

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ DE MÉDECINE

Année : 2020

N° 2020-90

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Et

Mémoire du DES de Biologie Médicale

par

Thomas DRUMEL

Né le 16 mars 1991 à St Sébastien sur Loire

Présentée et soutenue publiquement le 18/09/2020

**Evaluation du panel respiratoire Pneumonia *plus* (FilmArray®)
dans le diagnostic et la prise en charge des pneumopathies en
Réanimation au CHU de Nantes.**

Président : Monsieur le Professeur Antoine ROQUILLY
Directeur de thèse : Madame le Docteur Lise CREMET

Remerciements

A mon Président de jury,

Monsieur le Professeur Antoine Roquilly,

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse,

Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Aux membres de mon jury, vous me faites le plaisir de juger ce travail. Merci de m'accorder votre temps précieux, et de vous être rendus disponibles pour assister à ma soutenance.

Madame le Professeur Berthe-Marie IMBERT, merci de m'avoir accueilli dans initié à la pratique de la virologie dans votre service.

Monsieur le Professeur David BOUTOILLE, merci de m'avoir accueilli au SMIT, au cours d'un stage très particulier, j'y ai beaucoup appris et grandi.

Monsieur le Docteur Karim LAKHAL, c'est un honneur de vous compter parmi les membres de mon jury.

Madame le Docteur Sophie-Anne GIBAUD, merci de m'avoir accompagné sur ce sujet qui vous tenais à cœur.

A ma directrice de thèse ,

Madame le Docteur Lise CREMET,

Pour m'avoir orienté et encadré avec patience et justesse tout au long de ce travail. Merci pour ta disponibilité, le partage de tes compétences et tes conseils avisés.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de ma grande estime.

Remerciements personnels

Aux internes de biologie et biologistes du CHU que j'ai rencontré au cours de mon parcours : Clémence, Anne, Adélaïde, Ronan, Alix, Elise, Fakhri, Rose-Anne, Anne-Gaëlle, Pierre, Charles, Yoan, Adeline, Claire, Sarah, Arthur, Fatema, Edouard, Chloé et tous les autres, vous m'avez beaucoup appris.

Un merci particulier à Martin et Erwan qui ont aidé pour la réalisation des manip.

Aux internes de clinique, Gwen, Antoine, Morgane, Claire, Agathe, Naïla, Alexis, Romain, Thibault, Donatienne, Marc que j'ai rencontré au cours de mon stage hors filière et qui m'ont accueilli sans me juger et avec une solidarité sans faille.

A toute l'équipe du laboratoire de la Roche sur Yon, qui m'a accueilli et permis de développer mes compétences.

A mes amis : présents à mes côtés au cours de mon parcours, Alexandre, Anthony, Damien, Cyril, Lucie, Jade, Sonia, Seb, et ceux que j'oublie.

A mes parents, ma sœur et Yoann qui m'ont encouragé, soutenu, apporté leurs conseils précieux.

A Marion,

Pour ton soutien, ta patience et tes encouragements. Merci d'être toujours là pour moi dans les bons et les mauvais moments. « Aimer, c'est savoir dire je t'aime sans parler » Victor Hugo

Table des matières

Liste des figures et tableaux	6
Liste des annexes	7
Liste des abréviations.....	7
Introduction	8
Partie I : Diagnostic et prise en charge des pneumopathies	9
I. 1- Généralités sur les pneumonies	9
I. 1-1. Définitions	9
I. 1-2. Physiopathologie	10
I. 1-3- Incidence	11
I. 1-4- Prévention des HAP et PAVM	12
I. 2. Diagnostic	13
I. 2-1. Diagnostic clinique.....	13
I. 2-2. Diagnostic microbiologique actuel.....	15
I. 3. Antibiothérapie	24
I. 3-1. Antibiothérapie probabiliste	25
I. 3-2. Antibiothérapie adaptée.....	27
Partie II : Etude Oracle-phase 1 et présentation du panel Pneumonia plus (FilmArray®)	29
II. 1- Description de l'étude Oracle-phase 1	29
II. 1-1. Protocole de l'étude	29
II. 1-2. Le panel Pneumonia plus (FilmArray®) : un outil diagnostique d'infection respiratoire	30
II. 1-3. Prise en charge des prélèvements en routine au laboratoire du CHU de Nantes : 38	
II. 2- Analyse des résultats	39
Partie III- Résultats	41
III. 1- Caractéristiques de la population et des prélèvements	41
III. 2- Comparaison des techniques de routine et du PPFA : Résultats bactériologiques.	42
III. 2-1. Prélèvements positifs et polybactériens.....	42
III. 2-2. Espèces bactériennes	45
III. 2-3. Analyse des discordances	48

III. 2-4. Comparaison des résultats obtenus pour les AT et LBA couplés à J1	53
III. 2-5. Intérêt de l'examen direct	53
III. 3- Comparaison des techniques de routine et du PPFA: Résultats virologiques et bactéries atypiques.	54
III. 4- Antibiothérapie	56
III. 4-1. Détection de la résistance aux antibiotiques.....	56
III. 4-2. Impact théorique du PPFA sur l'antibiothérapie initiale	56
Partie IV : Discussion	59
Conclusion/Perspective	66
Annexes	67
Bibliographie	120

Liste des figures et tableaux

Figure 1 : Représentation schématique d'une réaction de PCR	20
Figure 2 : Schéma de la réaction de PCR.....	22
Figure 3 : Représentation simplifiée de la quantification d'une PCR quantitative	23
Figure 4 : Cassette FilmArray® (vue de dessous) et déroulement des étapes de la réaction.	31
Figure 5 : Intervalles de quantification du PPFA	34
Figure 6 : Préparation d'une cassette FilmArray®	37
Figure 7 : Exemple d'un résultat du PPFA.....	37
Figure 8 : Prélèvements reçus par patient (n=100).....	42
Figure 9: Nombre de bactéries signalées en fonction du type de prélèvement	44
Figure 10 : Nombre de bactéries par prélèvements en fonction du seuil dans les AT	44
Figure 11 : Bactéries retrouvées avec le PPFA (J1 et J3) (Pas de seuil)	45
Figure 12 : Bactéries retrouvées en Culture à J1 et J3	46
Figure 13 : : Proportion des bactéries positives en FilmArray® détectées en culture, pour les espèces les plus fréquemment identifiées (au moins 20 prélèvements positifs avec les deux techniques).	47
Figure 14 : Bactéries retrouvées à J1 et J3 (PPFA et culture)	48
Figure 15 : Répartition des prélèvements (n=237) positifs et négatifs dans les deux techniques (pas de seuil) (FA : FilmArray®, C : culture)	49
Figure 16 : Répartition des prélèvements (n=237) positifs et négatifs dans les deux techniques (seuil 10 ⁵ copies/ml) (FA : FilmArray®, C : culture)	49
Figure 17 : Pourcentage de résultats discordants par type de prélèvement	50
Figure 18: Nombre de prélèvements discordants et concordants en fonction du nombre de bactéries retrouvées avec le FilmArray®	50
Figure 19: Explications des discordances à J1 et J3.....	52
Figure 20: Résultats virologiques (comparaison des techniques) (n=37).....	55
Figure 21: Antibiothérapies réelles et simulées avec le résultat du PPFA (pourcentage).....	58
Tableau 1 : Score CPIS (un score supérieur à 6 est évocateur d'une PAVM)	14
Tableau 2 : Cibles du <i>Pneumonia plus</i> (FilmArray®).....	33
Tableau 3 : Gènes codant pour des résistances bactériennes et bactéries correspondantes ciblées par le PPFA (données fournisseur).....	35
Tableau 4 : Détection de SARM par le PPFA.....	36
Tableau 5 : Caractéristiques de la population.....	41

Liste des annexes

Annexe 1: PPA, NPA et OPA par bactéries a J1.....	67
Annexe 2: Comparaison des numérations entre les deux techniques (AT J1)	68
Annexe 3 : Comparaison des numérations entre les deux techniques (LBA)	69
Annexe 4 : Seuils de significativité des prélèvements respiratoire et dilutions recommandées (10)....	70
Annexe 5 : Algorithme de décision d'antibiothérapie initiale en fonction du résultat du PPFA	71
Annexe 6 : Exemple d'envahissement d'une gélose par <i>P. mirabilis</i>	72
Annexe 7 : Gélose chromogène ensemencée avec un prélèvement polybactérien.....	73
Annexe 9 : Article	85

Liste des abréviations

AT :	Aspiration trachéo-bronchique
ATS:	American thoracic society
BHRe :	Bactérie hautement résistante émergente
BMR :	Bactérie multi-résistante
C2G/C3G	Céphalosporine de deuxième/troisième génération
CMV:	Cytomégalovirus
DDS:	Décontamination digestive sélective
EBCASE	Entérobactérie hyperproductrice de céphalosporinase
E-BLSE :	Entérobactérie productrice de bêta-lactamase à spectre étendu
EBV:	Epstein-Barr virus
ESCMID:	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.
HAP :	Pneumopathie acquise à l'hôpital (Hospital-acquired pneumonia)
HSV:	Herpès simplex virus
IDSA:	Infectious Diseases Society of America
LBA :	Lavage broncho-alvéolaire
Mers-CoV	Coronavirus du Syndrome Respiratoire du Moyen-Orient
PAC :	Pneumopathie aiguë communautaire
PAVM :	Pneumopathie associée à la ventilation mécanique
PCR :	Polymerase chain reaction
PPFA :	Pneumonia <i>plus</i> (FilmArray®)
SARM :	<i>S. aureus</i> résistant à la méthicilline
SFAR:	Société française d'anesthésie-réanimation
SRLF :	Société de réanimation de langue français

Introduction

En 1920, Marcel Proust a écrit dans son roman « le Côté de Guermantes » : « *La nature ne semble guère capable de donner que des maladies assez courtes. Mais la médecine s'est annexée l'art de les prolonger* ». De nos jours, les pneumopathies représentent une part importante des infections nosocomiales dans le monde.

Les premières recommandations internationales portant sur la prise en charge des pneumonies acquises à l'hôpital (HAP) ont été publiées en 1996 aux Etats-Unis. De celles-ci découlent plusieurs conclusions telles que : l'HAP est la première cause de décès par infection nosocomiale chez les patients de soins intensifs, la compréhension de sa physiopathologie est incomplète et enfin la méthode de diagnostic microbiologique n'est pas clairement établie (1).

Les dernières versions des recommandations internationales (ESCMID et ATS/IDSA) et françaises (SFAR/SRLF) ont été publiées en 2016 et 2017 (4, 5, 6). Un certain nombre des recommandations repose toujours sur des niveaux de preuves faible (5). Les points majeurs sur lesquels elles insistent sont : la prévention des épisodes de pneumopathie et la prescription d'une antibiothérapie adaptée, le plus précocement possible. Elles mettent aussi l'accent sur la nécessité de la documentation microbiologique et de la désescalade antibiotique.

L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier une des nouvelles méthodes de diagnostic microbiologique des pneumopathies : le panel *Pneumonia plus* (FilmArray®). Il permet de réaliser une PCR multiplex et est capable de détecter, à partir de prélèvements respiratoires, les principales bactéries et virus responsables de pneumonies, ainsi que des gènes de résistances aux antibiotiques. Son délai de réalisation est de 75 à 90 minutes. Nous comparerons les résultats de cette nouvelle méthode à ceux des techniques de routine utilisées au CHU de Nantes, chez 100 patients suspects de pneumopathie acquise à l'hôpital. Ces patients étaient inclus dans l'étude clinique non interventionnelle Oracle phase-1 qui a eu lieu d'Octobre 2018 à Janvier 2020.

Partie I : Diagnostic et prise en charge des pneumopathies

I. 1- Généralités sur les pneumonies

I. 1-1. Définitions

Les pneumopathies infectieuses sont des maladies très fréquentes (500 000 cas/an de pneumopathie aigüe communautaire (PAC) en France (6)) et pouvant mettre en jeu le pronostic vital. Elles sont le résultat du développement d'un processus infectieux au dépend du parenchyme pulmonaire (6). Elles sont habituellement réparties en deux grands cadres nosologiques ; les PAC et les pneumopathies associées aux soins ou acquises à l'hôpital (6).

La PAC est une pneumonie acquise en milieu extra hospitalier, ou se déclarant moins de 48 heures après l'admission (6). Elle peut être le résultat d'une co-infection virale-bactérienne et est généralement liée à des germes présents dans la flore oro-pharyngée. Ces germes sont souvent virulents et transmis fréquemment par les gouttelettes de Flügge ou par des aérosols inhalés (virus à tropisme respiratoire, *Legionella pneumophila*, bactéries atypiques et bactéries de la flore oro-pharyngée) (7). Les bactéries responsables de PAC sont majoritairement : *Streptococcus pneumoniae* (impliqué dans 25 à 50 % des cas), *Haemophilus influenzae*, *Branhamella catarrhalis*, ainsi que des bactéries intracellulaires comme *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydia pneumoniae*. Les PAC ne nécessitent pas de documentation microbiologique, si l'évolution clinique est favorable (6). Elles ne posent pas, à l'heure actuelle, de difficultés dans le choix de l'antibiothérapie (6) (7).

Les pneumopathies acquises à l'hôpital surviennent au moins 48 heures après une admission à l'hôpital (6) et sont généralement causées par des pathogènes de l'environnement hospitalier (8). Elles apparaissent au décours d'une prise en charge (diagnostique, thérapeutique, palliative, préventive ou éducative) et ne doivent pas être en incubation au début de celle-ci (9). Les bactéries impliquées (Entérobactéries, *Staphylococcus aureus* et bacilles non fermentant) présentent souvent des résistances aux antibiotiques. On estime que l'infection est polymicrobienne dans 30% des cas (4).

Les pneumopathies d'inhalation surviennent suite à un trouble de la conscience. Le patient inhale une partie du contenu de l'estomac ou du tube digestif. Des entérobactéries et des bactéries anaérobies sont impliquées dans le processus infectieux et il est nécessaire de les prendre en compte lors de la prescription de l'antibiothérapie probabiliste (6).

Les pneumopathies de l'immunodéprimé sont graves et résultent de la rupture de l'équilibre entre l'hôte et son environnement. Elles sont généralement le fait de germes opportunistes : champignons (*Aspergillus sp*, *Pneumocystis jirovecii*), bactéries à croissance lente (*Nocardia sp*, Mycobactéries atypiques) ou virus (Metapneumovirus) (10).

I. 1-2. Physiopathologie

Le plus fréquemment, l'infection est le résultat de l'association de facteurs diminuant les défenses de l'arbre respiratoire (virose, pathologie pulmonaire et/ou une immunodépression, ventilation mécanique), et de la multiplication d'un ou plusieurs germes pathogènes (7). Le processus infectieux est principalement d'origine bactérienne (95%), plus rarement d'origine virale ou fongique ; particulièrement chez les patients âgés ou immunodéprimés (6). Les pathogènes pénètrent dans l'arbre bronchique majoritairement par voie aérienne et dans de rares cas par voie hématogène ou par contiguïté (fistule) (2).

Les poumons sont situés dans la cage thoracique et leur parenchyme est composé de tissu interstitiel et d'alvéoles. La fonction des poumons est de permettre l'oxygénation du sang et l'évacuation du CO₂, au niveau des alvéoles. L'air extérieur atteint les alvéoles en passant par la trachée puis les bronches et les bronchioles (11). La pénétration des microorganismes pathogènes par voie aérienne dans le poumon aurait lieu principalement lors de micro-aspirations des sécrétions orotrachéales. Celles-ci ont lieu de manière fréquente chez toute personne. L'évolution vers la pneumonie va dépendre de l'inoculum microbien et de la capacité de défense de l'hôte (12).

La diminution des défenses pulmonaires face aux infections est en majorité liée à une altération de l'épithélium cilié situé dans les bronches et bronchioles qui draine l'appareil respiratoire. Cette altération peut être due à une infection par un virus à tropisme respiratoire, la consommation de tabac ou la consommation d'alcool (7). Des pathologies chroniques du

poumon, comme la bronchopneumopathie chronique obstructive ou la mucoviscidose, favorisent aussi les infections (6).

La physiologie pulmonaire est profondément modifiée chez les patients hospitalisés notamment chez les patients hospitalisés en réanimation qui peuvent être, en fonction de leurs pathologies, aidés à respirer par un dispositif de ventilation mécanique, de façon invasive (intubation) ou non (7). La ventilation invasive (par intubation endotrachéale ou trachéotomie) est un facteur de risque majeur de développer une infection pulmonaire. On estime que les patients intubés ont une probabilité entre 6 à 20 fois plus élevée de faire une pneumopathie (13). En effet, la ventilation mécanique altère l'arbre respiratoire en déclenchant des dysfonctionnements des cellules ciliées, empêchant le mouvement du mucus vers la trachée (14). L'arbre respiratoire se « nettoyant » par l'action muco-ciliaire et la toux. Les patients ventilés de manière invasive sont inconscients et le matériel présent dans l'appareil bronchique empêche la clairance des sécrétions par l'appareil muco-ciliaire. Les microorganismes de la flore orale pullulent, et se propagent le long du tube d'intubation jusqu'à la partie distale des voies aériennes, en formant notamment un biofilm. La source d'infection chez des patients intubés peut-être la flore oro-pharyngée, le contenu gastrique (remontées gastriques très fréquentes chez les patients intubés), les circuits de ventilation, les humidificateurs et nébuliseurs (15).

La fragilisation de l'arbre respiratoire est responsable de la possibilité d'une infection de celui-ci par des bactéries non habituellement retrouvées dans les pneumopathies et qui possèdent des profils de résistance aux antibiotiques différents (7).

I. 1-3- Incidence

En 2017 le centre Européen de prévention et contrôle des maladies estimait le nombre d'infections nosocomiales à 2,5 millions de cas par an, dont 500 000 étaient des HAP. On estime le coût moyen d'un épisode d'HAP à 40 000 euros (14). Les (HAP) sont la 2^{ème} cause d'infection nosocomiale, derrière les infections urinaires (9) et la 1^{ère} cause de décès par infection nosocomiale en réanimation (2). L'incidence des HAP varie entre 5 et 20 épisodes pour 1000 jours d'hospitalisations (16). Les pneumopathies associées à la ventilation mécanique (PAVM) sont des pneumopathies nosocomiales qui surviennent après 48 heures de ventilation mécanique. L'incidence des PAVM est estimée entre 1,9 et 3,8 pour 1000 jours de ventilation

aux Etats-Unis, et plus de 18 pour 1000 jours de ventilation en Europe. Elles représentent environ un tiers des pneumopathies nosocomiales (2).

En Europe on estime qu'environ 40% des patients admis en réanimation présentent ou vont présenter une pneumonie (13). Parmi ces pneumonies, environ 75% sont d'origine nosocomiale, les pneumonies aiguës communautaires graves représentent les 25% restant. Au sein des pneumonies nosocomiales 56 à 90% sont des PAVM (13) (17).

L'incidence des PAVM semble en cours de diminution dans le monde grâce à de meilleures méthodes de prévention, mais elle reste élevée chez les patients ayant subi un traumatisme important et/ou un traumatisme cérébral (2). Les PAVM se développent habituellement après environ 5 à 7 jours de ventilation (4). La PAVM est une entité clinique particulière, ses critères diagnostiques et son étiologie bactérienne varient selon les régions et les pays (15). La mortalité directement attribuable à cette infection est difficilement évaluable car les patients atteints présentent de nombreuses comorbidités. Elles sont toutefois responsables d'un surcoût et d'une augmentation du temps du séjour hospitalier estimé à 7 jours par épisode (2).

I. 1-4- Prévention des HAP et PAVM

Les voies respiratoires distales ont longtemps été considérées stériles (car chez les patients non infectés la culture bactérienne des prélèvements distaux est le plus souvent stérile) (14). On a donc considéré que des micro-aspirations de la flore oro-pharyngée et du contenu digestif étaient responsables des HAP et des PAVM. C'est à partir de cette théorie que les mesures de prévention actuelles ont été mises en place. Elles se basent sur trois approches principales : 1) la diminution des micro et macro aspirations de la flore digestive ; 2) la réduction du volume de sécrétions oro-pharyngées pouvant être aspirées dans le poumon ; 3) l'inhibition de la prolifération du microbiote présent au niveau larynx et de l'oropharynx (4), (14).

Les facteurs de risque de pneumopathie ont été répartis en deux familles : les risques liés aux patients et ceux liés à la ventilation. Les risques liés à la ventilation peuvent être limités par des actions de prévention contrairement aux risques liés aux patients (18). Les principaux facteurs de risque liés à la ventilation sur laquelle la prévention peut avoir un impact important

sont : la durée de la ventilation, le degré de sédation du patient, la prévention de l'ulcère gastro-duodénal, l'entretien du matériel de ventilation et l'antibiothérapie (18).

Les recommandations françaises s'appuient sur une approche standardisée multimodale pour diminuer la survenue d'une PAVM (4). Cette approche multimodale consiste en la réalisation d'une décontamination digestive sélective (DDS) (seulement si le taux de BMR du service est inférieur à 20%) et des mesures de prévention liées à la ventilation (4). La DDS consiste en l'utilisation d'un topique antiseptique (par voie entérale) et d'une antibioprophylaxie (voie systémique) pour une durée totale inférieure à 5 jours. Cette stratégie a permis une diminution de la mortalité, surtout chez les patients les plus précaires, sans que soit notifiée une augmentation de la prévalence des bactéries résistantes aux antibiotiques (4).

Malgré le fait que des pratiques de prévention soient appliquées en Europe depuis plusieurs années, leur efficacité est relative. En effet l'incidence des HAP et des PAVM ne s'est pas réduite de manière significative. Il n'y a pas eu d'impact sur la durée d'hospitalisation liée aux HAP (14). Cela suggère que la voie de contamination « gastro-pulmonaire » sur laquelle s'appuie les recommandations de prévention n'est pas la seule voie de développement des HAP et PAVM, et que des mécanismes plus complexes peuvent jouer un rôle (14).

I. 2. Diagnostic

I. 2-1. Diagnostic clinique

Le diagnostic de toute pneumopathie repose sur la triade : signes fonctionnels d'atteintes de l'arbre respiratoire (toux, expectorations purulentes, dyspnée, douleurs thoraciques), imagerie montrant l'atteinte parenchymateuse, et la présence de fièvre ou d'autres signes généraux d'infection (6). L'imagerie est le plus souvent une radiographie pulmonaire mais peut aussi être un scanner thoracique, montrant une image de pneumopathie : soit un foyer systématisé, soit une atteinte interstitielle.

Le diagnostic de PAVM et d'HAP grave est complexe pour plusieurs raisons :

1) les nombreux motifs d'hospitalisation en réanimation peuvent se confondre avec les signes généraux de pneumopathie (19)

- 2) la radio de thorax au lit du patient est d'interprétation difficile (7)
- 3) l'intubation potentielle rend plus délicate l'interprétation des résultats microbiologiques (distinction entre infection et colonisation) (20)

En pratique, le diagnostic est le plus souvent évoqué devant une dégradation des paramètres d'oxygénation, des sécrétions qui deviennent purulentes et de la fièvre.

Des scores de probabilité ont été établis, notamment le score CPIS (Clinical Pulmonary Infection Score : **Tableau 1**), mais il ne fait pas l'unanimité (5). Si le score CPIS est supérieur à 6 ; il est en faveur d'une pneumopathie. Cependant, il n'est pas recommandé de l'utiliser pour le diagnostic initial de pneumopathie (8). Les recommandations internationales et françaises s'accordent sur le fait que les critères diagnostiques cliniques sont à privilégier. Les dosages de marqueurs biologiques d'inflammation (CRP, PCT) ne sont pas recommandés pour le diagnostic de pneumopathies (3).

Tableau 1 : Score CPIS (un score supérieur à 6 est évocateur d'une PAVM)

	0 points	1 point	2 points
Temperature, °C	≥36.5 – ≤38.4	≥38.5 – ≤38.9	≥39.0 or ≤36.0
Leukocyte count, mm ³	≥4,000 – ≤11,000	<4,000 or >11,000	<4,000 or >11,000 >50% immature forms
Tracheal secretion	no tracheal secretion	non-purulent tracheal secretion	purulent tracheal secretion
Oxygenation: PaO ₂ /FIO ₂ , mm Hg	>240 or ARDS*		≤240 and no ARDS*
Chest x-ray	no infiltrates	diffuse infiltrates	localized infiltrates
	* see Table 6 for definition of ARDS		

La stratégie diagnostique retenue en France par la société française d'anesthésie-réanimation (SFAR) est de réaliser une radiographie thoracique chez un patient présentant un tableau clinique compatible avec une pneumopathie. Si cet examen retrouve un aspect de pneumopathie il est alors recommandé de réaliser un prélèvement au niveau de l'arbre respiratoire pour mettre en évidence un ou des microorganismes pathogènes. Après la réalisation du prélèvement, il faut débiter un traitement antibiotique probabiliste. Si le

prélèvement revient négatif, et que la suspicion initiale n'était pas élevée, il est possible d'arrêter l'antibiothérapie (4). L'antibiothérapie doit être systématiquement adaptée à la documentation microbiologique (2), (4), (16). Le résultat microbiologique joue donc un rôle majeur dans l'antibiothérapie des pneumopathies nosocomiales.

I. 2-2. Diagnostic microbiologique actuel

Le diagnostic de pneumopathie repose sur un faisceau d'arguments cliniques, radiologiques et biologiques. L'examen microbiologique de prélèvements respiratoires est recommandé uniquement pour les patients hospitalisés (6). La documentation microbiologique est nécessaire pour guider la prise en charge de ces patients. Toutefois, cette recherche n'est indiquée que si elle est susceptible de changer la prise en charge thérapeutique, en présence de signes de gravité clinique ou d'échec du traitement initial pour les PAC (10).

La grande majorité des HAP sont d'étiologie bactérienne et les virus sont le plus souvent responsables de bronchites ou bronchiolites mais ils peuvent faire le lit d'une infection bactérienne (21). Cependant ils sont aussi responsables d'authentiques pneumopathies chez la personne âgée ou le patient immunodéprimé.

On distingue deux grands groupes de virus :

1) les virus à tropisme respiratoire primaire (Groupe 1) dont la cible est les cellules ciliées de la muqueuse respiratoire et qui provoquent des symptômes localisés aux voies aériennes. Le plus fréquent est le virus Influenza (2).

2) le Groupe 2 est composé de virus à tropisme respiratoire secondaire (dans le cadre de la maladie systémique). Par exemple lors de la rougeole (10).

➤ Prélèvements

Le choix du mode de prélèvement se fait en fonction de l'état de gravité du patient et des pratiques du service où il est hospitalisé. Un pathogène est retrouvé dans environ 70% des cas de PAVM (40 à 90% selon les réanimations) (4). Le type et l'interprétation des prélèvements nécessaires à la documentation microbiologique des HAP et des PAVM est toujours un sujet à controverse (5). En effet une différence majeure entre les recommandations de l'ERS/ESICM/ESCMID/ALAT et de l'IDSA/ATS est la méthode d'obtention des prélèvements respiratoires pour le diagnostic microbiologique. Les recommandations

Américaines sont en faveur de prélèvements non invasifs (aspiration endo-trachéale), alors que les recommandations Européennes sont en faveur de prélèvements distaux (lavage broncho-alvéolaire ou brosse bronchique protégée) (4, 7) .

Les grands types de prélèvements sont :

-L'examen cytobactériologique des crachats (ECBC)

C'est un examen non invasif mais rarement contributif et source d'erreur (8). Il se fait de préférence avec l'aide d'un kinésithérapeute, après rinçage buccodentaire à l'eau stérile, lors d'un effort de toux. Sauf cas particulier (échec du traitement empirique et impossibilité d'un examen sous fibroscopie), l'examen doit être réservé aux surinfections de BPCO, aux recherches de mycobactéries et au suivi de patients atteints de mucoviscidose. La mise en culture n'est effectuée qu'après un examen direct permettant de confirmer la bonne qualité du prélèvement. Seuls les ECBC purulents (>25 leucocytes par champ) et de préférence non contaminés par la salive (< 10 cellules épithéliales par champ) doivent être mis en culture.

-L'aspiration trachéo-bronchique

C'est un examen qui peut être réalisé sans fibroscopie chez les patients intubés. On prélève alors les sécrétions trachéales au niveau du tube d'intubation. Les prélèvements réalisés sous fibroscopie sont probablement à privilégier (2), mais le choix de la méthode employée ne semble pas avoir d'influence sur la mortalité et la consommation d'antibiotiques (5). De ce fait, il est laissé la liberté à chaque service de choisir le type de prélèvement utilisé en routine (20). L'aspiration trachéo-bronchique sous fibroscopie consiste en l'aspiration des sécrétions au niveau trachéo-bronchique.

- Le prélèvement protégé distal (PDP)

Il consiste à insérer sous fibroscopie, un cathéter « protégé » que l'on libère dans le territoire anatomique où réside l'infection afin de réaliser le prélèvement.

-Le lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Il consiste en l'instillation d'eau stérile dans le poumon et la récupération d'une partie du liquide injecté, ce qui permet un drainage plus large et plus distal du territoire pulmonaire atteint.

-Pour les prélèvements à visée de diagnostic virologique, les virus à tropisme respiratoire se multiplient dans les cellules cylindriques ciliées de l'arbre respiratoire. Le prélèvement doit donc recueillir des sécrétions cellulaires, au niveau nasal (par écouvillonnage naso-pharyngé) ou dans l'arbre bronchique (par des prélèvements plus distaux (10). En fonction du site de prélèvement les résultats peuvent être différents. La pathogénicité des virus dans les HAP est encore un sujet d'étude (22).

➤ Culture bactériologique

Il existe un faisceau d'arguments en faveur d'une analyse quantitative ou semi-quantitative de prélèvements distaux (réalisés sous fibroscopie) pour optimiser le diagnostic bactériologique (prélèvements moins susceptibles d'être contaminés par la flore oro-pharyngée et ciblant plus précisément le site de l'infection). Les limites de cette pratique se trouvent chez les patients graves qui présentent des troubles de la ventilation et chez qui une fibroscopie est contre-indiquée. De plus, cela nécessite une expertise technique médicale qui n'est pas forcément disponible dans tous les centres hospitaliers (2).

Le diagnostic bactériologique repose sur l'examen microscopique après coloration de Gram et la mise en culture des prélèvements respiratoires. Cette méthode peut se révéler longue (48 à 72 heures) et parfois complexe. Les facteurs influençant la justesse du résultat bactériologique sont : le type de prélèvement réalisé, l'absence d'antibiothérapie préalable, la rapidité du transport et de la prise en charge par le laboratoire (10). L'analyse bactériologique peut parfois être complexe si le prélèvement est polybactérien ou contaminé par la flore oro-pharyngée. Il est possible d'utiliser des géloses sélectives qui permettent d'isoler des pathogènes spécifiques (gélose cétrimide pour *P. aeruginosa* ou gélose Chapman pour *S. aureus*).

On distingue :

- 1) la culture semi-quantitative (avec un seuil de significativité et une numération de la quantité des bactéries ayant poussé sur milieux gélosés)
- 2) la culture qualitative (on note alors la présence ou l'absence de bactéries pathogènes en culture, sans numération)

Les études qui ont comparé les deux méthodes d'analyse n'ont pas montré de différence significative sur le taux de mortalité, la durée de ventilation mécanique, la durée de séjour en réanimation et l'épargne antibiotique dans la prise en charge des PAVM (17).

La culture semi-quantitative se déroule en deux grandes étapes :

1) Examen direct au microscope (coloration de Gram) et ensemencement : L'examen direct est contributif si un ou deux types de bactéries sont présents en grand nombre, avec de nombreux polynucléaires. Toutefois, cet examen est peu fiable dans la plupart des autres situations. La mise en culture, consiste à ensemercer les milieux de cultures, après une éventuelle dilution, sur différents milieux gélosés. L'ensemencement est calibré, c'est-à-dire que chaque milieu de culture est ensemençé avec une quantité précise de prélèvement pour permettre une quantification. (**Annexe 4**) (2).

2) L'interprétation des cultures et la réalisation des antibiogrammes. Dans la plupart des laboratoires, les bactéries sont identifiées par spectrométrie de masse après lecture des cultures. Du fait de la non stérilité des prélèvements et du risque de contamination, des seuils de significativité ont été établis pour la culture semi-quantitative (**Annexe 4**). Quelle que soit la méthode employée, en cas d'examen positif, les résultats définitifs sont disponibles au mieux 48h après le prélèvement, mais les premières identifications bactériennes peuvent être disponibles 12h après le prélèvement.

➤ PCR (Polymerase Chain Reaction) :

La PCR est une technique qui permet de détecter dans un échantillon une séquence d'acides nucléiques spécifique. Elle est utilisée dans de nombreux domaines scientifiques. Elle consiste en une suite de réactions enzymatiques qui permettent de sélectionner puis d'amplifier un fragment d'ADN spécifique. En microbiologie, son intérêt à d'abord été de détecter les micro-organismes dont la culture était complexe ou impossible, comme les virus et les bactéries intracellulaires, microorganismes non ou difficilement visibles au microscope optique. A l'heure actuelle son utilisation se développe afin de détecter tous les pathogènes possiblement impliqués dans un processus infectieux (tests syndromiques) (23)

Avant de réaliser la PCR une extraction et une purification de l'ADN présent dans l'échantillon biologique est nécessaire. Cette étape est délicate et nécessite des précautions importantes pour éviter toute contamination.

La PCR permet ensuite l'amplification des extraits purifiés d'ADN : une suite de cycles chacun composé de 3 étapes qui se déroulent à des températures différentes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Les cycles se répètent en boucle environ 20 à 40 fois en fonction du type de PCR. La réaction nécessite des amorces spécifiques qui encadrent la région d'ADN que l'on cherche, des enzymes pour synthétiser l'ADN (Taq polymérase) et des acides nucléiques, ainsi qu'un thermocycleur (24).

1) La dénaturation consiste à séparer les deux brins d'ADN et se déroule à 95°. A cette température, l'ADN perd sa structure en double hélice et on obtient un ADN simple brin.

2) L'hybridation est la fixation des amorces sur la séquence d'ADN recherchée. Elle se déroule entre 50 et 60°.

3) L'élongation est la reformation du double brin d'ADN à partir des amorces. Elle se déroule à 72° et utilise une enzyme synthétisant l'ADN à partir d'acides nucléiques (ADN Polymérase).

Après un certain nombre de cycles (dépendant de la quantité d'ADN recherchée présent dans le prélèvement), l'amplification de l'ADN cible atteint un plateau (**Figure 1**), lorsqu'il n'y a plus assez de réactif pour synthétiser de nouveaux brins.

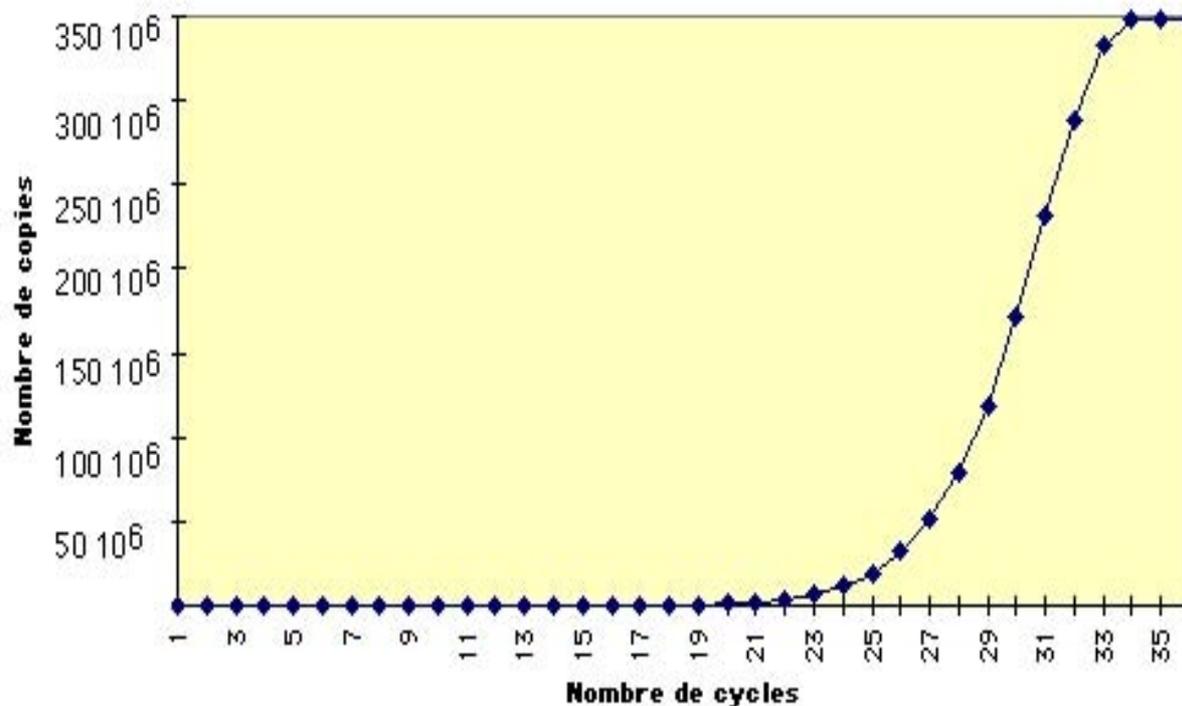


Figure 1 : Représentation schématique d'une réaction de PCR

Pour chaque PCR, il existe des contrôles permettant de vérifier le bon déroulement de la réaction : généralement un contrôle d'amplification pour vérifier que l'amplification a bien eu lieu et un contrôle négatif pour vérifier qu'il n'y a pas eu de contaminations des réactifs de la PCR (25).

Dans le cas d'une PCR simple ou à point final, il n'y a pas de quantification, le résultat est qualitatif. Pour révéler les produits d'amplification, on peut utiliser divers moyens : gel d'agarose, fluorescence, lecture optique (23).

PCR multiplex et PCR « nichée » :

La PCR multiplex permet de détecter plusieurs séquences d'ADN différentes au cours de la même réaction de PCR. On utilise alors plusieurs sets d'amorces spécifiques des cibles recherchées. C'est une technique plus complexe et habituellement moins sensible que la PCR à cible unique. On utilise une analyse au point terminal de la réaction pour distinguer des produits. Les PCR multiplex ont comme principale limitation : la génération de produits de

réactions non spécifiques (par des interactions amorces-amorces) qui interfèrent avec l'amplification des cibles recherchées et diminue la sensibilité de la technique (24).

La PCR « nichée » ou « par polymérase emboîtée » se révèle particulièrement intéressante dans le cas des PCR multiplex. Elle permet de réduire la quantité de produits non spécifiques (due à la liaison des amorces à des sites non recherchés) et ainsi d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la PCR. Elle consiste en une amplification de la cible en deux étapes à l'aide de deux couples d'amorces : une première PCR avec une paire d'amorces dites « externes », pour amplifier spécifiquement la région d'ADN recherchée. La deuxième PCR est réalisée avec une seconde paire d'amorces dites « internes » permettant d'amplifier spécifiquement une séquence révélée par le couple d'amorces « externes ». Grâce à la première étape, le risque de liaison de cette seconde paire d'amorces à des sites incorrects est limité, et le produit de cette seconde PCR est très peu contaminé. Les produits du second cycle peuvent être détectés par une PCR quantitative ou à point final.

PCR quantitative/en temps réel et courbes de fusion.

La PCR quantitative est une méthode particulière de PCR permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN cible présent dans le prélèvement. Elle est basée sur la détection de l'émission de fluorescence lors de l'amplification de l'ADN. Ce signal est proportionnel à la quantité d'amplicons créés pendant la PCR. La détection se fait en continu (« temps réel ») par un automate.

Une réaction de PCR quantitative classique peut se décomposer en 3 étapes (**Figure 2**) :

- 1) La quantité d'ADN amplifiée est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (seuil de détection de la fluorescence par l'automate).
- 2) Phase exponentielle de croissance : la quantité d'ADN amplifié génère un signal fluorescent supérieur au bruit de fond, puis le nombre de produits amplifiés double à chaque cycle.
- 3) Dernière étape correspondant à une phase de plateau : Le système ne permet plus une amplification exponentielle du fait de la quantité limitante de certains réactifs.

La fluorescence est donc détectée en temps réel par l'automate. L'analyse du signal de fluorescence est basée sur le concept de "cycle seuil" ou cycle threshold (Ct). C'est le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (valeur seuil).

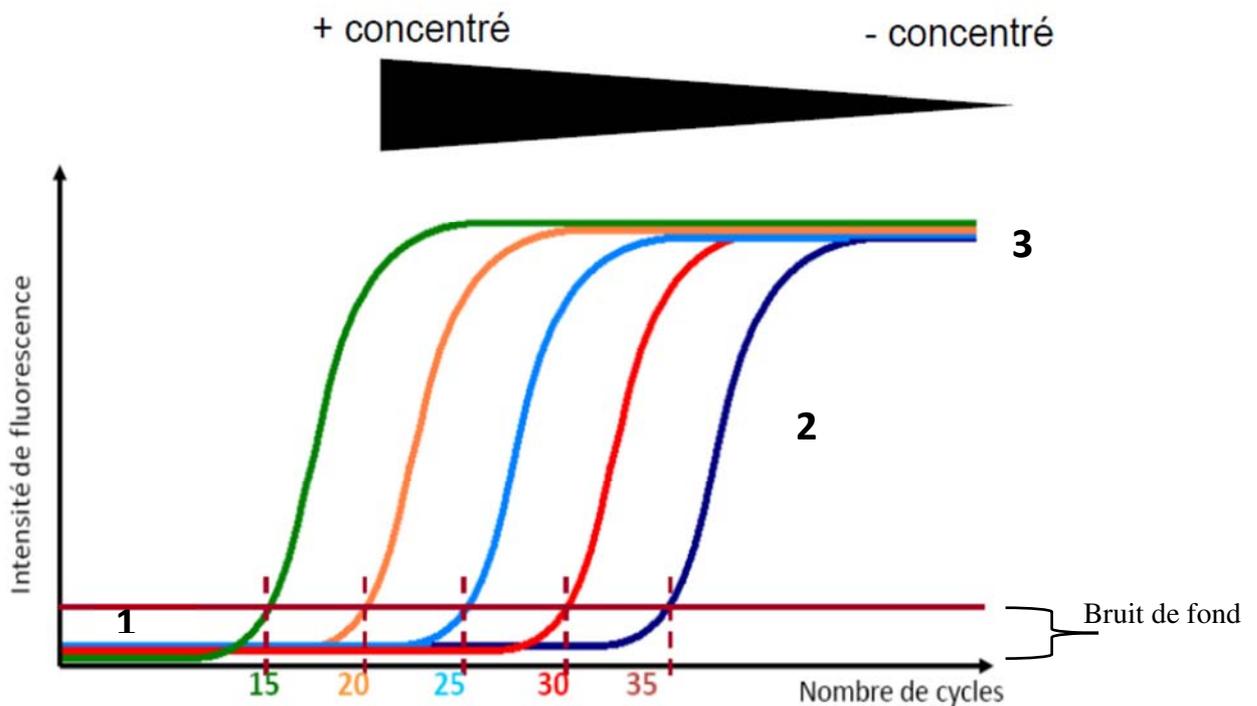


Figure 2 : Schéma de la réaction de PCR

On mesure donc la quantité d'ADN en déterminant le nombre de cycles nécessaires pour atteindre une fluorescence significativement supérieure au bruit de fond (Ct). Une gamme d'étalonnage permet ensuite la réalisation d'une quantification de l'ADN présent dans le prélèvement. Cette gamme est réalisée à partir de « standards » (échantillons dont on connaît à l'avance la quantité d'ADN). Ces « standards » sont inclus dans la même réaction de PCR que l'échantillon test. On compare ensuite le Ct de l'échantillon étudié avec les résultats des échantillons de la gamme et on obtient ainsi une quantification (**Figure 3**).

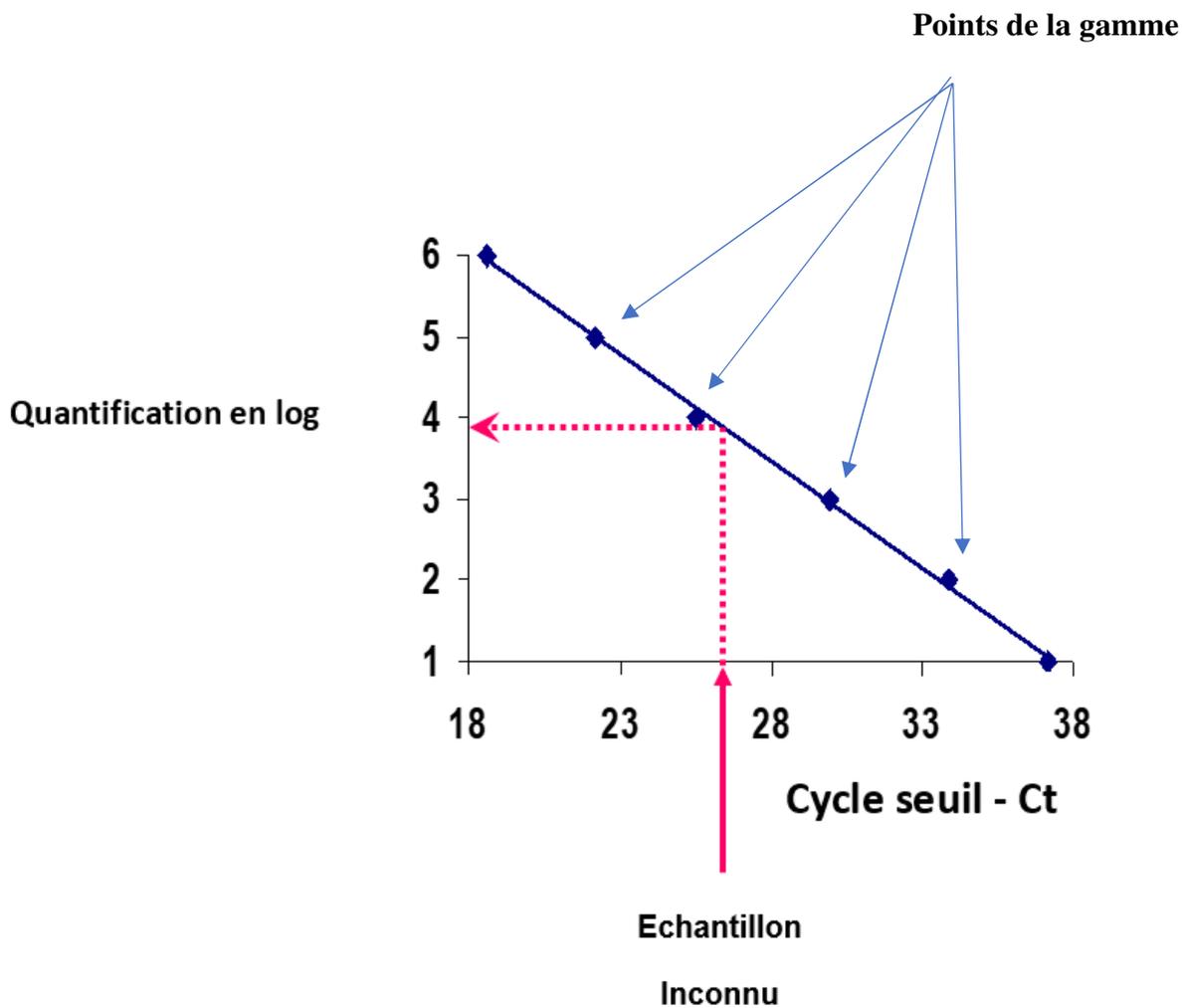


Figure 3 : Représentation simplifiée de la quantification d'une PCR quantitative

Il existe deux outils principaux qui permettent une émission de fluorescence lors de l'amplification de l'ADN : les agents intercalants et les sondes d'hybridation :

1) Les agents intercalants (par exemple SYBR green) sont des molécules dont l'émission de fluorescence augmente lorsqu'elles sont liées à l'ADN double brin. Leur liaison à l'ADN double brin n'est pas ciblée.

2) Les sondes d'hybridation vont se lier spécifiquement à la séquence d'ADN recherchée. Elles sont composées d'un Fluorochrome émetteur (reporter) en 5' et d'un fluorochrome suppresseur (quencher) en 3'. Quand il est stimulé, le fluorochrome émetteur transfère son énergie au fluorochrome suppresseur voisin qui dissipe l'énergie sous forme de chaleur. Lors de l'élongation (donc de l'amplification), la Taq polymérase déplace la sonde et l'hydrolyse. Le reporter est alors libéré permettant ainsi l'émission de fluorescence qui augmente à chaque cycle proportionnellement aux taux d'hydrolyse de la sonde. L'activité de la Taq

polymérase étant spécifique de l'ADN double brin, les sondes libres en solution demeurent intactes et aucune fluorescence n'est émise (26).

Une courbe de fusion au cours de la PCR en temps réel, est une étape supplémentaire à la fin des cycles d'amplification. Elle est nécessaire lors de l'utilisation d'agents intercalants. Elle permet de contrôler qu'un seul produit de PCR a été amplifié et qu'il s'agit bien de la cible recherchée et non de produits aspécifiques (25). En effet, chaque produit d'amplification est caractérisé par sa température de fusion (T_m). C'est la température pour laquelle 50% de l'ADN double brin est dissocié. Le T_m varie avec la composition en guanine et cytosine et la taille du produit d'amplification. Il est mesuré en suivant l'évolution de la fluorescence lorsque la température augmente (seule l'ADN dissocié produit de la fluorescence). On fait donc l'acquisition de l'intensité de fluorescence en continu à une température variant de 45°C à 75°C par palier de 0.1°. Cela permet de différencier les produits de la PCR et de vérifier que l'on a bien amplifié une des cibles recherchées.

I. 3. Antibiothérapie

La précocité de l'introduction d'un traitement antibiotique adapté est un enjeu majeur dans la guérison et le pronostic d'une pneumonie bactérienne (4). De plus, l'épargne antibiotique est un enjeu majeur de santé publique, particulièrement chez les patients de réanimation très exposés au risque de portage de bactéries multi-résistantes. La mise en place de nouvelles méthodes diagnostiques permettant la détection plus rapide de bactéries pathogènes au sein de prélèvements respiratoires et de leurs résistances aux antibiotiques, devrait permettre d'optimiser la prescription d'antibiotiques et ainsi améliorer la prise en charge des pneumopathies acquises à l'hôpital.

En effet, une antibiothérapie adaptée le plus précocement possible a montré une réduction de la morbi-mortalité (27). De plus, il a aussi été montré qu'une antibiothérapie non adaptée sur des pathogènes multi-résistants est responsable d'une augmentation de la morbi-mortalité (28). Les différentes recommandations internationales insistent sur le fait que pour chaque patient, il est important de déterminer si celui-ci sera éligible à une antibiothérapie probabiliste de spectre étroit, ou s'il faudra couvrir d'emblée des bactéries plus résistantes.

Les pneumonies acquises à l'hôpital ont été séparées en deux groupes en fonction de la durée d'hospitalisation précédant la survenue de la pneumopathie. En effet l'étiologie bactérienne peut varier en fonction de la durée d'hospitalisation et donc l'antibiothérapie probabiliste sera différente. Les pneumopathies sont dites précoces si elles surviennent avant 5 jours d'hospitalisation. Dans ce cas les bactéries impliquées sont généralement *S. aureus*, *S. pneumoniae* ou *H. influenzae*. Les pneumonies apparaissant au-delà de 5 jours d'hospitalisation sont dites tardives. Les bactéries impliquées sont généralement des entérobactéries, *P. aeruginosa*, *A. complex baumannii* et *S. aureus* (4). Toutefois cette distinction semble s'avérer caduque dans les hôpitaux où il existe une forte proportion de BMR et BHR (3). Chez les patients de réanimation la prise en compte de cette distinction peut être associée à une surconsommation d'antibiotiques à large spectre (28).

I. 3-1. Antibiothérapie probabiliste

A l'heure actuelle, la première antibiothérapie est probabiliste, c'est-à-dire qu'elle est initiée sans aucune documentation microbiologique de l'épisode aigu. Une antibiothérapie probabiliste est considérée adaptée si elle est introduite de manière précoce par rapport au début de l'infection et si le spectre de l'antibiotique couvre la ou les bactéries responsable(s) de l'infection (28). Le début de l'antibiothérapie a un impact majeur sur la guérison, en raison notamment de la prolifération du pathogène dans le poumon et de l'inoculum bactérien. En effet, même si le germe est résistant *in vitro*, l'antibiotique pourra avoir une action partielle *in vivo* en fonction de l'espèce bactérienne, de l'inoculum, du type de résistance et de la posologie (29).

Une antibiothérapie adaptée le plus précocement possible est un challenge pour les réanimateurs, microbiologistes et les infectiologues qui les conseillent, car le diagnostic clinique précoce est parfois complexe. Les signes cliniques peuvent être peu spécifiques et les résultats microbiologiques sont disponibles après plusieurs jours, alors que ce sont les premières heures de l'infection qui comptent le plus (28).

Le choix de l'antibiothérapie probabiliste prend en compte les facteurs de risque d'infection par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, c'est-à-dire principalement les entérobactéries productrices de bêta-lactamase à spectre étendu (E-BLSE), le *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM), et les bacilles non fermentants (BNF).

- 1) Les entérobactéries résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération (et aux pénicillines associées aux inhibiteurs de bêta-lactamase) :

Ce sont principalement les bactéries produisant une bêta-lactamase à spectre étendu. Plus rarement cette résistance est liée à une hyperproduction de céphalosporinase. L'HAS a en 2019 mis à jour ses recommandations pour identifier les patients à risque. Les facteurs de risque sont : l'exposition à un antibiotique (amoxicilline-acide clavulanique, C2G, C3G, fluoroquinolones) dans les 3 mois précédents ; une infection nosocomiale ou liée aux soins ; un antécédent de colonisation ou d'infection à entérobactérie résistante aux C3G dans les 3 mois ; un voyage à l'étranger dans les 3 mois dans les zones géographiques connues à risque (notamment le sous-continent Indien, l'Asie du Sud-Est, le Moyen-Orient et l'Afrique du Nord, le Bassin Méditerranéen) (30).

En France le portage rectal de bactéries BLSE en réanimation en 2018 a été estimé à 21,7% (31). La probabilité d'être porteur augmente avec la durée d'hospitalisation. Parmi les porteurs de E-BLSE, on estime qu'environ 10% vont développer une infection à E-BLSE. Un portage de E-BLSE n'est donc pas synonyme d'infection à ce type de bactérie et une stratégie d'antibiothérapie uniquement basée sur des dépistages positifs peut amener à une surconsommation d'antibiotiques (32).

La principale option thérapeutique pour les infections à E-BLSE est l'utilisation d'un carbapénème. En cas de pneumonie avec colonisation à E-BLSE, qu'elle soit rectale ou respiratoire, un carbapénème (imipénème ou méropénème) est recommandé en cas de signes de gravité ou d'immunodépression, et en l'absence de ces critères, une bithérapie sans carbapénème mais comprenant l'amikacine est possible (30). Par définition, les pneumonies admises en réanimation présentent des signes de gravité. Afin de ne pas utiliser les carbapénèmes avec une fréquence importante, l'utilisation du dépistage rectal de BLSE peut être une aide. La valeur prédictive négative, si le dépistage est négatif et date de moins de 7 jours (>99%) (32) est excellente pour les infections à BLSE.

- 2) SARM (résistance à toutes les bêta-lactamines sauf la ceftaroline et le ceftobiprole et très fréquemment associée à une résistance aux fluoroquinolones).

La résistance est rare en France (<10%) (10). Elle doit surtout être prise en compte en cas d'antécédents d'infection ou de colonisation à SARM. Le linézolide est la molécule de choix dans ce cas. La daptomycine ne peut être utilisée car elle est inactivée par le surfactant.

3) *P. aeruginosa*

Cette bactérie doit être prise en compte en cas de pneumonie précoce avec facteur de risque de *P. aeruginosa* (BPCO sévère, dilatation des bronches, mucoviscidose ou colonisation antérieure à *P. aeruginosa*) ou d'infection tardive (> 5 jours) (30). Les molécules de choix sont le céfépime, la ceftazidime ou la pipéracilline-tazobactam.

4) Bacilles à Gram négatif producteurs de carbapénèmase

Ils sont encore très rares en France, mais le nombre d'infections à ces bactéries risque d'augmenter dans le futur. La détection la plus précoce possible de ces bactéries va avoir un impact majeur sur la morbi-mortalité et sur la dissémination de celles-ci. L'antibiothérapie doit se faire au cas par cas, après avis spécialisé (30).

Le choix d'antibiothérapie probabiliste est aussi fait en fonction de la durée de ventilation et d'hospitalisation préalable à l'infection, et tient compte de l'épidémiologie locale d'antibiorésistance (33). Il est absolument nécessaire d'établir une épidémiologie locale pour chaque centre de réanimation et de la mettre à jour régulièrement. Cela permet d'ajuster l'antibiothérapie probabiliste le plus étroitement possible et de la centrer sur les pathogènes locaux (3). Parfois la décision d'antibiothérapie probabiliste est prise avec l'aide de l'examen direct réalisé sur un prélèvement respiratoire profond.

I. 3-2. Antibiothérapie adaptée

Lorsque la pneumonie est documentée, la durée recommandée de l'antibiothérapie est de 7 jours si l'antibiothérapie probabiliste était adaptée (4). Elle est prolongée si l'antibiothérapie probabiliste n'était pas adaptée. En cas d'évolution défavorable, d'immunodépression sévère, d'empyème, de pneumonie nécrosante ou abcédée, elle est prolongée de 14 jours, voire 6 semaines en cas d'abcès (6).

Lorsqu'une pneumonie associée aux soins est documentée bactériologiquement il est indispensable d'adapter l'antibiothérapie. Cette adaptation doit être systématique même pour quelques prises (4). Dans les pneumonies documentées à entérobactéries résistantes aux C3G, il est recommandé d'utiliser une monothérapie. En cas de BLSE, il est possible d'utiliser la pipéracilline-tazobactam si la CMI est ≤ 4 mg/L. Si le traitement probabiliste était adapté, il est possible de faire un relais par des fluoroquinolones lorsque la souche est sensible à toutes les quinolones. Dans les cas d'hyperproduction de céphalosporinase et sans production de BLSE, il faut utiliser de préférence le céfépime à un carbapénème (29). Il n'existe pas de données dans la littérature permettant d'émettre des recommandations sur l'utilisation de la témocilline et du cotrimoxazole comme alternative aux carbapénèmes pour les pneumonies à E-BLSE. Leur utilisation est possible sous réserve d'un avis spécialisé en antibiothérapie (30).

Les nouvelles bêta-lactamines ceftazidime-avibactam (CZA) et ceftolozane-tazobactam (C/T) sont à réserver en dernière option comme alternative aux carbapénèmes (30). Elles peuvent avoir un intérêt sur les bactéries productrices de BLSE et carbapénémase (KPC) et les *P. aeruginosa* résistants aux carbapénèmes. Elles ont montré une non-infériorité par rapport au méropénème dans les pneumopathies nosocomiales (34) (35).

Partie II : Etude Oracle-phase 1 et présentation du panel Pneumonia *plus* (FilmArray®)

II. 1- Description de l'étude Oracle-phase 1

II. 1-1. Protocole de l'étude

Ce travail de thèse s'appuie sur l'étude Oracle-phase 1 qui a eu lieu au CHU de Nantes entre les mois d'Octobre 2018 et Janvier 2020. Ce projet avait pour but d'évaluer les performances du panel PPFA par rapport aux techniques diagnostiques de routines et de mesurer son impact médico-économique potentiel dans la prise en charge des HAP en réanimation.

L'étude a porté sur 100 patients présentant une suspicion de pneumopathie sévère acquise à l'hôpital. Ils étaient hospitalisés dans 3 services de réanimation différents de post-chirurgie (neurochirurgie, chirurgie générale, chirurgie thoracique). Un des services prenait aussi en charge des patients brûlés. Ces unités étaient réparties dans deux centres du CHU de Nantes (Hôtel Dieu et Hôpital Nord Laënnec) distants d'environ 10 kilomètres. Les patients étaient inclus dans le groupe d'étude ATLANREA. L'étude a été approuvée par le comité d'éthique local (GNEDS, Nantes, France). Les patients et leur famille étaient informés de l'étude.

Les critères d'inclusion d'un patient étaient :

- au moins 48 heures d'hospitalisation en réanimation ou de ventilation mécanique,
- au moins 2 signes cliniques évocateurs de pneumopathie parmi ceux-ci : fièvre, sécrétions purulentes, hyperleucocytose
- une nouvelle image ou une modification de l'imagerie évocatrice d'une infection pulmonaire.

Les patients inclus ont été prélevés au moment du diagnostic (=J1) : une aspiration trachéo-bronchique (AT) et/ou un lavage broncho-alvéolaire (LBA) étaient réalisés de préférence sous fibroscopie bronchique. Une seconde AT était réalisée si possible, deux jours

plus tard (=J3), généralement sans fibroscopie bronchique. Au total, 237 prélèvements respiratoires ont été effectués et analysés : 82 AT J1, 76 LBA J1 et 79 AT J3.

Les prélèvements étaient pris en charge selon la procédure habituelle du laboratoire et il était effectué un test PPFA en parallèle. Le résultat de ce test n'était pas communiqué aux cliniciens, ni aux biologistes. Les prélèvements arrivés en dehors des heures ouvrables du laboratoire étaient pris en charge le lendemain et conservés à température ambiante. L'objectif principal de cette première phase était d'étudier la concordance microbiologique entre le PPFA (FilmArray®) et la culture bactérienne standard.

II. 1-2. Le panel *Pneumonia plus* (FilmArray®) : un outil diagnostique d'infection respiratoire

Le FilmArray® est un dispositif automatisé de diagnostic *in vitro* destiné à la détection de séquences cibles d'acides nucléiques multiples contenues dans des échantillons cliniques. Les réactions de PCR et leurs analyses sont totalement automatisées et se déroulent dans une seule « cassette », placée dans un automate. Il n'est pas nécessaire de réaliser un « prétraitement » des échantillons. Le logiciel du FilmArray® contrôle le fonctionnement de l'automate, collecte, analyse et conserve les données générées par l'automate.

Chaque cassette contient tous les produits de la réaction (sous forme lyophilisée). Ainsi la combinaison de l'extraction, la purification des acides nucléiques et les réactions de PCR (36) se font dans un système fermé, cela permet de limiter le risque de contamination (24). Ce système de cassette confère une adaptabilité au FilmArray® (intégration possible de nouvelles cibles) et la possibilité d'avoir différents panels (respiratoire, méningé...) sur un même automate.

La technologie FilmArray® combine PCR multiplex et « nichée » avec la possibilité d'une quantification en utilisant la technologie des puces à ADN. La puce à ADN (DNA microarray), consiste en un support rigide (verre ou nylon) de quelques centimètres carrés, sur lequel de courtes séquences d'ADN (appelées sondes) ont été déposées. Cette technique de révélation des produits de PCR repose sur le principe d'hybridation (37) : deux fragments d'acides nucléiques peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu. Les sondes sont spécifiques d'une séquence d'acide nucléique. Les cibles préalablement marquées (par un fluorochrome) sont mises au

contact de ces sondes et l'hybridation se fait de manière spécifique. Après l'hybridation on peut réaliser une PCR quantitative afin de refléter la quantité initiale des cibles dans l'échantillon.

Les étapes de la réaction du FilmArray® (Figure 4) :

1) Extraction et Purification : Lyse des cellules, bactéries et virus pour libérer les acides nucléiques qui se fixent à des billes magnétiques. Puis lavage pour éliminer le surplus d'acides nucléiques, pendant qu'un aimant maintient les billes magnétiques. Elution pour libérer les acides nucléiques des billes.

2) Première étape de la PCR « nichée » puis dilution pour évacuer les amorces non hybridées.

3) Ajout d'un master mix et passage des produits de la première PCR dans les puits de réaction où se situent les puces à ADN (chaque puits contient des amorces spécifiques d'une cible).

4) Deuxième étape de la PCR « nichée » avec amplification des produits de la première PCR, avec lecture de la fluorescence émise à chaque cycle et réalisation de la quantification.

5) Analyse des amplicons avec utilisation de courbes de fusion afin de vérifier leur spécificité.

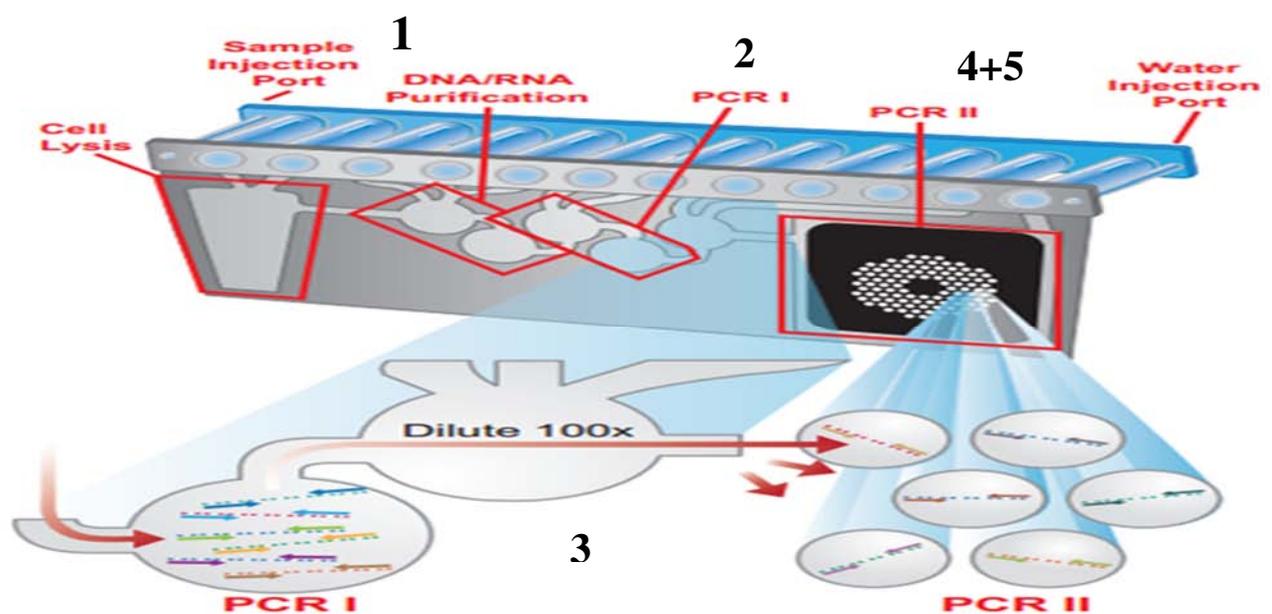


Figure 4 : Cassette FilmArray® (vue de dessous) et déroulement des étapes de la réaction.

Il existe deux contrôles internes dans le test FilmArray® :

- Le RNA Process Control (*Schizosaccharomyces pombe*). Il permet de vérifier le bon déroulement de toutes les étapes de l'analyse (contrôle d'amplification).
- Le QSM – Quantified Standard Material. Acide nucléique qui est traité avec l'échantillon et sert de référence interne pour la quantification des cibles en copies/ml.

Les résultats des contrôles doivent être valides (« Passed ») pour que le logiciel du FilmArray® rende le résultat. Il n'y a pas de contrôle négatif car les réactions de PCR se déroulant dans un circuit fermé, il y a, à priori, peu de risque de contamination. En cas d'échec d'un test il est conseillé de le relancer (le fournisseur s'engage à ne pas faire payer les tests en échec).

Le PPFA peut détecter 18 bactéries (dont 3 bactéries intracellulaires), 9 virus et 7 gènes de résistance aux antibiotiques. Il a deux modes d'analyse : SPUTUM, qui a été validé pour les crachats et les aspirations trachéo-bronchiques, et BAL, validé pour les LBA (il n'est pas validé pour les PDP).

Les bactéries détectées sont les principales responsables de PAC et d'HAP (**Tableau 2**). Une numération semi-quantitative est rendue pour les bactéries extracellulaires grâce à la PCR quantitative. Les bactéries intracellulaires et les virus sont rendus de manière qualitative. Les virus détectés sont les principaux virus à tropisme respiratoire : rhinovirus/entérovirus, Virus influenza A et B, coronavirus (espèces 229E, OC43, HKU1, NL63) et MERS-CoV, métapneumovirus, adénovirus, VRS, Virus para influenzae. Le PPFA ne peut différencier les genres entérovirus et rhinovirus. Cette détection de virus est importante afin d'identifier des virus émergents et peut apporter un diagnostic à une infection chez des patients immunodéprimés.

Les principaux pathogènes absents du panel sont : *Stenotrophomonas maltophilia*, des entérobactéries du groupe 3 (*H. alvei*, *Morganella morganii*) ainsi que les genres *Citrobacter* spp et *Providencia* spp. La particularité de ces bactéries est (pour la majorité) une résistance naturelle à l'amoxicilline-acide clavulanique.

Tableau 2 : Cibles du Pneumonia plus (FilmArray®)

15 bactéries avec numération semi-quantitative (10^4 , 10^5 , 10^6 , and $\geq 10^7$ copies ADN/ml)

3 bactéries atypiques

<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i> complex	<i>Chlamydia pneumoniae</i>
<i>Enterobacter cloacae</i> complex	<i>Legionella pneumophila</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	7 familles de virus
<i>Klebsiella (enterobacter) aerogenes</i>	Adenovirus
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coronavirus (229E, OC43, HKU1, NL63) et MERS-CoV
<i>Klebsiella pneumoniae</i> group	Metapneumovirus
<i>Moraxella catarrhalis</i>	Influenza A et B
<i>Proteus spp.</i>	Virus para influenza
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Rhinovirus/Enterovirus
<i>Serratia marcescens</i>	VRS
<i>Staphylococcus aureus</i>	
<i>Streptococcus agalactiae</i>	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	
<i>Streptococcus pyogenes</i>	

La semi-quantification dont l'unité est la copie/ml est décrite par le fabricant Bio Mérieux® comme « analogue » à la semi-quantification de la culture. Les intervalles de la quantification sont représentés sur **la Figure 5**. Ainsi de l'ADN bactérien quantifié à $10^{3.5}$ copies/ml peut être rendu positif par l'automate. Ce seuil est bien inférieur au seuil de significativité des aspirations trachéo-bronchiques (10^5 UFC/ml), mais aussi des LBA (10^4 UFC/ml).

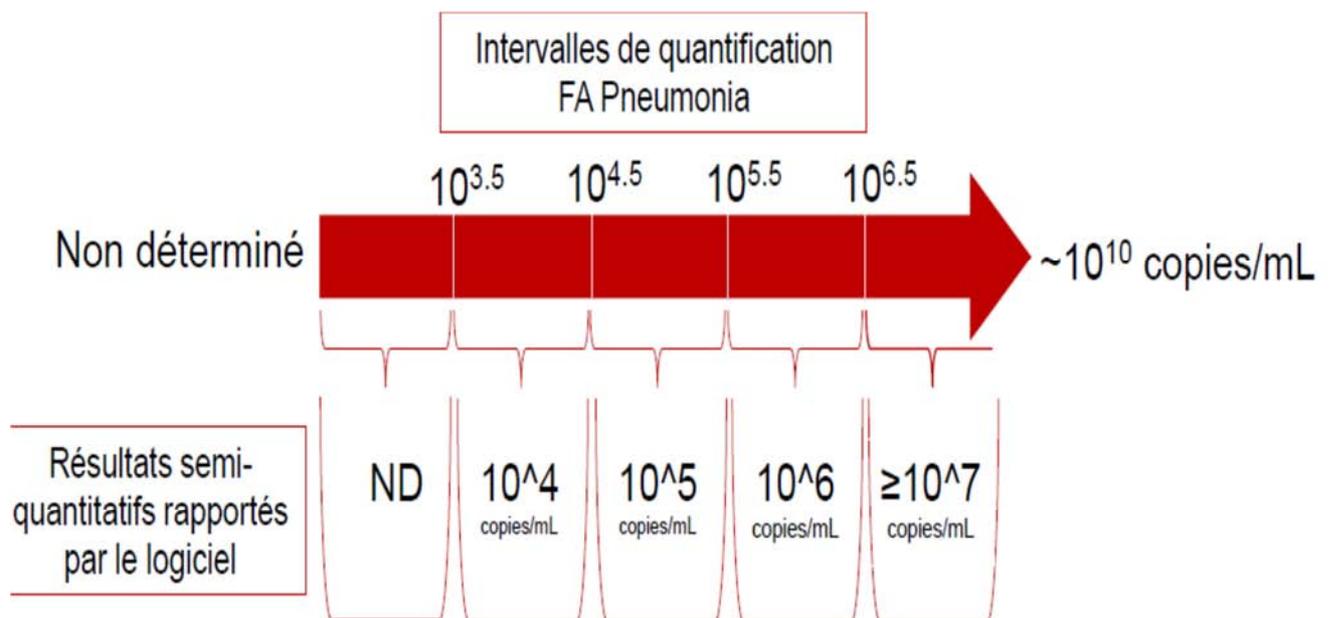


Figure 5 : Intervalles de quantification du PPFA

Parmi les 7 gènes de résistance détectés, 6 concernent des bactéries à Gram négatif. Si un gène de résistance est détecté sans bactérie correspondante, celui-ci ne sera pas signalé par l'automate (par exemple, un gène codant pour une BLSE produite par une entérobactérie hors panel, ne serait pas rendu si aucun BGN n'est détecté dans l'échantillon). De plus, en cas de prélèvement polybactérien, lorsqu'un gène de résistance (BLSE ou carbapénèmase) est identifié, on ne sait pas quelle espèce bactérienne porte la résistance. Dans le **Tableau 3** figurent les gènes de résistance détectés par le panel et les bactéries concernées par ces résistances. L'existence de carbapénèmase OXA-48 et ses apparentés n'a pas été décrite pour les genres *Acinetobacter* et *Pseudomonas* (38).

Tableau 3 : Gènes codant pour des résistances bactériennes et bactéries correspondantes ciblées par le PFFA (données fournisseur).

Classe de résistance	BLSE	Carbapénémase		β-lactame (mécilline R)
Gènes de résistances	CTX-M	KPC / VIM / IMP / NDM	Oxa-48-like	mecA/C et MERJ
Bactéries concernées	<i>Acinetobacter calcoaceticus -baumannii</i> complexe <i>Enterobacter cloacae</i> complexe <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> groupe <i>Proteus spp.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> complexe <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> groupe <i>Proteus spp.</i> <i>Serratia marcescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	

La recherche de la résistance à la métiline chez *S. aureus* est basée sur la détection de 3 composants différents : la présence de *S. aureus* dans le prélèvement, la présence d'un gène *mecA* ou *mecC* et la présence d'une région spécifique de la cassette SCCmec (MREJ) liée au génome de *S. aureus*. La résistance à la métiline est rendue seulement si les 3 composants sont détectés (**Tableau 4**). Ce test combiné permet d'éviter certains faux positifs, car les gènes *mecA/C* peuvent être présents chez les staphylocoques à coagulase négative (39).

Tableau 4 : Détection de SARM par le PPFA

Résultat du test mec A/C et MREJ du <i>Pneumoplus</i> (FilmArray®)	Résultat du test <i>S. aureus</i> du <i>Pneumoplus</i> (FilmArray®)	Mec A/C	MREJ
DéTECTÉ	DéTECTÉ	+	+
Non détecté	DéTECTÉ	+	-
Non détecté	DéTECTÉ	-	+
Non détecté	DéTECTÉ	-	-
N/A	Non détecté	+/-	+/-

Réalisation technique du PPFA :

La technologie PPFA est une technique de biologie moléculaire. Sa réalisation nécessite donc de respecter des conditions strictes pour éviter les contaminations, c'est-à-dire que la préparation de la cassette doit être réalisée sous hotte à flux laminaire, avec des gants. Il n'y a pas de prétraitement de l'échantillon, ni de centrifugation.

La préparation de la cassette dure quelques minutes, selon le protocole suivant :

- 1) Réhydratation des réactifs (qui sont sous forme lyophilisée),
- 2) Prélèvement de l'échantillon respiratoire à l'écouvillon pendant au moins 10 secondes,
- 3) Déchargement de l'écouvillon dans une solution tampon,
- 4) Injection de cette solution dans la cassette,
- 5) Introduction de la cassette dans l'automate,
- 6) Démarrage du test.

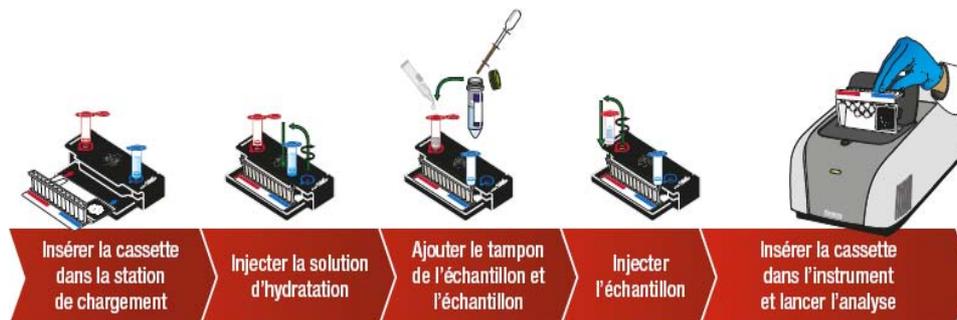


Figure 6 : Préparation d'une cassette FilmArray®

Rendu du résultat par l'automate :

 FilmArray® Pneumonia Panel <i>plus</i> - IVD		 A BIOMÉRIEUX COMPANY www.BioFireDx.com	
Run Information			
Sample ID	191272131	Run Date	07 May 2019 2:54 PM
Protocol	BAL v3.3	Serial No.	19412470
Pouch Type	Pneumoplus v2.0	Lot No.	379118
Controls	Passed	Operator	Sophie Gibaud (SG)
Run Status	Completed	Instrument	2FA00264
Detection Summary			
Bacteria			
	Bin (copies/mL)	Bin (copies/mL)	
		10 ⁴	10 ⁵
		10 ⁶	≥10 ⁷
Detected: ✓	10 ⁶ <i>Klebsiella pneumoniae</i> group		
<p>Note: Detection of bacterial nucleic acid may be indicative of colonizing or normal respiratory flora and may not indicate the causative agent of pneumonia. Semi-quantitative Bin (copies/mL) results generated by the FilmArray Pneumonia Panel <i>plus</i> are not equivalent to CFU/mL and do not consistently correlate with the quantity of bacterial analytes compared to CFU/mL. For specimens with multiple bacteria detected, the relative abundance of nucleic acids (copies/mL) may not correlate with the relative abundance of bacteria as determined by culture (CFU/mL). Clinical correlation is advised to determine significance of semi-quantitative Bin (copies/mL) for clinical management.</p>			
Antimicrobial Resistance Genes			
Detected: ✓	CTX-M		
<p>Note: Antimicrobial resistance can occur via multiple mechanisms. A Not Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance does not indicate susceptibility to associated antimicrobial drugs or drug classes. A Detected result for a genetic marker of antimicrobial resistance cannot be definitively linked to the microorganism(s) detected. Culture is required to obtain isolates for antimicrobial susceptibility testing and FilmArray Pneumonia Panel <i>plus</i> results should be used in conjunction with culture results for the determination of susceptibility or resistance.</p>			
Atypical Bacteria			
Detected:	None		
Viruses			
Detected: ✓	Parainfluenza Virus		

Figure 7 : Exemple d'un résultat du PPFA

La durée du test n'est pas fixe (elle varie en fonction de la complexité de l'analyse). Elle dure environ 1 heure 15 minutes en moyenne. Voici un exemple de résultat pour un LBA (**Figure 7**) : une *Klebsiella pneumoniae* a été identifiée à la numération 10^6 , avec un gène de résistance *bla*_{CTX-M}, ainsi qu'un virus para influenza. Aucune bactérie atypique n'a été détectée.

II. 1-3. Prise en charge des prélèvements en routine au laboratoire du CHU de Nantes :

➤ Analyse Bactériologique :

Les cultures bactériologiques et les antibiogrammes étaient effectués et analysés selon les recommandations du REMIC (société française de microbiologie et du CA-SFM/EUCAST).

Première étape : examen microscopique

Dans les premières heures suivant l'arrivée du prélèvement au laboratoire, on réalise un étalement d'une partie de l'échantillon sur une lame de microscope, que l'on colore avec la technique de Gram. On évalue ensuite au microscope la présence de bactéries (avec une estimation semi-quantitative) et de cellules (avec une estimation semi-quantitative des polynucléaires afin de définir le caractère purulent ou non du prélèvement). Cet examen, dont le résultat est connu quelques heures après le prélèvement, donne une première indication sur les bactéries présentes dans le prélèvement.

Deuxième étape : ensemencement

L'ensemencement des prélèvements doit être effectué, le plus rapidement possible après l'arrivée au laboratoire. Pour chaque milieu de culture 10 µL sont ensemencés, sans dilution pour les LBA ou après dilutions pour les AT (première dilution 1 :1 avec du fluidifiant puis une deuxième dilution 1 :100).

Les milieux de culture ensemencés sont une gélose au sang et une gélose au sang cuit avec suppléments polyvitaminiques. De plus, une gélose chromogène est ensemencée pour les

LBA. Les milieux ensemencés sont ensuite incubés dans des étuves à 37° sous 5% de CO₂ pendant au moins 48h.

Troisième étape : lecture des cultures et interprétations des antibiogrammes

Chaque gélose étant ensemencée avec 10µL d'échantillon, 1 colonie bactérienne correspond donc à 10² UFC/ml si l'ensemencement est fait sans dilution (**Annexe 3**). L'UFC est l'unité permettant de dénombrer les bactéries. Une UFC correspond à une colonie bactérienne.

La lecture des milieux s'effectue après 1 à 2 jours de culture. Un antibiogramme est réalisé sur les bactéries reconnues comme pathogènes respiratoires et dont la numération est supérieure au seuil de significativité (**Annexe 3**). Concernant les autres bactéries, la mention de leur présence et la réalisation de l'antibiogramme est à l'appréciation du biologiste. Les antibiogrammes sont réalisés en grande majorité avec les cartes VITEK ® AST et interprétés selon les recommandations du CASFM/EUCAST. En cas de nécessité, des tests supplémentaires peuvent être effectués : détection des BLSE (MastdiscsTM D68C), détection de carbapénémase (CORIS BioConcept RESIST-3 O.K.N. immuno-chromatographic, des PCR maison détectant les gènes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM}), détection de la résistance à la méticilline (AlereTM PBP2A culture colony test et/ou BDMAXTM StaphSR).

➤ Analyse virologique :

En cas de demande du réanimateur il était réalisé une PCR multiplex (Fast-track DiagnosticsTM). Cette PCR a pour cibles : influenza A et le sous type H1N1, influenza B, le rhinovirus, les coronavirus NL63, 229E, OC43 et HKU1, les virus para influenza 1, 2, 3 et 4, les métapneumovirus A/B, le bocavirus, les VRS A/B, les adénovirus, entérovirus, Parechovirus et une bactérie intracellulaire : *Mycoplasma pneumoniae*. Il était aussi possible de demander des PCR spécifiques pour des virus non détectés par le PPF (CMV, EBV, HSV).

II. 2- Analyse des résultats

Nous allons nous intéresser à la concordance microbiologique entre les résultats du PPF et les techniques de routine au CHU de Nantes (la culture bactérienne et la PCR multiplex Fast-

track DiagnosticsTM pour les virus). Les biologistes qui ont analysé et validé les dossiers en bactériologie et en virologie ne connaissaient pas les résultats du PFFA.

Pour les résultats bactériologiques, nous avons considéré un résultat « positif » avec le PFFA quand au moins une bactérie a été détectée. En culture un résultat était « positif » quand au moins un pathogène avait été identifié et rendu au clinicien. Nous avons considéré un résultat discordant quand au moins une bactérie retrouvée par une des deux méthodes ne l'était pas avec l'autre et un prélèvement était considéré comme polybactérien quand au moins deux bactéries pathogènes étaient signalées.

Le seuil de significativité des cultures était fixé à 10^5 UFC/ml pour les AT et 10^4 UFC/ml pour les LBA. Pour les résultats obtenus avec le PFFA, toute bactérie détectée, quel que soit sa numération, était considérée comme positive. Nous avons également fait des simulations en considérant comme négatives, des bactéries détectées au seuil de 10^4 copies/ml dans les AT, pour mieux correspondre au seuil de significativité des cultures, fixé à 10^5 UFC/ml dans ces prélèvements.

Chaque résultat discordant a été analysé a posteriori, soit par relecture des feuilles de travail du dossier, soit par relecture des milieux de culture ou par des réensemencements à partir du prélèvement ou des cultures.

Nous avons déterminé a posteriori si le résultat du PFFA aurait modifié l'antibiothérapie probabiliste. Pour comparer les antibiothérapies nous utiliserons des recommandations d'antibiothérapie reposant sur les résultats du PFFA. Ce guide d'antibiothérapie a été mis en place de façon multidisciplinaire avec des réanimateurs, infectiologues et microbiologistes (**Annexe 5**).

Partie III- Résultats

III. 1- Caractéristiques de la population et des prélèvements

Les 100 patients inclus dans l'étude pré-oracle présentaient à 67 % une HAP tardive avec un temps médian de séjour à l'hôpital de 5 jours avant le diagnostic. (**Tableau 5**). 87/100 patients ont présenté un tableau de PAVM. 40 patients avaient reçu des antibiotiques dans les 3 mois précédant le premier prélèvement et 25 étaient sous antibiothérapie au moment du premier prélèvement. 81% des patients étaient des hommes. L'âge médian était de 57 ans. Peu de patients avaient des facteurs de risque de portage de SARM (6%) et seulement 2% des patients étaient connus porteurs de E-BLSE (2%).

Tableau 5 : Caractéristiques de la population

Caractéristiques des patients	n= 100
Age (année), Médiane (range)	57 (19-85)
Sexe masculin, n (%)	81 (81%)
Durée d'hospitalisation moyen avant la pneumonie, jours	6
Durée de séjour en réanimation moyen avant la pneumonie, jours	5
Pneumonie « précoce », n (%)	33 (33%)
Pneumonie « tardive », n (%)	67 (67%)
PAVM, n (%)	87 (87%)
Facteurs de risque de SARM, n (%)	6 (6%)
Porteur de BLSE, n (%)	2 (2%)
Antibiotiques reçus dans les 90 jours précédant la pneumonies, n (%)	40 (40%)
Antibiothérapie avant les prélèvements J1, n (%)	25 (25%)
Décès au cours du séjour en Réanimation n (%)	21 (21%)

Nous avons reçu 237 prélèvements : 82 AT J1, 76 LBA J1 et 79 AT J3. Seuls 46% des patients ont été prélevés 3 fois. Chez 58 patients, les deux prélèvements de J1 ont été réalisés (LBA et AT J1). Pour 9 patients nous n'avons eu qu'un prélèvement (**Figure 8**).

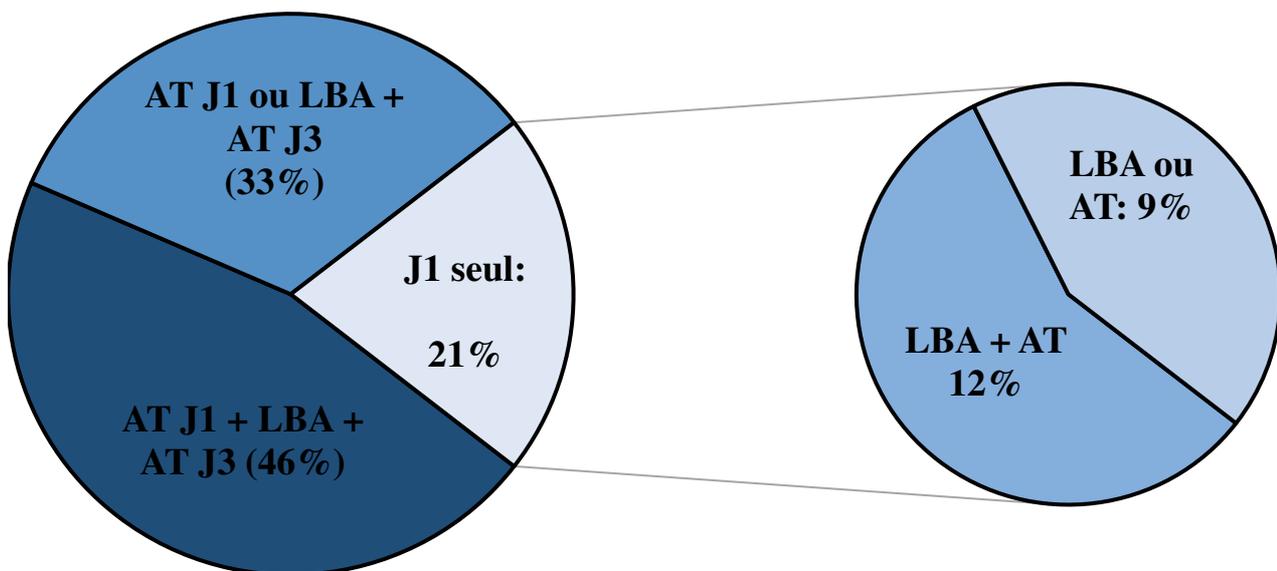


Figure 8 : Prélèvements reçus par patient (n=100)

III. 2- Comparaison des techniques de routine et du PPFA : Résultats bactériologiques.

III. 2-1. Prélèvements positifs et polybactériens

➤ **Résultat PPFA :**

Indépendamment de la numération, le PPFA retrouvait au moins une bactérie dans 183 (77,2 %) des prélèvements (69/82 AT J1, 59/76 LBA, 58/79 AT J3). Parmi ceux-ci, 111 (60,7 %) étaient polybactériens, avec un maximum de 7 bactéries retrouvées dans un prélèvement. En appliquant un seuil de 10^5 copies/ml pour les AT (17 AT avec seulement des

bactéries à 10^4 copies/ml), 166/237 (68,7%) prélèvements sont positifs (59/76 LBA, 58/82 AT J1 et 49/79 AT J3), dont 92 (56,4%) polybactériens.

En prenant en compte les virus détectés aussi par le panel, 81,6% (62/76) des LBA J1 et 75,6% (62/82) des AT J1 étaient positifs pour au moins une cible (avec un seuil de 10^5 copies/ml pour les bactéries dans les AT). La détection de plusieurs pathogènes (virus et/ou bactérie(s)) par prélèvement n'était pas plus élevée dans les LBA que dans les AT (36/62 (58.1%) LBA J1 *versus* 36/62 (58.1%) AT J1). En l'absence de seuil, la détection de plusieurs pathogènes par prélèvement aurait été plus élevée dans les AT que dans les LBA, puisque 69/82 (84,1%) AT J1 auraient été positifs, et 42/69 (60,9%) auraient été polymicrobiens (**Figures 9 et 10**).

A J1 (diagnostic de la pneumonie), le PPFa retrouvait donc au moins une bactérie, avec une numération significative ($\geq 10^5$ copies/ml pour les AT), chez 82 % des patients (81.6% (62/76) LBA J1, et 75.6% (62/82) AT J1), avec une infection polymicrobienne chez 49/100 patients.

A J3, le FilmArray® retrouvait une bactérie, quelle que soit la numération, dans 58/79 (73%) des prélèvements, dont 37/58 (63%) polybactériens. En appliquant un seuil de 10^5 copies/ml, 49/79 (62%) prélèvements étaient positifs dont 25/49 (51%) polybactériens.

➤ Résultats des cultures

La culture bactérienne a permis d'identifier au moins une bactérie pathogène dans 140/237 prélèvements (59%) (52/76 LBA, 53/82 AT J1 et 35/79 AT J3), dont 55 (39%) polybactériens.

A J1, la culture a permis d'identifier au moins une bactérie chez 73% patients (52/76 (68.4%) LBA J1 et 53/82 (64.6%) AT J1). Chez 32 patients au moins deux bactéries ont été signalées, proportionnellement dans un plus grand nombre de LBA (27/52, 51.9%) que d'AT (19/53, 35.8%) (**Figure 9**).

A J3, la culture a montré un taux de positivité inférieur au FilmArray® (41,8% (33/79)). Parmi les négatifs, 76,1% (35/46) étaient liés à l'absence complète de pousse bactérienne. Cette

différence est donc probablement liée à l'antibiothérapie initiée après les prélèvements de J1 (Figure 10).

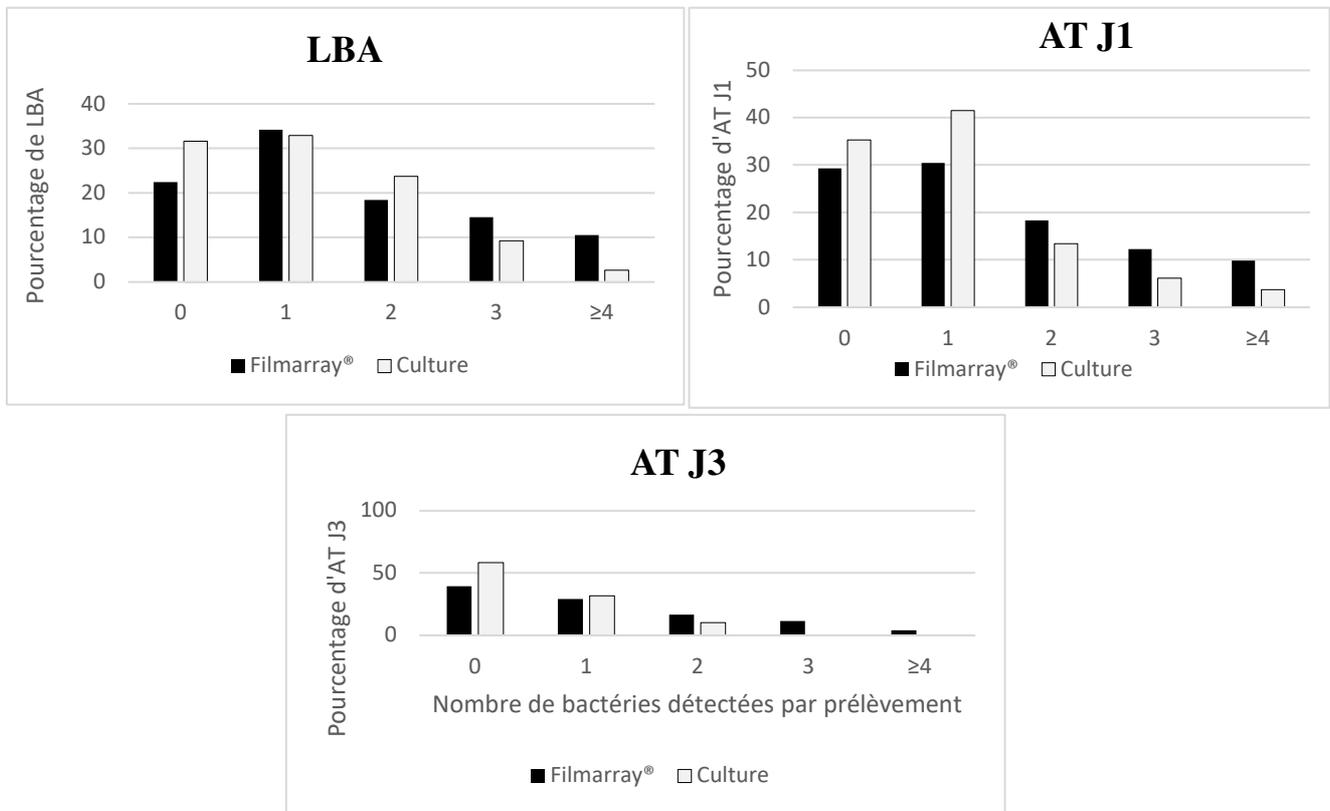


Figure 9: Nombre de bactéries signalées en fonction du type de prélèvement

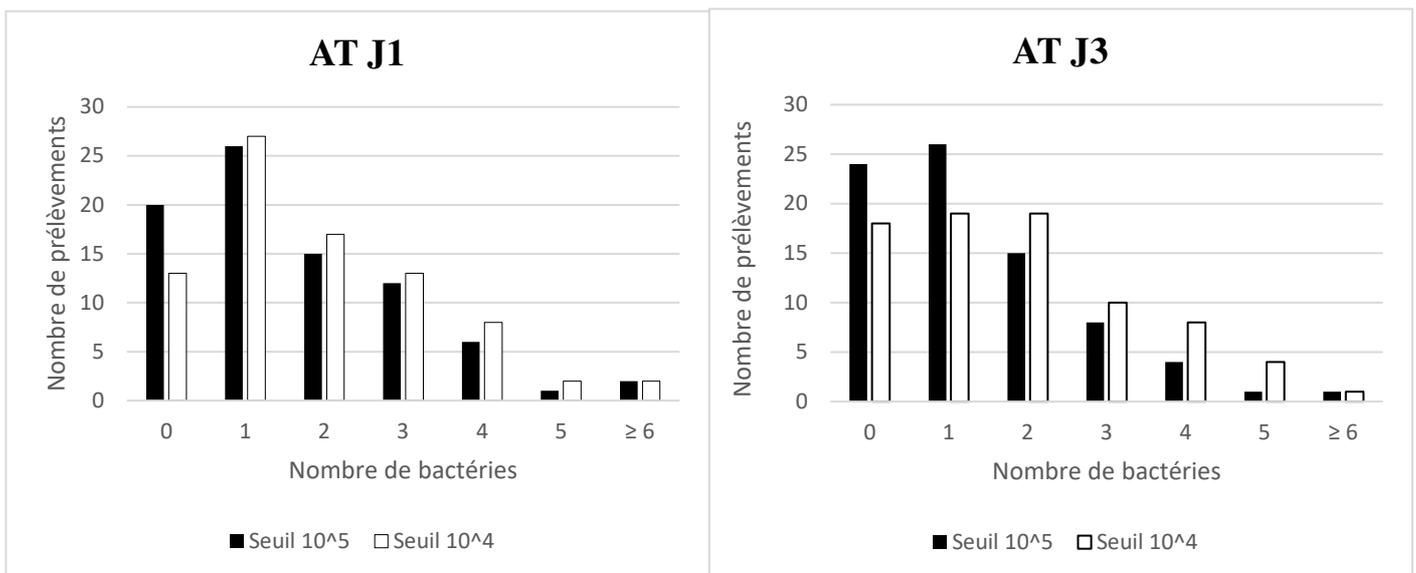


Figure 10 : Nombre de bactéries par prélèvements en fonction du seuil dans les AT

III. 2-2. Espèces bactériennes

Les bactéries retrouvées avec le PPFA (**Figure 11**) étaient principalement des bactéries de la flore oro-pharyngée (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *B. catarrhalis*) (40%) et *S. aureus* (25%) classiquement responsables de pneumopathies communautaires ou d'HAP précoce. Les Entérobactéries (30%) et les bacilles non fermentants (6%) ont été moins retrouvés. A J3, Le pourcentage de bacilles non fermentants était de 12% en technique FilmArray® dont 5 prélèvements positifs à *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii complex*.

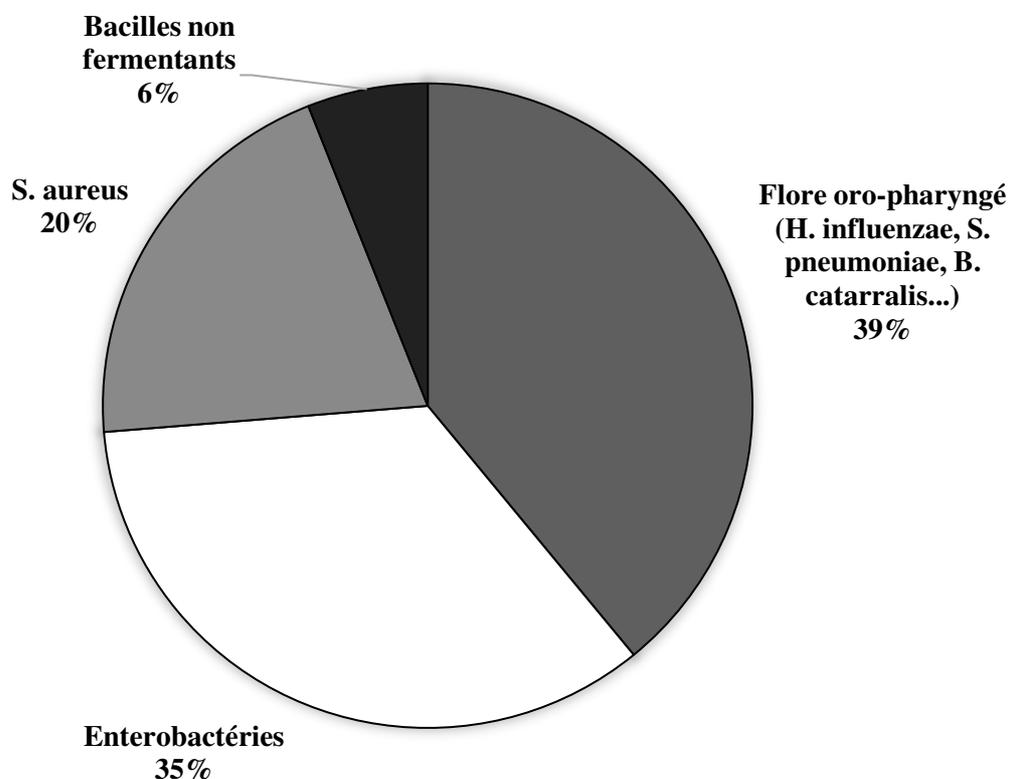


Figure 11 : Bactéries retrouvées avec le PPFA (J1 et J3) (Pas de seuil)

La répartition des familles bactériennes était similaire en culture. Les familles bactériennes les plus fréquemment retrouvées étaient les germes de la flore oro-pharyngée (sans *S. aureus*) (40%), Entérobactéries (27%), *S. aureus* (24%) et 9 % de bacilles non fermentants (**Figure 12**). Le pourcentage plus élevé de bacilles non fermentants et était lié à *S. maltophilia* (4 prélèvements chez 3 patients).

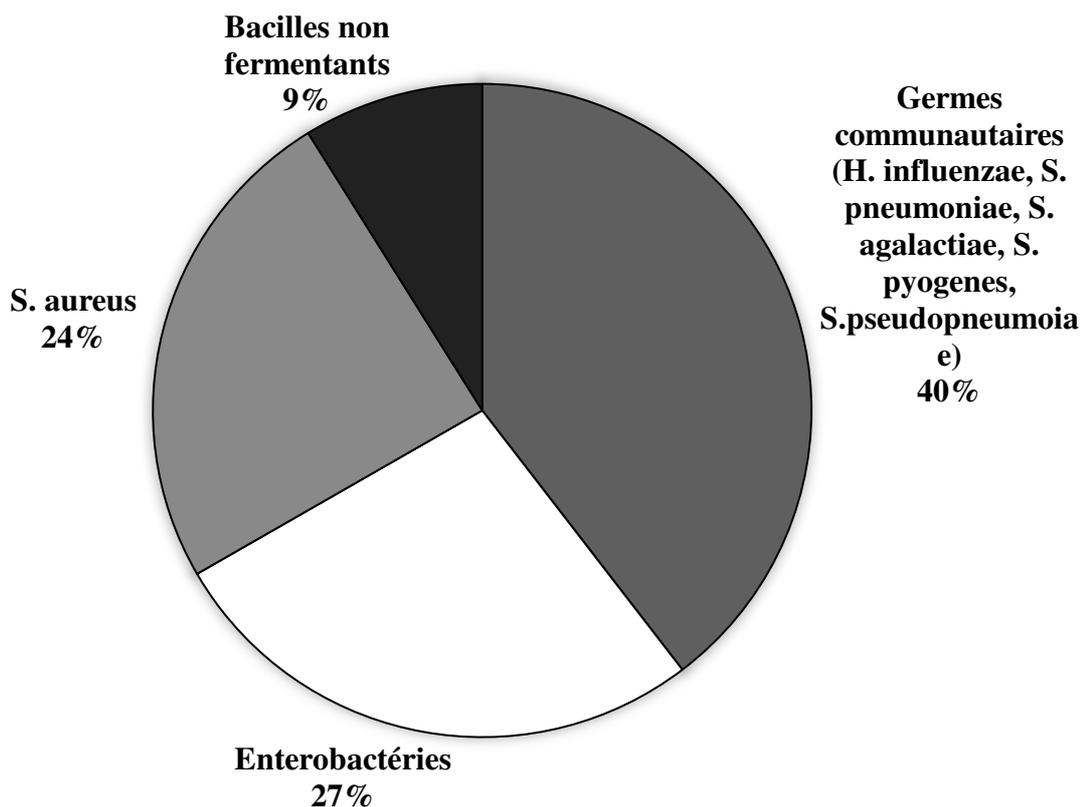


Figure 12 : Bactéries retrouvées en Culture à J1 et J3

Toutes les bactéries du panel ont été détectées en plus grand nombre par le FilmArray® (Figure 16) qu'en culture.

H. influenzae était la bactérie la plus retrouvée par les deux techniques, tous prélèvements confondus (89 prélèvements avec le FilmArray® vs 47 prélèvements pour la culture). Seulement 52% (46/89) des *H. influenzae* retrouvés avec le PPFA l'ont été aussi en culture (Figure 13). En ce qui concerne les autres espèces les plus détectées (*S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae* et *K. pneumoniae*), les discordances observées entre les deux méthodes, étaient aussi liées à une non détection en culture, de bactéries identifiées par le PPFA.

Les discordances étaient moindres pour les entérobactéries que pour les autres espèces qui peuvent être des constituants de la flore oro-pharyngée et dont la pousse est moins rapide (*H. influenzae*, *S. pneumoniae*) (Figure 13).

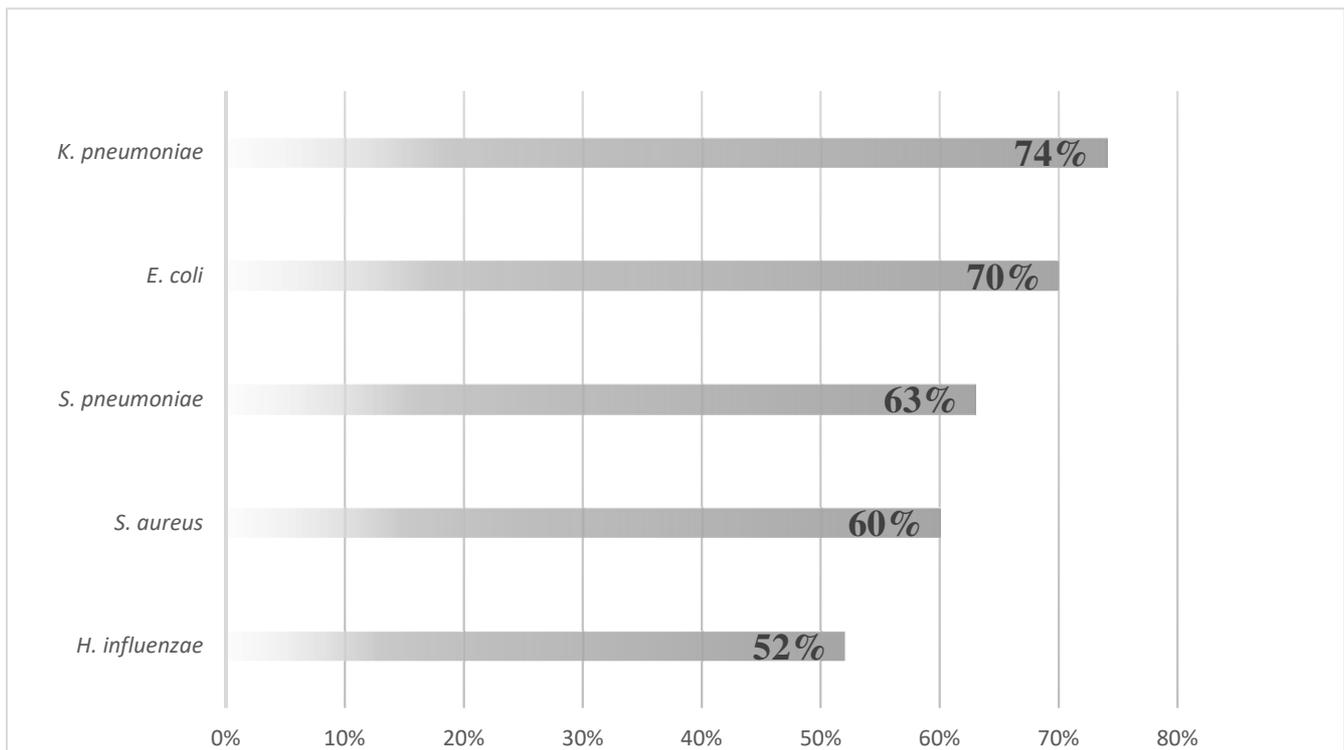


Figure 13 : : Proportion des bactéries positives en FilmArray® détectées en culture, pour les espèces les plus fréquemment identifiées (au moins 20 prélèvements positifs avec les deux techniques).

Chez 8 patients (5/76 (6,6%) LBA et 6/82 (7,3%) AT J1) la culture a retrouvé des bactéries non détectées par le PPFA (*Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Streptococcus pseudopneumoniae*) (Figure 14).

Au diagnostic (J1), nous avons mesuré le taux de concordance entre les deux techniques pour chaque pathogène sous la forme de pourcentage d'accord positif (PPA : Percentage of positive agreement), de pourcentage d'accord négatif (NPA : Negative percentage agreement) et de taux de concordance globale (OPA : Overall agreement percentage) (Annexe 1). Ces taux ont été calculés en considérant que la culture était la méthode de référence.

Le taux de concordance globale entre les deux techniques variait selon les espèces, de 88 à 100 % pour les LBA et de 82 à 100 %. Seulement trois espèces bactériennes du panel

avaient un OPA inférieur à 95% : *H. influenzae*, *S. aureus* dans les LBA et *K. oxytoca* dans les LBA.

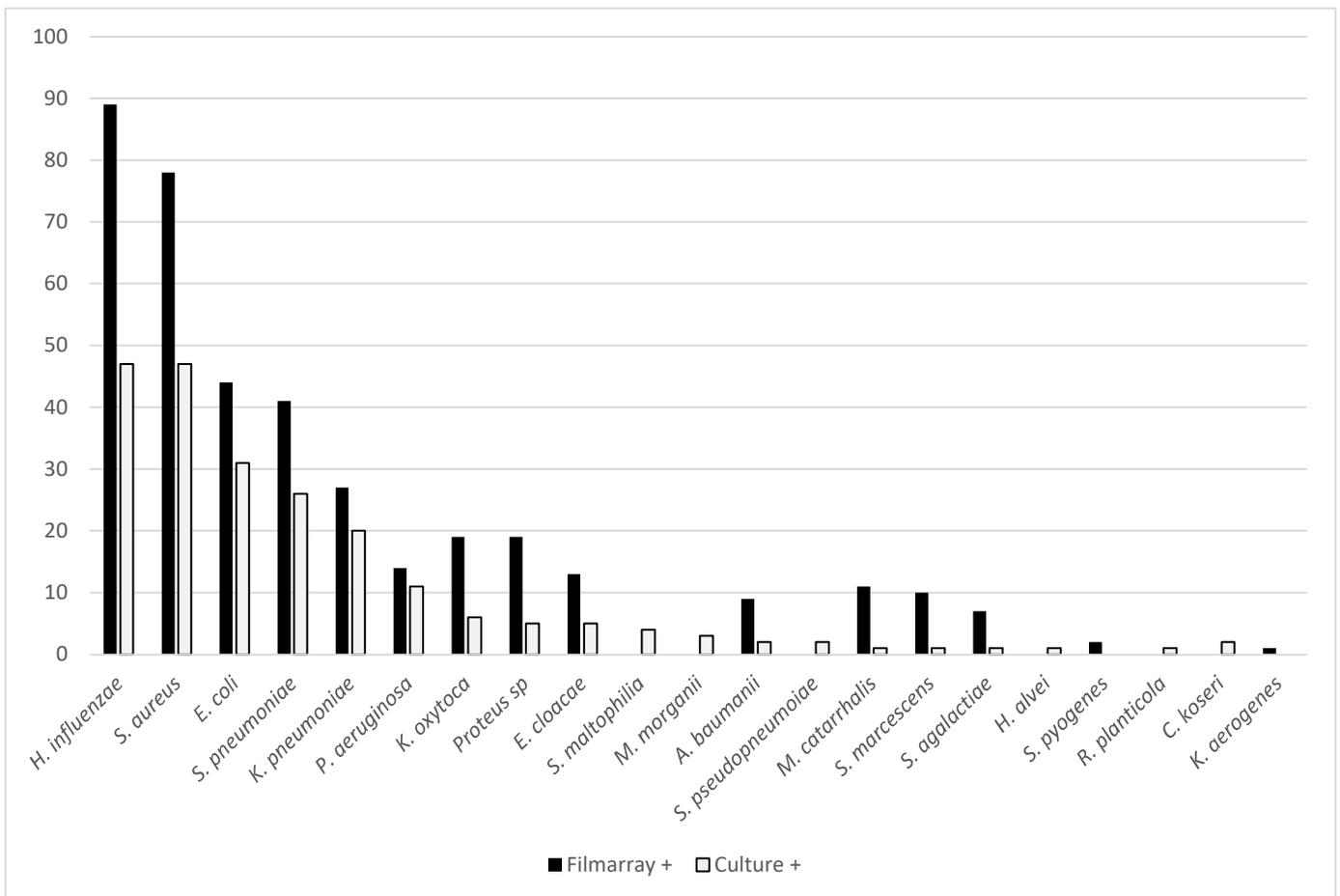


Figure 14 : Bactéries retrouvées à J1 et J3 (PPFA et culture)

III. 2-3. Analyse des discordances

Au total 58% des prélèvements étaient positifs dans les deux techniques. Sans seuil, 19% des prélèvements retrouvaient au moins une bactérie seulement avec le PPFA. Avec un seuil de 10^5 copies/ml pour les AT, ce taux est de 11% (**Figure 15 et 16**). A J1, 69/158 (43%) des résultats étaient discordants (36/82 AT J1 (et 33/76 LBA J1), si le seuil de 10^5 était appliqué aux AT.

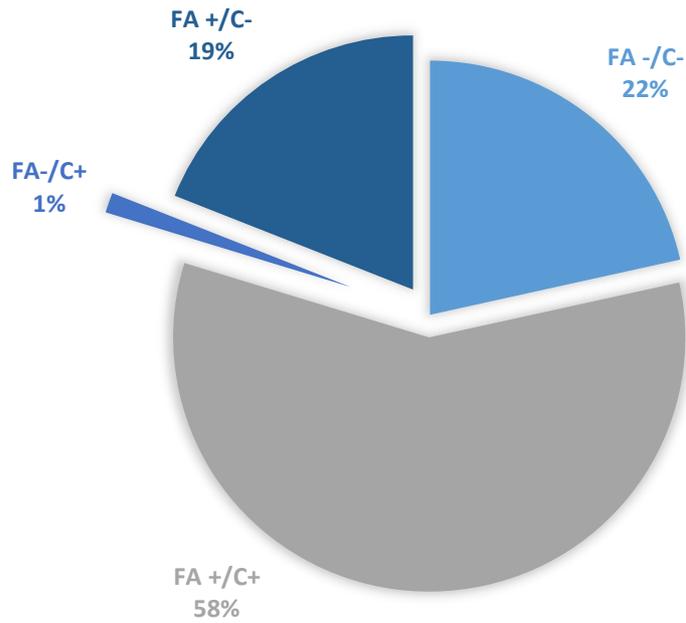


Figure 15 : Répartition des prélèvements (n=237) positifs et négatifs dans les deux techniques (pas de seuil) (FA : FilmArray®, C : culture)

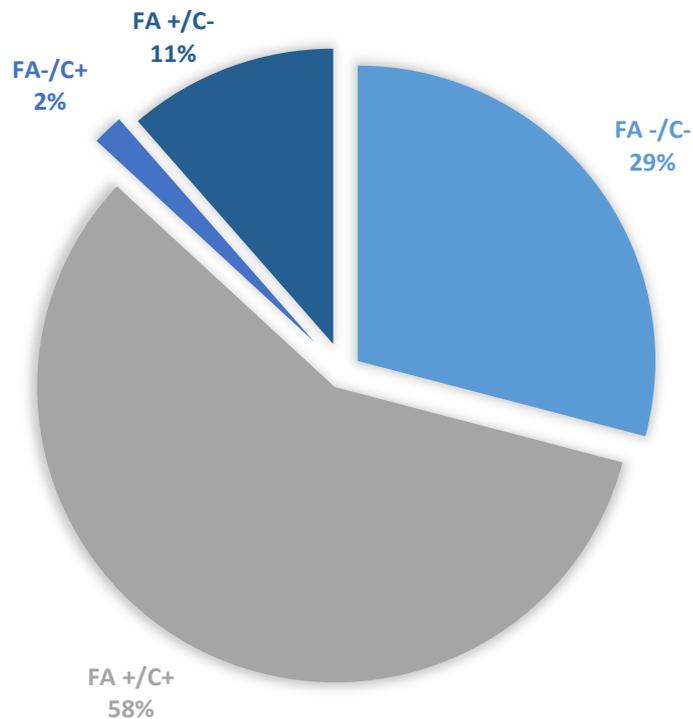


Figure 16 : Répartition des prélèvements (n=237) positifs et négatifs dans les deux techniques (seuil 10⁵ copies/ml) (FA : FilmArray®, C : culture)

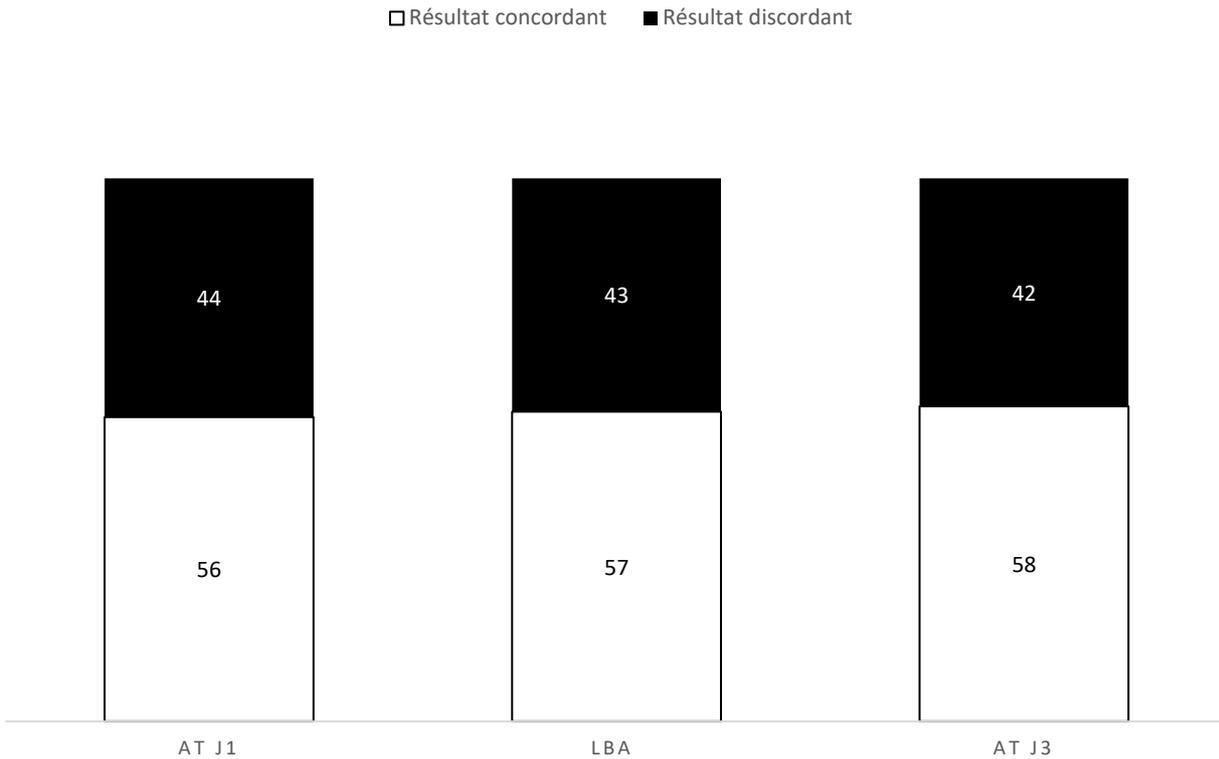


Figure 17 : Pourcentage de résultats discordants par type de prélèvement

La plupart des discordances entre les deux techniques étaient liées à la présence d'une bactérie supplémentaire avec le PFFA. De ce fait, plus un prélèvement était complexe (c'est-à-dire polybactérien), plus il y avait de discordances. A partir de 3 bactéries retrouvées avec le PFFA, le taux de concordance entre les deux techniques était seulement de 6% (**Figure 18**).

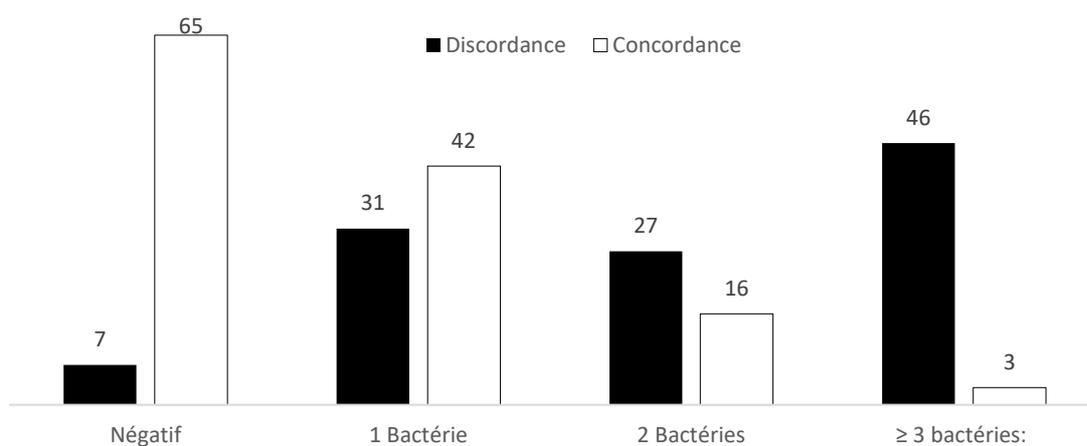


Figure 18: Nombre de prélèvements discordants et concordants en fonction du nombre de bactéries retrouvées avec le FilmArray®

A J1 et J3, respectivement, 69/158 (44%) et 33/79 (42%) dossiers présentaient donc au moins une discordance. Nous avons classé ces discordances en 6 catégories :

1- Une ou deux bactéries dominante(s) ou envahissante(s) en culture, limitant l'identification d'autres bactéries dont la pousse pourrait être empêchée. C'est particulièrement vrai, en cas de prélèvements contenant des entérobactéries. L'espèce *P. mirabilis* peut en particulier, envahir les milieux de culture en quelques heures à partir d'une seule colonie. Il est dans ce cas très complexe d'identifier d'autres bactéries présentes dans le prélèvement (notamment des bactéries à croissance plus lente) (**Annexe 6**).

Cela représentait 28/69 discordances à J1. 10 de ces discordances ont été résolues après une analyse approfondie des dossiers. Dans ces cas, la bactérie détectée avec le FilmArray® et non signalée en culture a été retrouvée rétrospectivement. Il s'agissait de 2 *S. pneumoniae*, 1 *E. coli*, 1 *B. catharralis*, 4 *H. influenzae*, et 2 *S. aureus*, non détectés à la première lecture ou non rendus car en quantité moindre.

2- Prélèvements polybactériens sans bactérie dominante (> 3 bactéries retrouvées avec le PPFa ou contaminés par de la flore oro-pharyngée). Pour ce type de prélèvement, l'identification de toutes les bactéries présentes peut-être complexe et/ou jugée inutile par le biologiste (**Annexe 7 et Figure 16**). Cela représentait 11/69 discordances à J1.

3- Bactéries avec une numération faible en FilmArray®. Nous avons constaté que la numération en copies/ml ne correspondait pas exactement à la numération en UFC/ml (plus grande sensibilité de la technique moléculaire avec un écart de 2,4 log en moyenne entre les deux techniques) (**Annexe 2 et 3**). Ainsi, 11/69 discordances à J1 correspondaient à des bactéries détectées en faible quantité avec le FilmArray® (10^4 ou 10^5 copies/ml dans les AT, 10^4 copies/ml dans les LBA), mais n'ayant pas poussé en culture.

4- Une antibiothérapie efficace administrée avant le prélèvement et qui pourrait stériliser les cultures. Cela représentait 2/69 discordances à J1.

5- Présence de bactéries détectées avec le FilmArray® mais non habituellement signalés en culture lorsque le prélèvement est polybactérien : *S. agalactiae* et *S. pyogenes*. Cela représentait 7/69 discordances à J1, dont 5 avec un *S. agalactiae*, retrouvées après réanalyse.

6- Bactéries détectées en culture mais non ciblées par le panel FilmArray®. Elles étaient responsables de 6/69 discordances à J1.

Finalement, 4 prélèvements discordants ne rentraient pas dans ces critères. Deux correspondaient à une probable fausse négativité du FilmArray®, puisque des bactéries du panel ont été retrouvées en culture mais pas en technique FilmArray® (1 *K. oxytoca* à 10^3 UFC/mL dans un LBA et 1 *H. influenzae* à 10^5 UFC/mL dans un AT J1). Deux autres étaient probablement liées à des erreurs techniques au laboratoire de bactériologie (problème d'ensemencement de géloses et absence de relecture des milieux de culture à plus de 12h).

A J3, 20/33 (60%) discordances correspondaient à l'absence de pousse de bactéries détectées par le panel. Cela s'expliquait probablement par l'institution d'une antibiothérapie efficace depuis au moins 48h avant le prélèvement.

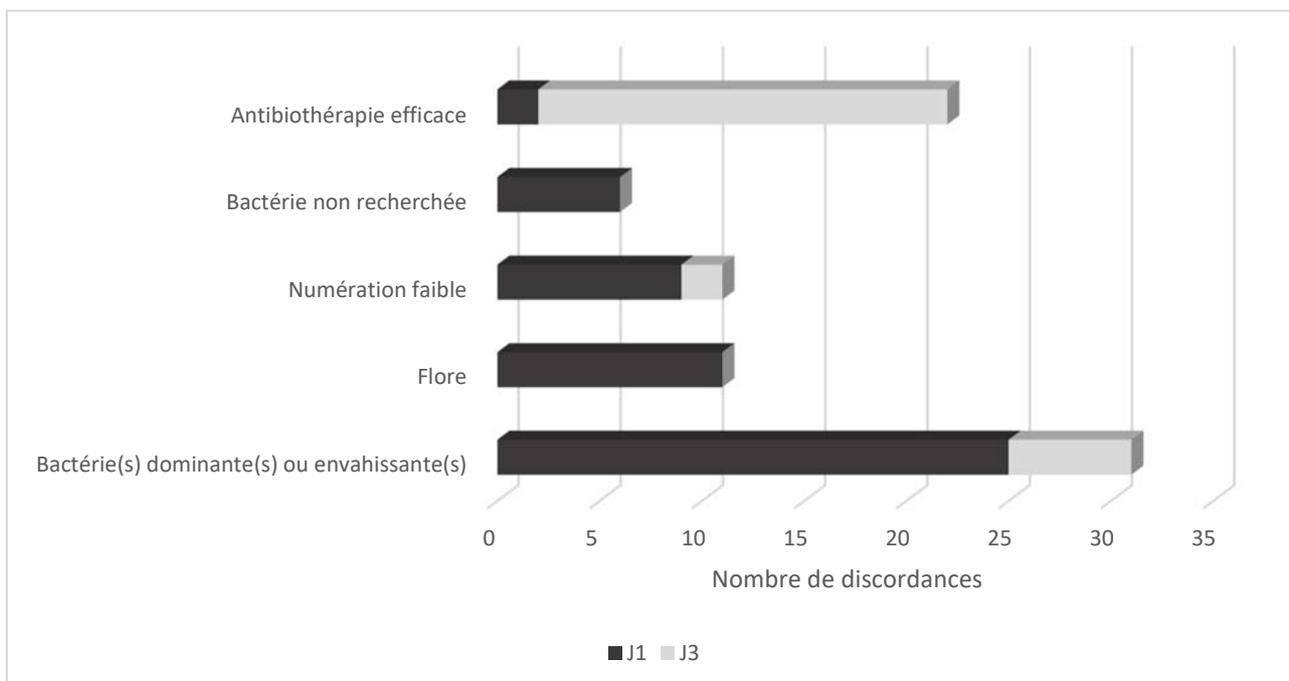


Figure 19: Explications des discordances à J1 et J3

III. 2-4. Comparaison des résultats obtenus pour les AT et LBA couplés à J1

En appliquant le seuil de 10^5 copies/ml pour les AT, parmi les 58 patients avec une paire LBA/AT à J1, pour 46 (79,3%), le résultat du PPFA (positif ou négatif) était le même entre les 2 prélèvements. Concernant les 12 discordances, 5 étaient dues à la détection d'un pathogène supplémentaire dans l'AT, 4 étaient dues à un pathogène en moins dans l'AT et sur les 3 dernières, la différence portait sur 2 pathogènes. Sans seuil, le pourcentage de concordance entre les deux types de prélèvements aurait été moins bon (38/58 (65,5%)).

En ce qui concerne la culture, les AT et LBA J1 étaient concordants chez 48/58 (82,8%) patients. Parmi les 10 discordances, 7 étaient liées à la présence d'au moins une bactérie supplémentaire dans le LBA.

III. 2-5. Intérêt de l'examen direct

Nous nous sommes intéressés à la corrélation entre examen direct et résultat du PPFA (FilmArray®). L'examen direct a pu être réalisé sur 235 prélèvements. Nous avons considéré qu'un examen direct était négatif lorsque aucune bactérie n'était rendue, ou quand seule une flore polymorphe ou des bacilles à Gram positif étaient notifiés.

69 prélèvements avaient un examen direct négatif. Le PPFA était négatif aussi pour 47 d'entre eux (si seuil de 10^5 copies/ml pour les AT). Les 22 autres prélèvements ED-/ PPFA (FilmArray®) + correspondaient soit à des AT J3 (9), soit à des prélèvements mono-bactériens avec une numération faible (7 avec une numération à 10^4 , 5 à 10^5 et 1 à 10^6 copies/ml).

L'un des problèmes majeurs du PPFA (FilmArray®) est la non détection de certains bacilles à Gram négatif naturellement résistant à l'amoxicilline-acide clavulanique (bactéries hors panel). Nous avons donc regardé si à l'aide de l'examen direct nous aurions pu prédire leur présence. Sur les 15 prélèvements avec des bactéries hors panel (Entérobactéries, *S. maltophilia*, *S. pseudopneumoniae*), 14 examens directs retrouvaient des formes (bacilles à Gram négatifs, cocci à Gram positif en chainettes). Pour 8 des 14 prélèvements il y avait d'autres bactéries du même genre dans le prélèvement (autres entérobactéries ou autres streptocoques). Pour les 6 autres, les bactéries hors panel avaient été visualisées à l'examen direct. Cela suggère qu'en l'absence de détection de bacilles à Gram négatif au résultat du

PPFA, l'examen direct doit être systématiquement être prise en compte, spécialement quand l'antibiothérapie initiale débutée au résultat du PPFA est l'amoxicilline-acide clavulanique.

III. 3- Comparaison des techniques de routine et du PPFA: Résultats virologiques et bactéries atypiques.

Le PPFA a permis d'identifier au moins un virus chez 16 patients à J1 avec une co-infection virale-bactérienne chez 12 patients. Les virus retrouvés étaient rhinovirus/entérovirus (5 patients), coronavirus (4 patients), influenza A (3 patients), para influenza (2), adénovirus (2), VRS (1). Chez un patient une co-infection influenza A et adénovirus a été retrouvée. Tous les patients, chez qui le PPFA a détecté un virus, et pour lesquels un prélèvement a été réalisé à J1 et J3, le même virus a été retrouvé dans les deux prélèvements (13/13). Pour 2 patients le virus retrouvé à J1 l'a été seulement dans l'AT. Nous n'avons pas eu le cas inverse (virus retrouvé uniquement dans le LBA)

Chez 37/100 patients une recherche de virus a été demandée en routine, dans les 15 jours antérieurs ou suivants le prélèvement J1. Pour 33/37 (89%) des patients les résultats étaient identiques. Tous les prélèvements pour lesquels les deux techniques avaient été réalisées le même jour avaient un résultat identique (9/9).

Toutes les discordances (n=4) étaient liées à la non détection d'un virus dans une des deux techniques :

- 3 coronavirus : 2 détections avec le FilmArray®, une avec la technique de routine. Les deux techniques différentes avaient été réalisées à au moins 7 jours d'intervalle .

- L'autre discordance a porté sur un entérovirus/rhinovirus détecté avec le FilmArray® mais pas avec la PCR multiplex (la recherche virologique classique avait été effectuée sur un LBA prélevé 15 jours plus tôt et sur un écouvillon naso-pharyngé réalisé deux jours plus tard, sans retrouver le virus).

Pour un des patients un adénovirus a été retrouvé seulement avec le PPFA dans l'AT J3 mais le LBA J1 était négatif avec le PPFA et la technique de routine réalisé sur celui-ci était aussi négative.

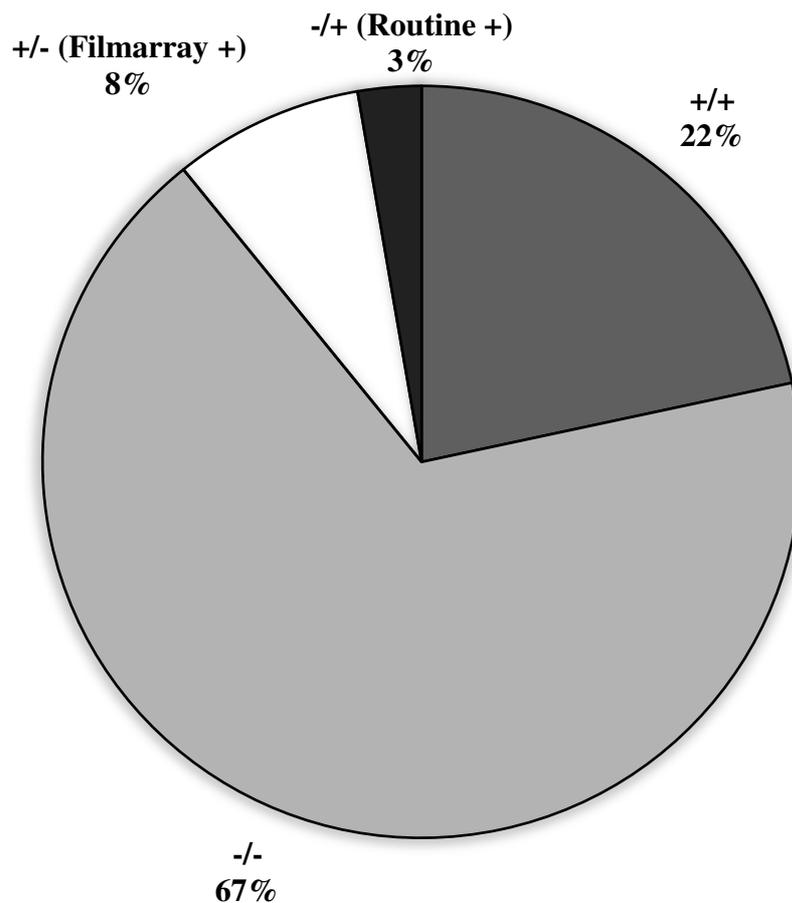


Figure 20: Résultats virologiques (comparaison des techniques) (n=37)

75% des 16 patients avaient une co-infection virale-bactérienne. Chez les 4 patients infectés seulement avec un virus, nous avons retrouvé une grippe A, un VRS, un Coronavirus et un Rhinovirus

Le panel a identifié une bactérie intracellulaire (*M. pneumoniae*) chez un seul patient, dans le LBA et l'AT J3 (AT J1 non réalisé). La PCR multiplex Fast-track Diagnostics™ n'avait pas été réalisée chez ce patient. Le *M. pneumoniae* a été retrouvé avec la technique de PCR utilisée en routine.

Au total, au moment du diagnostic le panel PPFA a permis de retrouver une documentation microbiologique (virus et/ou bactéries) chez 86/100 des patients suspect d'HAP

alors que les techniques de routine ont permis une documentation microbiologique (virus et/ou bactérie) pour 78/100 patients.

III. 4- Antibiothérapie

III. 4-1. Détection de la résistance aux antibiotiques

Le PPFA a détecté quatre gènes de résistance aux antibiotiques différents chez 9 patients (9%) : *mecA/C* + MREJ (2 patients), *bla_{CTX-M}* (7 patients) soit seul (5 patients), soit associé à un gène de carbapénèmase (2 patients) : 1 *bla_{NDM}* et 1 *bla_{OXA-48-like}*.

La concordance était de 100%, entre le PPFA et la culture, pour la détection des BLSE et des carbapénèmases (9/9). Pour un patient avec un test *mecA/C* + MREJ positif, uniquement, positif en FilmArray® (LBA), *S. aureus* a été retrouvé en culture mais la résistance à la méticilline n'a pas été mise en évidence malgré l'utilisation de plusieurs techniques : antibiogramme Vitek, recherche de la PLP2A par technique immuno-chromatographique Alere™ PBP2A, détection moléculaire à l'aide d'un autre kit (BDMAX™ StaphSR) ou test avec un disque de céfoxitine sur plusieurs colonies. Pour ce patient le PPFA a retrouvé un *S. aureus* dans l'AT J3 mais n'a pas détecté *mecA/C* + MREJ. Chez un deuxième patient avec une détection de SARM par le PPFA (dans un AT J3), *S. aureus* n'a pas été retrouvé en culture. Ces deux patients n'ont pas eu de prélèvement retrouvant un SARM dans les suites de leur prise en charge.

En culture, 11 entérobactéries de notre cohorte étaient résistantes aux céphalosporines de 3^{ème} génération. Parmi 7 d'entre elles, il s'agissait de souches productrices de BLSE. Dans les 4 autres cas, cette résistance était un mécanisme d'hyperproduction de céphalosporinase (2 *E. cloacae* complex, 1 *S. marcescens*, and 1 *E. coli*). Deux *K. pneumoniae* exprimaient des carbapénémases : OXA 48-like et NDM (détermination effectuée avec le phénotype de résistance, l'antibiogramme Vitek et le test CORIS BioConcept RESIST-3 O.K.N. immuno-chromatographic). Aucun SARM n'a été retrouvé en culture.

III. 4-2. Impact théorique du PPFA sur l'antibiothérapie initiale

Pour analyser l'impact potentiel du PPFA sur l'antibiothérapie nous utiliserons le seuil de significativité de 10^{-5} pour les AT. La simulation de l'antibiothérapie à partir des résultats du PPFA aurait conduit à une prescription d'amoxicilline-acide clavulanique chez 84/100 patients *versus* 59/100 en vie réelle (**Figure 21, Annexe 5**).

La prescription d'amoxicilline-acide clavulanique n'aurait pas été optimale chez 7/84 patients (8,2%). Pour 4 patients cela était dû à la présence de bactéries ayant acquis des résistances à l'amoxicilline-acide clavulanique (2 *H. influenzae* et 2 *E. coli* : par production de pénicillinase de haut niveau ou par modification des PLP). Ces résultats suggèrent que l'utilisation de céphalosporine de 3^{ème} génération peut être discutée lors de la présence d'entérobactéries des groupe 1 ou 2 ou d'*H. influenzae*. Pour les 3 autres patients des bactéries à Gram négatif naturellement résistantes à l'amoxicilline-acide clavulanique et non détectées par le panel (*M. morgani/H. alvei/S. maltophilia*) étaient présentes en cultures. Nous avons vu que l'examen direct peut être une aide pour la détection précoce de la présence de ces bactéries dans le prélèvement si aucun autre bacille à Gram négatif n'est présent. Nous suggérons donc de porter une attention importante à cet examen notamment chez des patients à risque (durée de séjour en réanimation > à 15 jours, antibiothérapie préalable).

L'antibiothérapie prescrite en vie réelle était la même que celle simulée chez 59/100 patients. Chez 29/100 patients l'antibiothérapie était plus large que celle simulée avec le PPFA. Dans notre hôpital où la prévalence de BMR est faible, l'utilisation du PPFA aurait comme principal effet de diminuer l'utilisation des bêta-lactamines à large spectre (**Figure 21**).

Chez 6 patients l'utilisation du linézolide (5) et de la vancomycine (1) aurait pu être théoriquement évitée (pas de détection de *mecA/C* + MREJ). Les résistances à ces antibiotiques sont rares mais peuvent émerger si leur utilisation n'est pas limitée (40).

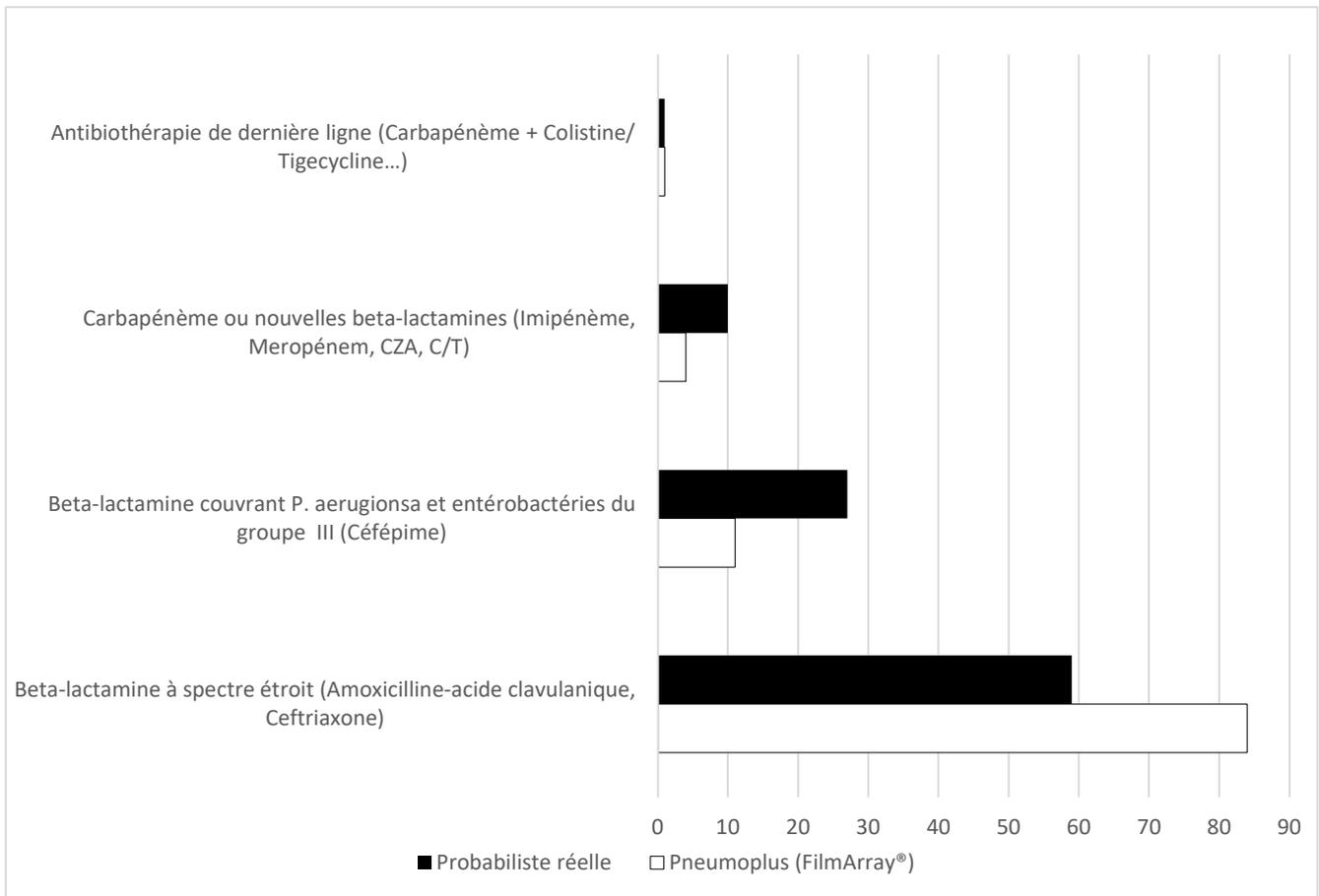


Figure 21: Antibiothérapies réelles et simulées avec le résultat du PPFa (pourcentage)

La non détection de la résistance par hyperproduction de céphalosporinase a un moindre impact car si une entérobactérie du groupe 3 est présente il y a une indication à mettre le patient sous céfépime, (molécule efficace sur une large majorité d'Entérobactéries hyper-productrices de céphalosporinase (3/100 patients dans notre étude)) (30).

Partie IV : Discussion

Le panel Pneumonia *plus* (FilmArray®) combine PCR multiplex nichée et PCR quantitative. La réalisation de ce test se fait de manière automatisée, dans une cassette fermée (extraction et amplification des acides nucléiques). Elle est insérée dans un automate thermocycleur qui permet aussi la lecture de la fluorescence émise. En dehors de la préparation de la cassette, aucune intervention extérieure n'est nécessaire. L'analyse des résultats se fait par le logiciel du fournisseur automatiquement.

Il y a une dizaine d'années, les tests de diagnostic syndromiques des infections respiratoires basses ont été développés pour la détection des virus à tropisme respiratoire et des bactéries atypiques (24). Ces techniques ont été récemment mises à jour afin d'améliorer la précision du diagnostic étiologique des pneumopathies. Le PPFA et le Curetis® Unyvero Hospitalised Pneumonia Panel, sont les deux premiers tests commerciaux (approuvés par la Food and Drug administration aux Etats-Unis et ayant le marquage CE dans l'Union Européenne) qui permettent de détecter des bactéries extracellulaires et des gènes de résistance aux antibiotiques.

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'étude prospective publiée ayant comparé les deux techniques. Toutefois les caractéristiques techniques des deux systèmes varient sur certains paramètres. Le PPFA présente l'intérêt de fournir un résultat plus rapidement (en moyenne 75 minutes *versus* 4 à 5h pour le panel Curetis® Unyvero) et permet une semi-quantification bactérienne, ainsi que la détection des principaux virus à tropisme respiratoire contrairement au panel Curetis® Unyvero. A l'inverse, le panel Curetis® Unyvero détecte davantage de gènes de résistance (n=17) et de bactéries (n=19). Il recherche aussi la présence de *Pneumocystis jirovecii* (41).

Au cours de ce travail, nous avons comparé les résultats du PPFA aux résultats des méthodes de routine utilisées au CHU de Nantes (culture bactérienne et PCR virale multiplex : Fast-track Diagnostics™). Cette comparaison a été effectuée à partir de 237 LBA et AT collectés de manière prospective, obtenus chez 100 patients hospitalisés en réanimation et suspects d'HAP.

Le délai moyen théorique de rendu des résultats avec la technique FilmArray® était de 4h15 (une des réanimations participant à l'étude étant située à 10km du laboratoire). Le délai de rendu des résultats définitifs était de 52 à 69h pour la culture, mais des résultats partiels (identification bactérienne) étaient le plus souvent disponibles dès 12 à 24h. Le résultat de la PCR virale multiplex était disponible dans les 12 à 24h suivant le prélèvement.

En accord avec des publications récentes (39, 41), nous avons constaté que le PPFA augmentait le taux de documentation microbiologique (81,6 % de LBA J1, 75,6% d'AT J1 et 60% d'AT J3 positifs), par rapport à la culture (69% de LBA J1, 65% d'AT J1 et 47% AT J3 positifs). La technique de biologie moléculaire identifiait une bactérie supplémentaire dans 39,5% des LBA et 37,8 % des AT (résultats en fixant un seuil de 10^5 copies/ml pour les AT).

Les bactéries les plus retrouvées étaient les mêmes avec les deux méthodes, soit dans l'ordre : *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*, et *K. pneumoniae*. Les germes pouvant être présents dans la flore oro-pharyngée (excepté *S. aureus*) étaient prédominants (39% en FilmArray®, 40% en culture). Ces bactéries sont habituellement décrites comme responsables des PAC. De ce fait, nos résultats divergent de l'étiologie bactérienne habituellement décrite chez des patients suspects d'HAP tardive. Dans le dernier rapport de surveillance Européen des infections liées aux soins en réanimation datant de 2017 (44); *P. aeruginosa* était la bactérie la plus retrouvée dans les pneumonies (19,9%) suivi de *S. aureus* (18,5%) *Klebsiella spp* (15,2%) et *E. coli* (13,5%). Dans cette étude, la majorité des cas de pneumonie était associée à l'intubation et l'épisode d'HAP intervenait entre 7 et 12 jours après l'entrée en réanimation. Dans notre étude, le délai moyen d'hospitalisation avant le diagnostic d'HAP était de 5 jours.

La bactérie la plus retrouvée dans notre étude est *H. influenzae*, chez 40/100 patients avec le PPFA, après une durée moyenne de séjour en réanimation de 4 jours. En culture l'espèce *H. influenzae* a été retrouvée chez 29/100 patients (elle reste la bactérie la plus détectée).

L'espèce *P. aeruginosa* a été retrouvée à J1, seulement chez 4 patients. Deux patients présentaient une HAP précoce (4 jours d'hospitalisation) et ne présentaient pas de facteurs de risque d'infection à *P. aeruginosa*. Les deux autres ont présenté une HAP tardive (29 jours et 6 jours). Aucun *Acinetobacter spp* n'a été retrouvé à J1 malgré des durées d'hospitalisation longues avant l'épisode de pneumonie (15 patients à plus de 15 jours).

Dans les publications récentes, comme dans notre étude, la majorité des discordances entre le PFFA et la culture concernait des bactéries exigeantes (c'est-à-dire dont la pousse est fastidieuse). Elles étaient expliquées par une meilleure sensibilité des tests de biologie moléculaire et/ou la présence d'une antibiothérapie au moment du prélèvement. (42) (45). Dans un peu plus de la moitié des résultats discordants observés pour *H. influenzae*, cette bactérie avait poussé sur le milieu de culture enrichi utilisé en routine (nous l'avons retrouvée en réanalysant les dossiers), mais avait été dépassée par la pousse d'autres pathogènes ou de bactéries de la flore oro-pharyngée et n'avait donc pas été signalée.

La responsabilité infectieuse d'*H. influenzae* (bactérie infectante ou commensale) est parfois débattu dans les HAP (46) et il sera intéressant de préciser le rôle que pourrait jouer cette espèce lorsque qu'elle est isolée au sein d'une communauté polybactérienne (47).

S. aureus est une bactérie dont le pouvoir pathogène dans les pneumopathies est bien établi. Cette bactérie a une croissance rapide et est peu exigeante. Elle est aussi décrite comme faisant partie de la flore normale (30% de la population a un portage nasal (48)). Dans notre étude, de la même façon que pour l'espèce *H. influenzae*, nous avons obtenu des résultats discordants pour cette espèce chez 7 patients (PPFA positif et culture négative).

Ces résultats pointent la limite de la culture bactérienne, sujette à interprétation, pour la détection des bactéries non pathogènes strictes et/ou présentes en moindre quantité parmi une culture polymicrobienne. De plus, ils mettent en lumière l'intérêt d'utiliser des géloses sélectives pour faciliter la détection exhaustive de bactéries spécifiques parmi des flores (dans notre étude, des géloses sélectives Chapman et cétrimide étaient ensemencées dans certains cas pour faciliter la recherche de *S. aureus* et *P. aeruginosa*) (49).

Dans notre étude, un certain nombre des discordances était lié à une absence de pousse en culture de bactéries détectées avec le FilmArray® : 11/33 (33,3%) des LBA, 14/36 (38,9%) des AT J1 et 28/39 (77,8%) des AT J3. Ces discordances sont probablement liées à la présence d'ADN bactérien en faible quantité (sous le seuil de détection de la culture) ou de bactéries non viables dans les prélèvements. 25 patients de l'étude étaient sous antibiothérapie au moment du premier prélèvement et tous les AT J3 ont été prélevés sous antibiothérapie. Ces discordances ne sont donc probablement pas liées à des faux positifs ou à des "amplifications non

spécifiques" avec la technique FilmArray®. En effet, pour 14 patients avec des discordances à J1, la ou les bactéries responsables de discordance(s), étaient détectée(s) par le PPFA à J3.

Avec la technique FilmArray® on trouve une augmentation de l'incidence des coinfections (polybactérienne ou virales-bactériennes). En effet, chez 49/100 patients une infection à plusieurs germes a été détectée (58,1% des LBA et des AT J1), tandis qu'avec la culture, 32 patients avaient une infection polymicrobienne (51,9 % des LBA et 34,6 % des AT J1). Ces données concordent avec les autres publications sur ce sujet et montre que l'incidence des pneumonies polymicrobiennes est probablement sous-estimée (42), (43).

Nous avons retrouvé au moins un virus chez 17 (1 patient avec une détection seulement à J3) patients avec le PPFA. Chez la moitié de ces patients aucune recherche virale n'avait été réalisée (notamment un patient chez qui seul un virus Influenza A était présent). Le rôle des virus dans les HAP est débattu (22). L'apport du PPFA pourrait être important, pour diminuer la transmission intra hospitalière ou justifier l'arrêt d'une antibiothérapie non nécessaire.

Les virus les plus fréquemment retrouvés étaient : rhinovirus/enterovirus (5 patients) et des Coronavirus (4 patients). Nous avons retrouvé 4 discordances entre les deux techniques, dont 3 liées à une détection avec le FilmArray® et l'absence de détection avec la technique Fast-track Diagnostics™. Pour 2 de ces discordances (2 Coronavirus) les deux techniques avaient été effectuée à 7 et 14 jours d'intervalle, pour la 3^{ème} (portant sur un rhinovirus/entérovirus) les prélèvements étaient de nature différente (un écouvillon nasal versus une AT) et réalisés à 2 jours d'intervalles. Pour la 4^{ème} discordance avec une technique de routine positive et un PPFA négatif les deux recherches avaient été réalisées à 15 jours d'intervalle. Ces discordances sur les résultats virologiques sont donc, dans notre étude, à prendre avec des réserves (différentes dates de réalisation et/ou différents sites de prélèvement). Lorsque les deux techniques ont réalisé sur le même prélèvement, aucune discordance n'a été constatée.

Les coronavirus actuellement détectés par le panel PPFA (229E, OC43, HKU1, NL63) sont responsables d'infections respiratoires habituellement banales. Devant la pandémie actuelle d'infection à SARS CoV-2, il y a nécessité d'intégrer la détection de ce virus dans le panel et cela est en cours de développement. Le Mers-CoV, n'est pas détecté par la PCR Fast-track Diagnostics™ mais fait partie du panel du PPFA. Devant la contagiosité, la mortalité, et

les précautions importantes à prendre chez un patient suspect, la détection rapide de ce virus est d'un intérêt majeur (50). Par ailleurs, nous pouvons regretter que certains herpesviridae (HSV, EBV, CMV) ne soient pas détectés, car leur réactivation fréquente en réanimation (notamment HSV) est reconnue comme un facteur de mauvais pronostic, et d'authentiques pneumopathies virales sont décrites (22).

L'inclusion dans l'étude de patients chez qui l'on analysait l'AT et le LBA est intéressant (n=58). En effet, les recommandations Européennes et Américaines divergent sur la nature du prélèvement à réaliser en cas de suspicion de pneumopathie (2), (3). Dans notre étude, les résultats des cultures étaient équivalents pour les deux types de prélèvement. De même, avec la technique FilmArray®, nous avons constaté qu'à condition d'appliquer un seuil de 10^5 copies/ml pour les AT, les résultats étaient comparables entre LBA et AT. Les AT ont plus de risque d'être contaminées par une bactérie commensale ou un pathogène non responsable de la pneumopathie, mais peuvent être réalisées plus facilement qu'un LBA. Nos données suggèrent qu'elles peuvent avoir autant de valeur qu'un LBA avec le FilmArray®, à condition de ne pas prendre en compte les bactéries détectées à 10^4 copies/ml dans ces prélèvements.

Un des intérêts majeurs du PFFA est la semi-quantification des bactéries, qui permet une interprétation plus juste. Nous n'avons pas trouvé de corrélation linéaire entre les deux types de numération (PFFA vs culture) pour les concentrations bactériennes élevées (10^5 , 10^6 , 10^7), mais la numération était calculée de manière approximative en culture (souvent simplement limitée à inférieur/supérieur au seuil de significativité) ne permettant pas une comparaison fiable. Nous avons constaté que la numération de 10^4 copies/ml pour les LBA correspondait soit à des numérations de 10^3 / 10^4 UFC/ml en culture (9/22 LBA), soit à une absence de détection en culture. En ce qui concerne les AT, les bactéries énumérées à 10^4 copies/ml avec le FilmArray® n'étaient pas retrouvées en culture dans 96,7% des cas (59/61)). Ainsi, devant ces résultats, nous proposons d'établir un seuil de positivité à 10^5 copies/ml pour les AT FilmArray® afin d'être plus concordant avec la culture et les recommandations de la Société Française de Microbiologie (**Annexe 5**). Néanmoins, la question des bactéries présentes à de faibles numérations et leur rôle dans le processus infectieux est un sujet intéressant de recherche pour le futur. Est-ce qu'une bactérie présente seule à une numération faible peut-être responsable d'une authentique pneumopathie ? Les détections de ces bactéries peuvent-elles amener à un sur diagnostic ou un mauvais diagnostic ? Dans notre étude, 38,9% des bactéries

détectées dans les AT J1 à 10^4 copies/ml ont été retrouvées à des numérations supérieures ou égale à J3 en FilmArray®.

De nouvelles recherches ont récemment émergé sur la physiopathologie des HAP, car la guérison clinique est seulement d'environ 70%. Il a été montré que des poumons sains (14) hébergent un microbiote divers et dynamique qui est profondément modifié chez les patients de soins critiques et ce déséquilibre pourrait jouer un rôle dans le développement de la pneumonie et la guérison. Une technologie comme le PPFA permettra probablement grâce à la détection plus large de bactéries et de virus de mieux appréhender ces interactions (47).

Toutes les résistances portées par des bactéries à Gram négatif (n=9) détectées génotypiquement avec le PPFA ont été retrouvées phénotypiquement. Dans les autres études sur le PPFA ce taux n'était pas de 100% (25-80%, (43,45,51). Cette différence était souvent liée à des bactéries avec des numérations faibles avec le PPFA qui n'étaient pas retrouvées en culture. Nous n'avons pas eu ce genre de cas dans notre étude, pour les bactéries à Gram négatif. Il faut toutefois garder à l'esprit que les résistances détectées par le PPFA ne sont pas reliées à une espèce (en dehors du SARM) et il est possible qu'une résistance détectée génotypiquement ne le soit pas phénotypiquement car la bactérie concernée n'aurait pas poussé en culture.

Nous mettons en garde contre la détection de la résistance à la méticilline par le PPFA, malgré le fait que cela soit une détection combinée (*mecA/C* et *MREJ*) (**Tableau 4**) nous avons eu un probable faux positif.

Nous avons eu plusieurs échecs du test PPFA au premier passage (« Test Invalid »). Après un nouvel essai, le test fonctionnait (prélèvements trop muqueux ? ou cassette défectueuse ?).

Nos résultats suggèrent que le PPFA pourrait permettre de diminuer l'utilisation de bêta-lactamines à large spectre, lors de l'antibiothérapie initiale. Dans nos centres la prévalence de BMR et BHR est faible (8). En effet, avec le résultat du PPFA, 84% des antibiothérapies initiales auraient pu être une association amoxicilline + acide clavulanique *versus* 59% en vie réelle. En simulant l'antibiothérapie initiale nous avons constaté que l'on aurait pu éviter l'utilisation de bêta-lactamines couvrant *P. aeruginosa* chez 16 patients et l'utilisation de

carbapénèmes/nouvelles bêta-lactamines chez 6 patients. Le PPFA permettrait une détection très précoce des BMR et des BHRe en réanimation (1h30 *versus* 24h pour le dépistage rectal par culture et 48h pour la culture des prélèvements respiratoires).

Bien qu'étant un outil novateur qui va améliorer le diagnostic microbiologique des infections respiratoires basses, le PPFA ne permet pas de se passer d'une analyse classique par culture. En effet, nous avons retrouvé chez 8% des patients de notre étude des bactéries hors panel qui auraient pu avoir un impact majeur sur l'antibiothérapie. De plus, la détection de la résistance aux antibiotiques du PPFA est limitée à la détection de résistances aux bêta-lactamines (BLSE, SARM et carbapénémase). L'adaptation de l'antibiothérapie nécessite un antibiogramme plus complet avec la détection de la résistance à d'autres famille d'antibiotiques.

Conclusion/Perspective

La recherche conventionnelle de pathogènes dans les prélèvements respiratoires par culture est d'une sensibilité limitée. Le délai de rendu des résultats est long dans les pneumonies sévères où l'importance d'une thérapeutique antibiotique adaptée et précoce est majeure. L'émergence de bactéries multi-résistantes et de virus responsables de pneumopathies graves (MERS-CoV, BHRé) suscitent aussi l'intérêt d'un outil détectant rapidement de multiples cibles et ayant la capacité d'en intégrer de nouvelles (SARS-CoV2).

Le panel *Pneumonia plus* (FilmArray®) permet une détection des principaux agents pathogènes des pneumopathies infectieuses à une vitesse et une sensibilité jamais expérimentée. Cette efficacité pourrait permettre la prescription d'une antibiothérapie d'emblée adaptée et ainsi éviter une grande consommation d'antibiotiques à large spectre. Il reste des points de faiblesse à cette technique, comme les bactéries à Gram négatif non détectées par le panel, ou la détection de la résistance à la méticilline chez *S. aureus*. Par ailleurs, afin de correspondre aux seuils établis pour la culture, il semble nécessaire d'interpréter comme négatifs, les résultats délivrés à 10^4 copies/mL dans les AT.

Le panel *Pneumonia plus* (FilmArray®) ne permet pas de se passer des techniques de culture bactérienne, mais apporte une plus-value non négligeable et pourrait être plus précis dans l'identification des bactéries responsables de la pneumopathie (prélèvements polybactériens).

La deuxième étape de l'étude Oracle se déroule actuellement au CHU de Nantes. Elle a pour but d'évaluer le PPFA en « vie réelle » (avec rendu du résultat au clinicien). Nous évaluons l'impact clinique de l'association du PPFA avec un algorithme de décision thérapeutique.

Annexes

Bactéries ciblées par le <i>Pneumoplus</i> (FilmArray®)	LBA (Nombre de prélèvement positifs en <i>Pneumoplus</i> (FilmArray®/culture))							AT (Nombre de prélèvement positifs en <i>Pneumoplus</i> (FilmArray®/culture))						
	(+/+)	(+/-)	(-/+)	(-/-)	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)	(+/+)	(+/-)	(-/+)	(-/-)	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)
<i>A. baumannii</i>	0	0	0	76	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>E. cloacae</i>	2	3	0	71	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]	2	3	0	77	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]
<i>E. coli</i>	15	2	0	59	100 [100 ; 100]	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	9	0	0	73	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>H. influenzae</i>	23	9	0	44	100 [100 ; 100]	83 [73 ; 93]	88 [81 ; 95]	20	14	1	47	95 [86 ; 100]	77 [66 ; 88]	82 [73 ; 90]
<i>K. aerogenes</i>	0	0	0	76	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>K. oxytoca</i>	2	4	1	69	67 [13 ; 100]	95 [89 ; 100]	93 [88 ; 99]	2	4	0	76	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>K. pneumoniae</i>	7	2	0	67	100 [100 ; 100]	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	6	1	0	75	100 [100 ; 100]	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]
<i>M. catarrhalis</i>	0	2	0	74	NA	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	1	4	0	77	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>Proteus spp</i>	1	4	0	71	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]	4	4	0	74	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>P. aeruginosa</i>	3	0	0	73	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	3	0	0	79	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>S. marcescens</i>	1	1	0	74	100 [100 ; 100]	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]	0	3	0	79	NA	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]
<i>S. aureus</i>	17	6	0	53	100 [100 ; 100]	90 [82 ; 98]	92 [86 ; 98]	19	5	0	58	100 [100 ; 100]	92 [85 ; 99]	94 [89 ; 99]
<i>S. agalactiae</i>	1	3	0	72	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]	0	4	0	78	NA	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>S. pneumoniae</i>	11	4	0	61	100 [100 ; 100]	94 [88 ; 100]	95 [90 ; 100]	9	4	0	69	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>S. pyogenes</i>	0	1	0	75	NA	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
Total	83	41	1	1015	99 [96 ; 100]	96 [95 ; 97]	96 [95 ; 97]	75	46	1	1108	99 [96 ; 100]	96 [95 ; 97]	96 [95 ; 97]

Annexe 1: PPA, NPA et OPA par bactéries a J1

Culture (Numération en UFC/ml)	Numération PPFA (en copies/ml)				Total
	10^4	10^5	10^6	$>10^7$	
Pas de pousse significative	22	19	8	15	64
10^3	0	0	0	0	0
10^4	0	0	0	0	0
$>10^5$	0	1	15	36	52
$>10^6$	0	0	1	12	13
$>10^7$	0	0	1	2	3
Total	22	20	25	65	

Annexe 2: Comparaison des numérations entre les deux techniques (AT J1)

Culture (Numération en UFC/ml)	Numération PPFA (en copies/ml)				Total
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	>10 ⁷	
Pas de pousse significative	13	10	7	6	36
10 ²	2	0	0	0	2
10 ³	5	2	0	3	10
>10 ⁴	2	7	12	35	56
>10 ⁵	0	0	1	2	3
>10 ⁶	0	0	0	4	4
>10 ⁷	0	0	0	1	1
Total	22	19	20	51	

Annexe 3 : Comparaison des numérations entre les deux techniques (LBA)

	Dilutions recommandées	Seuils de significativité
Expectorations	1 /100000 et 1/10000000	$\geq 10^7$
Aspiration endotrachéale	1/1000 et 1/100000	$\geq 10^5$
LBA et aspiration endo bronchique	1 /100 et 1/10000	$\geq 10^4$
PDP et brosse bronchique	Pur et 1/100	$\geq 10^3$

Dilution	Colonies	UFC
Pur	1	$10^2/\text{ml}$
1/10	1	$10^3/\text{ml}$
1/100	1	$10^4/\text{ml}$

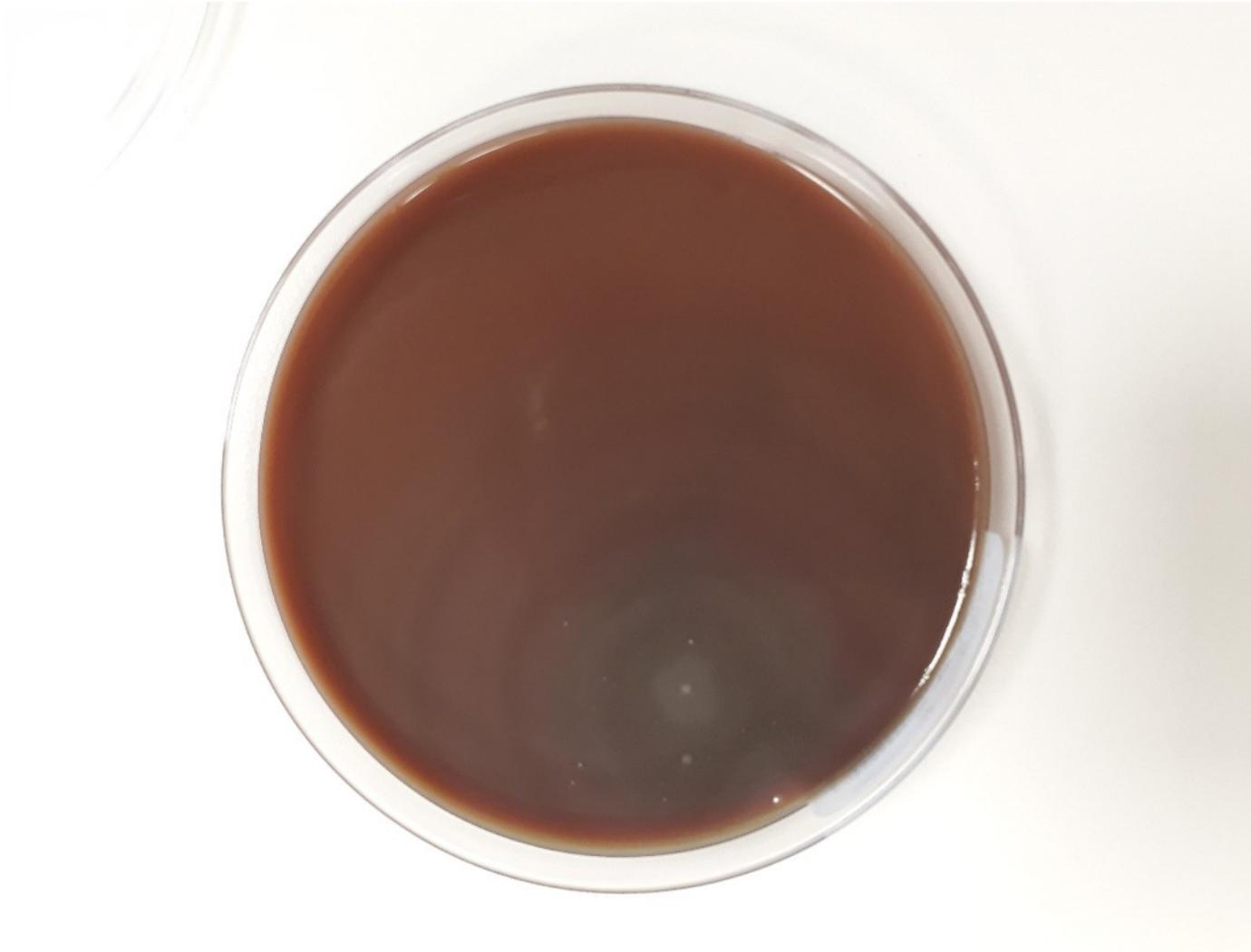
Annexe 4 : Seuils de significativité des prélèvements respiratoire et dilutions recommandées (10)

		Linezolid or vancomycin	Colistine	Meropenem or	Ceftazidime-Avibactam	Ceftazidime	Cefepime	Levofloxacin	Spiramycin	Amoxicillin + ac. clav. or C3G	Amoxicillin	Osetamivir	Aminoglycoside
Positive for Antimicrobial resistance gene	mecA/C and MREJ (Methicillin resistance)												In association, in case of septic shock or after prior exposure to broad-spectrum beta-lactams (cefepime, carbapenems) in case of potentially difficult to treat bacteria
	CTX-M (ESBL)												
	KPC, Oxa48-like* (Carbapenemases)		+ Cefta/Avi		+ Colistine								
	NDM, VIM, IMP* (Carbapenemases)		+ Meropenem	+ Colistine	+ aztreonam								
Potentially difficult to treat bacteria	<i>Acinetobacter baumannii</i>												
	<i>E. cloacae</i>												
	<i>K. aerogenes</i>												
	<i>S. marcescens</i>												
intracellular bacteria	<i>P. aeruginosa</i>												
	<i>L. pneumophila</i>							+ rova	+ lévo				
Viruses	<i>C. ou M. pneumoniae</i>												
	Influenza A, B									Amox/ac. clav			
Positive for others	Others												
	<i>Proteus sp</i>									Amox/ac. clav			
	<i>K. pneumoniae</i>									C3G			
	<i>K. oxytoca</i>									C3G			
	<i>E. coli</i>									Amox/ac. clav			
	<i>H. influenzae</i>									Amox/ac. clav			
	<i>M. catarrhalis</i>												
	<i>S. aureus</i>												
<i>Strepto. A or B</i>													
Negative for all tested bacteria***	<i>S. pneumoniae</i>									Polymicrob.	seul		
							Si BGN à FED avis inf.			Si ED négatif			

*Si Carbapénémases(KPC, OXA48, NDM, VIM, IMP) : Avis SMIT et faire tester sensibilité à Colistine, Tigécycline et Fosfomycine

*** Si discordance PCR et examen direct : Possibilité de *S.maltophilia*, *M. morgani*, *C. freundii*, *C.koseri*, *H.alvei*(avis SMIT)

Annexe 5 : Algorithme de décision d'antibiothérapie initiale en fonction du résultat du PPFA



Annexe 6 : Exemple d'envahissement d'une gélose par *P. mirabilis*



Annexe 7 : Gélose chromogène ensemencée avec un prélèvement polybactérien

Annexe 8 : Résultats du PPFA et des techniques de routine pour les 100 patients

Légende :

NR = non réalisé

Non retrouvé en culture

Bactérie <10⁵ dans une AT

Ab = *Acinetobacter calcoaceticus baumannii* complex

Eccx = *Enterobacter cloacae* complex

Ec = *Escherichia coli*

Hi = *Haemophilus influenzae*

Ka = *Klebsiella aerogenes*

Ko = *Klebsiella oxytoca*

Kp = *Klebsiella pneumoniae* group

Mc = *Moraxella catarrhalis*

Pspp = *Proteus* spp.

Pa = *Pseudomonas aeruginosa*

Sm = *Serratia marcescens*

Sa = *Staphylococcus aureus*

SgpB = *Streptococcus agalactiae*

Sp = *Streptococcus pneumoniae*

SgpA = *Streptococcus pyogenes*

Ck = *Citrobacter koseri*

Ha = *Hafnia alvei*

Mm = *Morganella morganii*

Pm = *Proteus mirabilis*

Pv = *Proteus vulgaris*

Rp = *Raoultella planticola*

Spp = *Streptococcus pseudopneumoniae*

Stm = *Stenotrophomonas maltophilia*

Patients	Durée Hospitalisation à J1 (jours)	Prélèvements	Résultats Pneumoplus (FilmArray®)	Résultats Culture	Résultats virologie routine	ATB avant prélèvement	Antibiothérapie initiale
1	4	1-AT J1 1-LBA 1-AT J3	Sa ($>10^7$) + Hi ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) + Ko ($=10^5$) Sa ($=10^6$) + Hi ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) + Ko ($=10^4$) Ab ($=10^6$) + Hi ($=10^5$) + Ko ($=10^5$) + Sp ($=10^4$) + Sa ($=10^4$)	Sa ($>10^5$) + Hi ($>10^5$) + Sp ($>10^5$) Sa ($>10^4$) + Hi ($>10^4$) + Sp ($>10^4$) Ab ($=10^5$)	NR	Non	Augmentin
2	8	2-AT J1 2-LBA 2-AT J3	Hi ($=10^6$) Hi ($=10^6$) NR	Hi ($>10^5$) Hi ($=10^4$) NR	NR	Non	Cefepime
3	20	3-AT J1 3-LBA 3-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	négatif	Non	Cefepime
4	2	4-AT J1 4-LBA 4-AT J3	Hi ($>10^7$) + Sp ($=10^5$) Hi ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) Hi ($>10^7$) + Sp ($=10^5$) + Ec ($=10^4$)	Hi ($>10^5$) Hi ($>10^4$) Hi ($>10^5$) + Ec ($>10^5$)	NR	Non	Augmentin
5	5	5-AT J1 5-LBA 5-AT J3	Sa ($>10^7$) Sa ($>10^7$) Sa ($>10^7$) + Ko ($=10^4$)	Sa ($>10^5$) Sa ($>10^4$) Sa ($>10^5$)	négatif	Non	Augmentin
6	0	6-AT J1 6-LBA 6-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	négatif	Non	Augmentin
7	7	7-AT J1 7-LBA 7-AT J3	Hi ($=10^5$) Hi ($=10^5$) Négatif	Négatif Hi ($=10^3$) Négatif	NR	Non	Merone Ciprofloxacine
8	5	8-AT J1 8-LBA 8-AT J3	Eccx ($=10^5$) + Hi ($=10^6$) Hi ($=10^5$) Négatif	Négatif Négatif Négatif	NR	Non	Augmentin
9	6	9-AT J1 9-LBA 9-AT J3	Eccx ($=10^4$) Négatif Psp ($>10^7$) + Eccx ($>10^7$)	Négatif Négatif Pv ($>10^5$) + Eccx ($=10^5$)	NR	Oui (Augmentin)	Augmentin
10	1	10-AT J1 10-LBA 10-AT J3	Mc ($=10^4$) NR négatif	Hi ($>10^5$) NR Négatif	NR	Non	Augmentin

11	4	11-AT J1 11-LBA 11-AT J3	Ec (=10 ⁶) + Hi (>10⁷) NR Ec (=10 ⁶)	Ec (>10 ⁵) NR Ec (=10 ⁶)	NR	Non	Augmentin
12	8	12-AT J1 12-LBA 12-AT J3	Ab (=10 ⁴) + Ec (=10 ⁴) Ec (=10 ⁵) Négatif	Négatif Ec (>10 ⁴) Négatif	Négatif	Non	Augmentin
13	15	13-AT J1 13-LBA 13-AT J3	Eccx (=10 ⁶) Eccx (=10⁵) NR	Eccx (>10 ⁶) Négatif NR	Négatif	Oui tienam	Impénème
14	10	14-AT J1 14-LBA 14-AT J3	Kp (=10 ⁶) + Pa (=10 ⁴) Kp (=10 ⁴) Pa (=10⁶) + Kp (=10⁵) + Ec (=10⁴) + Adenovirus	Kp (>10 ⁵) Kp (=10 ³) Négatif	négatif	Oui Augmentin	Cefepime
15	7	15-AT J1 15-LBA 15-AT J3	Hi (=10 ⁶) + Sa (10 ⁴) Hi (=10 ⁵) NR	Hi (>10 ⁵) Hi (>10 ⁴) NR	NR	Non	Augmentin
16	7	16-AT J1 16-LBA 16-AT J3	Hi (>10 ⁷) + SgpA (=10 ⁴) + Adenovirus Hi (=10 ⁶) + SgpA (=10⁴) Hi (>10 ⁷) + Ec (=10 ⁶) + SgpA (=10 ⁵) + adenovirus	Hi (>10 ⁵) Hi (>10 ⁴) Ec (>10 ⁵)	NR	Non	Augmentin
17	3	17-AT J1 17-LBA 17-AT J3	Hi (=10⁵) + Mc (=10⁶) + Pspp (=10⁶) NR Pspp (=10 ⁴)	Pm (=10 ⁵) NR Négatif	NR	Non	Augmentin
18	5	18-AT J1 18-LBA 18-AT J3	Sa (=10 ⁶) + Hi (>10 ⁷) + Mc (>10⁷) + Coronavirus NR NR	Hi (>10 ⁵) + Sa (>10 ⁵) NR NR	négatif	Non	Augmentin
19	13	19-AT J1 19-LBA 19-AT J3	Sa (=10 ⁶) + Eccx (=10⁵) + Coronavirus NR Sa (=10⁵) + Eccx (=10⁴) + Coronavirus	Sa (>10 ⁵) NR Négatif	négatif	Oui (Ciprofloxacine)	Cefepime
20	10	20-AT J1 20-LBA 20-AT J3	NR Ec (=10⁵) + Sm (=10⁴) + M. pneumoniae Sm (=10 ⁴) + <i>M. pneumoniae</i>	NR Sm (=10 ³) Négatif	NR	Oui (Tazocilline)	Cefepime

21	1	21-AT J1 21-LBA 21-AT J3	<i>SgpB</i> ($=10^5$) NR Négatif	Négatif NR Négatif	négatif	Non	Augmentin, amoxicilline, Dalacine, Cefazoline
22	2	22-AT J1 22-LBA 22-AT J3	Hi ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) Hi ($>10^7$) + Sp ($=10^5$) Hi ($>10^7$) + Sp ($=10^5$)	Hi ($>10^6$) + Sp ($>10^6$) Hi ($>10^4$) + Sp ($>10^4$) Négatif	NR	Non	Augmentin
23	8	23-AT J1 23-LBA 23-AT J3	Hi ($>10^7$) + Sa ($=10^6$) NR Hi ($=10^5$)	Hi ($>10^5$) + Sa ($>10^5$) NR Négatif	NR	Non	Cefepime
24	9	24-AT J1 24-LBA 24-AT J3	négatif + VRS Négatif négatif + VRS	Négatif Négatif Négatif	VRS	Oui Céfépime	Meronem + linezolide
25	8	25-AT J1 25-LBA 25-AT J3	Sa ($>10^7$) NR NR	Sa ($>10^6$) NR NR	NR	Non	Antibiothérapie retardée de 3 jours
26	69	26-AT J1 26-LBA 26-AT J3	Ec ($=10^4$) Négatif Négatif	Négatif Négatif Stm ($>10^5$)	NR	Non	Cefepime
27	24	27-AT J1 27-LBA 27-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	négatif	Non	Méronème, Linezolide,
28	26	28-AT J1 28-LBA 28-AT J3	Kp ($>10^7$) + <i>bla</i> _{CTXM} + <i>bla</i> _{NDM} NR Kp ($>10^7$) + <i>bla</i> _{CTXM} + <i>bla</i> _{NDM}	Kp ($>10^6$) + Stm ($>10^6$) NR Kp ($>10^5$)	NR	Non	Meronem Colimycine
29	14	29-AT J1 29-LBA 29-AT J3	NR Sa ($=10^4$) + Ec ($=10^6$) + <i>bla</i> _{CTXM} Ec ($=10^4$) + <i>bla</i> _{CTXM}	NR Ec ($>10^4$) + Sa ($=10^3$) Négatif	NR	Non	Imipénème
30	3	30-AT J1 30-LBA 30-AT J3	Ec $>10^7$) NR NR	Ec ($>10^5$) NR NR	NR	Non	Augmentin

31	2	31-AT J1 31-LBA 31-AT J3	Hi (>10⁷) + Sp (>10⁷) + Rhinovirus/Enterovirus NR Hi (=10⁴) + Sp (=10⁴) + Rhinovirus/Enterovirus	Sp (>10 ⁶) NR Négatif	Rhinovirus/Enterovirus	Non	Augmentin
32	6	32-AT J1 32-LBA 32-AT J3	Ec (>10 ⁷) + Sa (=10⁶) Ec (=10 ⁶) + Sa (=10⁵) Ec (=10 ⁴)	Ec (>10 ⁶) Ec (>10 ⁴) Spp (>10 ⁵)	Négatif	Non	Augmentin
33	3	33-AT J1 33-LBA 33-AT J3	Sa (>10 ⁷) + Hi (>10⁷) + Ec (=10 ⁶) + Rhinovirus/Enterovirus Sa (>10 ⁷) + Hi (>10⁷) + Ec (>10 ⁷) + Rhinovirus/Enterovirus Ec (>10 ⁷) + Hi (>10⁷) + Sa (=10 ⁵) + Ko (=10 ⁴) + Rhinovirus/Enterovirus	Ec (>10 ⁵) + Sa (>10 ⁵) Ec (>10 ⁴) + Sa (>10 ⁴) Ec (>10 ⁵) + Sa (>10 ⁵)	Rhinovirus/Enterovirus	Non	Augmentin
34	7	34-AT J1 34-LBA 34-AT J3	Hi (>10 ⁷) + Pspp (=10 ⁶) + Sa (>10 ⁷) Hi (>10⁷) + Pspp (=10⁶) + Sa (>10 ⁷) NR	Sa (>10 ⁵) + Hi (>10 ⁵) + Pm (>10 ⁵) + Ha (>10⁵) Sa (=10 ³) + Ha (=10³) NR	NR	Non	tazocilline linézolide
35	7	35-AT J1 35-LBA 35-AT J3	Sp (=10 ⁴) + Adenovirus + Influenza A Sp (=10⁴) + Adenovirus + Influenza A négatif + Adenovirus + Influenza A	Négatif Négatif Négatif	Adenovirus + Influenza A	Oui amoxicilline	Non
36	4	36-AT J1 36-LBA 36-AT J3	Hi (>10 ⁷) + Sp (>10 ⁷) + Sa (=10 ⁶) + SgpB (=10⁶) Hi (>10 ⁷) + Sp (=10 ⁶) + Sa (=10 ⁶) + SgpB (=10⁵) Hi (>10⁷) + Sp (>10⁷) + Sa (=10⁶) + SgpB (=10⁶)	Hi (>10 ⁵) + Sp (>10 ⁵) + Sa (>10 ⁵) Hi (>10 ⁴) + Sp (>10 ⁴) + Sa (>10 ⁴) Sa (>10 ⁵)	Négatif	Non	Augmentin
37	2	37-AT J1 37-LBA 37-AT J3	Hi (=10⁵) + Influenza A négatif + Influenza A Ab (>10 ⁷) + Ec (=10 ⁶) + bla _{CTXM} + Influenza A	Négatif Négatif Ab (>10 ⁵) + Ec (=10 ⁵)	Influenza A	Non	Rocephine rovamycine flagyl
38	29	38-AT J1 38-LBA 38-AT J3	Pspp (>10 ⁷) + Pa (=10 ⁶) + Kp (=10 ⁴) NR Pspp (=10⁵) + Pa (>10⁷) + Kp (=10⁵)	Pm (>10 ⁵) + Pa (>10 ⁵) NR Pa (>10 ⁵)	Négatif	Non	Meronem
39	13	39-AT J1 39-LBA 39-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	NR	Oui Augmentin Triflucan	Augmentin
40	3	40-AT J1 40-LBA 40-AT J3	Ec (>10 ⁷) + Kp (>10 ⁷) + Pspp (>10⁷) + Eccx (=10⁵) + Hi (=10⁵) + Ko (=10⁵) + Sp (=10 ⁴) + rhinovirus/enterovirus Ec (=10 ⁶) + Kp (>10 ⁷) + Pspp (>10⁷) + Eccx (=10⁴) + Hi (=10⁴) + Ko (=10⁴) + rhinovirus/enterovirus Ec (=10 ⁴) + Kp (=10 ⁴) + Pspp (=10 ⁴) + Rhinovirus/Enterovirus	Ec (>10 ⁵) + Kp (>10⁵) + Ck (>10⁵) + Mm (>10⁵) Ec (=10 ⁴) + Kp (=10 ⁴) + Ck (=10⁴) + Mm (=10⁴) Négatif	Rhinovirus/Enterovirus	Non	Augmentin

41	5	41-AT J1 41-LBA 41-AT J3	Sa (>10 ⁷) + Hi (>10 ⁷) Sa (>10 ⁷) + Hi (>10 ⁷) Hi (>10⁷) + Kp (>10 ⁷) + Sa (>10 ⁷)	Sa (>10 ⁵) + Hi (>10 ⁵) Sa (>10 ⁴) + Hi (>10 ⁴) Kp (>10 ⁵) + Sa (>10 ⁵)	NR	Non	Augmentin
42	4	42-AT J1 42-LBA 42-AT J3	Sa (>10 ⁷) NR Sa (=10 ⁵)	Sa (>10 ⁵) NR Sa (=10 ⁵)	NR	Non	Augmentin
43	2	43-AT J1 43-LBA 43-AT J3	Ec (>10 ⁷) + Ko (=10 ⁶) + Sa (=10⁶) + bla _{CTXM} Ec (>10 ⁷) + Sa (=10⁵) + Ko (=10 ⁴) + bla _{CTXM} Ec (=10 ⁶) + Sa (=10 ⁴) + bla _{CTXM}	Ec (>10 ⁵) + Ko (>10 ⁵) Ec (>10 ⁴) + Ko (=10 ³) Ec (=10 ⁵)	NR	Oui Augmentin	Merone
44	5	44-AT J1 44-LBA 44-AT J3	NR Ec (=10 ⁴) + Sa (=10 ⁵) Sa (=10 ⁵)	NR Ec (>10 ⁴) + Sa (>10 ⁴) Sa (=10 ⁵)	NR	Non	Cefepime
45	20	45-AT J1 45-LBA 45-AT J3	Négatif Kp (=10⁴) Négatif	Négatif Négatif Négatif	NR	Oui Rocéphine Flagyl	Rocéphine flagyl
46	9	46-AT J1 46-LBA 46-AT J3	Sa (>10 ⁷) NR Sa (=10⁵) + Kp (=10 ⁶) + bla _{CTXM} + bla _{OXA-48 like}	Sa (>10 ⁵) NR Kp (>10 ⁵)	NR	Oui Bactrim	Bactrim
47	2	47-AT J1 47-LBA 47-AT J3	NR Hi (>10 ⁷) + Sp (>10 ⁷) + Sa (=10 ⁶) + coronavirus Hi (>10⁷) + Sp (=10⁶) + Sa (=10⁶) + coronavirus	NR Sa (>10 ⁴) + Hi (>10 ⁴) + Sp (>10 ⁴) Négatif	NR	Non	Augmentin Tavanic
48	3	48-AT J1 48-LBA 48-AT J3	Mc (>10 ⁷) NR Mc (=10⁵)	Mc (>10 ⁵) NR Négatif	NR	Non	Cefepim
49	14	49-AT J1 49-LBA 49-AT J3	Négatif Ec (=10 ⁵) + Eccx (=10 ⁴) Ec (=10⁵)	Négatif Eccx (=10 ⁴) + Mm (=10³) + Ec (=10 ³) Négatif	négatif	Oui Augmentin	Cefepim Tavanic
50	8	50-AT J1 50-LBA 50-AT J3	Négatif Négatif NR	Négatif Négatif NR	négatif	Non	Méronem, Linézolide

51	2	51-AT J1 51-LBA 51-AT J3	négatif + Coronavirus NR négatif + Coronavirus	Négatif NR Négatif	NR	Cefuroxime (ABP)	Augmentin
52	8	52-AT J1 52-LBA 52-AT J3	Hi (>10⁷) + Pspp (>10⁷) + Sp (>10⁷) + Ko (=10⁵) + Coronavirus Hi (>10⁷) + Pspp (>10⁷) + Sp (=10⁶) + Ko (=10⁴) NR	Pm (>10 ⁶) Pm (>10 ⁴) NR	NR	Non	Augmentin Tavanic
53	21	53-AT J1 53-LBA 53-AT J3	NR Kp (=10 ⁶) + bla _{CTXM} + Virus parainfluenza NR	NR Kp (=10 ⁴) NR	Parainfluenzae type 3	Oui Cefazoline, Clindamycine	Cefepime Linezolid
54	5	54-AT J1 54-LBA 54-AT J3	Hi (>10⁷) Hi (>10 ⁷) NR	Négatif Hi (>10 ⁴) NR	NR	Non	Augmentin Tavanic
55	36	55-AT J1 55-LBA 55-AT J3	Sa (=10⁵) + Ab (=10⁴) Sa (=10⁵) Sa (=10 ⁶) + Ab (=10⁶)	Stm (>10⁵) Stm (>10⁴) Sa (>10 ⁵)	NR	Non	Augmentin
56	28	56-AT J1 56-LBA 56-AT J3	Kp (>10 ⁷) + Sm (=10⁶) + Sa (=10⁵) + Ka (=10 ⁴) + bla _{CTXM} Kp (=10 ⁵) + bla _{CTXM} Kp (=10 ⁶) + Sm (=10⁶) + Sa (=10⁴) + Hi (=10⁴) + bla_{CTXM}	Kp (>10 ⁶) Kp (=10 ⁴) Kp (=10 ⁵)	NR	Non	Cefepime
57	23	57-AT J1 57-LBA 57-AT J3	NR Négatif Négatif	NR Ko (=10³) Négatif	NR	Non	Aztreonam
58	11	58-AT J1 58-LBA 58-AT J3	NR Sa (=10⁴) Sa (=10⁵)	NR Négatif Négatif	NR	Oui Augmentin Tavanic	Cefepime tavanic
59	3	59-AT J1 59-LBA 59-AT J3	Hi (>10 ⁷) Hi (>10 ⁷) Hi (=10⁶)	Hi (>10 ⁵) Hi (>10 ⁴) Négatif	négatif	Non	Augmentin
60	14	60-AT J1 60-LBA 60-AT J3	Négatif NR Négatif	Négatif NR Négatif	NR	Oui Céfepime Linézolide	Cefepime Linezolid

61	10	61-AT J1 61-LBA 61-AT J3	Négatif Négatif Ab ($=10^4$)	Négatif Négatif Négatif	NR	Oui Tazocilline	Meropenem tavanic
62	2	62-AT J1 62-LBA 62-AT J3	Sa ($=10^4$) Négatif Ab ($=10^5$) + Sa ($=10^5$)	Rp ($>10^6$) Négatif Négatif	NR	Non	Augmentin
63	5	63-AT J1 63-LBA 63-AT J3	NR Sp ($=10^6$) + Hi ($>10^7$) + SgpB ($=10^6$) Hi ($=10^6$) + Ab ($=10^4$) + SgpB ($=10^4$)	NR Sp ($>10^4$) + Hi ($>10^4$) Négatif	NR	Non	Augmentin
64	5	64-AT J1 64-LBA 64-AT J3	Hi ($>10^7$) + Eccx ($=10^6$) + Sm ($=10^5$) + Ko ($=10^4$) Hi ($>10^7$) + Eccx ($=10^4$) Eccx ($=10^5$) + Hi ($=10^4$) + Sm ($=10^4$)	Hi ($>10^6$) + Eccx ($>10^6$) Hi ($>10^4$) + Eccx ($=10^3$) Négatif	NR	Non	Augmentin
65	8	65-AT J1 65-LBA 65-AT J3	NR Sa ($=10^5$) Sa ($=10^4$)	NR Sa ($>10^4$) Sa ($=10^5$)	NR	Non	Augmentin
66	7	66-AT J1 66-LBA 66-AT J3	Kp ($=10^6$) + Sp ($>10^7$) Kp ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) Kp ($>10^7$) + Sp ($>10^7$)	Kp ($>10^6$) + Sp ($>10^6$) Kp ($>10^4$) + Sp ($>10^4$) Kp ($>10^6$) + Sp ($>10^6$)	NR	Non	Augmentin
67	40	67-AT J1 67-LBA 67-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	Négatif	Oui Ciflox	Ciprofloxacine
68	6	68-AT J1 68-LBA 68-AT J3	Kp ($=10^4$) Kp ($=10^4$) NR	Négatif Négatif NR	Négatif	Non	Tazocilline
69	7	69-AT J1 69-LBA 69-AT J3	SgpB ($>10^7$) + Kp ($=10^6$) + Ko ($=10^4$) Kp ($=10^4$) + SgpB ($>10^7$) Kp ($=10^5$) + SgpB ($=10^4$)	Kp ($>10^5$) Kp ($=10^3$) + SgpB ($=10^4$) Kp ($>10^5$)	NR	Oui	Augmentin
70	8	70-AT J1 70-LBA 70-AT J3	Ec ($>10^7$) + Hi ($>10^7$) + Kp ($=10^5$) Ec ($=10^5$) + Kp ($=10^4$) + Hi ($=10^5$) Ec ($=10^4$)	Ec ($>10^5$) Ec ($>10^4$) + Kp ($=10^3$) Négatif	négatif	Non	Augmentin

71	12	71-AT J1 71-LBA 71-AT J3	<i>Sp</i> ($=10^6$) + <i>Hi</i> ($=10^5$) + <i>Sa</i> ($=10^6$) <i>Sp</i> ($=10^6$) + <i>Hi</i> ($=10^4$) + <i>Sa</i> ($=10^4$) NR	Négatif Négatif NR	NR	Non	Cefepime
72	36	72-AT J1 72-LBA 72-AT J3	Négatif NR Négatif	<i>Spp</i> ($>10^5$) NR Négatif	NR	Non	Meropenem, vancomycine
73	3	73-AT J1 73-LBA 73-AT J3	NR Ec ($>10^7$) + <i>Hi</i> ($>10^7$) + <i>Mc</i> ($=10^6$) <i>Ec</i> ($=10^5$) + <i>Hi</i> ($=10^6$) + <i>Mc</i> ($=10^4$)	NR Ec ($>10^4$) + <i>Hi</i> ($>10^4$) Négatif	NR	Non	Cefepime
74	4	74-AT J1 74-LBA 74-AT J3	Pa ($>10^7$) + <i>Sa</i> ($>10^7$) + <i>Hi</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($>10^7$) + <i>Ec</i> ($=10^4$) Pa ($=10^6$) + <i>Sa</i> ($=10^6$) + <i>Hi</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($>10^7$) Pa ($>10^7$) + <i>Sa</i> ($=10^5$) + <i>Hi</i> ($=10^5$) + <i>Sp</i> ($=10^4$)	Pa ($>10^5$) + <i>Sa</i> ($>10^5$) + <i>Hi</i> ($>10^5$) + <i>Sp</i> ($>10^5$) Pa ($>10^4$) + <i>Sa</i> ($>10^4$) + <i>Hi</i> ($>10^4$) + <i>Sp</i> ($>10^4$) Pa ($>10^5$)	négatif	Non	Augmentin
75	12	75-AT J1 75-LBA 75-AT J3	<i>Hi</i> ($=10^5$) <i>Hi</i> ($=10^4$) Négatif	Négatif Négatif Négatif	négatif	Oui Augmentin	Cefepime
76	5	76-AT J1 76-LBA 76-AT J3	Ko ($=10^6$) Ko ($=10^6$) NR	Ko ($>10^5$) Ko ($>10^4$) NR	NR	Non	Augmentin
77	11	77-AT J1 77-LBA 77-AT J3	<i>Hi</i> ($>10^7$) + <i>Pspp</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($>10^7$) <i>Hi</i> ($>10^7$) + <i>Pspp</i> ($=10^5$) + <i>Sp</i> ($>10^7$) <i>Hi</i> ($=10^5$) + <i>Pspp</i> ($=10^4$) + <i>Sp</i> ($=10^4$)	Négatif <i>Hi</i> ($=10^4$) + <i>Sp</i> ($=10^3$) Négatif	NR	Non	Cefepime
78	11	78-AT J1 78-LBA 78-AT J3	Ko ($=10^4$) + <i>Sa</i> ($=10^4$) NR NR	Négatif NR NR	NR	Oui (Céfazoline)	Tazocilline
79	8	79-AT J1 79-LBA 79-AT J3	Négatif Négatif Négatif	Négatif Négatif Négatif	NR	Non	Augmentin
80	2	80-AT J1 80-LBA 80-AT J3	Ec ($>10^7$) + <i>Sa</i> ($>10^7$) + <i>SgpB</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($=10^6$) Ec ($>10^7$) + <i>Sa</i> ($>10^7$) + <i>SgpB</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($>10^7$) Pa ($>10^7$) + <i>Ec</i> ($>10^7$) + <i>Sa</i> ($>10^7$) + <i>SgpB</i> ($>10^7$) + <i>Sp</i> ($=10^6$)	Ec ($>10^5$) + <i>Sa</i> ($>10^5$) + <i>Sp</i> ($>10^5$) Ec ($>10^4$) + <i>Sa</i> ($>10^4$) + <i>Sp</i> ($=10^4$) Pa ($>10^5$) + <i>Ck</i> ($>10^5$)	négatif	Non	Augmentin

81	4	81-AT J1	Hi ($>10^7$) + Mc ($>10^7$) + Pa ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) + Pspp ($=10^5$) + Sm ($=10^5$) + Kp ($=10^4$)	Hi ($>10^5$) + Pa ($>10^5$) + Sp ($>10^5$)	Négatif	Non	Augmentin
		81-LBA	Hi ($>10^7$) + Mc ($=10^6$) + Pa ($=10^6$) + Sp ($>10^7$) + Pspp ($=10^4$) + Sm ($=10^4$)	Hi ($>10^4$) + Pa ($>10^4$) + Sp ($>10^4$)			
		81-AT J3	Hi ($>10^7$) + Mc ($=10^6$) + Pa ($>10^7$) + Sp ($=10^6$) + Pspp ($=10^5$) + Sm ($=10^6$)	Pa ($>10^5$)			
82	2	82-AT J1	Négatif	Négatif	NR	Non	Augmentin
		82-LBA	NR	NR			
		82-AT J3	Sa ($>10^7$)	Sa ($>10^6$)			
83	3	83-AT J1	Hi ($>10^7$) + Pspp ($=10^5$)	Hi ($>10^5$)	NR	Non	Augmentin
		83-LBA	NR	NR			
		83-AT J3	Hi ($=10^6$) + Pspp ($=10^4$)	Négatif			
84	3	84-AT J1	Hi ($>10^7$) + Sa ($=10^5$)	Hi ($>10^5$) + Sa ($>10^5$)	NR	Non	Augmentin
		84-LBA	Hi ($>10^7$) + Sa ($>10^7$)	Hi ($=10^4$) + Sa ($>10^4$)			
		84-AT J3	Hi ($=10^6$) + Sa ($=10^6$)	Sa ($>10^5$)			
85	4	85-AT J1	NR	NR	NR	Non	Augmentin
		85-LBA	Hi ($=10^6$) + Sa ($>10^7$)	Sa ($>10^4$)			
		85-AT J3	NR	NR			
86	7	86-AT J1	Sa ($>10^7$)	Sa ($>10^5$)	NR	Non	Augmentin
		86-LBA	Sa ($=10^5$)	Sa ($=10^4$)			
		86-AT J3	Sa ($>10^7$)	Sa ($>10^5$)			
87	6	87-AT J1	Hi ($>10^7$) + Sp ($>10^7$) + Sa ($>10^7$) + Ko ($=10^5$)	Hi ($>10^5$) + Sp ($=10^6$) + Sa ($>10^6$)	NR	Non	Augmentin
		87-LBA	NR	NR			
		87-AT J3	Ko ($=10^6$) + Sa ($=10^6$) + Sp ($=10^5$) + Hi ($=10^4$) + Pspp ($=10^4$)	Ck ($>10^5$) + Ko ($=10^5$)			
88	6	88-AT J1	NR	NR	NR	Non	Augmentin
		88-LBA	Ec ($=10^5$) + Pa ($>10^7$) + Sa ($>10^7$) + MecA/C and MREJ	Pa ($>10^4$) + Sa ($>10^4$)			
		88-AT J3	Pa ($>10^7$) + Sa ($=10^4$)	Pa ($>10^5$)			
89	2	89-AT J1	Sa ($>10^7$) + Mc ($=10^6$) + Ko ($=10^4$) + Rhinovirus/Enterovirus	Sa ($>10^5$)	Négatif	Non	Augmentin 1J puis Cefepime
		89-LBA	NR	NR			
		89-AT J3	NR	NR			
90	9	90-AT J1	NR	NR	Négatif	Non	Augmentin
		90-LBA	Sp ($>10^7$) + Hi ($>10^7$) + Ec ($=10^6$) + Ko ($=10^5$) + Eccx ($=10^4$)	Sp ($>10^4$) + Hi ($>10^4$) + Ec ($>10^4$)			
		90-AT J3	NR	NR			

91	17	91-AT J1 91-LBA 91-AT J3	Sa (=10 ⁶) + Hi (=10 ⁴) NR Hi (=10⁶) + Sa (=10⁵)	Sa (=10 ⁵) NR Négatif	NR	Oui Céfépime	Cefepime
92	10	92-AT J1 92-LBA 92-AT J3	Ec (>10 ⁷) Ec (>10 ⁷) Ec (=10⁶) + Sa (=10⁴) + mecA/C and MREJ	Ec (>10 ⁶) Ec (>10 ⁴) Négatif	négatif	Oui Augmentin	Cefepime/Tavanic
93	5	93-AT J1 93-LBA 93-AT J3	NR Sa (=10 ⁶) + Virus parainfluenzae Sa (=10⁶) + Virus parainfluenzae	NR Mm (>10⁴) + Sa (>10⁴) Mm (>10⁵)	NR	Non	etude restore: Imipenem / cilastatine/relebactam Ou pipe tazo ; avec linezolid
94	6	94-AT J1 94-LBA 94-AT J3	NR Ec (=10 ⁴) Négatif	NR Ec (=10 ³) Négatif	négatif	Oui Tazocilline	Tazocilline/tavanic
95	3	95-AT J1 95-LBA 95-AT J3	Hi (>10 ⁷) Hi (>10 ⁷) NR	Hi (>10 ⁶) Hi (>10 ⁴) NR	NR	Non	Augmentin
96	3	96-AT J1 96-LBA 96-AT J3	NR Négatif NR	NR Négatif NR	NR	Non	Tazocilline
97	6	97-AT J1 97-LBA 97-AT J3	Hi (>10 ⁷) Hi (>10 ⁷) NR	Hi (>10 ⁶) Hi (>10 ⁴) NR	NR	Non	Augmentin
98	3	98-AT J1 98-LBA 98-AT J3	NR Influenza A Sm (>10 ⁷) + Influenza A	NR Négatif Sm (=10 ⁶)	NR	Non	Augmentin
99	5	99-AT J1 99-LBA 99-AT J3	NR Ec (>10 ⁷) + Hi (>10 ⁷) + Sa (=10⁴) Ec (=10⁵) + Hi (=10⁶) + Sa (=10⁵) + Ab (=10⁴)	NR Ec (>10 ⁴) + Hi (>10 ⁴) Négatif	NR	Non	Augmentin + Tavanic
100	22	100-AT J1 100-LBA 100-AT J3	Rhinovirus/Enterovirus Rhinovirus/Enterovirus Pa (=10 ⁴) + Rhinovirus/Enterovirus	Négatif Négatif Négatif	Rhinovirus/Enterovirus	Oui (Tazocilline/Bactrim)	Meropenem + Bactrim

Annexe 8 : Article

Cet article, écrit à partir des résultats de l'étude oracle phase-1, a été accepté dans le journal « Frontiers in Microbiology ». Voici la version en pré-publication.

1 **Evaluation of the FilmArray® Pneumonia *plus* Panel for Rapid Diagnosis of**
2 **Hospital-acquired Pneumonia in Intensive Care Unit Patients**

3

4 Lise Crémet^{1,2#}, Benjamin Gaborit^{2,3}, Marwan Bouras^{2,4}, Thomas Drumeil¹, Florian Guillotin⁴,
5 Cécile Poulain⁴, Elise Persyn¹, Karim Lakhal⁵, Bertrand Rozec⁶, Marie-Anne Vibet⁷, Antoine
6 Roquilly^{2,4,†}, Sophie Gibaud^{1,†}

7 †These authors jointly directed this work.

8

9 **Running title :** FilmArray Pneumonia *plus* Panel for HAP diagnosis

10

11

12 **Affiliations**

13 ¹ Service de Bactériologie-Hygiène, Pôle de Biologie, CHU Nantes, Nantes, France

14 ² Laboratoire UPRES EA3826, IRS2 - Nantes Biotech, Université de Nantes, Nantes, France

15 ³ Service de Maladies Infectieuses et Tropicales et CIC 1413, CHU Nantes, Nantes, France

16 ⁴ Service d'Anesthésie Réanimation Chirurgicale, Pôle Anesthésie-Réanimation, CHU Nantes, Nantes,
17 France

18 ⁵ Service de Réanimation en Chirurgie Polyvalente, Pôle Anesthésie-Réanimation, Hôpital Nord
19 Laennec, CHU Nantes, Nantes, France

20 ⁶ Service de Réanimation en Chirurgie Cardio-Thoracique et Vasculaire, Pôle Anesthésie-Réanimation,
21 Hôpital Nord Laennec, CHU Nantes, Nantes, France

22 ⁷ Plateforme de méthodologie et biostatistique, CHU Nantes, Nantes, France

23

24

25 **#Corresponding Author:**

26 Dr Lise Crémet

27 Service de Bactériologie-Hygiène, Pôle de Biologie, CHU de Nantes, 9 quai Moncousu, 44000 Nantes,
28 France

29 EA3826, Institut de Recherche en Santé 2, Université de Nantes, 22 bd Bénoni-Goullin, 44200 Nantes,
30 France

31 Tel: +33 (0)2 40 08 39 57 / Fax: +33 (0)2 40 08 38 29

32 E-mail : lise.cremet@chu-nantes.fr / lise.cremet@univ-nantes.fr

33

34 **Abstract**

35

36 The FilmArray® Pneumonia *plus* Panel (FAPP) is a new multiplex molecular test for hospital-
37 acquired pneumonia (HAP), which can rapidly detect 18 bacteria, 9 viruses, and 7 resistance
38 genes. We aimed to compare the diagnosis performance of FAPP with conventional testing
39 in 100 intensive care unit (ICU) patients who required mechanical ventilation, with clinically
40 suspected HAP. A total of 237 samples [76 bronchoalveolar lavages (BAL_{DS}) and 82
41 endotracheal aspirates (ETA_{DS}) obtained at HAP diagnosis, and 79 ETA obtained during
42 follow-up (ETA_{TT})], were analyzed independently by routine microbiology testing and FAPP.
43 58 patients had paired BAL_{DS} and ETA_{DS}. The positivity thresholds of semi-quantified bacteria
44 were 10³-10⁴ CFUs/mL or 10⁴ copies/mL for BAL, and 10⁵ CFUs/mL or copies/mL for ETA.
45 Respiratory commensals (*H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*) were the most
46 common pathogens. Discordant results for bacterial identification were observed in 33/76
47 (43.4%) BAL_{DS} and 36/82 (43.9%) ETA_{DS}, and in most cases, FAPP identified one supplemental
48 bacteria (23/33 BAL_{DS} and 21/36 ETA_{DS}). An absence of growth, or polybacterial cultures,
49 explained almost equally the majority of the non-detections in culture. No linear relationship
50 was observed between bin and CFUs/mL variables. Concordant results between paired BAL_{DS}
51 and ETA_{DS} were obtained in 46/58 (79.3%) patients with FAPP. One of the 17 resistance
52 genes detected with FAPP (*mecA/C* and *MREJ*) was not confirmed by conventional testing.
53 Overall, FAPP enhanced the positivity rate of diagnostic testing, with increased recognition
54 of coinfections. Implementing this strategy may allow clinicians to make more timely and
55 informed decisions.

56

57 248 words

58

59 **Keywords**

60 multiplex syndromic testing, hospital-acquired pneumonia, rapid diagnosis, coinfection,
61 antibiotic resistance

62

63 **4878 words**

64 **4 Figures, 3 Tables**

65

66 **1 Introduction**

67 Hospital-acquired pneumonia (HAP) is the most frequent cause of nosocomial infection
68 in intensive care unit (ICU) patients, with dramatic effects on patients' outcomes.
69 International experts have developed guidelines to prevent and improve the management of
70 HAP (Kalil et al., 2016; Torres et al., 2017). Among strategies proposed, optimization of
71 empiric antimicrobial therapy is of major importance. This entails administering early
72 appropriate antimicrobial therapy, while limiting overuse of broad-spectrum antibiotics.
73 Hence, European guidelines suggest using narrow-spectrum empiric therapy (amoxicillin-
74 clavulanate, cefotaxime, ceftriaxone, fluoroquinolones) in patients without risk factors for
75 multidrug-resistant (MDR) pathogens in case of early-onset HAP (first 4 days of
76 hospitalization). However, making such choice is not so obvious in ICU patients, and
77 adherence to guidelines is associated with a high rate of unnecessary broad-spectrum
78 antibiotics (Roquilly et al., 2016; Ekren et al., 2018).

79 Microbiological confirmation of HAP is a crucial step for tailoring antibiotic therapy.
80 Nevertheless, current culture methods take 48 to 72 hours to obtain antimicrobial
81 susceptibility results. Moreover, traditional techniques fail to recover pathogens in up to
82 30% of clinically-diagnosed HAP (Roquilly et al., 2019). Recently, syndromic multiplex
83 molecular tests have emerged as powerful tools for rapid diagnostics
84 (meningitis/encephalitis, gastroenteritis, bacteraemia, pneumonia) (Couturier et al., 2019;
85 Poole and Clark, 2020). Initially based on qualitative DNA detection, those approaches were
86 not suitable for diagnosing pneumonia caused by common colonizers of the upper airways
87 (e.g., *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*). The FilmArray® Pneumonia plus
88 Panel (FAPP) is a new panel for HAP, which offers potential advantage to detect and quantify
89 in a single test, 27 respiratory pathogens (18 bacteria, 9 viruses) and 7 antibiotic resistance
90 genes.

91 The aim of this study was to assess the performances of this new molecular test on
92 bronchoscopy specimens [bronchoalveolar lavages (BAL) and/or endotracheal aspirates
93 (ETA)] from 100 ICU patients with HAP requiring mechanical ventilation.

94

95 **2 Materials and Methods**

96 **2.1 Ethic and study design**

97 The study protocol was approved by our local Ethical Committee (GNEDS, Nantes, France).
98 Patients and relatives were informed of the trial. Consent was waived according to French
99 law.

100

101 **2.2 Population and Specimen Collection**

102 The study was conducted at the Nantes University Hospital (France), in 3 ICUs located on
103 two sites spaced 10 km apart. We recruited 100 critically ill adult patients receiving
104 mechanical ventilation with clinically suspected HAP, between October 2018 and January
105 2020 (Table 1). Pneumonia was suspected based on European guidelines, if there were the
106 following criteria : a new or persistent radiological pulmonary infiltrate without another
107 obvious cause combined with two clinical signs among fever, purulent endotracheal
108 secretions, hyperleukocytosis or leukopenia, and increasing oxygen requirements (Torres et
109 al., 2017). Patients underwent a bronchoscopy with BAL and/or ETA at the time of suspicion
110 of HAP (BAL_{DS} (for DIAGNOSIS) and ETA_{DS}, respectively). In addition, if an ETA was collected 2-3
111 days later, as part of a routine clinical care, the specimen (ETA_{TT} (for TREATMENT)) was also sent to
112 the laboratory for microbiological analysis. A total of 237 respiratory specimens were
113 analyzed (76 BAL_{DS}, 82 ETA_{DS}, and 79 ETA_{TT}). Both BAL_{DS} and ETA_{DS} were collected in 58
114 patients.

115

116 **2.3 Microbiological Testing**

117 The respiratory specimens were analyzed in parallel by routine microbiology testing and
118 FAPP, as soon as they arrived at the microbiology laboratory. The turnaround times from
119 samples to validated results were recorded. Results of routine microbiology testing were
120 analysed independently of FAPP.

121 **2.3.1 Routine Microbiology Testing**

122 Gram staining and bacteriological cultures were performed for all respiratory specimens
123 according to the French REMIC recommendations (SFM, 2018). Briefly, 10µL of the samples

96 **2.1 Ethic and study design**

97 The study protocol was approved by our local Ethical Committee (GNEDS, Nantes, France).
98 Patients and relatives were informed of the trial. Consent was waived according to French
99 law.

100

101 **2.2 Population and Specimen Collection**

102 The study was conducted at the Nantes University Hospital (France), in 3 ICUs located on
103 two sites spaced 10 km apart. We recruited 100 critically ill adult patients receiving
104 mechanical ventilation with clinically suspected HAP, between October 2018 and January
105 2020 (Table 1). Pneumonia was suspected based on European guidelines, if there were the
106 following criteria : a new or persistent radiological pulmonary infiltrate without another
107 obvious cause combined with two clinical signs among fever, purulent endotracheal
108 secretions, hyperleukocytosis or leukopenia, and increasing oxygen requirements (Torres et
109 al., 2017). Patients underwent a bronchoscopy with BAL and/or ETA at the time of suspicion
110 of HAP (BAL_{DS} (for DIAGNOSIS) and ETA_{DS}, respectively). In addition, if an ETA was collected 2-3
111 days later, as part of a routine clinical care, the specimen (ETA_{TT} (for TREATMENT)) was also sent to
112 the laboratory for microbiological analysis. A total of 237 respiratory specimens were
113 analyzed (76 BAL_{DS}, 82 ETA_{DS}, and 79 ETA_{TT}). Both BAL_{DS} and ETA_{DS} were collected in 58
114 patients.

115

116 **2.3 Microbiological Testing**

117 The respiratory specimens were analyzed in parallel by routine microbiology testing and
118 FAPP, as soon as they arrived at the microbiology laboratory. The turnaround times from
119 samples to validated results were recorded. Results of routine microbiology testing were
120 analysed independently of FAPP.

121 **2.3.1 Routine Microbiology Testing**

122 Gram staining and bacteriological cultures were performed for all respiratory specimens
123 according to the French REMIC recommendations (SFM, 2018). Briefly, 10µL of the samples

124 were seeded directly (for BAL), or after dilution (1:100 after fluidification for ETA), onto
125 Columbia horse blood (Oxoid), Chocolate agar (BD), and chromogenic UriSelect4 agar
126 (Biorad) plates, and if necessary (cases of chronic obstructive pulmonary disease) on
127 Chapman (bioMérieux) and Cefrimide (Biorad) selective agar plates, then incubated at 37°C
128 in 5% CO₂ for 24-48 h, as necessary. Plates were examined daily for bacterial growth.
129 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*,
130 Enterobacteriales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and any other
131 largely predominant pathogen were searched on the plates. In accordance with current
132 guidelines, the positivity thresholds were 10⁵ CFUs/mL for ETA and 10⁴ CFUs/mL for BAL, but
133 in BAL, potential pathogens that were present in pure culture at 10³ CFUs/mL and associated
134 with many leukocytes at Gram staining were reported as positive. Culture results were
135 considered as negative if there was no significant growth or a normal non-pathogenic flora.
136 Bacterial isolates were identified by mass spectrometry (BioMérieux). Antimicrobial
137 susceptibility testing (AST) was performed according to the CA-SFM/EUCAST guidelines
138 (SFM, 2019), using Vitek2 AST cards. Based on phenotypic susceptibility results, additional
139 tests were performed if required, for ESBLs (Mastdiscs™ D68C), carbapenemases (CORIS
140 BioConcept RESIST-3 O.K.N. immuno-chromatographic test and/or in-house real-time PCRs
141 for the *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} genes), and methicillin-resistance detection
142 (Alere™ PBP2A culture colony test and BDMAX™ StaphSR). Furthermore, when requested
143 by the Clinicians, the presence in respiratory samples of *Mycoplasma pneumoniae* and/or
144 respiratory viruses was investigated by real-time PCR (Fast Track Diagnostics® Respiratory
145 Pathogens 21 qPCR assay for viruses and/or in-house real-time PCR for *M. pneumoniae*).

146 **2.3.2 FilmArray Pneumonia plus Panel Assay**

147 The BioFire® FilmArray® Pneumonia plus Panel (bioMérieux) was performed according to the
148 manufacturer's instructions, with a handling time of approximately 5 minutes. Briefly, the
149 respiratory sample collected with a flocked swab (~ 200 µL) and then mixed with a sample
150 buffer, was injected along with an hydration solution in the reagent pouch "Pneumonia plus
151 Panel", which was then inserted into the FilmArray® instrument. The test consisted of
152 automated nucleic acid extraction, purification, amplification, detection, and analysis with
153 each target reported as "detected" or "not detected". A semi-quantitative measurement
154 reported into bins (i.e. 10⁴, 10⁵, 10⁶, and ≥ 10⁷ bacterial DNA copies/mL) was provided for 15

124 were seeded directly (for BAL), or after dilution (1:100 after fluidification for ETA), onto
125 Columbia horse blood (Oxoid), Chocolate agar (BD), and chromogenic UriSelect4 agar
126 (Biorad) plates, and if necessary (cases of chronic obstructive pulmonary disease) on
127 Chapman (bioMérieux) and Cefrimide (Biorad) selective agar plates, then incubated at 37°C
128 in 5% CO₂ for 24-48 h, as necessary. Plates were examined daily for bacterial growth.
129 *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*,
130 Enterobacteriales, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and any other
131 largely predominant pathogen were searched on the plates. In accordance with current
132 guidelines, the positivity thresholds were 10⁵ CFUs/mL for ETA and 10⁴ CFUs/mL for BAL, but
133 in BAL, potential pathogens that were present in pure culture at 10³ CFUs/mL and associated
134 with many leukocytes at Gram staining were reported as positive. Culture results were
135 considered as negative if there was no significant growth or a normal non-pathogenic flora.
136 Bacterial isolates were identified by mass spectrometry (BioMérieux). Antimicrobial
137 susceptibility testing (AST) was performed according to the CA-SFM/EUCAST guidelines
138 (SFM, 2019), using Vitek2 AST cards. Based on phenotypic susceptibility results, additional
139 tests were performed if required, for ESBLs (Mastdiscs™ D68C), carbapenemases (CORIS
140 BioConcept RESIST-3 O.K.N. immuno-chromatographic test and/or in-house real-time PCRs
141 for the *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM} genes), and methicillin-resistance detection
142 (Alere™ PBP2A culture colony test and BDMAX™ StaphSR). Furthermore, when requested
143 by the Clinicians, the presence in respiratory samples of *Mycoplasma pneumoniae* and/or
144 respiratory viruses was investigated by real-time PCR (Fast Track Diagnostics® Respiratory
145 Pathogens 21 qPCR assay for viruses and/or in-house real-time PCR for *M. pneumoniae*).

146 **2.3.2 FilmArray Pneumonia plus Panel Assay**

147 The BioFire® FilmArray® Pneumonia plus Panel (bioMérieux) was performed according to the
148 manufacturer's instructions, with a handling time of approximately 5 minutes. Briefly, the
149 respiratory sample collected with a flocced swab (~ 200 µL) and then mixed with a sample
150 buffer, was injected along with an hydration solution in the reagent pouch "Pneumonia plus
151 Panel", which was then inserted into the FilmArray® instrument. The test consisted of
152 automated nucleic acid extraction, purification, amplification, detection, and analysis with
153 each target reported as "detected" or "not detected". A semi-quantitative measurement
154 reported into bins (i.e. 10⁴, 10⁵, 10⁶, and ≥ 10⁷ bacterial DNA copies/mL) was provided for 15

155 bacteria, if detected. The panel included 15 bacteria, 3 atypical bacteria, 9 viruses, and 7
156 antimicrobial resistance genes (Table 2). Each resistance marker was reported only if the
157 potential microorganism harbouring the gene was concomitantly detected in the sample.
158 Clinicians were left blinded to the FAPP results.

159

160 **2.4 Data Analysis**

161 BAL were considered as positive with FAPP when at least one microbial target was detected
162 (at $\geq 10^4$ copies/mL for semi-quantified bacteria). For ETA, in order to match the culture
163 threshold that differentiate commensalism from pathogenicity ($\geq 10^5$ CFUs/mL), we set up a
164 bin threshold of $\geq 10^5$ copies/mL to consider the 15 semi-quantitative bacterial targets as
165 positive. The agreement between FAPP and culture was measured for each bacterial
166 pathogen in the form of negative percent agreement (NPA), positive percent agreement
167 (PPA) and overall percent agreement (OPA), and their two-sided 95 percent confidence
168 intervals. In order to explain discrepant results, cultures were reread after routine final
169 reports in light of results obtained with FAPP. Concordance was calculated based on the
170 original culture reading.

171

172

173 **3 Results**

174

175 **3.1 Summary of FAPP findings**

176 At the time of HAP diagnosis, FAPP yielded positive results with significant levels (i.e. $\geq 10^4$
177 bin in BAL and $\geq 10^5$ bin in ETA for semi-quantified bacteria) in 82/100 patients. Thus, as
178 shown in Figure 1A, 81.6% (62/76) BAL_{DS}, and 75.6% (62/82) ETA_{DS} were positive for at least
179 one target. Of these, more than half were positive for at least two pathogens (36/62 (58.1%)
180 for BAL_{DS}, and 36/62 (58.1%) for ETA_{DS}), leading to the diagnosis of coinfection in 49/100
181 patients (Fig. 1). Multiple detections per positive specimen were not higher in ETA_{DS} than in
182 BAL_{DS}, since bacteria with bin results of 10^4 were considered as negative in ETA (it

155 bacteria, if detected. The panel included 15 bacteria, 3 atypical bacteria, 9 viruses, and 7
156 antimicrobial resistance genes (Table 2). Each resistance marker was reported only if the
157 potential microorganism harbouring the gene was concomitantly detected in the sample.
158 Clinicians were left blinded to the FAPP results.

159

160 **2.4 Data Analysis**

161 BAL were considered as positive with FAPP when at least one microbial target was detected
162 (at $\geq 10^4$ copies/mL for semi-quantified bacteria). For ETA, in order to match the culture
163 threshold that differentiate commensalism from pathogenicity ($\geq 10^5$ CFUs/mL), we set up a
164 bin threshold of $\geq 10^5$ copies/mL to consider the 15 semi-quantitative bacterial targets as
165 positive. The agreement between FAPP and culture was measured for each bacterial
166 pathogen in the form of negative percent agreement (NPA), positive percent agreement
167 (PPA) and overall percent agreement (OPA), and their two-sided 95 percent confidence
168 intervals. In order to explain discrepant results, cultures were reread after routine final
169 reports in light of results obtained with FAPP. Concordance was calculated based on the
170 original culture reading.

171

172

173 **3 Results**

174

175 **3.1 Summary of FAPP findings**

176 At the time of HAP diagnosis, FAPP yielded positive results with significant levels (i.e. $\geq 10^4$
177 bin in BAL and $\geq 10^5$ bin in ETA for semi-quantified bacteria) in 82/100 patients. Thus, as
178 shown in Figure 1A, 81.6% (62/76) BAL_{DS}, and 75.6% (62/82) ETA_{DS} were positive for at least
179 one target. Of these, more than half were positive for at least two pathogens (36/62 (58.1%)
180 for BAL_{DS}, and 36/62 (58.1%) for ETA_{DS}), leading to the diagnosis of coinfection in 49/100
181 patients (Fig. 1). Multiple detections per positive specimen were not higher in ETA_{DS} than in
182 BAL_{DS}, since bacteria with bin results of 10^4 were considered as negative in ETA (it

183 represented 23 bacteria in 21 ETA_{DS}). Of note, if the 10⁴ cutoff had been used for ETA, 84.1%
184 (69/82) ETA_{DS} would have been positive, and multiple targets would have been detected in
185 60.9% (42/69) of these specimens (Fig. 2). A maximum of 7 pathogens (6 bacteria and one
186 human rhinovirus/enterovirus) was detected in one patient (BAL_{DS} and ETA_{DS}). The most
187 common pathogens detected at diagnosis were *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S.*
188 *pneumoniae*, and *K. pneumoniae*, which were found in 40 (40%), 33 (33%), 19 (19%), 17
189 (17%), and 10 (10%) patients, respectively (Fig. 1). The panel identified 6 viruses at diagnosis
190 [human rhinovirus/enterovirus (5 patients), coronavirus (4 patients), influenza A (3 patients),
191 adenovirus (2 patients), parainfluenza viruses (2 patients), and RSV (1 patient)] in 16/100
192 patients (11.8% (9/76) BAL_{DS}, and 14.6% (12/82) ETA_{DS}). In most cases, it corresponded to
193 viral-bacterial co-infections (12 patients, including one with multiple viruses (adenovirus and
194 influenza A) and *S. pneumoniae*) (Table S1). An atypical bacteria (*M. pneumoniae*) was
195 detected with other bacteria in one patient. The positivity rate of ETA_{TT} obtained during
196 follow-up was 69.6% (55/79), and 38 bacteria were below the 10⁵ cutoff in 29 ETA_{TT} (Fig. 1A,
197 Fig. 2). Four types of resistance genes were detected in 8 patients : *mecA/C* and MREJ (one
198 patient), and the CTX-M ESBL (7 patients), either alone (5 patients) or combined with a
199 carbapenemase (*bla*_{NDM} in one patient, and *bla*_{OXA-48-like} in one another). The median
200 turnaround time (from sample collection to results) was 4 h 15 min (BAL_{DS} or ETA_{DS}).

201

202 **3.2 Summary of routine microbiology testing**

203 At HAP diagnosis, culture identified one or more bacteria in 73/100 patients (52/76 (68.4%)
204 BAL_{DS} and 53/82 (64.6%) ETA_{DS}), and respiratory viruses were detected in 8/35 (22.9%)
205 patients who benefited from a Fast Track multiplex PCR routinely ordered by clinicians,
206 yielding an overall positive detection in 78/100 patients. Two or more bacterial pathogens
207 were identified and reported in 32/100 patients, in a higher proportion of BAL_{DS} (27/52,
208 51.9%) than ETA_{DS} (19/53, 35.8%), certainly because BAL are more distal than ETA and are
209 normally not contaminated. Indeed, this property might have encouraged microbiologists to
210 identify and report any bacteria found in these distal specimens rather than concluding to
211 "polymicrobial flora". Thus, only 25.0% (6/24) of culture-negative BAL_{DS} had results reported
212 as "mixed bacterial flora" vs 41.4% (12/29) of culture-negative ETA_{DS} (Table S1). The most
213 frequent bacteria detected by culture were *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*,

183 represented 23 bacteria in 21 ETA_{DS}). Of note, if the 10⁴ cutoff had been used for ETA, 84.1%
184 (69/82) ETA_{DS} would have been positive, and multiple targets would have been detected in
185 60.9% (42/69) of these specimens (Fig. 2). A maximum of 7 pathogens (6 bacteria and one
186 human rhinovirus/enterovirus) was detected in one patient (BAL_{DS} and ETA_{DS}). The most
187 common pathogens detected at diagnosis were *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S.*
188 *pneumoniae*, and *K. pneumoniae*, which were found in 40 (40%), 33 (33%), 19 (19%), 17
189 (17%), and 10 (10%) patients, respectively (Fig. 1). The panel identified 6 viruses at diagnosis
190 [human rhinovirus/enterovirus (5 patients), coronavirus (4 patients), influenza A (3 patients),
191 adenovirus (2 patients), parainfluenza viruses (2 patients), and RSV (1 patient)] in 16/100
192 patients (11.8% (9/76) BAL_{DS}, and 14.6% (12/82) ETA_{DS}). In most cases, it corresponded to
193 viral-bacterial co-infections (12 patients, including one with multiple viruses (adenovirus and
194 influenza A) and *S. pneumoniae*) (Table S1). An atypical bacteria (*M. pneumoniae*) was
195 detected with other bacteria in one patient. The positivity rate of ETA_{TT} obtained during
196 follow-up was 69.6% (55/79), and 38 bacteria were below the 10⁵ cutoff in 29 ETA_{TT} (Fig. 1A,
197 Fig. 2). Four types of resistance genes were detected in 8 patients : *mecA/C* and MREJ (one
198 patient), and the CTX-M ESBL (7 patients), either alone (5 patients) or combined with a
199 carbapenemase (*bla*_{NDM} in one patient, and *bla*_{OXA-48-like} in one another). The median
200 turnaround time (from sample collection to results) was 4 h 15 min (BAL_{DS} or ETA_{DS}).

201

202 **3.2 Summary of routine microbiology testing**

203 At HAP diagnosis, culture identified one or more bacteria in 73/100 patients (52/76 (68.4%)
204 BAL_{DS} and 53/82 (64.6%) ETA_{DS}), and respiratory viruses were detected in 8/35 (22.9%)
205 patients who benefited from a Fast Track multiplex PCR routinely ordered by clinicians,
206 yielding an overall positive detection in 78/100 patients. Two or more bacterial pathogens
207 were identified and reported in 32/100 patients, in a higher proportion of BAL_{DS} (27/52,
208 51.9%) than ETA_{DS} (19/53, 35.8%), certainly because BAL are more distal than ETA and are
209 normally not contaminated. Indeed, this property might have encouraged microbiologists to
210 identify and report any bacteria found in these distal specimens rather than concluding to
211 "polymicrobial flora". Thus, only 25.0% (6/24) of culture-negative BAL_{DS} had results reported
212 as "mixed bacterial flora" vs 41.4% (12/29) of culture-negative ETA_{DS} (Table S1). The most
213 frequent bacteria detected by culture were *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. pneumoniae*,

214 and *K. pneumoniae* in 29 (29%), 26 (26%), 17 (17%), 13 (13%), and 8 (8%) patients,
215 respectively (Fig. 1). Culture showed a lower positivity rate of 41.8% (33/79) for ETA_{TT}
216 collected during follow-up, with a high proportion of culture-negative results reported as "no
217 growth" (35/46, 76.1%) (Table S1). Regarding AST, *Enterobacteriaceae* resistant to third-
218 generation cephalosporins were found on average 2 days after specimens collection, in
219 11/100 patients. In 7 cases, it was ESBL-producing strains (*K. pneumoniae* or *E. coli*), while in
220 the 4 others cases, high-level cephalosporinases were confirmed with additional tests
221 (MastdiscsTM D68C), in strains of *E. cloacae* complex (2 patients), *S. marcescens* (1 patient),
222 and *E. coli* (1 patient). Two ESBL-producing *K. pneumoniae* that were resistant to ertapenem
223 ± imipenem, were also confirmed to be carbapenemase (NDM or OXA-48 like) producers, by
224 means of an immuno-chromatographic test (CORIS BioConcept RESIST-3 O.K.N.) performed 2
225 days after specimen collection. All strains of *P. aeruginosa* detected in 4 patients were
226 susceptible to ceftazidime. The mean turnaround time from sample collection to results
227 validation was 70 h for BAL_{DS}, and 64 h for ETA_{DS}.

228

229 **3.3 Comparison of FAPP and routine microbiology testing**

230 In total, at HAP diagnosis, just over half of the specimens were concordant for the bacterial
231 identification (43/76 (56.6%) BAL_{DS} and 46/82 (56.1%) ETA_{DS}) (Fig. 3, Table 3). In most of the
232 discordant specimens (23/33 (69.7%) BAL_{DS} and 21/36 (58.3%) ETA_{DS}), FAPP identified one
233 supplemental bacterial pathogen, which was most often confirmed by FAPP in the paired
234 respiratory sample and/or in the ETA_{TT} collected 2-3 days later (Fig. 3). By rereading the
235 plates in light of FAPP results after final report, we showed that an absence of significant
236 growth, or polybacterial cultures impeding the accurate visualisation of non-predominant
237 pathogens, explained almost equally the majority of the non-detections in culture (Fig. 3). In
238 the rest of the cases, the corresponding bacteria had not been searched on the plates (*S.*
239 *pyogenes* or *S. agalactiae* in mixed flora, or because of an impossibility due to *Proteus*
240 invasion) (Fig. 3). Furthermore, in 8 patients (5/76 (6.6%) BAL_{DS} and 6/82 (7.3%) ETA_{DS}),
241 culture yielded bacteria that were not targeted by FAPP (*Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*,
242 *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and
243 *Streptococcus pseudopneumoniae*), and two FAPP false-negative results were observed : *K.*
244 *oxytoca* (one BAL_{DS} with a pure culture at 10³ CFUs/mL), and *H. influenzae* (one

214 and *K. pneumoniae* in 29 (29%), 26 (26%), 17 (17%), 13 (13%), and 8 (8%) patients,
215 respectively (Fig. 1). Culture showed a lower positivity rate of 41.8% (33/79) for ETA_{TT}
216 collected during follow-up, with a high proportion of culture-negative results reported as "no
217 growth" (35/46, 76.1%) (Table S1). Regarding AST, *Enterobacteriaceae* resistant to third-
218 generation cephalosporins were found on average 2 days after specimens collection, in
219 11/100 patients. In 7 cases, it was ESBL-producing strains (*K. pneumoniae* or *E. coli*), while in
220 the 4 others cases, high-level cephalosporinases were confirmed with additional tests
221 (MastdiscsTM D68C), in strains of *E. cloacae* complex (2 patients), *S. marcescens* (1 patient),
222 and *E. coli* (1 patient). Two ESBL-producing *K. pneumoniae* that were resistant to ertapenem
223 ± imipenem, were also confirmed to be carbapenemase (NDM or OXA-48 like) producers, by
224 means of an immuno-chromatographic test (CORIS BioConcept RESIST-3 O.K.N.) performed 2
225 days after specimen collection. All strains of *P. aeruginosa* detected in 4 patients were
226 susceptible to ceftazidime. The mean turnaround time from sample collection to results
227 validation was 70 h for BAL_{DS}, and 64 h for ETA_{DS}.

228

229 **3.3 Comparison of FAPP and routine microbiology testing**

230 In total, at HAP diagnosis, just over half of the specimens were concordant for the bacterial
231 identification (43/76 (56.6%) BAL_{DS} and 46/82 (56.1%) ETA_{DS}) (Fig. 3, Table 3). In most of the
232 discordant specimens (23/33 (69.7%) BAL_{DS} and 21/36 (58.3%) ETA_{DS}), FAPP identified one
233 supplemental bacterial pathogen, which was most often confirmed by FAPP in the paired
234 respiratory sample and/or in the ETA_{TT} collected 2-3 days later (Fig. 3). By rereading the
235 plates in light of FAPP results after final report, we showed that an absence of significant
236 growth, or polybacterial cultures impeding the accurate visualisation of non-predominant
237 pathogens, explained almost equally the majority of the non-detections in culture (Fig. 3). In
238 the rest of the cases, the corresponding bacteria had not been searched on the plates (*S.*
239 *pyogenes* or *S. agalactiae* in mixed flora, or because of an impossibility due to *Proteus*
240 invasion) (Fig. 3). Furthermore, in 8 patients (5/76 (6.6%) BAL_{DS} and 6/82 (7.3%) ETA_{DS}),
241 culture yielded bacteria that were not targeted by FAPP (*Citrobacter koseri*, *Hafnia alvei*,
242 *Morganella morganii*, *Raoultella planticola*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and
243 *Streptococcus pseudopneumoniae*), and two FAPP false-negative results were observed : *K.*
244 *oxytoca* (one BAL_{DS} with a pure culture at 10³ CFUs/mL), and *H. influenzae* (one

245 polymicrobial ETA_{DS} with *H. influenzae* at $> 10^5$ CFUs/mL) (Fig. 1E, Table 3). The atypical
246 bacteria *M. pneumoniae* found in one patient with FAPP, had not been searched with
247 conventional methods at the time of HAP diagnosis, but was subsequently confirmed with an
248 in-house real-time PCR. The performance data for each FAPP bacterial target are provided in
249 Table 3. The overall percent agreement (OPA) between FAPP and culture results ranged from
250 88% to 100% in BAL_{DS}, and 82% to 100% in ETA_{DS}. Only three bacterial species of the panel
251 had an OPA below 95% : *H. influenzae* and *S. aureus* in BAL_{DS} and ETA_{DS}, and *K. oxytoca* in
252 BAL_{DS}.

253 Regarding the 79 ETA_{TT} obtained under treatment, 45.6% (36/79) had discordant results
254 between both methods (Fig. 3A, Fig. 4, Table S1). Not surprisingly, most discrepancies
255 (28/36, 77.8%) were explained by no growth of bacteria identified with FAPP (Fig. 4A). The
256 vast majority of the 57 FAPP-positive bacterial targets that were not reported by routine
257 culture, had already been detected by FAPP at diagnosis, either above positive threshold
258 values (51/57, 89.5%), or not (bin result of 10^4 in ETA_{DS}) in a few cases (5/57, 8.8%) (Fig. 4B).

259 Regarding FAPP semi-quantitative results, most bacteria with bin results of 10^4 in ETA (i. e.
260 below our positivity threshold) were not reported in culture (23/23 (100%) in ETA_{DS}, and
261 36/38 (94.7%) in ETA_{TT}). On the other hand, for patients with ETA at diagnosis and 2-3 days
262 later, 38.9% (7/18) of the detections with a bin value of 10^4 in ETA_{DS} were positive again in
263 ETA_{TT} with a higher bin value ($\geq 10^5$ copies/mL). No linear relationship was observed
264 between the bin and CFUs/mL variables (Table S1). However, semi-quantitative culture
265 results were not stratified into log₁₀ ranges above positive thresholds (10^5 CFUs/mL for ETA
266 and 10^4 CFUs/mL for BAL).

267 Eighteen resistance markers were detected with FAPP in 15 samples (2 *mecA/C* and MREJ,
268 13 *bla*_{CTX-M}, 2 *bla*_{NDM}, and 1 *bla*_{OXA-48-like}) (Table S1). All ESBL and carbapenemases were
269 confirmed by standard laboratory protocols (AST and additional tests performed in routine).
270 Among both methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) detected with FAPP, one found at 10^4 bin
271 in ETA_{TT} did not grow in culture. The other corresponded to a false-positive *mecA/C* and
272 MREJ result since a methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) was found in culture. This result
273 was repeatable after retesting with FAPP, but none of the comparator methods (BDMAXTM
274 StaphSR performed on the same BAL_{DS}, or AlereTM PBP2A testing and cefoxitin susceptibility
275 testing performed on several colonies) found a MRSA. No additional cases of methicillin-

245 polymicrobial ETA_{DS} with *H. influenzae* at $> 10^5$ CFUs/mL) (Fig. 1E, Table 3). The atypical
246 bacteria *M. pneumoniae* found in one patient with FAPP, had not been searched with
247 conventional methods at the time of HAP diagnosis, but was subsequently confirmed with an
248 in-house real-time PCR. The performance data for each FAPP bacterial target are provided in
249 Table 3. The overall percent agreement (OPA) between FAPP and culture results ranged from
250 88% to 100% in BAL_{DS}, and 82% to 100% in ETA_{DS}. Only three bacterial species of the panel
251 had an OPA below 95% : *H. influenzae* and *S. aureus* in BAL_{DS} and ETA_{DS}, and *K. oxytoca* in
252 BAL_{DS}.

253 Regarding the 79 ETA_{TT} obtained under treatment, 45.6% (36/79) had discordant results
254 between both methods (Fig. 3A, Fig. 4, Table S1). Not surprisingly, most discrepancies
255 (28/36, 77.8%) were explained by no growth of bacteria identified with FAPP (Fig. 4A). The
256 vast majority of the 57 FAPP-positive bacterial targets that were not reported by routine
257 culture, had already been detected by FAPP at diagnosis, either above positive threshold
258 values (51/57, 89.5%), or not (bin result of 10^4 in ETA_{DS}) in a few cases (5/57, 8.8%) (Fig. 4B).

259 Regarding FAPP semi-quantitative results, most bacteria with bin results of 10^4 in ETA (i. e.
260 below our positivity threshold) were not reported in culture (23/23 (100%) in ETA_{DS}, and
261 36/38 (94.7%) in ETA_{TT}). On the other hand, for patients with ETA at diagnosis and 2-3 days
262 later, 38.9% (7/18) of the detections with a bin value of 10^4 in ETA_{DS} were positive again in
263 ETA_{TT} with a higher bin value ($\geq 10^5$ copies/mL). No linear relationship was observed
264 between the bin and CFUs/mL variables (Table S1). However, semi-quantitative culture
265 results were not stratified into log₁₀ ranges above positive thresholds (10^5 CFUs/mL for ETA
266 and 10^4 CFUs/mL for BAL).

267 Eighteen resistance markers were detected with FAPP in 15 samples (2 *mecA/C* and MREJ,
268 13 *bla*_{CTX-M}, 2 *bla*_{NDM}, and 1 *bla*_{OXA-48-like}) (Table S1). All ESBL and carbapenemases were
269 confirmed by standard laboratory protocols (AST and additional tests performed in routine).
270 Among both methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) detected with FAPP, one found at 10^4 bin
271 in ETA_{TT} did not grow in culture. The other corresponded to a false-positive *mecA/C* and
272 MREJ result since a methicillin-susceptible *S. aureus* (MSSA) was found in culture. This result
273 was repeatable after retesting with FAPP, but none of the comparator methods (BDMAX™
274 StaphSR performed on the same BAL_{DS}, or Alere™ PBP2A testing and cefoxitin susceptibility
275 testing performed on several colonies) found a MRSA. No additional cases of methicillin-

276 resistance, ESBL, or carbapenemase production were found with routine microbiology
277 testing.

278 Lastly, based on FAPP results, an initial antibiotic therapy by amoxicillin-clavulanate could
279 have been proposed in 83/100 patients, whose results ruled out pathogens with
280 chromosomally-encoded cephalosporinase (i. e. *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*
281 complex, *K. aerogenes*, and *S. marcescens*) and/or resistance markers of the panel. However,
282 this antibiotic would have not been optimal in 7/83 (8.4%) patients. In fact, in those cases,
283 culture brought to light bacterial strains with acquired resistance to amoxicillin-clavulanate
284 (2 *H. influenzae* and 2 *E. coli*, in 4 patients), or pathogens not targeted by FAPP and naturally
285 resistant to amoxicillin-clavulanate (1 *H. alvei*, 1 *M. morgani*, and 1 *S. maltophilia*, in 3
286 patients). A medico-economic evaluation is ongoing to determine what impacts FAPP results
287 would have had on care and antibiotics prescribing (Guillotin et al, in preparation).

288

289 **3.4 Comparison of paired BAL_{DS} and ETA_{DS} specimens**

290 Among the 58 patients with paired BAL_{DS} and ETA_{DS}, 46 (79.3%) had the same pathogen(s)
291 (or no pathogen) identified in both samples with FAPP. Of the 12 discrepancies observed, 5
292 were due to detection of one more pathogen in ETA_{DS} (2 viruses, and 3 bacteria at 10⁵ bin), 4
293 to detection of one additional bacteria in BAL_{DS} (3 of which were also detected in ETA_{DS}, but
294 considered as negative since at 10⁴ bin in ETA_{DS}). In the 3 latter cases, the difference relied
295 on two pathogens. If bacteria with a 10⁴ bin had been considered as positive in ETA_{DS}, the
296 agreement between both types of specimens would have been less satisfactory, with 38/58
297 (65.5%) concordant results (Fig. 2C and 2D). Regarding culture, concordant results were
298 obtained in 48/58 (82.8%) paired specimens. In most of the discordant cases (7/10), there
299 was at least one additional pathogen detected in BAL_{DS}. At last, only two of all discordant
300 pairs (n=20 with FAPP and/or culture) were confirmed with both methods (similar results
301 between FAPP and culture) (Table S1).

302

303 **4 Discussion**

304 At first developed for the detection of widely circulating respiratory viruses and
305 selected atypical bacteria, syndromic molecular tests for respiratory tract infections

276 resistance, ESBL, or carbapenemase production were found with routine microbiology
277 testing.

278 Lastly, based on FAPP results, an initial antibiotic therapy by amoxicillin-clavulanate could
279 have been proposed in 83/100 patients, whose results ruled out pathogens with
280 chromosomally-encoded cephalosporinase (i. e. *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *E. cloacae*
281 complex, *K. aerogenes*, and *S. marcescens*) and/or resistance markers of the panel. However,
282 this antibiotic would have not been optimal in 7/83 (8.4%) patients. In fact, in those cases,
283 culture brought to light bacterial strains with acquired resistance to amoxicillin-clavulanate
284 (2 *H. influenzae* and 2 *E. coli*, in 4 patients), or pathogens not targeted by FAPP and naturally
285 resistant to amoxicillin-clavulanate (1 *H. alvei*, 1 *M. morgani*, and 1 *S. maltophilia*, in 3
286 patients). A medico-economic evaluation is ongoing to determine what impacts FAPP results
287 would have had on care and antibiotics prescribing (Guillotin et al, in preparation).

288

289 **3.4 Comparison of paired BAL_{DS} and ETA_{DS} specimens**

290 Among the 58 patients with paired BAL_{DS} and ETA_{DS}, 46 (79.3%) had the same pathogen(s)
291 (or no pathogen) identified in both samples with FAPP. Of the 12 discrepancies observed, 5
292 were due to detection of one more pathogen in ETA_{DS} (2 viruses, and 3 bacteria at 10⁵ bin), 4
293 to detection of one additional bacteria in BAL_{DS} (3 of which were also detected in ETA_{DS}, but
294 considered as negative since at 10⁴ bin in ETA_{DS}). In the 3 latter cases, the difference relied
295 on two pathogens. If bacteria with a 10⁴ bin had been considered as positive in ETA_{DS}, the
296 agreement between both types of specimens would have been less satisfactory, with 38/58
297 (65.5%) concordant results (Fig. 2C and 2D). Regarding culture, concordant results were
298 obtained in 48/58 (82.8%) paired specimens. In most of the discordant cases (7/10), there
299 was at least one additional pathogen detected in BAL_{DS}. At last, only two of all discordant
300 pairs (n=20 with FAPP and/or culture) were confirmed with both methods (similar results
301 between FAPP and culture) (Table S1).

302

303 **4 Discussion**

304 At first developed for the detection of widely circulating respiratory viruses and
305 selected atypical bacteria, syndromic molecular tests for respiratory tract infections

306 continuously expand their breadth of coverage to improve diagnostic accuracy. FAPP and the
307 Curetis® Unyvero Hospitalised Pneumonia Panel, are the first two, FDA approved and CE
308 marked, commercially available platforms which target a large number of lower respiratory
309 tract pathogens and resistance genes from aspirates or BAL fluids (Collins et al., 2020;
310 Murphy et al., 2020). There are no published prospective studies comparing the
311 performances of both platforms, but regarding their technical characteristics, FAPP offers a
312 shorter turnaround time (75 minutes *versus* 4-5 hours), a smaller footprint, and the
313 possibility to detect viral pathogens and to semi-quantify bacteria (Poole and Clark, 2020). In
314 this study, this test was compared to routine microbiological methods using 237
315 prospectively collected BAL and ETA specimens obtained from 100 ICU patients at the time
316 of suspected HAP and, if possible, at a later timepoint during follow-up.

317 As expected, implementation of FAPP shortened the delay in getting results (4 h 15
318 min on average, one ICU setting being located 10 km away from the laboratory *versus* 64-70
319 h with culture). In accordance with recent evaluations (Lee et al., 2019; Buchan et al., 2020;
320 Murphy et al., 2020; Yoo et al., 2020), FAPP increased the positivity rate of diagnostic testing
321 (81.6% for BAL_{DS}, and 75.6% for ETA_{DS}), enabling identification of additional bacteria in 39.5%
322 BAL_{DS} and 37.8% ETA_{DS}. The most common pathogens detected were consistently the same
323 across both methods (i.e. in order of prevalence, *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S.*
324 *pneumoniae*, and *K. pneumoniae*). This pathogen distribution, which mostly corresponded to
325 bacterial species that are part of the normal throat flora, was not really different from that
326 described in community-acquired pneumonia. According to the latest European surveillance
327 report on healthcare-associated infections acquired in ICU in 2017, *P. aeruginosa* was the
328 most common microorganism associated with pneumonia (19.9%), followed by *S. aureus*
329 (18.5%), *Klebsiella* spp. (15.2%), and *E. coli* (13.5%). In the majority of cases, pneumonia was
330 associated with intubation, and HAP episodes occurred after an average length of ICU stay of
331 7.3 to 12.1 days, depending on the country (ECDC, 2019). In our study, whatever the method
332 used, *P. aeruginosa* was identified in only 4/100 patients, including three who did not
333 present classic risk factors for MDR pathogens (no previous antimicrobial therapy or
334 hospitalisation in the preceding 90 days, and length of ICU stay of 4 to 6 days) (Torres et al.,
335 2017; ECDC, 2019). The most common pathogen of our study, *H. influenzae*, was detected
336 with FAPP in 40/100 patients at diagnosis, after a median length of ICU stay of 4 days, but

306 continuously expand their breadth of coverage to improve diagnostic accuracy. FAPP and the
307 Curetis® Unyvero Hospitalised Pneumonia Panel, are the first two, FDA approved and CE
308 marked, commercially available platforms which target a large number of lower respiratory
309 tract pathogens and resistance genes from aspirates or BAL fluids (Collins et al., 2020;
310 Murphy et al., 2020). There are no published prospective studies comparing the
311 performances of both platforms, but regarding their technical characteristics, FAPP offers a
312 shorter turnaround time (75 minutes *versus* 4-5 hours), a smaller footprint, and the
313 possibility to detect viral pathogens and to semi-quantify bacteria (Poole and Clark, 2020). In
314 this study, this test was compared to routine microbiological methods using 237
315 prospectively collected BAL and ETA specimens obtained from 100 ICU patients at the time
316 of suspected HAP and, if possible, at a later timepoint during follow-up.

317 As expected, implementation of FAPP shortened the delay in getting results (4 h 15
318 min on average, one ICU setting being located 10 km away from the laboratory *versus* 64-70
319 h with culture). In accordance with recent evaluations (Lee et al., 2019; Buchan et al., 2020;
320 Murphy et al., 2020; Yoo et al., 2020), FAPP increased the positivity rate of diagnostic testing
321 (81.6% for BAL_{DS}, and 75.6% for ETA_{DS}), enabling identification of additional bacteria in 39.5%
322 BAL_{DS} and 37.8% ETA_{DS}. The most common pathogens detected were consistently the same
323 across both methods (i.e. in order of prevalence, *H. influenzae*, *S. aureus*, *E. coli*, *S.*
324 *pneumoniae*, and *K. pneumoniae*). This pathogen distribution, which mostly corresponded to
325 bacterial species that are part of the normal throat flora, was not really different from that
326 described in community-acquired pneumonia. According to the latest European surveillance
327 report on healthcare-associated infections acquired in ICU in 2017, *P. aeruginosa* was the
328 most common microorganism associated with pneumonia (19.9%), followed by *S. aureus*
329 (18.5%), *Klebsiella* spp. (15.2%), and *E. coli* (13.5%). In the majority of cases, pneumonia was
330 associated with intubation, and HAP episodes occurred after an average length of ICU stay of
331 7.3 to 12.1 days, depending on the country (ECDC, 2019). In our study, whatever the method
332 used, *P. aeruginosa* was identified in only 4/100 patients, including three who did not
333 present classic risk factors for MDR pathogens (no previous antimicrobial therapy or
334 hospitalisation in the preceding 90 days, and length of ICU stay of 4 to 6 days) (Torres et al.,
335 2017; ECDC, 2019). The most common pathogen of our study, *H. influenzae*, was detected
336 with FAPP in 40/100 patients at diagnosis, after a median length of ICU stay of 4 days, but

337 was less frequently found in culture (29/100 patients). In line with our data, the majority of
338 discrepancies previously reported between FAPP and culture, concerned the same fastidious
339 bacteria, and were explained by the higher sensitivity of the molecular test and/or
340 antibiotics consumption before sampling (Lee et al., 2019; Yoo et al., 2020). Here, in just
341 over half of the discrepant cases, *H. influenzae* grew on the enriched medium used for
342 culture, but was overgrown by other pathogens or commensal bacteria, and was therefore
343 not detected and/or not reported. Thus, whether detection of *H. influenzae* represents true
344 infection or colonization will be an important area for future research. It is less a question for
345 *S. aureus*, which is a member of the normal nasal flora in about 30% of the population, but
346 can also be regarded as an aggressive and life-threatening bacterial pathogen (Laux et al.,
347 2019). However, in the same manner as for *H. influenzae*, discrepant results obtained for *S.*
348 *aureus* in 7 patients (FAPP-positive but culture-negative), were not always explained by no
349 bacterial growth. As noted previously, these findings pointed the limits of bacterial cultures,
350 which are subject to interpretation and based on selection of dominant species assigned to
351 play a pathogenic role, the minority species being not considered (Buchan et al., 2020;
352 Murphy et al., 2020). These results confirmed the need to inoculate selective agars for
353 enhancing detection of specific bacteria in lower airways (Chapin and Doern, 1983; Doern
354 and Brogden-Torres, 1992). Moreover, a significant part of discrepancies was linked to a lack
355 of growth in culture (11/33 (33.3%) for BAL_{DS}, 14/36 (38.9%) for ETA_{DS}, and 28/36 (77.8%) for
356 ETA_{TT}). A quarter (25/100) of the patients enrolled in the study had received antibiotics
357 before sampling at the time of HAP diagnosis, while ETA_{TT} were collected under antibiotic
358 treatment. Thus, in our view, these culture-negative detections most likely corresponded to
359 pathogens present at low abundances (i.e. below the limit of detection in culture) or to
360 remnant DNA from nonviable bacteria, notably in supplemental ETA_{TT}, rather than non-
361 specific amplifications. In fact, FAPP results from ETA_{TT} and/or paired BAL_{DS} or ETA_{DS} allowed
362 to verify a lot of FAPP-positive results for bacteria that had been undetected by culture. As a
363 result, FAPP may prove useful to guide treatment in situations of diagnostic uncertainty
364 where patients have received antibiotics before sampling, and/or have unfavourable
365 treatment outcomes after obtaining culture, because the higher sensitivity of this method
366 decreases the likelihood to miss out on pathogens of the panel.

367 An important finding of this study, was that the implementation of FAPP increased the
368 number of coinfections detected compared to conventional methods. Thus, the multiplex
369 panel identified mixed infections in 49/100 patients (58.1% of positive BAL_{DS} or ETA_{DS}),
370 compared to 32/100 patients (51.9% and 34.6% of positive BAL_{DS} and ETA_{DS}, respectively) by
371 culture. These data corroborate other published results, and outline that the true incidence
372 of polymicrobial HAP is probably underestimated with conventional techniques (Lee et al.,
373 2019; Buchan et al., 2020; Murphy et al., 2020; Yoo et al., 2020). It remains to be evaluated
374 whether detection of more pathogens will increase cure rates, and not adversely result in
375 unnecessary consumption of broad-spectrum antimicrobials. New research avenues have
376 emerged in recent years about the pathophysiology of HAP, because their rate of clinical
377 cure does not commonly exceed 70% (Roquilly et al., 2019). It has been demonstrated that
378 healthy lungs harbour a diverse and dynamic microbiota, which is profoundly altered in
379 critically ill patients, and would play a role in the development of pneumonia. Future
380 progress in this field should help understand how to appreciate lower abundance taxa of the
381 microbiome, over other most numerous species (Panzer et al., 2018; Roquilly et al., 2019).

382 In our study, viruses were identified in 16/100 patients with FAPP, but in half of them
383 no viral testing had been ordered, including one with an influenza A. As this virus can be
384 responsible for severe pneumonia, and can represent a potential source of intra-hospital
385 transmission, FAPP demonstrated a concrete benefit in that case (Loubet et al., 2017; Van
386 Someren Gréve et al., 2018). Conventional testing for respiratory viruses other than
387 influenza, has not been universally embraced as a standard of care, especially because viral
388 carriage is not uncommon in patients with HAP (Loubet et al., 2017; Torres et al., 2017;
389 Papazian et al., 2020). Furthermore, while the interaction between influenza and *S.*
390 *pneumoniae* or *S. aureus* is a major contributor to influenza mortality in community-acquired
391 pneumonia, the consequences of viral-bacterial coinfection on the prognosis of HAP is still
392 unclear (Loubet et al., 2017; Van Someren Gréve et al., 2018). In our study, the majority
393 (75%) of the 16 patients with identified viruses, were coinfecting with bacteria, and 4
394 patients were infected with a single virus (influenza A, RSV, coronavirus, or human
395 rhinovirus/enterovirus). Furthermore, in our opinion, additional viral targets (herpes simplex
396 virus and cytomegalovirus) might be relevant if added to the panel, because reactivation of

397 these viruses are indeed quite frequent in ICU patients, causing nosocomial viral pneumonia
398 that can evolve into acute respiratory distress syndrome (ARDS) (Papazian et al., 2020).

399 One special feature of FAPP, is its ability to provide semiquantitative assessment of
400 bacterial DNA targets to help in interpretation. Here, we showed that in BAL, 10^4 copies/mL
401 corresponded to bacterial counts of approximately 10^3 to 10^4 CFU/mL. In ETA, bacteria with
402 bin results of 10^4 copies/mL were not found in culture in 96.7% of the cases (59/61).
403 However, a small proportion (38.9%) of targets quantified as 10^4 copies/mL in ETA_{DS}, were
404 recovered later with higher bin values in ETA_{TT}. Thus, we show that in those potentially
405 contaminated samples, targets quantified as 10^4 copies/mL by FAPP, can be reported as
406 negative to provide results concordant with those routinely reported by culture, in
407 accordance with current guidelines ($\geq 10^5$ CFU/mL) (Buchan et al., 2020). Nonetheless, this
408 raises the important question of whether low concentration culture-negative detections
409 with FAPP are adding value in the care of ICU patients. This issue is discussed in the medico-
410 economic evaluation coupled with this study (Guillotin et al, in preparation). We found no
411 correlation between bin $\geq 10^5$ and culture concentrations in both types of specimens.
412 However, the plating method used in the present study did not allow accurate
413 determination of relative quantities beyond 10^4 CFU/mL for BAL, and 10^5 CFU/mL for ETA.

414 An originality of this work lies on the inclusion of 58 patients from whom both BAL_{DS}
415 and ETA_{DS} were collected, and could be compared. Latest European and American guidelines
416 for the management of HAP provide divergent recommendations on sampling techniques to
417 prioritize for diagnosis of HAP. While scientific societies from North America place a high
418 value on noninvasive sampling with semiquantitative cultures (i.e. ETA), European guidelines
419 suggest obtaining distal quantitative samples with invasive techniques to improve the
420 accuracy of results, and reduce overutilization of antibiotics (Kalil et al., 2016; Torres et al.,
421 2017). In fact, endotracheal aspirates may overestimate the presence of bacteria, but they
422 can be performed more quickly and simply, with fewer complications and resources. In our
423 study, provided that a 10^5 copies/mL threshold was applied for ETA, those specimens
424 appeared equally accurate as BAL for the diagnosis of HAP (concordance obtained in 79.3%
425 of patients with FAPP vs 82.8% patients for conventional culture).

426 Finally, this study examined if when compared to culture, informations supplied by
427 FAPP would have had positive impacts on antibiotics prescribing. Regarding the adequacy of

428 bacteria targeted by FAPP, five Gram-negative species including three resistant to
429 amoxicillin-clavulanate (*H. alvei*, *M. morgani*, and *S. maltophilia*) in 3/100 patients, were
430 missed by the panel. On the other hand, the molecular test led to an increased identification
431 of respiratory pathogens, and to the rapid detection of some genotypic markers of
432 resistance in 8 patients. Thus, in total, for covering FAPP findings, the narrow-spectrum
433 antibiotic amoxicillin-clavulanate could have been a therapeutic option in the majority of
434 patients (83%). Nonetheless, natural or acquired resistances to amoxicillin-clavulanate would
435 have gone unnoticed in 8.4% of them. All carbapenemase and/or ESBL-producing strains
436 were correctly detected with the multiplex panel (AST agreed with FAPP). However, it should
437 be noted that the overall prevalence of antimicrobial resistance was low in our study, and it
438 should also be kept in mind that a lack of detection of resistance genes does not necessarily
439 means susceptibility to antibiotics as there are resistance mechanisms that are not detected
440 by FAPP (i.e. derepressed or plasmidic cephalosporinases, or non-CTX-M ESBL). Regarding
441 methicillin resistance, consistent with previous observations, we noticed the false-positive
442 detection of *mecA/C* and MREJ genes in one specimen containing a MSSA in culture (Yoo et
443 al., 2020). Since this respiratory sample was polymicrobial, we hypothesized that it could
444 have contained both a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* carrying
445 *mecA/C*, and a MSSA with an empty SCCmec cassette (thus positive for MRJE) (Murphy et al.,
446 2020).

447 In conclusion, our study demonstrates that FAPP provides results at a speed and
448 sensitivity never possible before, and may allow clinicians to make more informed decisions
449 about antibiotics use and isolation of patients. There is still room for improvements in terms
450 of breadth (amoxicillin-clavulanate naturally resistant Gram-negative bacilli), resistance
451 (MRSA), and cost, but this culture-independent technique may achieve more reliable
452 identification of causative agents than culture. There will be a learning curve for physicians
453 to establish how best to use FAPP results in the management of ICU patients with HAP. To
454 achieve maximum benefit from this new molecular test, nuances in results interpretation
455 might be applied on the basis of clinical presentation, timing of initial antimicrobial therapy
456 (fresh vs post-treatment samples), sampling type (BAL vs ETA), and local bacterial ecology
457 and resistance patterns. We are currently assessing the impact of this platform on antibiotic

458 use and patients outcome in our hospital, and are evaluating if an algorithm-based
459 treatment plan guided by FAPP would be of great benefit.

460

461 4878 words

462

463 **5 Author contributions**

464 LC, AR, and SG were involved in all the aspects of the study and are the guarantors for the
465 data. In addition, BG, MB, KL, BR, and AR performed clinical procedures; LC, TD, EP, and SG
466 performed laboratory procedures; LC, TD, FG, CP, MAV, and SG analysed the data; LC and AR
467 wrote the manuscript.

468

469 **6 Funding**

470 This work has been supported by bioMérieux BioFire Medical, France. Authors maintained
471 control over all the aspects of the study and over the content of the publication.

472

473 **7 Acknowledgements**

474 We thank the Clinical Research and Innovation Department of the Nantes University Hospital
475 for their helpful contribution to this study.

476

477 **8 References**

- 478 Buchan, B. W., Windham, S., Balada-Llasat, J. M., Leber, A., Harrington, A., Relich, R., et al.
479 (2020). Practical comparison of the BioFire® FilmArray® Pneumonia Panel to routine
480 diagnostic methods and potential impact on antimicrobial stewardship in adult
481 hospitalized patients with lower respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 29,
482 JCM.00135-20. doi: 10.1128/JCM.00135-20.
- 483 Chapin, K. C., and Doern, G. V. (1983). Selective media for recovery of *Haemophilus*
484 *influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. *J*
485 *Clin Microbiol* 17, 1163-1165.
- 486 Collins, M. E., Popowitch, E. B., and Miller, M. B. (2020). Evaluation of a novel multiplex PCR
487 panel compared to quantitative bacterial culture for diagnosis of lower respiratory tract
488 infections. *J Clin Microbiol* 58, e02013-e02019. doi: 10.1128/JCM.02013-19.
- 489 Couturier, M. R., and Bard, J. D. (2019). Direct-from-specimen pathogen identification:
490 evolution of syndromic panels. *Clin Lab Med* 39, 433-451. doi: 10.1016/j.cl.2019.05.005.
- 491 Doern, G. V., and Brogden-Torres, B. (1992). Optimum use of selective plated media in
492 primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J*
493 *Clin Microbiol* 30, 2740-2742.
- 494 ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. Healthcare-associated infections
495 acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2017.
496 Stockholm: ECDC. (2019).
- 497 Ekren, P. K., Ranzani, O. T., Ceccato, A., Li Bassi, G., Muñoz Conejero, E., Ferrer, M., et al.
498 (2018). Evaluation of the 2016 Infectious Diseases Society of America/American Thoracic
499 Society Guideline Criteria for Risk of Multidrug-Resistant Pathogens in Patients with
500 Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia in the ICU. *Am J Respir Crit Care*
501 *Med* 197, 826-830. doi: 10.1164/rccm.201708-1717LE.
- 502 Kalil, A. C., Metersky, M. L., Klompas, M., Muscedere, J., Sweeney, D. A., Palmer, L. B., et al.
503 (2016). Management of adults with hospital-acquired and Ventilator-associated
504 Pneumonia: 2016 clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of

505 America and the American Thoracic Society. *Clin Infect Dis* 63, e61-e111. doi:
506 10.1093/cid/ciw353.

507 Laux, C., Peschel, A., and Krismer, B. (2019). Staphylococcus aureus colonization of the
508 human nose and interaction with other microbiome members. *Microbiol Spectr* 7, GPP3-
509 0029-2018. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0029-2018.

510 Lee, S. H., Ruan, S. Y., Pan, S. C., Lee, T. F., Chien, J. Y., and Hsueh, P. R. (2019). Performance
511 of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and
512 the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult
513 patients in intensive care units. *J Microbiol Immunol Infect* 52, 920-928. doi:
514 10.1016/j.jmii.2019.10.009.

515 Loubet, P., Voiriot, G., Houhou-Fidouh, N., Neuville, M., Bouadma, L., Lescure, F. X., et al.
516 (2017). Impact of respiratory viruses in hospital-acquired pneumonia in the intensive
517 care unit: A single-center retrospective study. *J Clin Virol* 91, 52-57. doi:
518 10.1016/j.jcv.2017.04.001.

519 Murphy, C. N., Fowler, R., Balada-Llasat, J. M., Carroll, A., Stone, H., Akerele, O., et al. (2020).
520 Multicenter evaluation of the BioFire® FilmArray® Pneumonia/Pneumonia *plus* panel for
521 the detection and quantification of agents of lower respiratory tract infection. *J Clin*
522 *Microbiol* 29, JCM.00128-20. doi: 10.1128/JCM.00128-20.

523 Panzer, A. R., Lynch, S. V., Langelier, C., Christie, J. D., McCauley, K., Nelson, M., et al. (2018).
524 Lung microbiota is related to smoking status and to development of acute respiratory
525 distress syndrome in critically ill trauma patients. *Am J Respir Crit Care Med* 197, 621-
526 631. doi: 10.1164/rccm.201702-0441OC.

527 Papazian, L., Klompas, M., and Luyt, C. E. (2020). Ventilator-associated pneumonia in adults:
528 a narrative review. *Intensive Care Med* 46, 888-906. doi: 10.1007/s00134-020-05980-0.

529 Poole, S., and Clark, T. W. (2020). Rapid syndromic molecular testing in pneumonia: the
530 current landscape and future potential. *J Infect* 80, 1-7. doi: 10.1016/j.jinf.2019.11.021.

531 Roquilly, A., Feuillet, F., Seguin, P., Lasocki, S., Cinotti, R., Launey, Y., et al. (2016). Empiric
532 antimicrobial therapy for ventilator-associated pneumonia after brain injury. *Eur Respir J*
533 47, 1219-1228. doi: 10.1183/13993003.01314-2015.

534 Roquilly, A., Torres, A., Villadangos, J. A., Netea, M. G., Dickson, R., Becher, B., et al. (2019).
535 Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *Lancet*
536 *Respir Med* 7, 710-720. doi: 10.1016/S2213-2600(19)30140-7.

537 SFM, Société Française de Microbiologie. Rémic - Référentiel en Microbiologie médicale. 6th
538 ed. (2018).

539 SFM, Société Française de Microbiologie. European Committee on Antimicrobial
540 Susceptibility Testing. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de
541 Microbiologie - Recommandations 2019. (2019).

542 Torres, A., Niederman, M. S., Chastre, J., Ewig, S., Fernandez-Vandellos, P., Hanberger, H., et
543 al. (2017). International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of
544 hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the
545 management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia
546 (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care
547 Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
548 (ESCMID) and Asociación Latino americana del Tórax (ALAT). *Eur Respir J* 50, 1700582.
549 doi: 10.1183/13993003.00582-2017.

550 Van Someren Gréve, F., Juffermans, N. P., Bos, L. D. J., Binnekade, J. M., Braber, A., Cremer,
551 O. L., et al. (2018). Respiratory viruses in invasively ventilated critically ill patients-A
552 prospective multicenter observational study. *Crit Care Med* 46, 29-36. doi:
553 10.1097/CCM.0000000000002752.

554 Yoo, I. Y., Huh, K., Shim, H. J., Yun, S. A., Chung, Y.N., Kang, O. K., et al. (2020). Evaluation of
555 the BioFire® FilmArray® Pneumonia Panel for rapid detection of respiratory bacterial
556 pathogens and antibiotic resistance genes in sputum and endotracheal aspirate
557 specimens. *Int J Infect Dis* 95, 326-331. doi: 10.1016/j.ijid.2020.03.024.

558

559 **Figure legends**

560

561 **Fig. 1 Summary of FAPP and culture results.**

562 FAPP results distribution per pathogen category and sample type (A). Number of bacteria
563 per sample with FAPP compared to culture in BAL_{DS} (B), ETA_{DS} (C), and ETA_{TT} (D). FAPP results
564 compared to culture results for bacterial detection (E).

565

566 **Fig. 2 Comparison of 10⁴ and 10⁵ cutoffs with FAPP for ETA.**

567 Number of positive detections per sample for each threshold, in ETA collected at diagnosis
568 (A) and 2-3 days later (B). Comparison of paired BAL_{DS} and ETA_{DS} for each threshold (C and
569 D).

570

571 **Fig. 3 Analysis of discordant results between FAPP and culture at diagnosis, by rereading
572 cultures in light of FAPP results, and by investigating the concordance with FAPP results
573 from the paired ETA_{DS}/BAL_{DS} and/or ETA_{TT} if collected.**

574 Concordance and discordance between FAPP and culture identifications (A). Causes of
575 discordant results in BAL_{DS} (B) and ETA_{DS} (C). Discrepancy investigations in BAL_{DS} (D) and
576 ETA_{DS} (E).

577

578 **Fig. 4 Analysis of discordant results between FAPP and culture in ETA_{TT}**

579 Causes of discordant results in ETA_{TT} (A). Discrepancy investigations for each additional
580 bacteria detected by FAPP (B).

581

582

583 **Table 1**

584 Characteristics of patients at onset of pneumonia

585

Patient characteristics	n= 100
Age (years), Median (range)	57 (19-85)
Male sex, n (%)	81 (81%)
Median length of hospital stay before pneumonia, days	6
Median length of ICU stay before pneumonia, days	5
Early-onset pneumonia, n (%)	33 (33%)
Late-onset pneumonia, n (%)	67 (67%)
Ventilator-associated pneumonia, n (%)	87 (87%)
Most pejorative PaO ₂ /FiO ₂ at day 1, Median (range)	135 (56-309)
Risk factors for MRSA ^a , n (%)	6 (6%)
Previous isolation of ESBL-Enterobacteria, n (%)	2 (2%)
Antibiotics use during the previous 90 days, n(%)	40 (40%)
Antibiotics use before sampling at the time of HAP diagnosis	25 (25%)

586

587 ^aRecent colonisation by MRSA, chronic skin lesions, chronic renal replacement therapy

588

589

590 **Table 2**

591 FilmArray® Pneumonia plus Panel Targets

592

Variables
15 bacteria reported into bins (10^4, 10^5, 10^6, and $\geq 10^7$ DNA copies/mL) <i>Acinetobacter calcoaceticus baumannii</i> complex <i>Enterobacter cloacae</i> complex <i>Escherichia coli</i> <i>Haemophilus influenzae</i> <i>Klebsiella aerogenes</i> <i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> group <i>Moraxella catarrhalis</i> <i>Proteus</i> spp. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Serratia marcescens</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus agalactiae</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>
3 atypical bacteria <i>Chlamydia pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
9 viruses Adenovirus Coronavirus human Metapneumovirus Influenza A Influenza B MERS CoV Parainfluenza viruses Rhinovirus/Enterovirus RSV
7 antimicrobial resistance genes MRSA genes (<i>mecA/C</i> and MREJ) Carbapenemases (<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{OXA-48-like}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i>) ESBL (<i>bla_{CTX-M}</i>)

593

594

595 **Table 3**

596 Comparison of FAPP and culture for each FAPP bacterial target, at the time of HAP diagnosis.

FAPP Bacterial targets	BAL ₀₅ (Number of results for FAPP/culture)							ETA ₀₅ (Number of results for FAPP/culture)						
	(+/+)	(+/-)	(-/+)	(-/-)	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)	(+/+)	(+/-)	(-/+)	(-/-)	PPA (95% CI)	NPA (95% CI)	OPA (95% CI)
<i>A. baumannii</i>	0	0	0	76	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>E. cloacae</i>	2	3	0	71	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]	2	3	0	77	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]
<i>E. coli</i>	15	2	0	59	100 [100 ; 100]	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	9	0	0	73	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>H. influenzae</i>	23	9	0	44	100 [100 ; 100]	83 [73 ; 93]	88 [81 ; 95]	20	14	1	47	95 [86 ; 100]	77 [66 ; 88]	82 [73 ; 90]
<i>K. aerogenes</i>	0	0	0	76	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>K. oxytoca</i>	2	4	1	69	67 [13 ; 100]	95 [89 ; 100]	93 [88 ; 99]	2	4	0	76	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>K. pneumoniae</i>	7	2	0	67	100 [100 ; 100]	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	6	1	0	75	100 [100 ; 100]	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]
<i>M. catarrhalis</i>	0	2	0	74	NA	97 [94 ; 100]	97 [94 ; 100]	1	4	0	77	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>Proteus spp</i>	1	4	0	71	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]	4	4	0	74	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>P. aeruginosa</i>	3	0	0	73	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	3	0	0	79	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
<i>S. marcescens</i>	1	1	0	74	100 [100 ; 100]	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]	0	3	0	79	NA	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]
<i>S. aureus</i>	17	6	0	53	100 [100 ; 100]	90 [82 ; 98]	92 [86 ; 98]	19	5	0	58	100 [100 ; 100]	92 [85 ; 99]	94 [89 ; 99]
<i>S. agalactiae</i>	1	3	0	72	100 [100 ; 100]	96 [92 ; 100]	96 [92 ; 100]	0	4	0	78	NA	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>S. pneumoniae</i>	11	4	0	61	100 [100 ; 100]	94 [88 ; 100]	95 [90 ; 100]	9	4	0	69	100 [100 ; 100]	95 [90 ; 100]	95 [90 ; 100]
<i>S. pyogenes</i>	0	1	0	75	NA	99 [96 ; 100]	99 [96 ; 100]	0	0	0	82	NA	100 [100 ; 100]	100 [100 ; 100]
Total	83	41	1	1015	99 [96 ; 100]	96 [95 ; 97]	96 [95 ; 97]	75	46	1	1108	99 [96 ; 100]	96 [95 ; 97]	96 [95 ; 97]

597

598

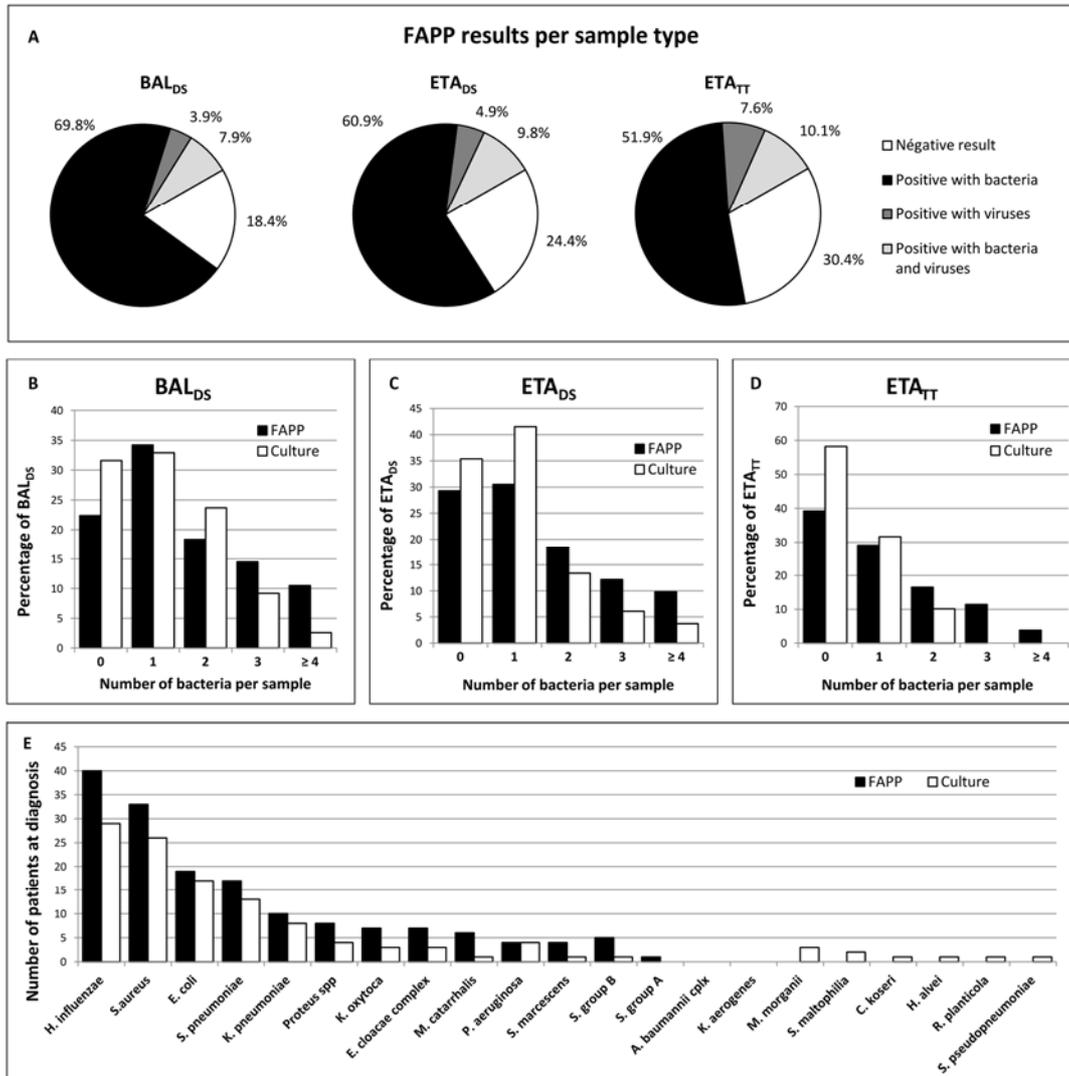


Fig. 1 Summary of FAPP and culture results.

FAPP results distribution per pathogen category and sample type (A). Number of bacteria per sample with FAPP compared to culture in BAL_{DS} (B), ETA_{DS} (C), and ETA_{TT} (D). FAPP results compared to culture results for bacterial detection (E).

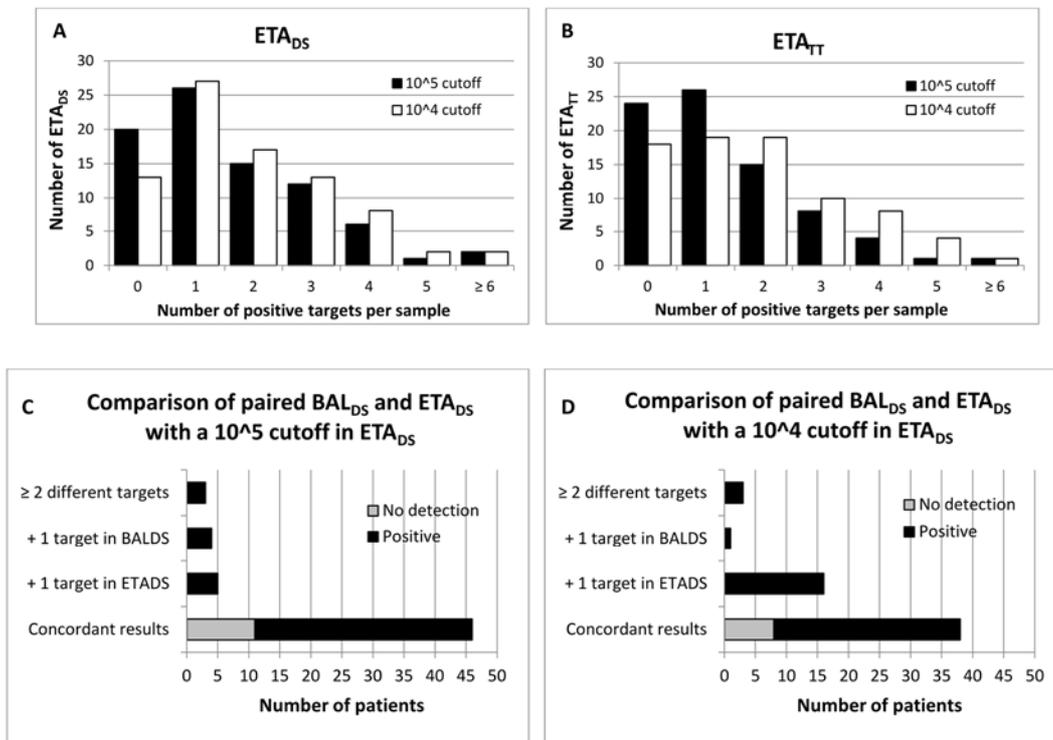


Fig. 2 Comparison of 10⁴ and 10⁵ cutoffs with FAPP for ETA.

Number of positive detections per sample for each threshold, in ETA collected at diagnosis (A) and 2-3 days later (B). Comparison of paired BAL_{DS} and ETA_{DS} for each threshold (C and D).

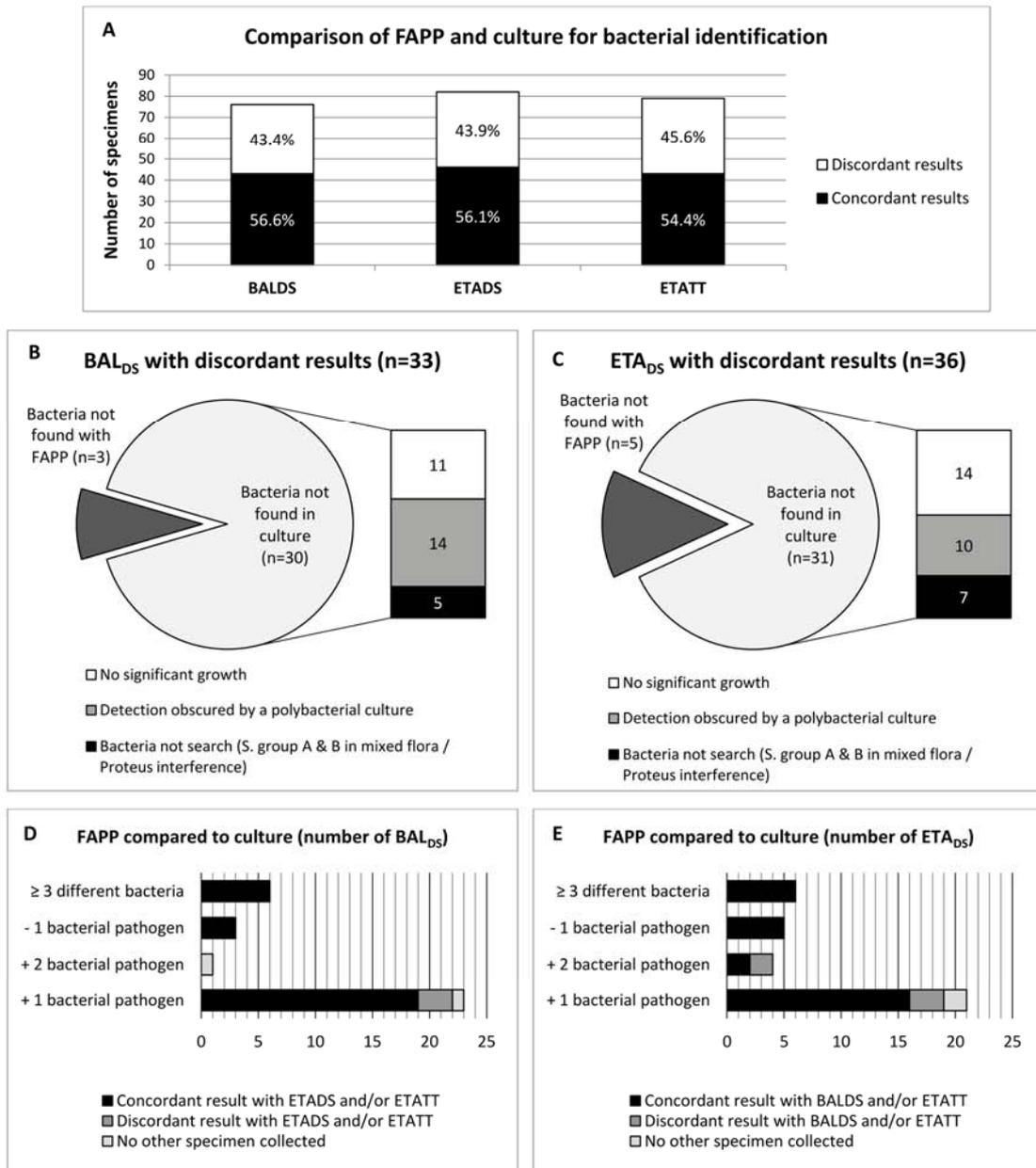


Fig. 3 Analysis of discordant results between FAPP and culture at diagnosis, by rereading cultures in light of FAPP results, and by investigating the concordance with FAPP results from the paired ETA_{DS}/BAL_{DS} and/or ETA_{TT} if collected.

Concordance and discordance between FAPP and culture identifications (A). Causes of discordant results in BAL_{DS} (B) and ETA_{DS} (C). Discrepancy investigations in BAL_{DS} (D) and ETA_{DS} (E).

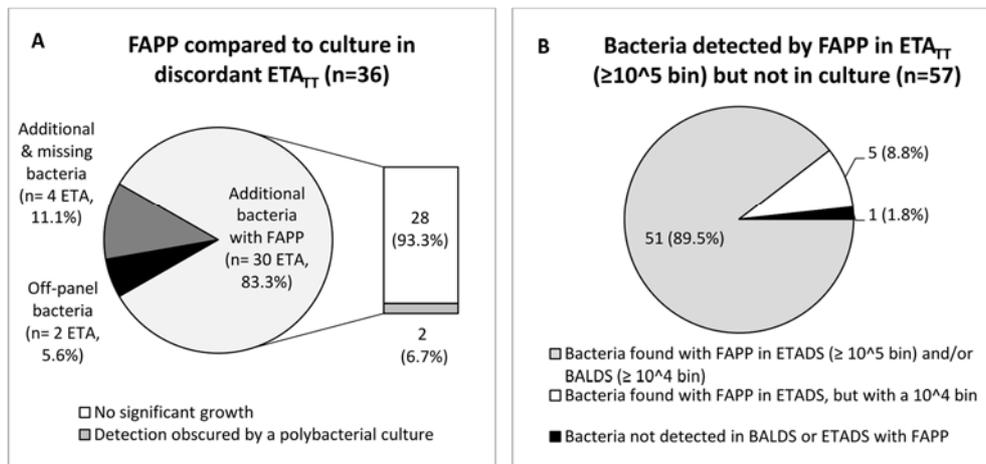


Fig. 4 Analysis of discordant results between FAPP and culture in ETA_{TT}

Causes of discordant results in ETA_{TT} (A). Discrepancy investigations for each additional bacteria detected by FAPP (B).

Bibliographie

1. Hospital-acquired pneumonia in adults: diagnosis, assessment of severity, initial antimicrobial therapy, and preventive strategies. A consensus statement, American Thoracic Society, November 1995. *Am J Respir Crit Care Med.* mai 1996;153(5):1711-25.
2. Torres A, Niederman MS, Chastre J, Ewig S, Fernandez-Vandellos P, Hanberger H, et al. International ERS/ESICM/ESCMID/ALAT guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia: Guidelines for the management of hospital-acquired pneumonia (HAP)/ventilator-associated pneumonia (VAP) of the European Respiratory Society (ERS), European Society of Intensive Care Medicine (ESICM), European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) and Asociación Latinoamericana del Tórax (ALAT). *Eur Respir J.* sept 2017;50(3):1700582.
3. Kalil AC, Metersky ML, Klompas M, Muscedere J, Sweeney DA, Palmer LB, et al. Management of Adults With Hospital-acquired and Ventilator-associated Pneumonia: 2016 Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America and the American Thoracic Society. *Clinical Infectious Diseases.* 1 sept 2016;63(5):e61-111.
4. Leone M, Bouadma L, Bouhemad B, Brissaud O, Dauter S, Gibot S, et al. Pneumonies associées aux soins de réanimation* RFE commune SFAR–SRLF. *Méd Intensive Réa.* 1 juin 2019;28(3):261-81.
5. Kelly DN, Martin-Loeches I. Comparing current US and European guidelines for nosocomial pneumonia: Current Opinion in Pulmonary Medicine. mai 2019;25(3):263-70.
6. ECN Pilly: Maladies infectieuses et tropicales 2019 Infections Broncho-pulmonaires de l'adulte et l'enfant. In.
7. Lanks CW, Musani AI, Hsia DW. Community-acquired Pneumonia and Hospital-acquired Pneumonia. *Medical Clinics of North America.* 1 mai 2019;103(3):487-501.
8. Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2017. 2017;12.
9. ECN Pilly: Maladies infectieuses et tropicales 2019: EIAS, sécurité du patient. In.
10. REMIC: référentiel en microbiologie médicale 2018. Société française de microbiologie.
11. Chaudhry R, Bordoni B. Anatomy, Thorax, Lungs. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019 [cité 12 nov 2019]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470197/>
12. Soussan R, Schimpf C, Pilimis B, Degroote T, Tran M, Bruel C, et al. Ventilator-associated pneumonia: The central role of transcolonization. *J Crit Care.* avr 2019;50:155-61.

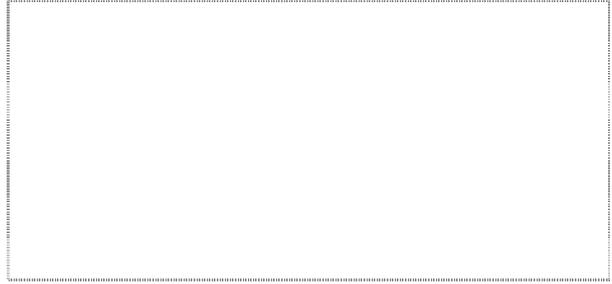
13. Koulenti D, Tsigou E, Rello J. Nosocomial pneumonia in 27 ICUs in Europe: perspectives from the EU-VAP/CAP study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* nov 2017;36(11):1999-2006.
14. Roquilly A, Torres A, Villadangos JA, Netea MG, Dickson R, Becher B, et al. Pathophysiological role of respiratory dysbiosis in hospital-acquired pneumonia. *The Lancet Respiratory Medicine.* août 2019;7(8):710-20.
15. Charles MP, Kali A, Easow JM, Joseph NM, Ravishankar M, Srinivasan S, et al. 12 Ventilator-associated pneumonia. *Australas Med J.* 31 août 2014;7(8):334-44.
16. Mandell LA, Wunderink RG, Anzueto A, Bartlett JG, Campbell GD, Dean NC, et al. Infectious Diseases Society of America/American Thoracic Society Consensus Guidelines on the Management of Community-Acquired Pneumonia in Adults. *Clin Infect Dis.* 1 mars 2007;44(Supplement_2):S27-72.
17. Berton DC, Kalil AC, Teixeira PJZ. Quantitative versus qualitative cultures of respiratory secretions for clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia. *Cochrane Acute Respiratory Infections Group, éditeur. Cochrane Database of Systematic Reviews [Internet].* 30 oct 2014 [cité 6 avr 2020]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD006482.pub4>
18. Bouadma L, Deslandes E, Lolom I, Le Corre B, Mourvillier B, Regnier B, et al. Long-Term Impact of a Multifaceted Prevention Program on Ventilator-Associated Pneumonia in a Medical Intensive Care Unit. *CLIN INFECT DIS.* 15 nov 2010;51(10):1115-22.
19. For The European HAP working group, Torres A, Ewig S, Lode H, Carlet J. Defining, treating and preventing hospital acquired pneumonia: European perspective. *Intensive Care Med.* janv 2009;35(1):9-29.
20. Metersky ML, Kalil AC. Management of Ventilator-Associated Pneumonia. *Clinics in Chest Medicine.* déc 2018;39(4):797-808.
21. Templeton KE. Why diagnose respiratory viral infection? *Journal of Clinical Virology.* oct 2007;40:S2-4.
22. van Someren Gréve F, Juffermans NP, Bos LDJ, Binnekade JM, Braber A, Cremer OL, et al. Respiratory Viruses in Invasively Ventilated Critically Ill Patients—A Prospective Multicenter Observational Study: *Critical Care Medicine.* janv 2018;46(1):29-36.
23. Torres A, Lee N, Cilloniz C, Vila J, Van der Eerden M. Laboratory diagnosis of pneumonia in the molecular age. *Eur Respir J.* déc 2016;48(6):1764-78.
24. Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, Meyers L, Nilsson K, Jones DE, et al. FilmArray, an Automated Nested Multiplex PCR System for Multi-Pathogen Detection: Development and Application to Respiratory Tract Infection. *Costa C, éditeur. PLoS ONE.* 19 oct 2011;6(10):e26047.
25. Wittwer CT. Democratizing the Real-Time PCR. *Clinical Chemistry.* 1 avr 2017;63(4):924-5.

26. Hawkins SFC, Guest PC. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. In: Guest PC, éditeur. *Multiplex Biomarker Techniques* [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2017 [cité 13 avr 2020]. p. 125-33. (Methods in Molecular Biology; vol. 1546). Disponible sur: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-6730-8_8
27. Martin-Loeches I, Torres A, Rinaudo M, Terraneo S, de Rosa F, Ramirez P, et al. 14. Resistance patterns and outcomes in intensive care unit (ICU)-acquired pneumonia. Validation of European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) classification of multidrug resistant organisms. *Journal of Infection*. 1 mars 2015;70(3):213-22.
28. Muscedere JG, Shorr AF, Jiang X, Day A, Heyland DK. The adequacy of timely empiric antibiotic therapy for ventilator-associated pneumonia: An important determinant of outcome. *Journal of Critical Care*. juin 2012;27(3):322.e7-322.e14.
29. Lenhard JR, Bulman ZP. Inoculum effect of β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 oct 2019;74(10):2825-43.
30. Laëtitia C. Antibiothérapie des infections à entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'adulte : place des carbapénèmes et de leurs alternatives Méthode. 2019;25.
31. Pilmis B, Cattoir V, Lecointe D, Limelette A, Grall I, Mizrahi A, et al. Carriage of ESBL-producing Enterobacteriaceae in French hospitals: the PORTABLE study. *Journal of Hospital Infection*. mars 2018;98(3):247-52.
32. Pilmis B, Zahar J-R. Ventilator-associated pneumonia related to ESBL-producing gram negative bacilli. *Ann Transl Med*. nov 2018;6(20):424-424.
33. Roquilly A, Feuillet F, Seguin P, Lasocki S, Cinotti R, Launey Y, et al. Empiric antimicrobial therapy for ventilator-associated pneumonia after brain injury. *Eur Respir J*. avr 2016;47(4):1219-28.
34. Torres A, Rank D, Melnick D, Rekeda L, Chen X, Riccobene T, et al. Randomized Trial of Ceftazidime-Avibactam vs Meropenem for Treatment of Hospital-Acquired and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia (REPROVE): Analyses per US FDA-Specified End Points. *Open Forum Infectious Diseases* [Internet]. 1 avr 2019 [cité 14 avr 2020];6(4). Disponible sur: <https://academic.oup.com/ofid/article/doi/10.1093/ofid/ofz149/5479954>
35. Lin W-T, Lai C-C, Cheong C-U. Novel β -Lactam/ β -Lactamase Combination Versus Meropenem for Treating Nosocomial Pneumonia. *Antibiotics*. 13 nov 2019;8(4):219.
36. Couturier MR, Barney T, Alger G, Hymas WC, Stevenson JB, Hillyard D, et al. Evaluation of the FilmArray[®] Respiratory Panel for Clinical Use in a Large Children's Hospital: Evaluation of the FilmArray Respiratory Panel. *J Clin Lab Anal*. mars 2013;27(2):148-54.
37. Southern E, Mir K, Shchepinov M. Molecular interactions on microarrays. *Nature Genetics*. janv 1999;21(1):5-9.
38. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1 juill 2012;67(7):1597-606.

39. Suzuki E, Hiramatsu K, Yokota T. Survey of methicillin-resistant clinical strains of coagulase-negative staphylococci for *mecA* gene distribution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1 févr 1992;36(2):429-34.
40. Stefani S, Bongiorno D, Mongelli G, Campanile F. Linezolid Resistance in Staphylococci. *Pharmaceuticals*. 24 juin 2010;3(7):1988-2006.
41. Collins ME, Popowitch EB, Miller MB. Evaluation of a Novel Multiplex PCR Panel Compared to Quantitative Bacterial Culture for Diagnosis of Lower Respiratory Tract Infections. Land GA, éditeur. *J Clin Microbiol*. 19 févr 2020;58(5):e02013-19, /jcm/58/5/JCM.02013-19.atom.
42. Lee SH, Ruan S-Y, Pan S-C, Lee T-F, Chien J-Y, Hsueh P-R. Performance of a multiplex PCR pneumonia panel for the identification of respiratory pathogens and the main determinants of resistance from the lower respiratory tract specimens of adult patients in intensive care units. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. déc 2019;52(6):920-8.
43. Buchan BW, Windham S, Balada-Llasat J-M, Leber A, Harrington A, Relich R, et al. Practical Comparison of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel to Routine Diagnostic Methods and Potential Impact on Antimicrobial Stewardship in Adult Hospitalized Patients with Lower Respiratory Tract Infections. Miller MB, éditeur. *J Clin Microbiol*. 29 avr 2020;58(7):e00135-20, /jcm/58/7/JCM.00135-20.atom.
44. Healthcare-associated infections in intensive care units - Annual Epidemiological Report for 2017 [Internet]. European Centre for Disease Prevention and Control. 2019 [cité 1 août 2020]. Disponible sur: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/healthcare-associated-infections-intensive-care-units-annual-epidemiological-1>
45. Yoo IY, Huh K, Shim HJ, Yun SA, Chung YN, Kang OK, et al. Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia Panel for rapid detection of respiratory bacterial pathogens and antibiotic resistance genes in sputum and endotracheal aspirate specimens. *International Journal of Infectious Diseases*. juin 2020;95:326-31.
46. Jones RN. Microbial Etiologies of Hospital-Acquired Bacterial Pneumonia and Ventilator-Associated Bacterial Pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1 août 2010;51(Supplement_1):S81-7.
47. Panzer AR, Lynch SV, Langelier C, Christie JD, McCauley K, Nelson M, et al. Lung Microbiota Is Related to Smoking Status and to Development of Acute Respiratory Distress Syndrome in Critically Ill Trauma Patients. *Am J Respir Crit Care Med*. mars 2018;197(5):621-31.
48. Laux C, Peschel A, Krismer B. *Staphylococcus aureus* Colonization of the Human Nose and Interaction with Other Microbiome Members. In: Fischetti VA, Novick RP, Ferretti JJ, Portnoy DA, Braunstein M, Rood JJ, éditeurs. *Gram-Positive Pathogens* [Internet]. Washington, DC, USA: ASM Press; 2019 [cité 8 juill 2020]. p. 723-30. Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1128/9781683670131.ch45>
49. Chapin KC, Doern GV. Selective media for recovery of *Haemophilus influenzae* from specimens contaminated with upper respiratory tract microbial flora. *Journal of Clinical Microbiology*. 1983;17(6):1163-5.

50. Mackay IM, Arden KE. MERS coronavirus: diagnostics, epidemiology and transmission. *Virology*. déc 2015;12(1):222.
51. Murphy CN, Fowler R, Balada-Llasat JM, Carroll A, Stone H, Akerele O, et al. Multicenter Evaluation of the BioFire FilmArray Pneumonia/Pneumonia Plus Panel for Detection and Quantification of Agents of Lower Respiratory Tract Infection. Miller MB, éditeur. *J Clin Microbiol*. 29 avr 2020;58(7):e00128-20, /jcm/58/7/JCM.00128-20.atom.

Vu, le Président du Jury,
(Tampon et signature)



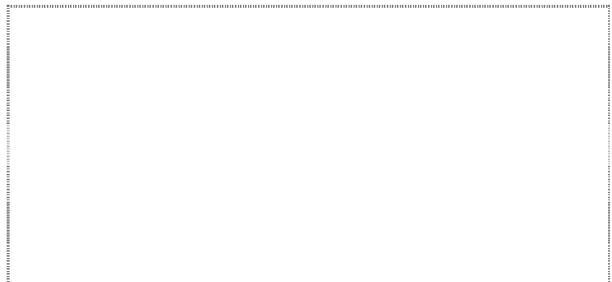
Professeur Antoine ROQUILLY

Vu, le Directeur de Thèse,
(Tampon et signature)



Docteur Lise CREMET

Vu, le Doyen de la Faculté,



Professeur Pascale JOLLIET

Evaluation du panel respiratoire Pneumonia *plus* (FilmArray®) dans le diagnostic et la prise en charge des pneumopathies en Réanimation au CHU de Nantes

RESUME

Le Pneumonia *plus* (FilmArray®), est un dispositif automatisé de diagnostic *in vitro* destiné à la détection par PCR des principaux pathogènes (virus, bactéries et gènes de résistance aux antibiotiques), responsables de pneumopathies communautaires et nosocomiales. Nous avons comparé cette nouvelle technologie avec les techniques de routine utilisées au CHU de Nantes, chez 100 patients inclus dans l'étude Oracle-phase 1 (Octobre 2018 - Janvier 2020). Nos résultats montrent que ce nouvel outil permet d'améliorer la documentation microbiologique des pneumonies, avec davantage de pathogènes détectés par prélèvement. Ce test a aussi ses limites. En effet, il ne détecte pas toutes les bactéries responsables de pneumopathies, et ne permet pas de se passer de la culture bactérienne. Néanmoins le rendu très rapide des résultats (1h15) devrait avoir un impact majeur dans la prise en charges des pneumonies sévères à l'hôpital.

MOTS-CLES

PNEUMONIE ACQUISE A L'HOPITAL-DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE-PCR MULTIPLEX-DIAGNOSTIC SYNDROMIQUE-COINFECTION-RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES