des gènes *mec* par une technique automatisée rapide (de type Gene Xpert®) peut être demandée et aidera surtout par son excellente valeur prédictive négative ; en revanche, les nouveaux panels moléculaires multiplex n'incluent, à l'heure actuelle, que très peu de bactéries responsables de PAVM dans leur spectre de détection.

- Le diagnostic de pneumopathie acquise sous ventilateur repose sur des arguments cliniques et radiologiques mais qui doivent être complétés par des critères microbiologiques pour identifier le germe en cause et orienter l'antibiothérapie.
- Il existe de nombreuses controverses opposant les stratégies « non invasives » (aspiration endotrachéale ou PBDP) aux stratégies « invasives » (brossage protégé et LBA). Ces deux stratégies semblent avoir des valeurs diagnostiques et des impacts comparables en termes de mortalité, de consommation d'antibiotiques ou de durée d'intubation.
- Quel que soit le prélèvement effectué, la bactériologie classique (culture quantitative et antibiogramme) apporte en général la solution, la biologie moléculaire ayant à l'heure actuelle une place secondaire.

Les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé

Les agents bactériens responsables de pneumopathies aiguës chez l'immunodéprimé sont extrêmement divers et varient selon la nature du déficit immunitaire. Le prélèvement de référence est ici le LBA et celui-ci servira pour une bactériologie classique quantitative avec recherches supplémentaires spécifiques (légionelles, éventuellement *Actinomyces* sp., *Nocardia* sp.), une recherche de mycobactéries (alors complétée par un prélèvement de sécrétions bronchiques renouvelé 3 jours de suite), des recherches

mycologiques (notamment *Aspergillus*) et un panel large de détections moléculaires virales, parasitomycologiques (notamment *Pneumocystis*) et bactériennes (*M. pneumoniae* et *C. pneumoniae*, *Legionella* sp.). C'est dans ce contexte notamment que les panels moléculaires multiplex vont trouver leur place, en permettant de rechercher une vingtaine, voire une trentaine de microorganismes en quelques heures. Il ne faut pas oublier de prélever du sang sur tubes secs pour le bilan sérologique éventuel (*Legionella* sp., *M. pneumoniae*, voire *C. psittaci* mais aussi sérologies virales) et des urines pour la recherche d'antigènes de pneumocoque et légionelle. Les hémocultures sont beaucoup moins rentables que dans les pneumopathies aiguës de l'immunocompétent.

- Les bactéries responsables de pneumopathies aiguës chez l'immunodéprimé sont extrêmement diverses et varient selon la nature du déficit immunitaire.
- Le prélèvement de référence est le lavage bronchoalvéolaire pour une bactériologie classique quantitative avec recherches supplémentaires spécifiques (légionelle, *Actinomyces*, *Nocardia*, mycobactéries), recherche mycologique (notamment *Aspergillus*) et large panel de détections moléculaires (*Pneumocystis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *Legionella*).
- Les panels moléculaires multiplex peuvent ici s'avérer précieux en recherchant une vingtaine, voire une trentaine de microorganismes en quelques heures.
- Il faut aussi prélever du sang sur tubes secs pour le bilan sérologique éventuel (*Legionella*, *M. pneumoniae*, *C. psittaci*, sérologies virales) et des urines pour la recherche d'antigènes de pneumocoque et légionelle.
- Les hémocultures sont beaucoup moins contributives que dans les pneumopathies aiguës de l'immunocompétent.

Conclusion

Les pneumopathies aiguës recouvrent en fait des contextes cliniques ainsi que des étiologies bactériennes variés. Aucune documentation bactériologique n'est nécessaire pour les PAC prises en charge en ambulatoire. En revanche, la documentation des pneumopathies aiguës hospitalisées (communautaires ou associées aux soins) repose essentiellement sur l'analyse de prélèvements respiratoires non invasifs (ECBC ou aspiration endotrachéale/PBDP pour les patients de réanimation) alors que les prélèvements invasifs (brosse protégée ou LBA) sont à réserver en seconde ligne pour les PAC hospitalisées en réanimation et à effectuer en première intention pour les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé.

Les techniques mises en œuvre au laboratoire sur ces prélèvements restent classiques. Seule la culture permet, à ce jour, de déterminer le profil de sensibilité aux antibiotiques de l'agent pathogène (élément essentiel pour la prise en charge des PAVM fréquemment liées à des

espèces multirésistantes). Les techniques de biologie moléculaire sont en général limitées au diagnostic des infections à *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, voire *Legionella* sp. Mais l'avenir à court terme sera marqué par le recours aux panels moléculaires multiplex capables de détecter de nombreux microorganismes en quelques heures. Cette approche syndromique trouvera surtout sa place dans les PAC sévères de réanimation et les pneumopathies aiguës de l'immunodéprimé dans un premier temps ; son expansion dépendra de la pertinence clinique des germes recherchés. Suivra, dans quelques années, l'ère du séquençage nucléotidique à haut débit qui révolutionnera le domaine du diagnostic microbiologique, offrant un accès au microbiote respiratoire du patient.

Points essentiels

- Les tableaux cliniques et les bactéries responsables des pneumopathies aiguës sont très variés et aucun outil microbiologique n'est 100 % sensible ni 100 % spécifique.
- Plus de 30 % des pneumopathies restent de cause indéterminée.
- Aucun prélèvement n'est indiqué pour les patients traités en ambulatoire ; on préconise les prélèvements respiratoires non invasifs dans les pneumopathies aiguës hospitalisées (ECBC ou aspiration endotrachéale/PBDP en réanimation).
- On recommande des prélèvements invasifs en seconde ligne pour les pneumopathies aiguës communautaires en réanimation, et en première ligne chez l'immunodéprimé.
- La culture, seul examen permettant de prédire l'efficacité des antibiothérapies, reste importante mais le prélèvement doit être effectué avant l'instauration de l'antibiothérapie et les techniques de biologie moléculaire sont en général limitées actuellement au diagnostic des infections à *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, voire *Legionella* sp.
- Les hémocultures, la recherche d'antigènes urinaires, les sérologies et les PCR sont d'utilisation courante.
- À l'avenir, on utilisera vraisemblablement les panels moléculaires multiplex qui détectent de nombreux micro-organismes en quelques heures et, ultérieurement, le séquençage génomique à haut débit.

Déclaration de liens d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Références

- [1] Grgurich PE, Hudcova J, Lei Y, et al. Diagnosis of ventilator-associated pneumonia: controversies and working toward a gold standard. *Curr Opin Infect Dis* 2013;26:140–50.
- [2] Bergot E. Épidémiologie et mécanismes des pneumonies de l'adulte. *Rev Prat* 2011;61:1064–7.
- [3] Chastre J, Fagon JY. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165:867–903.
- [4] Waterer GW, Rello J, Wunderink RG. Management of community-acquired pneumonia in adults. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:157–64.
- [5] Kalanuria AA, Zai W, Mirski M. Ventilator-associated pneumonia in the ICU. *Crit Care* 2014;18:208.
- [6] Society TJR. Pneumonia in immunocompromised patients. *Respirology* 2009;14:44–50.
- [7] Botterel F, Lachaud L, Pozzetto B, et al. Infections broncho-pulmonaires (hors tuberculose et mucoviscidose). *REMIC Soc Fr Microbiol Eds* 2015;1:179–92.
- [8] Reed WW, Byrd GS, Gates Jr RH, et al. Sputum gram's stain in community-acquired pneumococcal pneumonia. A meta-analysis. *West J Med* 1996;165:197–204.
- [9] Leroy O. Apport des explorations microbiologiques au diagnostic des infections des voies respiratoires basses. *Med Mal Infect* 2006;36:570–98.
- [10] Musher DM, Thorner AR. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 2014;371:1619–28.
- [11] Bergmans DC, Bonten MJ, De Leeuw PW, et al. Reproducibility of quantitative cultures of endotracheal aspirates from mechanically ventilated patients. *J Clin Microbiol* 1997;35:796–8.
- [12] Grossman RF, Fein A. Evidence-based assessment of diagnostic tests for ventilator-associated pneumonia. Executive summary. *Chest* 2000;117:1775–815.
- [13] Wimberley N, Faling LJ, Bartlett JG. A fiberoptic bronchoscopy technique to obtain uncontaminated lower airway secretions for bacterial culture. *Am Rev Respir Dis* 1979;119:337–43.
- [14] Girault C, Saigne L, Jusserand D, et al. Évaluation technique du prélèvement bronchique distal protégé à l'aveugle par cathéter en réanimation. *Reanim Urg* 1997;6:667–74.
- [15] Casetta M, Blot F, Antoun S, et al. Diagnosis of nosocomial pneumonia in cancer patients undergoing mechanical ventilation: a prospective comparison of the plugged telescoping catheter with the protected specimen brush. *Chest* 1999;115:1641–5.
- [16] Pham LH, Brun-Buisson C, Legrand P, et al. Diagnosis of nosocomial pneumonia in mechanically ventilated patients. Comparison of a plugged telescoping catheter with the protected specimen brush. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:1055–61.
- [17] Roson B, Carratala J, Verdager R, et al. 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.
- [18] Metersky ML, Ma A, Bratzler DW, et al. Predicting bacteremia in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:342–7.
- [19] Ishikawa G, Nishimura N, Kitamura A, et al. Impact of blood cultures on the changes of treatment in hospitalized patients with community-acquired pneumonia. *Open Respir Med J* 2013;7:60–6.
- [20] Accoceberry I, Cornet M, Lamy B. Bactériémies et fongémies – hémocultures. *REMIC Soc Fr Microbiol Eds* 2015;1:125–37.
- [21] Clark JE. Determining the microbiological cause of a chest infection. *Arch Dis Child* 2015;100:193–7.
- [22] Phin N, Parry-Ford F, Harrison T, et al. Epidemiology and clinical management of Legionnaires' disease. *Lancet Infect Dis* 2014;14:1011–21.
- [23] Pesola GR. The urinary antigen test for the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Chest* 2001;119:9–11.
- [24] Macfarlane J. Lower respiratory tract infection and pneumonia in the community. *Semin Respir Infect* 1999;14:151–62.
- [25] Sopena N, Sabria M, Pedro-Botet ML, et al. Factors related to persistence of *Legionella* urinary antigen excretion in patients with legionnaires' disease. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002;21:845–8.

- [26] Mercante JW, Winchell JM. Current and emerging *Legionella* diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clin Microbiol Rev* 2015;28:95–133.
- [27] Haut conseil de la Santé publique. Le risque lié aux légionelles. Guide d'investigation et d'aide à la gestion. http://www.google.fr/url?url=http://www.whcspfr/Explorecgi/Telecharger%3FNomFichier%3Dhcspr20130711_risqlegionnelguide-investigationpdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ved=0ahUKEwip8a3Ure_JAhUHWBQKHdoMALAQFggUMAA&sig2=nCYC3LMmTzUXiloPahd73Q&usq=AFQjCNEjwHPTG1EPwRiDLFyDselYq67DBQ. 2013.
- [28] Said MA, Johnson HL, Nonyane BA, et al. Estimating the burden of pneumococcal pneumonia among adults: a systematic review and meta-analysis of diagnostic techniques. *PLoS One* 2013;8:e60273.
- [29] Boulware DR, Daley CL, Merrifield C, et al. Rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia among HIV-infected adults with urine antigen detection. *J Infect* 2007;55:300–9.
- [30] Sinclair A, Xie X, Teltscher M, et al. Systematic review and meta-analysis of a urine-based pneumococcal antigen test for diagnosis of community-acquired pneumonia caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2013;51:2303–10.
- [31] Horita N, Miyazawa N, Kojima R, et al. Sensitivity and specificity of the *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test for unconcentrated urine from adult patients with pneumonia: a meta-analysis. *Respirology* 2013;18:1177–83.
- [32] Song JY, Eun BW, Nahm MH. Diagnosis of pneumococcal pneumonia: current pitfalls and the way forward. *Infect Chemother* 2013;45:351–66.
- [33] Andreo F, Prat C, Ruiz-Manzano J, et al. Persistence of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen excretion after pneumococcal pneumonia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2009;28:197–201.
- [34] Waller JL, Diaz MH, Petrone BL, et al. Detection and characterization of *Mycoplasma pneumoniae* during an outbreak of respiratory illness at a university. *J Clin Microbiol* 2014;52:849–53.
- [35] Chalker V, Stocki T, Litt D, et al. Increased detection of *Mycoplasma pneumoniae* infection in children in England and Wales, October 2011 to January 2012. *Euro Surveill* 2012;17, pii: 20081.
- [36] Nomanpour B, Ghodousi A, Babaei T, et al. Single tube real time PCR for detection of *Streptococcus pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae* and *Legionella pneumophila* from clinical samples of CAP. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2012;59:171–84.
- [37] Thurman KA, Warner AK, Cowart KC, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011;70:1–9.
- [38] Touati A, Pereyre S, Bouziri A, et al. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae*-associated respiratory tract infections in hospitalized children: results of a 4-year prospective study in Tunis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:103–9.
- [39] Cho MC, Kim H, An D, et al. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella pneumophila*. *Ann Lab Med* 2012;32:133–8.
- [40] Xu D, Li S, Chen Z, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in different respiratory specimens. *Eur J Pediatr* 2011;170:851–8.
- [41] Centre national de référence Chlamydiae. Rapport annuel d'activité 2015. Année d'exercice 2014. 2015. Available from: <http://www.cnrchlamydiae.u-bordeaux2.fr/wp-content/uploads/2015/05/CR-CNR-ann%C3%A9e-dexercice-2014-final.pdf>.
- [42] Nazarian EJ, Bopp DJ, Saylor A, et al. Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;62:125–32.
- [43] Cloud JL, Carroll KC, Pixton P, et al. Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol* 2000;38:1709–12.
- [44] Leone M, Malavieille F, Papazian L, et al. Routine use of *Staphylococcus aureus* rapid diagnostic test in patients with suspected ventilator-associated pneumonia. *Crit Care* 2013;17:R170.
- [45] Cercenado E, Marin M, Burillo A, et al. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* in lower respiratory tract secretions from patients with suspected ventilator-associated pneumonia: evaluation of the Cepheid Xpert MRSA/SA SST1 assay. *J Clin Microbiol* 2012;50:4095–7.
- [46] Driscoll AJ, Karron RA, Bhat N, et al. Evaluation of fast-track diagnostics and TaqMan array card real-time PCR assays for the detection of respiratory pathogens. *J Microbiol Methods* 2014;107:222–6.
- [47] Popowitch EB, O'Neill SS, Miller MB. Comparison of the BioFire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP fast multiplex assays for detection of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2013;51:1528–33.
- [48] Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, et al. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. *Arch Pathol Lab Med* 2015;139:636–41.
- [49] Parker J, Fowler N, Walmsley ML, et al. Analytical sensitivity comparison between singleplex real-time PCR and a multiplex PCR platform for detecting respiratory viruses. *PLoS One* 2015;10:e0143164.
- [50] Ruggiero P, McMillen T, Tang YW, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray respiratory panel and the GenMark eSensor respiratory viral panel on lower respiratory tract specimens. *J Clin Microbiol* 2014;52:288–90.
- [51] Cantais A, Mory O, Pillet S, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol* 2014;60:402–7.
- [52] Pozzetto B, Grattard F, Pillet S. Multiplex PCR theranostics of severe respiratory infections. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010;8:251–3.
- [53] Padmanabhan R, Mishra AK, Raoul D, et al. Genomics and metagenomics in medical microbiology. *J Microbiol Methods* 2013;95:415–24.
- [54] Hui AW, Lau HW, Chan TH, et al. The human microbiota: a new direction in the investigation of thoracic diseases. *J Thorac Dis* 2013;5:127–31.
- [55] Yongfeng H, Fan Y, Jie D, et al. Direct pathogen detection from swab samples using a new high-throughput sequencing technology. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:241–4.
- [56] Park H, Shin JW, Park SG, et al. Microbial communities in the upper respiratory tract of patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014;9:e109710.
- [57] Legatzki A, Rosler B, von Mutius E. Microbiome diversity and asthma and allergy risk. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:466.
- [58] Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, et al. Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002;186:127–8.
- [59] Phares CR, Wangroongsarb P, Chantra S, et al. Epidemiology of severe pneumonia caused by *Legionella longbeachae*, *Mycoplasma pneumoniae*, and *Chlamydia pneumoniae*: 1-year, population-based surveillance for severe pneumonia in Thailand. *Clin Infect Dis* 2007;45:e147–55.
- [60] Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. *Rev Francophone Lab* 2007:63–9.
- [61] Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, et al. 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.
- [62] Atkinson TP, Balish MF, Waites KB. Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *FEMS Microbiol Rev* 2008;32:956–73.
- [63] De Barbeyrac B, Obeniche F, Peuchant O, et al. Méthodes de diagnostic des infections à Chlamydiae : directes et/ou séro-diagnostic ? Que choisir ? *J Antiinfect* 2014;16:185–91.
- [64] Hammerschlag MR. *Chlamydia pneumoniae* and the lung. *Eur Respir J* 2000;16:1001–7.
- [65] Marti C, Garin N, Grosgrain O, et al. Prediction of severe community-acquired pneumonia: a systematic review and meta-analysis. *Crit Care* 2012;16:R141.
- [66] Smith SB, Ruhnke GW, Weiss CH, et al. Trends in pathogens among patients hospitalized for pneumonia from 1993 to 2011. *JAMA Intern Med* 2014;174:1837–9.
- [67] Niederman MS, Torres A, Summer W. Invasive diagnostic testing is not needed routinely to manage suspected ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:565–9.
- [68] Chastre J, Fagon JY. Invasive diagnostic testing should be routinely used to manage ventilated patients with suspected pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:570–4.
- [69] Fangio P, Rouquette-Vincenti I, Rousseau JM, et al. Diagnostic non invasif des pneumopathies nosocomiales acquises sous ventilation mécanique : comparaison entre le prélèvement distal protégé et l'aspiration endotrachéale. *Ann Fr Anesth Reanim* 2002;21:184–92.
- [70] Ruiz M, Torres A, Ewig S, et al. Noninvasive versus invasive microbial investigation in ventilator-associated pneumonia: evaluation of outcome. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:119–25.
- [71] Fagon JY, Chastre J, Wolff M, et al. Invasive and noninvasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2000;132:621–30.
- [72] Sanchez-Nieto JM, Torres A, Garcia-Cordoba F, et al. Impact of invasive and noninvasive quantitative culture sampling on outcome of ventilator-associated pneumonia: a pilot study. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157:371–6.
- [73] Fabregas N, Ewig S, Torres A, et al. Clinical diagnosis of ventilator associated pneumonia revisited: comparative validation using immediate post-mortem lung biopsies. *Thorax* 1999;54:867–73.
- [74] Marquette CH, Copin MC, Wallet F, et al. Diagnostic tests for pneumonia in ventilated patients: prospective evaluation of diagnostic accuracy using histology as a diagnostic gold standard. *Am J Respir Crit Care Med* 1995;151:1878–88.
- [75] Berton DC, Kalil AC, Teixeira PJ. Quantitative versus qualitative cultures of respiratory secretions for clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;10:CD006482.
- [76] American Thoracic Society. Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:388–416.