



Impact des tests de diagnostic rapide antigéniques ou moléculaires sur la prise en charge des infections respiratoires bactériennes et virales aux urgences pédiatriques

Aymeric Cantais

► To cite this version:

Aymeric Cantais. Impact des tests de diagnostic rapide antigéniques ou moléculaires sur la prise en charge des infections respiratoires bactériennes et virales aux urgences pédiatriques. Médecine humaine et pathologie. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSES048 . tel-03881075

HAL Id: tel-03881075

<https://theses.hal.science/tel-03881075>

Submitted on 1 Dec 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre NNT : 2021LYSES048

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
Université Jean Monnet à Saint Etienne

Ecole Doctorale

EDSIS 488 – Science et Ingénierie de la Santé

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie

Soutenue publiquement le 01/12/2021, par :

Aymeric CANTAIS

Impact des tests de diagnostic rapide antigéniques ou moléculaires sur la prise en charge des infections respiratoires bactériennes et virales aux urgences pédiatriques

Devant le jury composé de :

PATURAL Hugues	PU-PH	Université Jean Monnet	Président
DUBOS François	PU-PH	Université de Lille	Rapporteur
MORFIN-SHERPA Florence	PU-PH	Université de Lyon	Rapporteuse
MORY Olivier	PH	CHU Saint Etienne	Examineur
POZZETTO Bruno	PU-PH	Université Jean Monnet	Directeur de thèse
PILLET Sylvie	MCU-PH	Université Jean Monnet	Co-directrice de thèse

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Pr. Hugues Patural, d'avoir accepté de présider mon jury. Pour tout son soutien et sa présence, son écoute et ses conseils au cours de ces dernières années. Merci d'être ainsi un modèle de travail et de qualités humaines pour tous les internes.

Je tiens à remercier le Pr. François Dubos, d'avoir accepté de relire et de rapporter mon travail. Votre implication dans la recherche clinique et la pédiatrie d'urgence m'a marqué au sein du GFRUP. Merci de m'avoir accueilli ainsi dans notre société savante.

Je remercie également le Pr. Florence Morfin-Sherpa, d'avoir accepté de prendre le temps d'étudier ce travail, de le relire et de le critiquer. Je vous exprime mes sincères remerciements et ma gratitude.

Je remercie profondément et sincèrement le Dr. Olivier Mory. Merci pour ces années à m'encadrer, me soutenir, me pousser vers l'avant, m'écouter. Merci pour les qualités humaines et personnelles qui sont un exemple pour moi chaque jour passé dans le service. Merci.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements au Dr. Sylvie Pillet, pour son dynamisme, son soutien, ses qualités de chercheuse, de biologiste et surtout ses profondes qualités humaines. Merci d'avoir été là depuis le début et d'avoir cru en un petit pédiatre ...

J'exprime enfin mon plus sincère respect, mon amitié et mes remerciements au Pr Bruno Pozzetto, qui m'a appris la rigueur, la patience et le goût du travail bien fait. Merci pour tout.

A mon épouse, toujours présente, sans qui rien n'aurait été possible.

A mes enfants, pour le sens qu'ils donnent à ma vie.

A mon père et ma mère, pour m'avoir chacun donné quelque chose d'eux et les leçons de vie que j'ai comprises avec eux.

A mon frère et ma sœur, le temps et l'espace nous séparent, mais nous partagerons toujours notre enfance.

A mes grands-parents, tous toujours présents dans mon cœur et ma mémoire

A Olivier, bien sûr. Pour m'avoir accueilli en Pédiatrie, m'avoir soutenu, m'avoir toléré aussi parfois ... et pour les qualités humaines dont il me fait exemple chaque jour. Merci.

A tous les médecins du service des Urgences Pédiatriques, passés, présents et futurs ... A Charlotte, Claudine, Louise, Nadine et tous les autres ...

A Hugues, pour m'avoir accueilli un bout de chemin en réanimation, m'avoir épaulé et soutenu dans mon parcours, et permis aussi tout ça.

A l'équipe de Roanne, Mr Jeannoel pour m'avoir ouvert un monde et montré la porte.

A tous les médecins que j'ai pu rencontrer et observer durant mon parcours. Tous ont été des exemples.

A Michael Darmon, qui a été le tout premier à m'aider à appréhender ce qu'était la recherche clinique, qui m'a aidé et soutenu et qui m'a montré l'exemple.

Aux médecins du GFRUP et de la pédiatrie d'urgence qui m'ont accueilli dans leur équipe et avec qui j'espère encore longtemps travailler. Merci Christelle, François, et François.

Aux biologistes que j'ai fréquenté ces dernières années. Leur rigueur m'a toujours beaucoup plu.

Et bien sûr à Bruno et Sylvie. Pour tout ce que nous avons fait ensemble et que vous avez rendu possible, le travail, les publications, les moments de temps suspendus à relire nos articles et corriger les tournures de phrases. Je pense que je vous dois à peu près tout ce que j'ai appris sur la recherche clinique.

Liste des abréviations :

BALT	<i>bronchus-associated Lymphoid tissue</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
COVID	<i>Coronavirus disease</i>
CRP	<i>C-reactive protein</i>
ECDC	<i>European center for Disease Control and Prevention</i>
hBoV	<i>Human Bocavirus</i>
hCoV	<i>Human Coronavirus</i>
hib	<i>Haemophilus Influenza de type b</i>
hMPV	<i>Human metapneumovirus</i>
hPIV	<i>Human parainfluenzavirus</i>
HSV	<i>Herpes Simplex Virus</i>
HTIC	Hypertension Intracrânienne
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IDSA	<i>Infectious Diseases Society of America</i>
IFN	Interferon
LCS	Liquide cérébro-spinal
MALDI-TOF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight</i>
MERS	<i>Middle East respiratory syndrome</i>
NALT	<i>Nasal-associated Lymphoid Tissue</i>
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAC	Pneumonie aiguë communautaire
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PNN	Polynucléaire neutrophile
POCT	<i>Point-of-care test</i>
PPLO	<i>Pleuro Pneumonia Like Organisms</i>
PPR	<i>Pattern recognition receptors</i>
RSV	<i>Respiratory syncytial virus</i>
SARS	<i>severe acute respiratory syndrome</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
TDR	Test de diagnostic rapide
TLR	<i>Toll-like Receptors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VIH	virus de l'immunodéficience humaine
RSV	Virus respiratoire syncytial

Sommaire :

INTRODUCTION GENERALE	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
A. POSITION GENERALE DE LA PROBLEMATIQUE.....	8
1 Les infections des voies respiratoires basses – vue globale	8
2 Les méthodes de diagnostic étiologiques	11
B. DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES	17
1 Tests biologiques, aspects statistiques	17
2 Evolution historique des techniques de détection des infections respiratoires	22
3 Perspectives pour demain.....	26
C. PATHOGENIE GENERALE DES INFECTIONS DES VOIES RESPIRATOIRES BASSES	26
1 Mécanismes de défense pulmonaire	28
2 Pathogénie générale des infections virales.....	31
3 Pathogénie générale des infections bactériennes	33
4 Place de la vaccination	34
D. AGENTS ETIOLOGIQUES : VIRUS	34
1 Place des agents infectieux viraux dans les PAC.....	34
2 Virus de la Grippe.....	34
3 RSV.....	43
4 Entérovirus & Rhinovirus	50
5 Coronavirus.....	55
6 Adénovirus	59
7 Virus parainfluenza.....	63
8 Human Métapneumovirus	67
9 Bocavirus	69
E. AGENTS ETIOLOGIQUES BACTERIENS.....	71
1 Pneumocoque	71
2 Mycoplasma pneumoniae	76
3 Haemophilus Influenzae de type B.....	78
TRAVAUX PERSONNELS	82
A. DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PNEUMOPATHIES AUX URGENCES PEDIATRIQUES	82
1 Etude Epi-Paups	83
2 Etude OPTIPAC.....	90
B. UTILISATION DES TESTS ANTIGENIQUES RAPIDES POUR LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS RESPIRATOIRES AUX URGENCES PEDIATRIQUES	115
1 Introduction	115
2 Evaluation d’une stratégie utilisant un TDR pneumocoque.....	117
3 Performance analytique d’un POCT.....	127
4 Impact d’un TDR grippe sur la prise en charge aux urgences pédiatriques	132
5 Test antigénique SARS-CoV-2	140
C. DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	168
1 Principaux messages de ces travaux.....	168
2 Forces et faiblesses des travaux présentés	169
3 Implications pour la pratique clinique	170
4 Implications pour de futures recherches.....	172
BIBLIOGRAPHIE	174

ANNEXES.....	191
A. PLAN COMPLET.....	191
B. CV COMPLET.....	195

Introduction générale

Les infections des voies respiratoires basses en pédiatrie sont extrêmement fréquentes. Elles peuvent avoir tous les spectres de gravité et concernent l'ensemble des enfants du monde, avec des épidémiologies locales très différentes. Les recommandations applicables ces dix dernières années (Bradley, Byington, Shah, Alverson, Carter, Harrison, Kaplan, Mace, McCracken, Moore, St Peter, Stockwell, Swanson, et al. 2011) sont de traiter toute pneumopathie par amoxicilline ou un autre antibiotique d'emblée ; le rationnel étant que l'évolution vers une forme grave peut être fatale et que toutes les chances sont à donner au patient « au cas où ». Cette attitude a des conséquences en termes d'antibiothérapies itératives et répétées pour des cas où cela semble de moins en moins utile, en particulier dans l'ère post-vaccinale des pays développés. Un moyen de diminuer la pression antibiotique serait de pouvoir diagnostiquer l'étiologie de l'infection dès le début de sa prise en charge.

L'évolution des techniques microbiologiques avec notamment l'apparition de la PCR rend théoriquement possible une telle attitude. Mais cela n'est pas sans limites techniques, financières et organisationnelles, d'autant que l'arrivée des POCT et des techniques de multiplexage est venue complexifier le tableau. Sur le plan académique, par ailleurs, l'évolution de ces techniques de détection a permis de mieux cerner la physiopathologie de ces infections et de comprendre qu'elles sont probablement beaucoup plus complexes qu'initialement envisagé avec l'intrication potentielle de plusieurs pathogènes et du système immunitaire pour former un spectre de pathologies qui partagent un tableau clinique commun mais recouvrent des réalités – et donc des évolutions potentielles – très différentes.

Optimiser le traitement de ces pathologies revient à être capable de prédire l'évolution du tableau clinique en fonction de l'examen de l'enfant et des analyses réalisées au tout début de sa maladie. A ce jour, cela reste encore très probabiliste. Les travaux présentés dans cette thèse vont dans le sens d'un raccourcissement du délai de diagnostic étiologique et de l'instauration d'emblée du traitement anti-infectieux.

La réalisation de ce travail de thèse de science biologique et l'activité de recherche clinique afférente s'inscrit dans un cadre plus global, prenant en compte des spécificités locales. La réalisation et la publication d'articles en rapport avec ces problématiques ne survient pas par hasard : elle répond à un besoin et se trouve à la croisée d'une évolution historique des techniques de microbiologie avec des évolutions de paradigmes médicaux autour des pathologies infectieuses, en particulier aux urgences pédiatriques et dans un contexte de nécessité de résultat précoce afin d'optimiser l'antibiothérapie.

Aux urgences pédiatriques et façon plus générale dans un contexte de prise en charge initiale d'une suspicion d'infection respiratoire, la problématique thérapeutique la plus importante est celle de l'initiation ou non d'une antibiothérapie. Jusqu'à une période récente, comme développé plus haut, la recommandation était d'initier une antibiothérapie probabiliste d'emblée. Cette attitude était gênante car conduisait à traiter d'emblée des enfants ne présentant parfois que peu de critères de gravité et où le « bon sens clinique » aurait pu recommander de s'abstenir. Le volume important de patients traités dans un service comme celui des urgences pédiatriques du CHU de Saint Etienne rendait cette question d'autant plus importante.

Le service des Urgences Pédiatriques du CHU de Saint Etienne traite 32500 patients par an, avec un pic d'activité hivernal très important et très impactant sur la capacité de soins. Outre la problématique de l'antibiothérapie, l'engorgement causé par la très forte augmentation des afflux de patients en hiver pour des pathologies fébriles, gastrointestinales et/ou respiratoires amène l'équipe à chercher des solutions pour fluidifier les prises en charge.

Pour répondre à ces problématiques et essayer de faire évoluer les pratiques, j'ai proposé de tester en recherche clinique de nouvelles solutions techniques afin d'accélérer le diagnostic. Nous nous sommes d'abord intéressés à la pneumopathie aigüe de l'enfant, probablement le plus souvent d'origine virale, afin de tester tout d'abord si un diagnostic étiologique par PCR était possible en contexte d'urgences, puis en cherchant à savoir si la mise en place de ce diagnostic impactait plus globalement la prise en charge.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes préoccupés de la gestion des flux de patients en contexte d'épidémie, comme la grippe et la bronchiolite, en instaurant un diagnostic rapide systématique lors de la prise en charge afin d'optimiser l'orientation. Nous avons ainsi montré le bénéfice clinique et médico-économique sur la prise en charge. Un travail sur la performance du test antigénique SARS-CoV-2 a également montré l'utilité de ces dispositifs.

Ces travaux ont été très fortement appréciés des équipes soignantes et ont permis l'implantation de nouveaux protocoles de service ainsi qu'une évolution des mentalités. Ces techniques sont très utilisées aujourd'hui, largement en dehors de la recherche.

Dans le même champ de pratique, d'autres sujets de recherche et d'autres usages de ces technologies qui se modernisent se posent pour notre service. Quelle possibilité d'implémenter une PCR multiplex délocalisée directement dans les urgences ? Quel impact ? Quelle charge de travail supplémentaire ? Quel coût ? Peut-on envisager ce dispositif pour d'autres types de prélèvements que respiratoires (LCR des méningites, par exemple ?).

L'usage des TDR antigéniques pourrait s'étendre à d'autres pathogènes, voir à d'autres atteintes syndromiques au sens plus global, comme dans les syndrome neuroméningés ou digestifs.

Synthèse Bibliographique

A. Position générale de la problématique

1 Les infections des voies respiratoires basses – vue globale

Les infections des voies respiratoires basses de l'enfant sont une problématique importante de santé publique mondiale. L'OMS émet des rapports réguliers sur l'état des lieux de ces infections et leur impact sur la santé humaine (World Health Organization 2019). Il apparaît que ces infections ont été en 2019 responsable de plus d'un million de morts d'enfants de moins de cinq ans dans le monde, ce qui représente 15% de la mortalité de cette tranche d'âge et en fait la première cause de décès, devant la tuberculose, le sida et le paludisme réunis. La majorité de ces décès ont lieu dans les pays en voie de développement. Dans les pays dits « riches », au contraire, les pneumopathies de l'enfant, moins mortelles, posent surtout un problème de charge pour le système de soins, notamment hospitalier (Dowell et al. 2000b; Kochanek et al. 2014). Cette dualité entre pays dits « riches » et pays en voie de développement est bien marquée sur l'ensemble des pathologies infectieuses dont peuvent souffrir les enfants dans le monde.

La réduction importante du nombre de morts dans les pays riches est bien sûr due à l'amélioration du niveau de vie des habitants et d'un système de santé moderne et performant. Cependant, la prévention vaccinale semble être en réalité le paramètre le plus protecteur au niveau d'une population (Griffin et al. 2013; Grijalva et al. 2007), en particulier grâce à l'immunisation contre le pneumocoque et l'*Haemophilus influenzae B*.

Les pneumonies ne tuent pratiquement plus dans les pays développés, mais elles impactent malgré tout le système de santé à travers une part importante des consultations et des hospitalisations (Kronman et al. 2011; Lee et al. 2010). Ainsi, les pneumonies sont devenues la première cause d'hospitalisations chez l'enfant dans ces pays (Yu, Wier, and Elixhauser 2006; Lee et al. 2010; Pfuntnner 2011b).

Le coût financier supporté par le système de santé est important. A titre d'exemple, il a pu se monter à près d'un milliard de dollars US en 2010 (Pfuntnner 2011a). Une méta-analyse assez exhaustive et détaillée (Zhang et al. 2016) estime le cout moyen d'une pneumonie à 100 à 300 \$US, mais cela peut augmenter au-delà de 15 000 \$US pour les cas les plus sévères.

1.1 Recommandations de prise en charge et pratiques actuelles

A ce jour, les recommandations internationales de l'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) (Bradley, Byington, Shah, Alverson, Carter, Harrison, Kaplan, Mace, McCracken, Moore, St Peter, Stockwell, and Swanson 2011) commencent à dater un peu, mais sont assez claires sur l'essentiel de la prise en charge.

La notion d'épargne antibiotique est mentionnée, et il y est bien spécifié que la majorité des pneumonies sont virales et que l'antibiothérapie est alors inutile. Mais le point suivant précise que l'amoxicilline doit être utilisée dans toute pneumonie suspecte d'être bactérienne, y compris de symptomatologie légère à modérée. Aucune précision n'est faite sur les moyens utilisables pour différencier pneumonie virale et bactérienne. La conséquence logique de la tournure ambiguë de cette recommandation est de traiter toute pneumonie par amoxicilline d'emblée (hormis les cas grave qui nécessitent une approche plus agressive).

Des recommandations nationales existent, qui s'écartent parfois des recommandations internationales : anglaises (Harris et al. 2011), allemande (Rose et al. 2020) ou françaises (Cohen et al. 2017). Bien que divergentes dans la formulation, toutes se retrouvent contraintes à louvoyer en constatant que la majorité des infections sont virales et n'ont pas besoin d'antibiotiques, mais en affirmant finalement qu'une antibiothérapie est nécessaire dans la majorité des cas. A noter l'exception française qui recommande une antibiothérapie d'emblée dans toutes les pneumonies, mais qu'il faut l'éviter dans les bronchites et bronchiolites. Il s'agit d'un retour en arrière par rapport au message de l'IDSA émis quelques temps plus tôt.

L'analyse des pratiques réelles montre que la réalité est probablement pire encore que les recommandations du point de vue de l'épargne antibiotique. Une étude française rapporte ainsi que le taux de non-prescription d'antibiotiques dans les pneumopathies de l'enfant est passé de 8,6% à 1,8% (Launay et al. 2016). Plus important, cette étude montre que les erreurs principales sont en fait de antibiothérapies trop larges voire multiples. Des données analogues sont relevées également dans d'autres analyses (Tannous, Haddad, and Torbey 2020; da Fonseca Lima et al. 2016; Di Pietro et al. 2017).

Il y a d'autres recommandations supranationales. On peut citer les recommandations de la société savante de médecine polyvalente aux USA (Stuckey-Schrock, Hayes, and George 2012) de 2012, qui s'aligne sur la nécessité de prescrire l'amoxicilline d'emblée dans tous les cas. Plus globalement, il y a les recommandations de l'OMS (World Health Organization 2014) qui ne s'appliquent qu'aux pays en développement mais donnent des pistes de réflexion et recommandent l'antibiothérapie d'emblée.

Des réflexions d'experts du sujet, indépendants des sociétés savantes nationales (Principi and Esposito 2011; Clark et al. 2007) vont également dans le même sens.

1.2 Les enjeux

Diagnostiquer correctement l'étiologie d'une infection respiratoire permet de concentrer les thérapeutiques sur le germe pathogène responsable de l'infection. Comme on l'a vu, les recommandations actuelles sont d'instaurer une antibiothérapie probabiliste secondairement adaptée à l'antibiogramme. On cible le germe le plus probable et/ou le plus grave et on propose une couverture appropriée avec l'agent anti-infectieux correspondant le temps que les prélèvements microbiologiques soient analysés.

On voit bien dans ce raisonnement combien le délai de rendu du résultat de l'analyse microbiologique est central. C'est à cause de ce délai que la notion même d'antibiothérapie *probabiliste* a émergé.

Une antibiothérapie probabiliste conduit à mettre en place à dose thérapeutique un traitement potentiellement inutile pendant une durée plus ou moins longue. Bien que logique dans une démarche visant à minimiser le risque d'infections graves, cela entraîne potentiellement des conséquences sur la santé de l'enfant, mais également de la population.

Dans une revue générale de 2016 (Principi and Esposito 2016), les auteurs examinent les conséquences des antibiothérapies inappropriées chez l'enfant.

On note tout d'abord que les principales situations de prescription d'antibiothérapie inappropriée recouvrent essentiellement deux cas : la prescription d'un antibiotique probabiliste pour une infection virale, tout d'abord – qui est le cas qui nous intéresse ici et la prescription d'un antibiotique large spectre pour un pathogène qui aurait pu être traité avec une thérapeutique de spectre plus étroit (McCaig, Besser, and Hughes 2003).

Les conséquences de cette stratégie sont multiples. On retrouve une augmentation des coûts et des effets indésirables, bien sûr, conduisant entre autres à un allongement global des hospitalisations (Cosgrove 2006) et même de la mortalité (Maragakis, Perencevich, and Cosgrove 2008). Ce phénomène est à mettre en relation avec une augmentation probable de l'antibiorésistance par exposition répétée de pathogènes non contaminants, comme *E. Coli* mais aussi *C. difficile*, particulièrement problématique (Kocielek et al. 2016).

On retrouve également des impacts populationnels non infectieux plus larges, avec par exemple un risque accru d'obésité (Tagliabue et al. 2016) secondaire probablement à un dérèglement du microbiote (Vangay et al. 2015), éléments constitutifs de l'immunologie globale fondamentale de l'enfant – et en pleine période de constitution de l'équilibre de cet écosystème.

Il est possible que cet impact aille même plus loin et que l'exposition à des antibiotiques de manière répétée avec les modifications du microbiome que cela entraîne (Jernberg et al. 2010) soit au moins pour partie responsable de l'épidémie de diabète de type 1 et autres maladies immunologiques que la population pédiatrique de cette génération est en train de vivre (Aw and Fukuda 2018). Des études épidémiologiques prospectives sont en cours sur ce point (Rewers et al. 2018).

Cette problématique de « l'antibiothérapie inutile », que l'on devrait plutôt qualifier d'ailleurs d'antibiothérapie « évitable » est majeure dans l'organisation de nos prises en charge pédiatriques. Faire en sorte de pouvoir la réduire au maximum implique d'une part de mettre en œuvre des protocoles de gestion des antibiotiques (« Antibiotic Stewardship ») pour laquelle la littérature est assez abondante, mais qui sont structurellement limités ; et d'autre part de pouvoir améliorer le diagnostic afin de réduire, voire de faire disparaître, la notion d'antibiothérapie probabiliste en raccourcissant le délai de rendu des résultats et du diagnostic étiologique.

2 Les méthodes de diagnostic étiologiques

2.1 Les méthodes diagnostiques classiques

2.1.1 *Diagnostic non microbiologique*

La première étape est le diagnostic clinique de la pneumonie. Sans s'étendre sur le sujet ici, on note que des divergences existent à ce propos dans la littérature. Entre la réalité des pays riches, où les enfants sont vaccinés et la majorité des formes sollicitant le système de santé sont paucisymptomatique ; et les formes sévères des pays en développement où le recours au médecin est bien plus tardif, avec des enfants non vaccinés et où les examens complémentaires disponibles moins nombreux voire inexistants, les approches diagnostiques varient. Pour l'OMS, des paramètres cliniques seuls suffisent (notamment la polypnée fébrile). Cela est cohérent dans la mesure où la probabilité pré test de la maladie est importante dans ces situations. Pour les pays riches en revanche, des batteries d'examens complémentaires sont réalisés ou recommandés. Cependant, le diagnostic de la pneumonie ne peut reposer que sur un faisceau d'arguments (Shah et al. 2017; Schot et al. 2018; Van den Bruel et al. 2010), aucun signe ou examen complémentaire ne pouvant se suffire à lui seul dans cette situation.

On peut ainsi citer la place de la radiographie du thorax, indispensable dans les premières recommandations, mais plus discutées aujourd'hui (Cao et al. 2013), bien que l'intelligence artificielle commence à arriver à des capacités diagnostiques intéressantes (Nahid et al. 2020). L'enregistrement

des bruits thoraciques, avec ou sans intelligence artificielle, est également disponible (McCollum et al. 2020) et constitue une piste prometteuse.

La place des biomarqueurs est discutée (Principi and Esposito 2017), l'avenir étant probablement soit aux panels de marqueurs combinés (Sruogo et al. 2017), soit à l'analyse de protéome (van Houten et al. 2017).

2.1.2 Diagnostic bactériologique

Un des premières méthodes qui a été proposée pour améliorer le diagnostic étiologique des pneumopathies était l'hémoculture. Cependant, c'est un examen très rarement positif et surtout avec un nombre de contaminations élevé. (Youssef et al. 2020). En pratique, cela n'est pas un examen qui est utile au diagnostic positif, d'autant plus que le délai avant rendu des résultats est long. Certains auteurs ont proposé d'utiliser l'intelligence artificielle pour prédire la probabilité de positivité des hémocultures dans le diagnostic (Tsai et al. 2020). L'utilité des hémocultures est cependant ailleurs ; lors d'une infection bactérienne elle permet d'isoler le germe et de disposer d'une culture puis d'un antibiogramme – encore qu'avec les nouvelles techniques de détection de génome et donc de gènes de résistance, cette nécessité devienne moins importante qu'autrefois.

Les cultures de sécrétions respiratoires sont recommandées chez l'adulte (Mandell et al. 2007). Cependant, les analyses pédiatriques montrent une très forte contamination des prélèvements ne permettant pas de conclure. C'est notamment toute la problématique du portage des pneumocoques. En pédiatrie, l'usage de cette analyse ne peut que difficilement être recommandé, à moins que ces prélèvements ne soient réalisés dans le poumon profond à l'aide d'une fibroscopie – procédure invasive nécessitant une anesthésie générale inapplicable en pratique courante sur une large population.

La recherche d'antigène solubles urinaire, marqueur théorique de la présence sanguine de la bactérie et donc d'infection, semble plus intéressante. Elle est très fréquemment positive, le portage pouvant réactiver le passage dans le sang circulant d'antigènes du pneumocoque, qui vont se retrouver dans les urines. En outre, cette excrétion est prolongée. Un échantillon positif n'a donc aucune interprétation possible : portage sain, contamination ancienne, ou infection aigüe ... En revanche, un résultat négatif signe l'absence de toutes ces situations. L'infection à pneumocoque pourrait donc être considérée comme exclue dans les cas de négativité de l'antigène urinaire pneumococcique (dans les limites de la performance du test, de la dilution des urines et du temps de pré-analytique) (Neuman and Harper 2003). La recherche classiquement disponible au laboratoire de l'antigénurie de la légionnelle n'a que peu d'intérêt en pédiatrie. Ce germe n'étant rencontré que de façon exceptionnelle.

2.1.3 Diagnostic moléculaire

Brièvement, le principe de la PCR repose sur l'amplification de quantités infimes de génomes d'une espèce microbiologique présente dans un échantillon, jusqu'à rendre sa concentration détectable par une technique automatisée le plus souvent basée sur la détection de signaux fluorescents par un laser.

Cette technique très sensible a de nombreux avantages : capacité à détecter des petites quantités de matériel génétique, efficacité, fiabilité ... Le recul sur ces techniques est grand et la technologie est tout à fait mature et bien maîtrisée par les industriels. Les coûts baissent graduellement ces dernières années. A ce jour, entre les différentes techniques existantes, c'est la PCR qui fait figure de « gold standard » pour les études comparatives, et l'on juge ainsi des performances d'un test par rapport à cette dernière.

La PCR n'est cependant pas exempte de défauts. Tout d'abord, elle signe la présence de matériel génétique, pas la présence d'un pathogène vivant, ce qui peut faire une grande différence dans de nombreuses situations. Elle peut être considérée comme trop sensible dans certains cas, et rendre des résultats faussement positifs suite à des contaminations. Elle est encore relativement onéreuse et réservée à des laboratoires de haut niveau. Finalement, sa limite principale est qu'elle ne fait pas la différence entre une contamination et une infection. – elle ne fait que signer la présence du pathogène sans imputer sa responsabilité dans l'infection, même si des approches semi-quantitatives pourraient permettre de relativiser cette critique.

Cette limite est particulièrement problématique dans les infections respiratoires, notamment basses. En effet, les prélèvements analysés sont fréquemment issus de la sphère ORL alors que l'infection est localisée dans les voies respiratoires basses. Cette difficulté est relativisée par le fait que la flore identifiée dans les voies respiratoires supérieures est fréquemment le reflet de celle des voies inférieures. Ainsi, la détection d'un RSV dans les voies supérieures signe sa présence dans les voies inférieures, la physiopathologie de l'infection étant descendante. C'est beaucoup moins vrai pour le pneumocoque, qui peut se comporter en commensal des voies aériennes supérieures.

Enfin, notons que le délai de rendu d'un test PCR varie selon les techniques. Il peut descendre jusqu'à une heure au minimum (hors temps pré-analytique et de transfert du prélèvement en centre spécialisé), mais se situe plus habituellement autour de quelques heures (6-8h). Beaucoup de laboratoires disposent par ailleurs de machines réalisant plusieurs tests en une analyse, contraignant les laboratoires à attendre d'avoir un nombre suffisant d'échantillons pour faire le test, ce qui allonge les délais de rendus. Ainsi certains tests ne sont faits, selon les centres et les techniques, qu'une fois par jour, ou une fois par semaine. Ces délais peuvent rapidement devenir incompatibles avec une prise en charge en urgence.

2.1.4 Tests antigéniques

Le principe d'un test antigénique est de détecter dans un prélèvement une protéine particulière par une méthode immunologique, et de le mettre en évidence par une réaction de type ELISA ou par agglutination. Dans les tests immunochromatographiques, par exemple, une barre s'affiche sur une bandelette si la réaction a lieu, signant la présence dans l'échantillon de l'antigène recherché. Les propriétés des tests antigéniques s'inscrivent un peu en miroir de celle des tests PCR. Ils ne sont pas très sensibles, peu chers et rapides à effectuer.

Sur le plan de la sensibilité, il convient de préciser que la performance du test dépend directement de la concentration en antigène du prélèvement analysé qui est elle-même dépendante de la maladie et de la population cible. En population générale adulte, dans le cas d'une angine streptococcique, la concentration en antigène est telle que les performances du test sont satisfaisantes (de l'ordre de 90%), ce qui a permis sa mise en place large dans les angines streptococciques. Pour une infection grippale de l'adulte, en revanche, la performance semble décroître avec l'âge, ce qui s'explique par la diminution de la concentration de particules virales dans les sécrétions respiratoires pour de multiples raisons (prélèvement parfois de mauvaise qualité, existence d'une immunité antérieure, immunosénescence ...)

En pédiatrie, en revanche, on trouve le plus souvent des situations de primo-infections avec des charges virales élevées, de plus les prélèvements sont souvent standardisés. On obtient de bien meilleures performances pour ces tests antigéniques, ce qui permet leur utilisation en routine.

Leur principal avantage tient à l'aspect pratique. Ils ne demandent pas de conservation complexe, ont un entretien réduit, et sont techniquement facile à réaliser. Ils sont en outre peu onéreux et la réponse au test survient dans un temps très bref, en général d'une dizaine de minutes, ce qui permet leur usage *pendant* une consultation.

Une partie de ce travail de thèse s'attelle à préciser leurs avantages et les limites de leur utilisation en situation d'urgence.

2.2 Controverses actuelles : POCT et Multiplexing

L'évolution technique qu'a permis la PCR et l'explosion de son implication dans les soins grâce notamment à la réduction de délai de rendu des résultats a conduit à de plus vastes intégrations de la microbiologie dès la prise en charge immédiate du patient. Cela a permis de rendre réel des évolutions jusqu'alors inimaginables.

Ainsi, on a vu un double mouvement s'opérer en parallèle. Des tests plus simples, avec de moins en moins de pré-analytique et de nécessité de compétences techniques ont pu commencer à être intégrés

directement dans les services, au lit du malade. En parallèle, il est devenu possible techniquement grâce à des jeux d'amorces et de la miniaturisation de rendre les PCR multiplexables, c'est-à-dire opérant la recherche de plusieurs pathogènes en même temps dans le même échantillon. Ces deux possibilités bouleversent la réalisation des tests diagnostiques, permettant un temps de diagnostic très raccourci avec une simplicité apparente d'analyse très améliorée, au prix d'un coût de réactifs plus élevé. Mais leur impact sur la prise en charge des patients est encore largement débattu.

2.2.1 POCT

Avec le raccourcissement du temps de technique pure, la phase d'envoi de l'échantillon, de son traitement informatique avant analyse et du retour du résultat au clinicien par le biologiste est devenue de loin la plus longue. Les tests POC (Point-Of-Care) ou POCT, réalisés au lit du malade rendent possible une accélération considérable des diagnostics, jusqu'à les mettre au niveau de délai de la consultation, ce qui change de manière radicale la façon de raisonner du clinicien.

Les tests antigéniques ont été les premiers à intégrer les services de soins en tant que POCT, mais on voit ces dernières années de plus en plus de test moléculaires se délocaliser pour rejoindre les services de soins, et notamment d'urgence.

2.2.2 Multiplexing

Il est maintenant bien documenté que les PCR dites « multiplex », c'est-à-dire testant plusieurs pathogènes en même temps sur un même échantillon sont aussi sensibles et spécifiques que les autres types de PCR, si ce n'est plus (Huang et al. 2018). Les sensibilités et spécificités des différents appareils dépassent le plus souvent 95% et toujours 90% en conditions idéales d'utilisation.

Ces très hautes performances sur des plateformes technologiques qui recherchent automatiquement plus de pathogènes que ceux qu'on suspecte ont rapidement fait débat : que faire d'une positivité sur un virus ou une bactérie qui n'était pas la cible principale recherchée par le clinicien (Beckmann and Hirsch 2016) ? Comment interpréter la présence d'un RSV chez un enfant ne présentant pas de symptômes de bronchiolite mais de rhume (Gill et al. 2017; Jansen et al. 2011) ? Comment interpréter les co-infections ?

On rejoint ici la problématique de probabilité pré-test. La positivité d'un test ne vient que renforcer une impression clinique et il ne faut pas tenir compte d'un test en rapport avec une probabilité initiale trop faible. Mais alors, pourquoi faire des PCR multiplex dans ces conditions ? Qu'apporte la détection de cas non attendus et/ou peu crédibles, comme la détection d'un RSV en plein été ou une grippe hors épidémie ?

En réalité, il y a plusieurs réponses à cela. Hors le travail présenté dans cette thèse sur l'impact sur la prise en charge, on peut souligner les points suivants : Les positifs non attendus ne sont en général pas des faux positifs. Les techniques sont tellement performantes que la découverte de génome viral signe la présence du pathogène dans les muqueuses de l'enfant. En fait, c'est plus la signification de sa présence qui est questionnable. On peut détecter du génome viral hors infection. On peut le trouver dans des situations de portages asymptomatiques, bien sûr, mais également au cours de périodes d'incubation plus ou moins longues (Lessler et al. 2009), donc avant la maladie, comme en phase de récupération au décours de la maladie (Ip et al. 2017). La technique de multiplexing n'est pas en cause dans notre difficulté à conclure sur la maladie. C'est en réalité le manque de moyens techniques pouvant nous permettre de différencier portage et infection qui pose problème. Il va falloir s'appliquer à trouver les solutions pour répondre à cette question. La solution n'est pas de faire moins de PCR multiplex mais d'en faire plus pour mieux comprendre la réalité et comment avancer dans nos méthodes de diagnostic. A ce titre, le multiplexing est d'une grande utilité pour la recherche, autant fondamentale que pratique.

Il y a la même problématique avec les « coinfections », ou plutôt les détections multiples. Là encore, ce ne sont pas en général de fausses détections. Le génome du virus est réellement présent dans le prélèvement, mais c'est la signification de sa présence qui questionne. S'agit-il d'une co-infection ? D'une infection d'un virus facilité par un autre ? Y a-t'il en fait une interaction ? S'agit-il d'une fin d'infection, d'un portage prolongé ? Et encore une fois, cette constatation enrichie notre connaissance de la réalité et de la complexité de ces infections.

Avec l'amélioration des outils technologiques, on sort du modèle simplifié « un agent pathogène n'est présent que lors d'une infection, cause l'infection et, si le malade guérit, disparaît ». C'est à dire qu'on sort du concept pasteurien de la maladie infectieuse : un germe = une pathologie. Les mécanismes en jeu dans les déterminants d'une infection sont des intrications complexes entre plusieurs pathogènes et l'immunité dans des boucles de rétroactions multiples qui concourent à l'expression d'une maladie telle qu'on la définit en clinique. La question du diagnostic devient ainsi aujourd'hui celle de la définition d'une infection.

B. Diagnostic étiologique des infections respiratoires

1 Tests biologiques, aspects statistiques

Il convient de commencer cette section par un constat. Bien que réalisé quotidiennement et de manière extrêmement large par les praticiens, un test diagnostique voit son résultat très fréquemment mal interprété et mal utilisé (Riegelman 2005). L'habitude d'interpréter une variable continue (CRP) comme une variable catégorielle (positive ou négative) est un premier problème. La difficulté pour comprendre la différence non intuitive entre la précision d'un test (sensibilité/spécificité) et sa valeur prédictive en est un autre.

1.1 Qu'est-ce que la normalité d'un test ?

Lorsque l'on analyse une large population qui ne présente pas de signes de maladie pour définir la « norme » d'une variable biologique, on trouve une quantité de valeurs qui ne sont pas toutes égales.

A titre pédagogique, illustratif et fictif, imaginons l'exemple d'un nouveau marqueur d'infection bactérienne qui a été découvert par l'entreprise Tau : le « Zéta ». Des chercheurs soupçonnent sur la base d'une étude de cohorte que le taux de Zéta augmente en cas d'infection bactérienne systémique. Il est donc décidé de fixer la valeur de référence ; de « normalité » de ce marqueur, afin de déterminer à partir de quelle borne on décide que le marqueur permet de diagnostiquer l'infection bactérienne.

Ces valeurs se répartissent autour d'une valeur « moyenne » de façon symétrique, avec des paramètres particuliers : plus on s'éloigne de la valeur centrale, plus la probabilité de trouver une valeur dans la population de référence diminue. En biologie, cette répartition suit une distribution caractéristique. On définit comme une « déviation standard » la distance qu'il faut parcourir depuis la valeur centrale pour que 68.3% des valeurs soient contenues de part et d'autre de cette valeur centrale. A deux déviations standard, on retrouve 95,4% des valeurs. A trois SD (*standard deviation*), on retrouve 99.7% des valeurs. Ce modèle de répartition des valeurs s'appelle la loi normale, dont l'itération la plus célèbre est la courbe de Gauss bien connue et décrite ici.

Le taux de Zeta dans la population a été testé sur 2150 patients sains. Il semble être en moyenne autour de 100 UI/mL. On définira donc la norme de Zeta à 100 UI/mL. Les deux tiers des valeurs analysés se répartissent entre 70 et 130 UI/mL. Les logiciels décrètent donc que la déviation standard de Zéta est de 30. On définit habituellement la normalité comme 3 fois la déviation standard, soit 10 à 190 UI/mL. Une valeur supérieure à 200, pour arrondir, signerait donc une pathologie. On peut noter à ce stade

qu'un patient sain avait une valeur de 205 UI/mL, ce qui correspond à 3,5 SD. Mais 3,5 SD peut survenir, par définition de la loi normale, une fois sur 2149, donc rien de surprenant.

On remarque que cette répartition « normale » des données est une caractéristique des systèmes biologiques, des mathématiques du vivant. Il y a une explication à cela, qui s'appelle le théorème central limite. Celui-ci décrit que la somme de variables aléatoires uniformes tend toujours, lorsqu'on augmente le nombre de variables, vers une loi normale, plus précisément gaussienne.

Or c'est exactement ce qu'il se passe en biologie du vivant. La survenue d'un événement n'est pas réductible à un phénomène simpliste mais est l'intrication d'un nombre extrêmement élevé de petites variabilités individuelles « quiprobables qui en s'ajoutant tendent vers une répartition gaussienne. Au niveau microscopique, on peut imaginer énormément de ces petits facteurs individuels, non mesurables en tant que tel : âge des polynucléaires, poids de la rate, vascularisation du tissu médullaire différente pendant l'activité sportive, etc ... influent peut-être sur la production de CRP et expliquent la variabilité du taux de sécrétion entre les différents malades infectés par exemple ... Nous ne regardons la somme de tous ces « petits » phénomènes qu'en macroscopie pour en tirer des conclusions globales : la CRP monte.

Le taux de Zeta est un succès fulgurant dans le monde de la biologie médicale. Des laboratoires se ruent sur les brevets, les visiteurs médicaux offrent des kits de dépistage, on finance les études pour mettre au point des analyses Point-Of-Care ... Ce marqueur simple a tout pour être performant : au-delà de 200, on est infecté, c'est sûr ! Le message est simple pour les cliniciens !

Mais certains commencent à douter. Des messages s'échangent sur les réseaux sociaux : « Ouais, il avait 230 mais il allait bien, j'ai pas osé ne pas traiter ... J'ai mis les antibiotiques oui ... et maintenant il est porteur de résistance. Si j'avais pas eu cette analyse ... La protéine Zéta, c'est pourri ! »

La problématique ici est que la probabilité d'une valeur chez un individu sain n'atteint jamais zéro, sauf quand le nombre de sujets testés tend vers l'infini. Dans une population suffisamment vaste, il y aura toujours des patients normaux avec des valeurs anormales, la quantité dépendant de la taille de la population.

Dans l'absolu, imaginons que l'on dose le Zeta à l'ensemble de l'humanité, soit 6 milliards d'humains. Statistiquement parlant, un humain parfaitement sain sur l'ensemble aura un dosage de 290 UI/mL, sans être infecté. Et un sur 0,5 milliard aura un dosage de 280 sans être infecté. En vérité, la loi exponentielle qui sous-tend ce calcul est contre-intuitive (notre intuition est linéaire). Sur un ensemble théorique de 6 milliards d'humains suspect d'infections, 380 000 personnes ont plus de 230 de taux de Zeta sans présenter aucune infection ...

Les paramètres de la protéine n'ont pas changé, simplement il s'agit d'une variable continue avec une répartition normale, et non pas d'une variable catégorielle oui/non. Il faut être capable d'en tenir compte en médecine en intégrant la valeur biologique dans la globalité du raisonnement médical, par essence probabiliste.

En vérité, cet exemple sur la biologie de l'inflammation s'applique également en microbiologie. Réfléchissons à cette question : quelle est la probabilité de trouver du génome d'un virus donné dans le nez d'un enfant non infecté par ce virus ? En vérité elle n'est pas de 0 : il s'agit d'une probabilité continue centrée sur 0 avec une déviation standard très mince, mais cela peut arriver même sans erreur technique (portage ...) : la positivité d'un test ne signe pas forcément l'infection ... Et si on rajoute le risque d'erreur technique (faux positif) à ce calcul probabiliste ...

1.2 Précision

La précision d'un test est sa capacité à décrire la réalité du statut de malade ou non malade du patient en fonction de son résultat.

On définit donc les Vrais et Faux Positifs, et les Vrais et Faux Négatifs.

On peut parler de la précision globale du test en comptabilisant les « bien identifiés », soit la somme (vrais positifs + vrais négatifs) / total des tests réalisés. On obtient XX% de précision.

Cela recoupe toutefois des réalités différentes selon le sens dans lequel le test se trompe. On parle ainsi de sensibilité et de spécificité en médecine.

La sensibilité est la proportion de vrais positifs sur l'ensemble des malades. On calcule $VP / (VP + FN)$. On parle parfois de Fraction de Vrai Positifs (FVP). C'est directement la probabilité que le test soit positif si le patient est malade (et non pas l'inverse).

La spécificité est la proportion de vrais négatifs sur l'ensemble des non-malades. On calcule $VN / (VN + FP)$. On parle parfois de Fraction de Vrai Négatifs (FVN). C'est directement la probabilité que le test soit négatif si le patient n'est pas malade (et non pas l'inverse ...)

Idéalement, on aimerait un test parfait qui dispose de 100% de spécificité et de 100% de sensibilité. Aucun test ne peut cependant atteindre ces caractéristiques. Il y a une relation inverse entre sensibilité et spécificité. Quand on améliore la sensibilité d'un test, sa spécificité diminue. C'est logique : pour avoir vraiment tous les vrais positifs, on rend le test très « sensible » (au sens courant du terme) et celui-ci se positive « pour un rien », ce qui fait très facilement des faux négatifs...

Sensibilité et spécificité se calculent avec une table à double entrée, donc une variable binaire oui/non, positive/négative. Quand le test rend une valeur continue (*le Zeta ...*) on se retrouve avec une

sensibilité et une spécificité pour chaque valeur que peut prendre le marqueur. On peut les représenter graphiquement ensemble, c'est une courbe ROC, et identifier la valeur pour laquelle le couple sensibilité/spécificité est le plus intéressant.

Si la maladie est rare et impactante si elle est manquée (les faux négatifs ont alors un coût important pour la santé du patient et on veut à tout prix les éviter) on veut des tests très sensibles et il y aura beaucoup de faux positifs. Inversement, si la positivité du test va conduire à des gestes invasifs délabrants par exemple, et qu'on veut donc éviter à tout prix les faux positifs, on privilégiera les tests spécifiques – et cela se fera au détriment des faux négatifs qui vont augmenter.

Sensibilité et spécificité sont intéressants en recherche car ils permettent de comparer les tests entre eux. Cependant, ils sont de faible utilité en pratique clinique, car c'est une autre question que l'on se pose : *quelle est la probabilité que mon patient soit malade si le test est positif ?* (La démarche clinique se faisant dans ce sens ...)

1.3 Rapport de vraisemblance

Ce sont les rapports de vraisemblance qui répondent à cette question. Ils se calculent à partir de la sensibilité et de la spécificité ($RV+ = \text{Sensibilité} / (1 - \text{Spécificité})$). Ils correspondent à « l'augmentation de risque » que donne un résultat positif (ou la diminution du risque que donne un résultat négatif dans le RV-).

Ce sont ces paramètres que les cliniciens utilisent instinctivement, mais le plus souvent en confondant ces RV+ et RV- avec la sensibilité/spécificité ou pire en ignorant le sens. On voit ce problème avec les valeurs prédictives.

1.4 Valeur prédictive

Il s'agit de la probabilité qu'un patient soit malade ou non (respectivement VPP et VPN) si le test est positif.

Cette valeur prédictive a toutefois un défaut majeur : elle dépend de la prévalence de la maladie dans la population étudiée. La probabilité peut ainsi être modifiée en profondeur et il est obligatoire d'avoir une estimation de l'épidémiologie dans la population étudiée avant de calculer la VPP ...et de s'en servir en pratique !

Imaginons une maladie présente dans 1% de la population et un test avec une sensibilité de 95% et une spécificité de 90%. On peut calculer que la VPP est de 8.8% dans ce cas. Avec une prévalence de 10%, on peut calculer la VPP à 51,4%, et avec une prévalence de 50%, la VPP passe à 90,5% ! L'écart est plus que significatif (Seltzer and Shapiro 1996).

Cet exemple a un sens majeur en diagnostic microbiologique : la prévalence de la maladie dans la population varie au fur et à mesure des épidémies, ce qui conduit à des tests performants en milieu d'épidémie qui peuvent ne pas l'être au début ou à sa fin. De même, l'interprétation de la positivité d'un test en période de faible circulation virale nécessite une réflexion importante.

Parfois, un clinicien lance un test « pour confirmer » qu'un patient qui va bien n'a pas la maladie. Cela peut le mettre en grande difficulté en cas de positivité, le contraignant à ignorer le résultat, à lancer d'autres tests ou à traiter une maladie à laquelle il ne croyait pourtant pas ...

1.5 Théorème de Bayes et l'erreur en diagnostic médical

La statistique bayésienne (ou probabiliste) consiste à calculer la probabilité d'un événement « sachant que » il y a présence ou non d'un autre événement dans la population concernée. On ne fait plus des tests d'hypothèses que l'on confirme ou infirme en fonction des données mais on crée d'emblée un modèle de logique qui s'incrémente avec des observations et donne plus ou moins de poids aux divers paramètres en fonction des données auquel il se confronte (Westbury 2010).

Schématiquement, on définit une probabilité et on la modifie au gré des nouvelles données qui nous parviennent. C'est de cette façon que la majorité des cliniciens tentent de raisonner en pratique. Ce raisonnement est faussé par la conception erronée qu'ont les cliniciens de la justesse d'un test.

Un test diagnostique ne donne en réalité qu'une modification de la probabilité d'une maladie, au même titre que les autres paramètres cliniques, biologiques, anamnestiques, etc ... L'erreur est de considérer que le poids d'un test écrase toutes les autres probabilités, faute de pouvoir les évaluer numériquement.

Reprenons l'exemple du test lancé « pour confirmer » que le patient n'a pas la maladie.

Imaginons pour l'exemple que nous ayons des chiffres (en vérité le clinicien n'a que des « ressentis », des ordres de grandeurs). Le patient vient car il craint d'être malade. Sa probabilité initiale est de 10% sur une base épidémiologique. Le patient n'a pas de fièvre, cela divise sa probabilité d'être malade par deux. 5%. Puis, sa biologie est normale, cela divise encore par deux la probabilité, qui passe à 2,5%. Son scanner est normal, on divise par 10. On passe à 0,25% de probabilité ... Il serait sage de s'arrêter là. Mais le test diagnostique que veut le clinicien est extrêmement puissant : il multiplie par 20 la probabilité si positif... Le test est fait « pour se rassurer » et il revient positif. La probabilité ne passe en réalité qu'à 5%, mais le test est si « performant » dans les études que le clinicien se voit contraint de douter.

La statistique bayésienne fait exactement cela, avec des données chiffrées là où le clinicien ne dispose que de son expérience d'évaluation des risques.

Elle a été mise en place pour gérer deux types de situations : le « big data » et la pauvreté des données sources. En réalité, ce sont exactement les deux situations qui sont rencontrées en médecine ...

Cet exemple illustre la nécessité d'avoir une véritable réflexion autour des tests diagnostiques et de toute la démarche clinique diagnostique qui est d'une importance majeure dans la prise en charge, en particulier aux urgences, où l'évaluation probabiliste est la règle.

2 Evolution historique des techniques de détection des infections respiratoires

2.1 Détection bactériologique

2.1.1 *Première révolution : la culture*

Sans rentrer dans le détail de l'ensemble de l'histoire de la microbiologie, on peut faire remonter à Robert Koch en 1876 l'établissement du postulat qui portera son nom et qui a permis d'attribuer la causalité de la découverte d'un micro-organisme dans un prélèvement d'un patient malade du fait de cet agent pathogène.

Le postulat de Koch, en quatre points, précise :

- 1) Le micro-organisme doit être présent dans chaque cas de la maladie, mais absent chez le patient sain.
- 2) Le micro-organisme suspecté doit être isolé et pousser en culture lors de l'analyse de la lésion pure.
- 3) Le micro-organisme isolé, en culture pure, doit causer la même maladie s'il est inoculé à un animal sain.
- 4) Le même micro-organisme doit être retrouvé lorsqu'on analyse une lésion de l'animal expérimental.

Ces postulats ont été extrêmement précieux pour la constitution de la microbiologie diagnostique à ses débuts, même s'ils sont dépassés aujourd'hui (notion de portage, phases de l'infection, part de la réaction de l'hôte dans la maladie, etc.)

Koch a également été responsable de plusieurs avancées majeures dans la microbiologie. Il a popularisé le milieu d'Agar, identifié des milieux de monocultures spécifiques, inventé la hotte d'aspiration, des stériliseurs, une méthode d'évaluation de l'efficacité de l'antisepsie ...

Il est intéressant de noter que la majorité des découvertes de bactéries datent de cette époque, et que les grands scientifiques ont donné leur nom à ces pathogènes, tous à la même période de 1875 à 1890

(Nesser, Yersin, etc ...). C'est également à cette époque que Julius Petri – un assistant de Robert Koch – inventa la boîte qui porte son nom.

Suite à cet emballement, et durant une centaine d'année, la microbiologie diagnostique était essentiellement une affaire de culture. Optimisation des milieux, plus ou moins spécifiques, tests diagnostiques enzymatiques, chimiques, immuno-chimiques, etc ... mais aussi tests de résistances aux antibiotiques avec les antibiogrammes, indispensables ... Mais une autre révolution est maintenant en train de se vivre.

2.1.2 Deuxième révolution : Les tests moléculaires et la spectrométrie de masse

De nouvelles technologies permettent aujourd'hui de connaître plus rapidement, avec davantage de détail et de fiabilité les agents pathogènes en cause dans les infections. La biologie moléculaire a pris bien sûr une place prépondérante, en particulier dans les bactéries intracellulaires ou de cultures difficiles (tuberculose, germes atypiques respiratoires, etc.). La protéomique (spectrométrie de masse) a relégué au second plan les galeries biochimiques d'identification, mais deux autres méthodes ont particulièrement impacté le diagnostic : le MALDI-TOF et la séquençage haut débit.

Historiquement utilisé pour la chimie, le MALDI-TOF repose sur la spectrométrie de masse. L'amélioration technologique (ajout d'une matrice d'ionisation et d'un analyseur de temp de vol : TOF) a fini par rendre utilisable ce procédé en microbiologie, ce qui a justifié le prix Nobel en 2002 (Karas et al. 1987; Tanaka et al. 1988). Brièvement, les différentes molécules qui composent la bactérie sont analysées, séparées et identifiées puis comparées à une base de données décrivant la « signature » en spectrométrie des différentes espèces. Cela permet d'identifier le pathogène avec une assez grande précision. Pour le clinicien, le bénéfice est en moyenne de 36h de précocité du diagnostic par rapport à la culture, ce qui est extrêmement important (Harris et al. 2012). Le bénéfice a été également majeur pour le diagnostic des mycobactéries et des champignons (Mather, Rivera, and Butler-Wu 2014).

Le séquençage à haut débit n'est pas encore disponible en routine, mais le sera peut-être dans les prochaines années. Théoriquement, cela pourrait permettre des applications multiples, allant du suivi épidémique (typage définitif des souches) à l'identification des facteurs de virulences, des mécanismes de résistances aux antibiotiques ...

2.2 Diagnostic virologique

2.2.1 Cultures cellulaires

La détection de virus s'est faite historiquement par la mise en culture sur cellules (Fields et al. 2013). Bien que théoriquement toujours possible, et utilisé dans certains centres notamment pour augmenter la taille de l'échantillon, la culture cellulaire n'est quasiment plus utilisée aujourd'hui pour des raisons

de coût, de complexité technique et de délai de réalisation sans rapport avec la nécessité diagnostique en pratique clinique. Elle a été remplacée par les techniques moléculaires.

Historiquement, c'est en 1892 (Guarnieri 1892) que les premières modifications microscopiques intranucléaires et intracytoplasmiques ont été détectées sur des vésicules de varicelle. Il s'agissait de la première constatation d'un effet cytopathique qui sera utilisé plus tard pour signer l'infection virale. En 1898, Loeffler et Frosch (Mahy 2005) découvrent que l'agent de la fièvre aphteuse du bétail est plus petit que n'importe quelle bactérie connue ; il passe à travers le filtre qui retient habituellement les bactéries, il s'agit d'un agent « filtrable ». Un virus. En 1948 Weller et Enders décrivent la première mise en culture de virus sur cellules in vitro (Enders, Weller, and Robbins 1949; Weller and Enders 1948).

Le principe repose sur l'inoculation d'un virus vivant présent dans un échantillon arrivé au laboratoire sur des cellules spécifiques (cellules rénales de singe pour la grippe par exemple). L'apparition de signes d'infections spécifiques sur les cellules (inclusions intracytoplasmiques ou nucléaires) ou d'une modification cytopathique spécifique (formation de *syncytia* sur les cellules Hep-2 avec le RSV par exemple) d'un virus signe l'infection, que l'on pouvait parfois confirmer avec des techniques Elisa.

Des lignées cellulaires particulières ont parfois été développées pour améliorer les capacités de détection. Par exemple, pour le diagnostic de HSV, des cellules rénales de hamster nouveau-né ont été génétiquement modifiées pour produire de la β -galactosidase en présence d'antigènes de HSV. Mises au contact du virus, elles commencent à sécréter cette enzyme qui permet une détection par un simple test chimique, 16 à 24h après inoculation (Stabell and Olivo 1992).

2.2.2 Techniques antigéniques

Des méthodes de détection antigéniques directes ont pu être utilisées, avec des succès importants dans certaines pathologies, notamment pour le RSV où la performance de la détection antigénique surpassait celle de la culture cellulaire (Ray and Minnich 1987). L'antigène viral est reconnu par un anticorps spécifique, le plus souvent monoclonal que l'on détecte ensuite secondairement avec des techniques indirectes, comme l'immunofluorescence (on ajoute au mélange un conjugué fluorescent qui va se fixer à l'anticorps lorsqu'il est fixé à l'antigène. Après lavage, on expose la lame à un rayonnement UV sous microscope pour vérifier si une image fluorescente apparaît). Il est possible également d'utiliser des techniques enzymatiques pour révéler la présence de l'antigène. C'est notamment la technique utilisée dans les tests immunochromatographique rapides pour le diagnostic des infections virales respiratoires (RSV, Grippe, SARS-CoV-2) ou gastro-intestinales (adénovirus, rotavirus).

2.3 PCR

La découverte de la PCR est assez fascinante. Cette technique qui a été la pierre angulaire du projet de séquençage du génome humain et qui est aujourd'hui absolument fondamentale – au sens étymologique du terme – pour l'activité des laboratoires de biologie sur l'ensemble de la planète ne date que de 1983 (Bartlett and Stirling 2003).

La légende veut que Kary Mullis, au début des années 1980 en Californie, eut l'idée du concept de la PCR, de l'enzyme qui parcourt la chaîne d'ADN, alors qu'il roulait cheveux au vent en Honda Civic sur la Highway 128 entre San Francisco et Medocino au retour d'une séance de surf avec sa compagne. L'usage était en réalité déjà courant de synthétiser de brins courts d'ADN et d'utiliser une polymérase à ADN pour le répliquer. Mais le coup de « génie » (Rabinow 2011) de Kary Mullis a été d'imaginer deux oligonucléotides opposés encadrant une courte séquence permettant la reproduction du fragment qui persiste dans le milieu pour être utilisé au prochain cycle d'activité de la polymérase, permettant le déclenchement de la « réaction en chaîne », selon un processus exponentiel.

En réalité, le concept avait déjà été approché par des travaux plus anciens, remontant aux années 1970 voire 1960 mais publiés plus tard (Saiki et al. 1985). En outre, bien que l'idée fût brillante, des contraintes techniques durent être dépassées, notamment le fait que la polymérase était détruite à chaque cycle, bloquant la réaction en chaîne. C'est l'usage d'une polymérase d'une bactérie thermophile isolée dans l'eau des geysers à 70°C de l'ouest américain (*Thermophilus aquaticus*, qui a donné la Taq polymérase) qui a permis de résoudre les difficultés (Saiki et al. 1988), ce d'autant plus que l'activité de cette enzyme est particulièrement rapide et permet le recopiage des segments en quelques secondes.

L'origine, il était nécessaire de passer manuellement les échantillons dans divers bains de températures variables. Les premiers thermocycleurs (bains-marie à changement réglable de température) sont rapidement apparus (Schiffman et al. 1991).

Des améliorations successives ont émaillé l'histoire de la technique. La qPCR qui permet de quantifier la charge virale a fait suite à la PCR en temps réel (Higuchi et al. 1993). La RT-PCR utilise une reverse transcriptase (Chelly et al. 1988) pour pouvoir analyser l'ARN, et donc la RT-qPCR. Aujourd'hui, il y a également la dPCR pour « digital » PCR (Vogelstein and Kinzler 1999) qui améliore le processus en fractionnant l'échantillon en milliers, voire millions de sous échantillons, « lissant » les différences de concentration par la loi des grands nombres.

La PCR a également été un succès commercial, conduisant à des modifications structurelles profondes des laboratoires, grâce à une automatisation majeure des tâches et une capacité de traitement des échantillons bien plus importante au fil du raccourcissement des délais. A signaler qu'à côté de la PCR,

diverses autres techniques moléculaires - à différents niveaux thermiques comme la PCR ou isothermes comme certaines alternatives - sont venus compléter l'arsenal à disposition des laboratoires de microbiologie pour la détection des agents infectieux.

3 Perspectives pour demain

Les techniques moléculaires n'ont pas fini de repousser leurs limites, tant en matière de rapidité, de miniaturisation que de performances. L'arrivée des tests moléculaires au lit du patient est déjà une réalité. La possibilité de réaliser des tests d'amplification génique à partir de machines de la taille d'un téléphone portable est pour un avenir très proche. Mais la nouvelle révolution réside dans les techniques de séquençage haut débit qui promettent bientôt de mettre leur puissance à la portée du diagnostic clinique, en permettant le séquençage de mélanges complexes de matériels génétiques (d'origine humaine, microbienne ou virale) provenant d'échantillons humains dans des délais compatibles avec le diagnostic d'urgence.

Mais ceci fera l'objet d'autres thèses ...

C. Pathogénie générale des Infections des voies respiratoires basses

On définit comme infection des voies respiratoires basses l'envahissement par un pathogène de l'arbre respiratoire dans sa partie sous-glottique et sa prolifération, déclenchant une pathologie (Mani 2018).

Au premier rang des maladies infectieuses respiratoires, la pneumopathie aiguë communautaire tient une place particulière dans l'épidémiologie mondiale. Première cause de décès dans les pays en voie de développement (World Health Organization 2019), les pneumonies aiguës de l'enfant sont responsables de 15% de tous les décès d'enfants de moins de 5 ans dans le monde, soit plus d'un million de morts en 2015. C'est davantage que le VIH, le paludisme et la tuberculose combinés comme on l'a déjà vu. Dans les pays développés, en revanche, l'épidémiologie est très différente (Jain 2015). Ainsi, aux USA, la pneumonie de l'enfant ne tue presque plus jamais (Dowell et al. 2000a; Xu et al. 2020). En revanche, les coûts de sa prise en charge sont de plus en plus élevés, avec – devant la gravité potentielle de cette pathologie – une prise en charge souvent maximaliste et optant pour une antibiothérapie systématique. Ainsi, la pneumonie est devenue la première cause d'hospitalisations chez l'enfant (Yu, Wier, and Elixhauser 2006; Lee et al. 2010; Pfuntner 2011b) et le coût financier supporté par le système de santé est monté à un milliard de dollars US en 2010 (Pfuntner 2011a).

L'étiologie des pneumopathies aiguës communautaires de l'enfant est historiquement bactérienne, avec *Streptococcus pneumoniae* comme agent principal expliquant la majorité des décès, et avec *Haemophilus influenza* comme deuxième agent le plus souvent en cause. Ces deux pathogènes continuent à faire des ravages dans les pays en voie de développement. En revanche, dans les pays développés, à l'ère dite « post-vaccinale » ; leur présence a fortement diminué, étant même devenue nulle pour *Haemophilus influenza*. Pourtant, le nombre absolu de pneumonies a peu diminué dans les pays développés. L'amélioration technologique des moyens diagnostiques qui s'est produite au cours des dernières années a permis de comprendre que c'est en réalité la proportion de pneumopathies d'origine virale qui a explosé, mettant au jour ces pathologies différentes, tout aussi fréquentes mais bien moins mortelles, malgré l'existence de quelques cas graves. Cette modification de l'étiologie éclaire également la physiopathologie de ces infections, certaines hypothèses considérant que toute pneumonie est d'abord virale, et secondairement bactérienne et que la disparition des infections bactériennes dans les pays riches ne laisse plus que les phases précoces, virales, visibles. (Clarke 1979)

Des débats existent actuellement sur la pertinence des soins lourds qui sont dispensés dans les pays riches (Esposito et al. 2020). En effet, si les vaccins ont fait disparaître une bonne partie des agents bactériens dans ces pathologies, la pertinence de l'antibiothérapie large et probabiliste telle que recommandée est discutable. Ne serait-il pas plus efficace en termes économiques et pour la préservation du risque d'antibiorésistance de ne traiter ces infections de manière probabiliste que lorsqu'elles deviennent sévères (Hazir et al. 2011) ? Inversement, d'autres pensent que c'est justement l'antibiothérapie large et probabiliste qui a fait diminuer ces infections bactériennes et qu'il faut à tout prix la conserver pour éviter une recrudescence de la mortalité. Cette attitude semble partagée par la majorité des praticiens (Ambroggio et al. 2018), malgré les recommandations internationales. Enfin, certains auteurs soulignent le problème de la définition (Scott et al. 2012; Fahy and O'Byrne 2001; Brooks, Cloutier, and Afshani 1982; Mathews et al. 2009) d'une pneumopathie dans les études. Ce que l'on appelle « pneumopathie » dans certains cas d'infections respiratoires virales ne correspond pas forcément à ce qui est visé lorsqu'on parle de mortalité dans les pays en voie de développement (Anadol, Aydin, and Gocmen 2001).

Parmi l'ensemble des pathologies qu'il est possible de rencontrer chez l'enfant dans ce contexte, nous allons nous concentrer dans ce document sur les pneumopathies aiguës communautaires (PAC) de l'enfant. Nous verrons ainsi successivement les données actualisées de la physiopathologie connue à ce stade, les différents agents étiologiques en cause, les possibilités diagnostiques, les traitements possibles et un point sur la place des vaccins dans ces problématiques.

Une infection pulmonaire peut survenir lorsqu'un agent pathogène parvient à pénétrer l'espace sous-glottique, habituellement considéré comme stérile. Cela peut se voir lors de l'exposition à un aérosol

fortement concentré de particules infectieuses, lors d'échec des mécanismes mécaniques de filtration ou d'élimination des particules ou lors d'une inefficacité, transitoire ou définitive, de l'immunité.

En effet, dans l'immense majorité des cas l'infection se fait depuis les voies respiratoires supérieures vers les voies respiratoires inférieures, même si la voie hématogène d'infection pulmonaire a été décrite. De nombreux mécanismes de filtration sont en place pour empêcher l'arrivée d'agents infectieux de l'extérieur vers les voies respiratoires.

1 Mécanismes de défense pulmonaire

1.1 Voies respiratoires supérieures

1.1.1 Filtration de l'air

Le nez représente le tout premier système de filtration de l'air. La présence de poils et l'orientation du conduit responsable d'une non-laminarité de la progression de l'air et la production de mucus capturant les agents étrangers permettent la filtration des particules de plus de 10 μm . Les particules de 2 à 10 μm peuvent quant à elles être récupérées par le tapis de cellules muco-ciliaires qui recouvrent les voies respiratoires inférieures, assurant une remontée mécanique vers les voies supérieures qui permet, via la déglutition ou la toux, l'élimination des particules. Il est possible que des particules de moins de 1 μm passent cette première ligne de défense.

1.1.2 Immunité locale

Les voies respiratoires supérieures sont tapissées d'un tissu lymphoïde, le NALT (*Nasal-associated Lymphoid Tissue*) qui assure la reconnaissance d'antigènes capturés par des IgA sécrétoires spécifiques. Des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (dans la lamina propria) et CD8⁺ (dans le mucus) sont présentes, de même que de nombreux macrophages (Woodland and Randall 2004). Le mécanisme le plus efficace à ce stade est la capacité de neutralisation des IgA spécifiques, et leur rôle dans l'opsonisation et le déclenchement de la phagocytose locale. Un fort taux d'IgA locale est nécessaire afin de diminuer le portage des germes.

1.2 Voies respiratoires inférieures

Dans l'épithélium bronchique, on retrouve des structures immunologiquement assez proches du tube digestif. Des plaques de tissus lymphoïdes, ressemblant aux plaques de Peyer intestinales, sont présentes de façon diffuse et jouent un rôle majeur dans les premières années de la vie pour la constitution du répertoire immunologique de l'enfant avant de perdre en activité à l'âge adulte. Ces

plaques reposent sur un sous-ensemble de tissu lymphoïde riche, le BALT (*bronchus-associated Lymphoid tissue*) qui assure les réponses immunologiques rapides adaptées.

Au niveau du parenchyme pulmonaire lui-même, là où se réalisent les échanges gazeux, 90% des cellules présentes dans les alvéoles sont des macrophages. Il existe une sous-population moins nombreuse de lymphocytes T et B et de cellules dendritiques. Le tissu pulmonaire lui-même contient une large part de cellules T anergiques qui jouent vraisemblablement un rôle dans la régulation de l'activation du système immunitaire en réponse aux antigènes (Holt et al. 2008).

1.3 Immunité innée

L'immunité innée pulmonaire est la première ligne de défense activée lors d'un stimulus infectieux (Chaudhuri and Sabroe 2008). Elle réagit à deux types de signaux : des molécules produites par des agents pathogènes et des molécules produites lors de lésions tissulaires, quelle qu'en soit la cause.

Il existe différents récepteurs capables d'activer l'immunité innée, appelés PPR (*pattern recognition receptors*). Ils sont habituellement classés selon le type de molécules qu'ils identifient (Braciale, Sun, and Kim 2012). On retrouve ainsi les *Pathogen-Associated Molecular Patterns* qui reconnaissent les structures d'agents infectieux, l'ADN viral, l'ARN viral, les flagellines, les lipopolysaccharides ou les lipopeptides (Suzuki, Chow, and Downey 2008). Il existe des *Damage-Associated Molecular Patterns* qui reconnaissent des molécules associées aux lésions tissulaires, comme le fibrinogène, les composants de la matrice (acide hyaluronique et fibronectine), des facteurs de transcriptions, l'ADN, l'ARN, etc.

La reconnaissance spécifique de l'origine de l'agression repose sur la propriété de chaque récepteur à identifier un type unique de molécule. Ces récepteurs sont appelés des « Toll-like Receptors » (TLR) exprimés à la surface des cellules de l'immunité. Il existe également des récepteurs intracytoplasmiques, les NLR (NOD-Like Receptor, NOD signifiant « *nucleotide-binding oligomerization domain* »). Il existe une dizaine de TLR et une vingtaine de NLR.

Les TLRs sont assez spécifiques d'un type de pathogène. Ainsi TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et TLR9 sont associés à une réponse antibactérienne, alors que TLR3, TLR7, TLR8 sont associés à une réponse antivirale, bien que TLR4 puisse être activé par des protéines virales. Les plus étudiés sont TLR2 et TLR4. TLR4 répond principalement aux lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif, et à certaines molécules spécifiques de bactéries particulières, comme la pneumolysine de *Streptococcus pneumoniae*. TLR2 reconnaît plus spécifiquement les lipoprotéines des bactéries Gram positives.

Les NLR fonctionnent différemment et sont moins étudiées. À titre d'exemple, les NLR de type NOD 1 et 2 reconnaissent le peptidoglycane des bactéries à Gram positif et activent NF- κ B qui engendre à son

tour une sécrétion massive d'IL-1. C'est de cette façon que l'infection à *Legionella pneumophila*, une bactérie intracellulaire, est contrôlée.

Il y a plusieurs cellules qui participent par ailleurs à l'activation de l'immunité innée (Herold, Gabrielli, and Vadasz 2013). Les cellules épithéliales de type 2 alvéolaire expriment par exemple TLR2 et TLR4, réagissant au peptidoglycane et au polysaccharide des bactéries à Gram négatif. Les cellules épithéliales plus haut situées dans l'arbre respiratoire expriment, quant à elles, TLR1 et TLR 10 et produisent rapidement de cytokines pro-inflammatoires. Des cellules dendritiques jouent leur rôle de cellule présentatrice d'antigènes en migrant dans le tissu lymphatique pour activer les lymphocytes T dès l'activation de la cascade inflammatoire. Les neutrophiles sont rapidement recrutés par ces cytokines, principalement IL-8, C5a et les leucotriènes B4. Ils ont une courte demi-vie. Après apoptose, ils déclenchent une réaction anti-inflammatoire et facilitent la restauration *ad integrum* de l'épithélium (Crosby and Waters 2010). Enfin, les macrophages, notamment alvéolaires, sont localisés au niveau du surfactant pulmonaire, les exposant en premier aux pathogènes. Ils activent lors de la phagocytose une cascade pro-inflammatoire (Strickland et al. 1993) et peuvent jouer le rôle de cellule présentatrice d'antigène pour l'immunité adaptative (Kim et al. 2008).

1.4 Immunité adaptative

Pendant longtemps, il a été considéré que l'immunité adaptative pulmonaire était une simple affaire de régulation de l'équilibre entre TH1 et TH2. De nouvelles découvertes ont amélioré depuis notre compréhension de la complexité de ce processus (Zhou, Chong, and Littman 2009).

Les cellules TH1 (obtenues à partir des lymphocytes T CD4+, en présence d'interféron γ , IL-6 et IL-12) jouent un rôle majeur dans l'immunité bactérienne ou virale. Elles sont particulièrement importantes contre les infections intracellulaires, au premier rang desquels *Mycobacterium tuberculosis*. Les cellules TH2 (obtenue à partir des lymphocytes CD4+, en présence d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13) ont principalement un rôle contre les helminthes, mais sont utiles également lors des infections virales. Les cellules TH2 sont surtout connues pour leurs rôles dans l'allergie IgE médiée qui peut déclencher à ce niveau des crises d'asthme sévère, ainsi que pour leur rôle dans certaines réponses inflammatoires excessives, comme dans l'infection à RSV (Heier et al. 2008; Lukacs et al. 2006).

Notre compréhension de cet équilibre a été grandement améliorée par la découverte des cellules TH-17, qui proviennent des lymphocytes T CD4+ en présence combinée d'IL-6, IL-1 β et d'IL-23. Les cellules TH17, une fois différenciées, produisent de larges quantités d'IL-17 qui joue un rôle central dans l'activation des neutrophiles et dans l'équilibre de différenciation avec les lymphocytes T régulateurs. Cet équilibre est ce qui permet indirectement, par des voies de régulations complexes (IL-10, TGF- β et NO sur les Tregs), le retour en fin d'infection à une population lymphocytaire stable dans le

parenchyme, mais aussi à l'atténuation de la réponse immunitaire évitant l'apparition d'allergies et la régulation de l'inflammation post-virale qui permet d'éviter les séquelles pulmonaires.

Les lymphocytes T CD8⁺ agissent eux de plusieurs façons. Ils peuvent attaquer directement la cellule, forçant sa destruction par des mécanismes lytiques. Ils forcent également la cellule infectée à produire du TNF, conduisant à son apoptose, et enfin produisent des facteurs pro-inflammatoires conduisant à l'appel massif d'autres cellules immunitaires. Dans certaines pathologies, comme la grippe, cet effet peut dépasser son but et conduire à la destruction tissulaire. Un mécanisme similaire est à l'œuvre dans les réactions hyperinflammatoires du SARS-CoV-2 par exemple (Vabret et al. 2020) bien que celui-ci touche assez peu les enfants.

1.5 Microbiome

Très longtemps, le milieu sous-glottique a été considéré comme un milieu stérile. Il n'en est en réalité rien (Beck 2014). Il s'agit d'un milieu où se développe un microbiome, bien que quantitativement moindre que dans le tube digestif (Neish 2014). Certains germes sont retrouvés, en équilibre quantitatif dynamique (Moffatt and Cookson 2017). Il s'agit des *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* et *Actinobacteria*. La fonction de ces bactéries commence à être mieux connue, elles seraient symbiotiques et joueraient un rôle dans la réparation tissulaire, et dans la modulation comme dans l'initiation de la réponse immunitaire. On sait que ce microbiome est altéré dans des pathologies comme la mucoviscidose ou l'asthme. L'impact d'antibiothérapies inutiles sur le microbiome est encore peu connu. Ces données n'ont à ce jour pas d'impact clinique, mais des pistes de recherches sont actuellement explorées pour utiliser ces notions en diagnostique ou en thérapeutique (Das et al. 2020).

2 Pathogénie générale des infections virales

Nos principales connaissances sur les infections pulmonaires virales proviennent d'études sur le RSV, la grippe, en particulier la grippe A, et l'adénovirus, ainsi que quelques modèles animaux pour chaque pathogène (do Carmo Debur et al. 2010).

Dans la plupart des cas l'inoculation de l'enfant provient des voies aériennes supérieures après exposition à des sécrétions infectieuses d'autres personnes (toux, éternuements, jeux en collectivité, contage intrafamilial ...) ou par exposition sur les surfaces et objets inanimés avant transmission le plus souvent manuportée à la sphère ORL (ou après léchage : jouets ...).

Une fois présent dans les voies respiratoires inférieures, le virus se propage par contiguïté en proliférant pour atteindre des strates pulmonaires de plus en plus profondes. L'infection de

l'épithélium et la réaction inflammatoire subséquente conduisent à une perte de fonctionnalité du tapis mucociliaire, une accumulation de mucus et de débris cellulaires qui gênent la fonction pulmonaire, commençant à obstruer plus ou moins partiellement la circulation des gaz respiratoires.

Quand l'infection arrive dans la partie terminale de l'arbre respiratoire, les alvéoles elles-mêmes perdent leur fonction physiologique, ce qui commence – selon l'étendue de l'infection - à retentir sur la capacité du poumon à échanger l'oxygène et le CO₂. On parle alors d'atteinte « alvéolaire », par opposition aux atteintes « bronchiques ». Des désaturations en oxygène peuvent alors commencer à apparaître, directement liées à la perte de fonction de l'organe et non plus simplement à l'obstruction mécanique ou à l'épuisement général. L'infiltrat alvéolaire et l'œdème secondaire ainsi que la souffrance tissulaire locale bloquent la production de surfactant, aboutissant à un effondrement mécanique de l'alvéole sur elle-même, aggravant le tableau.

La pneumonie interstitielle secondaire est un processus diffus d'atteinte des alvéoles, mais également du tissu sous-jacent et de la vascularisation pulmonaire, entraîné par l'hyperactivation des cellules mononucléaires. Dans les cas rapportés de pneumonie virale fatale, ce sont ces deux processus combinés qui sont à l'origine du décès de l'enfant, indépendamment de l'agent pathogène en cause.

Dans certains pathogènes, en particulier le RSV, l'hyperproduction de débris cellulaires dans les petites bronchioles terminales (la « bronchiolite ») conduit à un effet de valve, « piège à air », qui amène à l'hyperinflation pulmonaire et aggrave secondairement la souffrance tissulaire. Enfin, certains virus au premier rang desquels l'adénovirus, entraînaient une nécrose tissulaire bien plus profonde que l'épithélium atteignant la sous-muqueuse et causant des destructions irréversibles, c'est le cas de la bronchiolite nécrosante.

La sévérité de l'infection à RSV chez l'enfant en regard de sa relative innocuité – supposée du moins – chez l'adulte est à mettre sur le compte de la réponse immunitaire trop puissante de l'immunité innée (Welliver 2008), et inadaptée de l'immunité adaptative (Welliver et al. 2007), avec une extension de la destruction tissulaire bien trop importante. C'est un bon exemple de la spécificité immunologique pédiatrique.

Trois facteurs importants peuvent influencer l'expression pathogénique des pneumopathies non bactériennes chez l'enfant. Il s'agit de l'anatomie, des pathologies pulmonaires en cours et de l'immunité. Chez le jeune enfant, l'étroitesse du calibre des voies respiratoires ainsi que l'absence d'interconnexions entre les espaces alvéolaires (pores de Kohn, qui se développent vers 3-4 ans) prédisposent à la survenue respective de wheezing et d'atélectasie. L'existence de pathologies sous-jacentes (par exemple la bronchodysplasie) peut aggraver le tableau ou prédisposer aux infections, par

exemple en diminuant les capacités d'élimination des sécrétions résultantes de la phase préliminaire de l'infection.

3 Pathogénie générale des infections bactériennes

Les facteurs les plus importants prédisposant à une infection pulmonaire bactérienne chez l'enfant sont la virulence du germe, l'absence d'immunité humorale spécifique et la préexistence d'une infection virale. La plupart des infections bactériennes sont secondaires à une colonisation du nasopharynx par le pathogène. De multiples mécanismes de défense, vus plus haut, existent pour bloquer la survenue d'une infection. Une défaillance, transitoire ou constitutive, d'un seul de ces axes immunitaires est suffisante pour permettre à la bactérie d'infecter le patient.

L'infection par un germe produit des atteintes pulmonaires différentes selon ses spécificités propres, que l'on traduit habituellement par virulence. *Streptococcus pneumoniae*, par exemple, produit la description classique de la pneumonie aiguë : inflammation aiguë, hyperhémie avec œdème transmural et inondation alvéolaire atteignant l'ensemble d'un lobe pulmonaire avec une phase d'infiltration de leucocytes polynucléaires (« hépatisation rouge »), suivi d'une phase secondaire de déposition de fibrine et d'activité macrophagique (« hépatisation blanche »). L'hypervascularisation physiologique du tissu pulmonaire contribue grandement au risque de dissémination secondaire, avec une bactériémie pouvant conduire au choc septique. Quand d'autres germes capables de destructions tissulaires plus étendues sont en cause (*Staphylococcus aureus*, bacilles à Gram-négatifs, *Pseudomonas spp* ...), l'atteinte est plus profonde et la formation d'abcès n'est pas rare. Enfin, certains germes produisent une exotoxine qui peut être responsable d'une atteinte lytique, parfois majeure (leucocidine de Panton Valentine de *Staphylococcus aureus*) avec un risque vital important.

Des modèles animaux (McCullers and Rehg 2002) ont montré que des signes et symptômes d'infection virale précédaient très fréquemment une infection bactérienne. Les virus respiratoires agissent par destruction première de l'épithélium, réduisant ainsi les moyens de défense naturels, mais aussi en médiant par cytokines une réponse inflammatoire exubérante et en activant une régulation positive des cellules présentatrices d'antigènes, saturant ainsi le système immunitaire. Cela a été particulièrement bien démontré dans le modèle associant le pneumocoque et la grippe (McCullers 2014), et est confirmé épidémiologiquement par la superposition des courbes épidémiques de pneumopathies à pneumocoques et de grippe (Morens, Taubenberger, and Fauci 2008), ou par les analyses *post-mortem* des victimes de la pandémie grippale de 1918 (Sheng et al. 2011). Cette analyse a également été confirmée pour d'autres virus respiratoires (Techasaensiri et al. 2010), y compris le rhinovirus (Peltola et al. 2011), habituellement plutôt considéré comme peu agressif.

4 Place de la vaccination

Ces dernières décennies, la vaccination rendue possible par l'amélioration des techniques immunologiques a modifié profondément l'épidémiologie des infections respiratoires. Il y a eu de très grands succès, comme par exemple la vaccination conjuguée contre le pneumocoque ou contre *Haemophilus*. Il y a des progrès encore à faire pour le vaccin contre la grippe, la réflexion autour d'un vaccin « universel » se faisant pressante avec le risque de cassure antigénique. Certains vaccins sont encore au stade de la recherche, parfois depuis très longtemps malgré un besoin grandissant, comme celui contre le RSV. Et certains sont le reflet d'échec de l'histoire et des sociétés, comme le vaccin à adénovirus qui a été perdu – puis retrouvé – pour des raisons exclusivement économiques.

Il est toutefois certain que la recherche en vaccinologie représente l'avenir de la lutte contre les agents infectieux, les antibiotiques se heurtant au mur de la résistance induite et la lutte antivirale étant plafonnée par les effets secondaires importants d'une large part de ces médicaments, dû à la physiopathologie particulière intracellulaire des virus.

D. Agents étiologiques : Virus

1 Place des agents infectieux viraux dans les PAC

Les virus respiratoires sont la cause majeure d'infections des voies respiratoires basses de l'enfant, pneumonies comprises, partout sur la planète et quel que soit le niveau de vie, aussi bien aux États-Unis (Jain 2015) qu'en Chine (Ning et al. 2017) ou dans les pays en voie de développement (Pneumonia Etiology Research for Child Health Study 2019). Ce renversement de perspective est très intéressant dans une perspective historique où la place supposée des infections bactérienne était considérée autrefois comme majeure, si ce n'est exclusive. Le développement des techniques de diagnostic a permis une modification des points de vue sur l'épidémiologie et une meilleure compréhension des mécanismes en jeu dans la pathogénie de la survenue de ces infections, comme vu au chapitre précédent.

2 Virus de la Grippe

La grippe est probablement le plus important des virus respiratoires de l'enfant, par son impact direct comme par le risque de pandémie qui est permanent et des conséquences que pourrait avoir une mutation aggravant sa virulence dans nos sociétés hyperconnectées et où les échanges se réalisent à

très grande vitesse. Les enfants sont par ailleurs les propagateurs principaux du virus, à cause de leur système immunitaire naïf au sens immunologique du terme et de leur fort taux de contacts sociaux.

La grippe est une zoonose, provenant d'un réservoir animal avec l'apparition, au gré des contacts rapprochés entre l'homme et certaines espèces, de transmissions inter-espèces. Lorsque cela arrive, le rapprochement dans une même cellule de deux virus grippaux différents peut donner naissance à un nouveau virus circulant dans l'espèce humaine pour les décennies suivantes avec le risque d'une pandémie brutale les deux premières années. Les enfants sont alors très souvent les premiers sujets humains porteurs du nouveau virus.

De grands systèmes nationaux et internationaux de surveillance des épidémies grippales se sont mis en place dans le monde. On peut citer l'OMS, qui édite des recommandations vaccinales mais aussi des bulletins épidémiologiques et des recommandations de traitement ou de dépistage. Au niveau national, d'autres structures existent dans chaque pays, comme les CDCs aux États-Unis, l'ECDC à l'échelle de l'Europe ou Santé Publique France.

2.1 Historique

Le terme Influenza provient probablement de l'italien « *Influenza di freddo* » avec l'idée que les épidémies surviennent en hiver. La première application du terme à une épidémie infectieuse date de 1743 (dans le London Magazine : « *News from Rome of a contagious Distemper, raging there, call'd Influenza* » lors d'une pandémie originaire d'Italie (Sherk 2004). Mais on retrouve dans des textes attribués à Hippocrate des descriptions cliniques de pathologies fortement évocatrices de grippe (Hopkirk 1914). Quoi qu'il en soit, la grippe semble suivre l'humanité depuis très longtemps et trouve probablement son origine dans la domestication d'espèces animales et la proximité afférente, comme d'autres maladies infectieuses (tuberculose, tænia ...)(Kacki 2012).

Plus récemment, c'est René Laennec, l'inventeur du stéthoscope, qui découvrit en 1803 la relation entre infection grippale et pneumonie lobaire, considérée alors comme bactérienne (Laennec 1819). La notion de surinfection bactérienne et sa gravité particulière sont devenues évidentes lors de la pandémie de grippe « espagnole » en 1918 (Morens, Taubenberger, and Fauci 2008). Louis Cruveilhier, médecin hygiéniste, a eu à ce propos cette phrase en 1919 : « Si la grippe condamne, l'infection secondaire exécute » (Cruveilhier 1919).

La première mise en évidence directe du virus vient d'une étude de Richard Shope en 1930 qui infectait des porcs à *Haemophilus Influenzae*. L'apparition d'un agent infectieux inattendu chez des porcelets s'est révélée être de nature virale (Shope and Francis 1936). Chez l'homme, c'est en 1933 que Wilson

Smith (Andrewes, Laidlaw, and Smith 1935) qui travaillait avec des furets s'est lui-même infecté et a fait une pneumonie bactérienne en complication.

Enfin, c'est vers 1970 que le réservoir aviaire a été plus finement identifié, et que l'histoire écologique du virus a été pleinement comprise (Webster et al. 1992).

2.2 Microbiologie

Les Influenzavirus sont des virus à ARN, segmentés. Ils sont divisés en quatre types, selon l'organisation fonctionnelle de la structure génomique, A, B, C et D. Les virus A et B, principaux virus humains responsables des épidémies grippales, ont divergé voici 100 à 350 ans seulement, et sont respectivement stables chez l'humain à ce jour. Le Virus C a divergé du A lors de l'antiquité. Il est stable chez l'humain et ne donne que de petites épidémies locales. Enfin, le virus D a divergé du C et n'est pas pathogène pour l'homme.

2.2.1 Convention de nommage

Les virus A et B sont les plus étudiés. Ils se divisent en sous-types pour le virus A et en lignées pour le virus B. Les sous-types du virus A sont nommés selon le polymorphisme antigénique de l'hémagglutinine et de la neuraminidase, sous la forme HxNy (H1N1, H3N2, etc ...). Avec 18 sous types H et 11 sous-types N, il peut y avoir jusqu'à 198 combinaisons possibles. Les virus B sont quant à eux nommés selon leur lignage, les principaux étant B/Yamagata et B/Victoria.

Les virus peuvent ensuite être divisés en clades (exemple H1N1 => 6B.1 ou B/Victoria => V1A), puis en sous-clades (exemple H1N1 => 6B.1 => 6B.1A ou B/Victoria => V1A => V1A.1)(CDC 2020).

Une convention de nommage internationale a été mise au point par l'OMS en 1980 (WHO 1980). Elle prend la forme par exemple de **A/Sidney/05/97/(H3N2)**, reprenant respectivement le type, la ville de découverte, le numéro de souche, l'année de découverte et le type antigénique d'hémagglutinine et de neuraminidase pour les virus de type A.

2.2.2 Structure

Le virus de la grippe appartient à la famille des *Orthomyxoviridae*. Ce sont des virus à ARN segmenté (7 à 8 segments), de 80 à 120 nm de diamètre. Leur enveloppe lipidique contient deux protéines enchâssées à sa surface. L'hémagglutinine est la protéine d'attachement primitive (Wilson, Skehel, and Wiley 1981). Via l'acide sialique présent à la surface des cellules pulmonaires, elle reconnaît sa cible spécifique puis est glycosylée pour être activée en deux sous-unités HA1 et HA2. Ce changement de conformation assure la fusion des membranes et permet la pénétration sous forme endosomale du matériel viral jusqu'au noyau (Krammer et al. 2018). Une fois le matériel génétique dans le noyau, sous

la forme de sept à huit ribonucléoprotéines virales, la transcription et la réplication de l'ARN viral peuvent commencer. Des protéines de structures sont alors formées, avec des molécules spécifiques (NS1, NS2, M1 et M2, HA, N ...) qui formeront le virion après activation secondaire. La neuraminidase, deuxième protéine de surface, joue ici un rôle majeur, clivant l'acide sialique résiduel et permettant la libération du virus dans le milieu extérieur à travers la membrane cytoplasmique de la cellule hôte.

2.2.3 Facteurs de virulence

L'hémagglutinine dans ses variantes peut être considérée comme un facteur de virulence important. À titre d'exemple, les hémagglutinines des virus aviaires reconnaissent spécifiquement les acides sialiques $\alpha 2-3$ chez l'oiseau, alors que chez l'humain il s'agit des domaines $\alpha 2-6$. Il a été suggéré qu'au gré de l'acquisition de la reconnaissance $\alpha 2-6$ lors du passage chez l'humain, une reconnaissance $\alpha 2-3$ a pu persister partiellement, conduisant à une plus grande facilité de fusion chez l'hôte, aggravant ainsi la virulence au niveau pulmonaire (van Riel et al. 2006).

La neuraminidase est en équilibre dynamique avec l'activité de l'hémagglutinine sur l'acide sialique. Si le clivage de la neuraminidase est trop rapide, l'hémagglutinine n'aura plus de cible, et inversement. La virulence des différentes souches peut être grandement impactée par cet équilibre dynamique.

Plus tard dans la réplication, le polymorphisme génétique du complexe polymérase du virus (PB1, PA, PB2) peut impacter la virulence en jouant sur la quantité et la vitesse de production de virions. Certaines souches sont ainsi bien plus virulentes, comme H5N1 et H7N9 (Yamayoshi et al. 2015).

On peut citer également le polymorphisme de NS-1, une protéine de structures dont la conformation lui permet de jouer un rôle bloquant comme antagoniste des interférons et de la réponse antivirale. C'est une modification de NS-1 qui est ainsi responsable de la virulence du virus H1N1 de la grippe espagnole de 1918 (Hrincius et al. 2015) ...

2.1 Pathophysiologie

L'analyse du déroulé de la réponse immunitaire au cas de l'infection grippale est un sujet maintenant bien étudié (Kreijtz, Fouchier, and Rimmelzwaan 2011). Il y a des implications dans la réflexion vaccinale, thérapeutique et épidémiologique.

2.1.1 Immunité innée

L'ARN viral est identifié par des TLRs (TLR 7 et TLR3), et des NLRs (NLRP3). L'activation de ces récepteurs entraîne la synthèse de cytokines pro-inflammatoires et d'interféron (IFN) de type 1 (Alexopoulou et al. 2001), les IFN α et IFN β . Ces interférons ont – en soi – une activité antivirale forte par stimulation d'une protéine intermédiaire MxA (Haller and Kochs 2002). Ces interférons vont ensuite stimuler les

cellules dendritiques, activant l'immunité adaptative par présentation d'antigènes aux lymphocytes T. NLRP3 va quant à lui activer la différenciation de lymphocytes Th17 (Ichinohe, Pang, and Iwasaki 2010) et de lymphocytes T CD4+ spécifiques.

Les macrophages alvéolaires réagissent à l'infection virale par phagocytose et sécrétion de médiateurs inflammatoires (NO₂s et TNF α). Ceux-ci réduisent l'activité virale, mais sont également toxiques pour l'organisme. Certaines souches, comme H5N1 déséquilibrent cette activité et contribuent par cette voie à la maladie inflammatoire aiguë du poumon (Peiris, Hui, and Yen 2010). Les cellules dendritiques, quant à elles, internalisent et opsonisent les virions, et remontent le circuit lymphatique pour présenter les protéines aux cellules CD8+ cytotoxiques et permettre leur différenciation.

Des cellules NK locales reconnaissent la cellule infectée par des récepteurs cytotoxiques spécifiques, NKp44 et NKp46. En présence d'hémagglutinine associée, la cellule sera lysée.

2.1.2 Immunité humorale

L'infection grippale entraîne une réponse anticorps spécifique (Gerhard 2001). Les sites de reconnaissance et de fixation sont l'hémagglutinine et la neuraminidase. Les anticorps spécifiques bloquent le changement conformationnel de l'hémagglutinine et réduisent l'entrée du virus dans la cellule. Le fragment constant permet aussi une reconnaissance et une phagocytose. Bien que spécifiques de l'hémagglutinine d'une espèce (il y en a 18 différentes), certains anticorps ont pu être identifiés comme étant spécifiques d'une région conservée entre les souches (Ekiert et al. 2009) laissant des espoirs pour un éventuel vaccin polyvalent.

Les anticorps spécifiques de la neuraminidase jouent également un rôle, bloquant l'émission de nouveaux virions et réduisant le développement de la maladie, mais ce mécanisme semble moins efficace que celui médié par l'hémagglutinine.

D'autres protéines de surfaces sont reconnues et possèdent des anticorps spécifiques, notamment la protéine M2 et les protéines de structure NP. Le mécanisme reste à élucider dans sa globalité.

La majorité des anticorps identifiés sont des IgG, IgA et IgM, suivant leur répartition habituelle : IgA dans les muqueuses, notamment ORL, IgM de sécrétion rapide et brève, suivie d'une sécrétion d'IgG de longue durée.

2.1.3 Immunité cellulaire

Lors de l'infection grippale, des lymphocytes T sont activés. On retrouve des lymphocytes CD4+, des CD8+ et des cellules régulatrices (Tregs). Les CD4+ sont majoritairement des T helper, assez peu cytotoxiques. Elles peuvent se différencier en TH2 qui sécrètent IL-4 et IL-13, dont le rôle est de

stimuler la production de lymphocytes B spécifiques, ou en TH1 qui sécrètent IFN- γ et IL-2 pour stimuler l'immunité cellulaire plus spécifiquement. En parallèle, Tregs et Th17 stimulent la différenciation de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques. Les lymphocytes T CD8+ cytotoxiques sont rapidement recrutés et rejoignent le site de l'infection, reconnaissant les cellules infectées et assurant l'apoptose rapide par l'usage de perforine et de granzymes (GrA et GrB) qui peuvent aussi avoir un effet négatif sur la réplication virale.

2.2 Épidémiologie

La grippe est une maladie saisonnière, très impactante en pédiatrie avec des taux d'attaque de 20 à 30% de la population chaque hiver, la proximité de contact social entre les enfants étant une des causes explicatives (Luh, You, and Chen 2016). Cependant, la majorité des décès a lieu chez les très jeunes enfants et surtout chez les personnes âgées.

La grippe est une maladie transmissible par voie aéroportée, aérosols et gouttelettes. Les conditions optimales de transmission par aérosol sont un air sec et froid, condition fréquemment rencontrée l'hiver dans les pays tempérés. La transmissibilité est significativement réduite en milieu humide. On remarque également qu'un air froid est plus difficile à saturer en eau, ce qui renforce la transmissibilité quand les températures baissent. La proximité sociale et les systèmes de traitement de l'air (climatisations) jouent également un rôle dans la transmission hivernale.

Le virus B est bien adapté à l'homme. L'épidémie est répétitive chaque année, avec un taux d'attaque élevé et une faible mortalité. L'absence de réservoir animal pour le type B confère une relative stabilité dans le temps au virus.

Au contraire, le virus A est caractérisé par un fort taux de mutation épidémique, avec des « cassures » antigéniques et des changements d'espèces au gré des interactions de nouveaux virus animaux avec l'être humain. Ce phénomène est responsable de pandémies grippales répétitives, tous les 10-20 ans depuis un siècle (1918, 1956-57, 1968, 2019).

La transmissibilité du virus est importante sans être un record en la matière. Le « R0 » est l'indice exprimant le nombre de contaminations par chaque individu infecté, on établit que la grippe saisonnière a un R0 de 1,3 à 1,7 en moyenne ; très loin de la rougeole par exemple (R0 de 10 à 15).

Il est difficile d'établir des chiffres précis de l'incidence des cas d'infections grippales car le diagnostic microbiologique n'est pas systématique, les formes paucisymptomatiques étant banalisées et ne donnant pas forcément lieu à un suivi médical dans les pays riches. Les pays pauvres n'ayant eux pas les moyens d'identifier la grippe initiale lors d'une surinfection bactérienne.

Globalement, on estime à 900 000 le nombre d'hospitalisations d'enfants de moins de cinq ans par an (Nair et al. 2011), pour un total de 90 millions d'épisodes infectieux (probablement sous-estimé (Alchikh et al. 2019)), dont 20 millions d'infections pulmonaires profondes et 1 million d'infections sévères. Dans ces études, 93 à 97% des cas d'infections profondes ou sévères ont lieu dans les pays en voie de développement.

En France, la grippe symptomatique concerne chaque année 2 à 8 millions de personnes, dont 15% ont moins de 5 ans, et 15% entre 5 et 9 ans. L'impact en pédiatrie est important, mais il y a très peu de décès dans cette tranche d'âge.

Le cout économique de la grippe est estimé à 65 euros par épisode (Federici et al. 2018), en moyenne (amplitude de 13 à 365 euros par épisode selon les pays), ce qui représente une charge de 120 à 520 millions d'euros par an en France ...

2.3 Écologie

Les principaux réservoirs des virus grippaux sont les oiseaux aquatiques de l'ordre des ansériformes (canards, oies, cygnes), dont certains sont migrateurs. Leur infection est asymptomatique, et le virus se réplique dans le tractus gastro-intestinal, assurant une contamination oro-fécale entre les espèces. Il est probable que les jeunes oiseaux domestiques s'infectent dans des lacs contaminés lors des migrations (Yoon, Webby, and Webster 2014). Plus au contact de l'humain, les volailles peuvent être secondairement infectées par ces oiseaux, notamment lors des migrations, avec parfois des survenues de réassortiments génétiques. L'infection peut devenir symptomatique (avec alors des pertes économiques importantes pour l'activité humaine) ou rester asymptomatique (Guan et al. 2004). L'infection symptomatique peut persister lors de l'exposition des volailles sur les marchés aux animaux, lieu de promiscuité où le virus peut diffuser, voire passer chez l'humain. La place des porcs comme hôte intermédiaire – c'est-à-dire premier lieu de passage des oiseaux aux mammifères – avant la transmission à l'homme a pu être étudiée : c'est ainsi que la pandémie de grippe porcine est survenue en 2009 (Peiris, Poon, and Guan 2009).

Ces interactions au niveau du réservoir animal sont l'occasion de réassortiments. Du fait de la proximité entre humains et animaux domestiques, de la promiscuité des lieux de ventes et d'élevage et de la mondialisation globale, la crainte d'une épidémie devenant pandémie devient de plus en plus importante. D'autres exemples de petites épidémies, circonscrites au niveau local car insuffisamment pathogènes (ou au contraire trop pathogènes pour être diffusées avant la mort de l'hôte) se sont déjà produites ces dernières années : H5N1 à Hong-kong en 1997 (18 contaminés, 6 morts avant fermeture des marchés et abattage des volailles) – virus réapparu en Chine en 2003 d'où il a essaimé dans le monde (850 cas avec une mortalité de 53%) (Webster et al. 2006). H7N9 en 2013 en Chine, 790 infectés

avec 41% de taux de mortalité. H9N2, H7N7, H5N6 sous forme de petites épidémies locales, vite circonscrites (Li et al. 2016; Gao et al. 2013). Il y a par ailleurs probablement beaucoup d'autres réassortiments causant des infections asymptomatiques.

La crainte autour du risque d'une pandémie massive survenue sur ce genre de phénomène pousse les gouvernements à se préparer au mieux – mais tant que la problématique de la proximité intense avec des espèces d'élevage et des marchés de gros dans les pays asiatiques ne sera pas résolue, nous serons à la merci d'un événement viral pandémique, grippal ou autre.

2.4 Manifestations cliniques

La grippe typique a une courte durée d'incubation, autour de 3 jours. La symptomatologie initiale se concentre sur les signes généraux : fièvre, asthénie, malaise, myalgie, céphalées. Après quelques jours, des signes respiratoires apparaissent : rhinorrhée, toux, maux de gorge, congestion nasale. Ils deviennent de plus en plus importants au fur et à mesure que les signes généraux s'estompent. La toux peut persister jusqu'à quelques semaines le temps de la guérison (Leung et al. 2014).

Chez l'enfant, les signes respiratoires peuvent être minimes, voire absents. Ils sont volontiers remplacés par des signes digestifs (vomissements, diarrhées), et ce d'autant plus que l'enfant est jeune (moins de cinq ans, et à fortiori moins de deux ans). Dans certains cas, ces signes digestifs peuvent être les seuls présents dans le cadre d'une authentique grippe. Chez le nouveau-né, en revanche, on a une présentation plutôt septique, avec parfois des apnées centrales. Globalement, en pédiatrie, 5 à 30% des infections grippales sont asymptomatiques (Patrozou and Mermel 2009).

Plusieurs complications peuvent survenir.

L'élévation transitoire des transaminases est fréquente dans la grippe, et sans signification clinique. Cependant, en présence de dérivés salicylés (aspirine), le risque d'un syndrome de Reye, défaillance hépatique mortelle, est réel. Ce qui contraindique l'usage de ce médicament en cas de suspicion de grippe. Par précaution, les AINS sont également déconseillés, malgré une automédication importante. La survenue des syndromes de Reye a considérablement diminué depuis ces recommandations (Halpin et al. 1982).

Une myosite est fréquente, pouvant aller dans certains cas jusqu'à la rhabdomyolyse sévère avec insuffisance rénale, en particulier dans les périodes de convalescence. Des myocardites grippales ont également été décrites (Ukimura et al. 2010).

Des complications neurologiques sont fréquentes en pédiatrie. La plus banale étant la crise convulsive hyperthermique, sans qu'il soit clairement établi si c'est le virus en lui-même qui cause la crise ou l'hyperthermie associée sur un terrain génétique prédisposé – possiblement les deux (Wilking et al.

2014). Des encéphalopathies grippales ont été décrites, allant de troubles du comportement à des comas sévères avec nécrose thalamique. L'incidence de ces complications semble dépendre à la fois de la souche circulante (toutes les années étant différentes) et de terrains génétiques de populations spécifiques (au Japon vers la fin des années 90, par exemple) (Ichiyama et al. 2003).

Les complications pulmonaires sont complexes à investiguer. Des infections secondaires bactériennes peuvent être responsables d'un fort taux de mortalité, en particulier à l'ère pré vaccinale et dans les pays en voie de développement. Mais cette approche est biaisée par le manque de tests diagnostiques. Un des derniers exemples en date, la pandémie H1N1 de 2009 a montré un fort taux de pneumonies authentiquement virales, sans surinfection bactérienne, régulièrement mortelle chez des sujets jeunes et en bonne santé. Cela dépend là encore probablement de la souche et de ses facteurs de virulence, mais la possibilité de formes sévères virales pures n'est pas à négliger, notamment par des mécanismes de réponses immunes exagérées (Monsalvo et al. 2011).

2.5 Vaccins et prévention

2.5.1 *Historique*

Le premier vaccin disponible historiquement était un vaccin contre la grippe A, administré en 1943 aux forces armées américaines, puis commercialisé en 1945 (McCullers and Huber 2012). Puis des vaccins combinés sont apparus, trivalent A en 1947. Les vaccins inactivés sont apparus en 1960, avec l'objectif de réduire notamment les effets indésirables en pédiatrie, convulsions fébriles surtout (Huber 2014), avec diverses souches. La réémergence d'une souche H1N1 en 1977 a conduit à l'utilisation d'un vaccin trivalent B / H1N1 / H3N2 dès 1978. La divergence de la grippe B en deux souches dans les années 80 a posé le problème du choix de la souche B à intégrer dans le vaccin chaque année : le choix de la mauvaise souche B pouvait réduire l'immunogénicité globale du vaccin (McCullers, Saito, and Iverson 2004). Ce problème a été résolu en 2012 avec l'emploi d'un vaccin quadrivalent contenant les deux souches B (lignées Yamagata et Victoria) et les deux souches A (H1N1 et H3N2).

2.5.2 *Sélection des souches*

Un comité international se réunit deux fois par an (février pour l'hémisphère nord et septembre pour l'hémisphère sud) sous l'égide de l'OMS. Les experts analysent les souches actuellement circulantes dans l'autre hémisphère, les données épidémiologiques, les caractéristiques génétiques (réarrangements, mutations connues) afin de tenter de prédire la souche qui sera circulante pour la prochaine épidémie. D'autres paramètres comme la capacité de culture sur œufs sont analysés. En effet, comme il faut 5 à 8 mois pour produire un vaccin à partir de l'identification de la souche, une souche difficile à cultiver ne pourrait pas être mise sur le marché (Uscher-Pines et al. 2008). Après

validation, les centres experts synthétisent par ingénierie génétique inverse des virus de culture sur œufs qui présentent les caractéristiques antigéniques (HA et NA notamment) requises. Chaque pays est libre ensuite d'utiliser ces souches ou de les modifier en cas de désaccord avec l'OMS. A ce jour, 7 épidémies sur 10 ont été correctement prédites par les experts, avec un vaccin efficace. Mais des réarrangements de dernière minute sont toujours possibles et l'efficacité du vaccin n'est jamais certaine pour l'ensemble des souches du virus A.

2.5.3 Immunogénicité

A ce jour, le mode de fonctionnement vaccinal se concentre sur une fixation sur l'hémagglutinine. Le titre d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est le marqueur reconnu de l'efficacité vaccinale en comparaison des vaccins, un titre de plus de 40 étant nécessaire pour la mise sur le marché.

2.5.4 Vaccination pédiatrique

La vaccination pédiatrique est recommandée dans la plupart de pays développés. En France, les recommandations se concentrent sur les enfants fragiles (asthmatiques, maladie chronique) tandis que d'autres pays vaccinent en population générale. La couverture vaccinale, de façon globale tout d'abord, mais plus spécifiquement pour la grippe reste mauvaise en France. On peut regretter que la grippe n'ait pas été concerné par la récente réforme sur l'obligation vaccinale.

Le vaccin est aujourd'hui très sûr en pédiatrie. Des débats ont émergé sur la crainte d'un surrisque de Guillain-Barré ou d'autres maladies inflammatoires, cependant la grippe étant par elle-même pourvoyeuse d'un grand nombre de pathologie de ce type, il s'avère que vacciner réduit plutôt le risque de façon globale. Les complications les plus sévères sont les convulsions fébriles, mais là encore vacciner semble plutôt protéger contre le risque (Halsey et al. 2015).

L'immunogénicité est en revanche faible dans les premières années de vie. Pour retrouver une efficacité, il faut soit des vaccinations tous les ans, soit un antécédent d'infection. Dans tous les cas, il faut doubler la première dose si elle est faite avant 3 ans.

3 RSV

Le RSV (Virus Respiratoire Syncytial) est un des pathogène respiratoire majeur en pédiatrie, responsable chaque année d'une vague épidémique hivernale de bronchiolite aiguë du nourrisson, une pathologie très spécifique, dont la pathogénie est bien connue maintenant. Mais le RSV est aussi un agent important de pneumonies et d'infections respiratoires basses au sens large. La recherche sur un vaccin est très active, et depuis longtemps, mais n'a toujours pas abouti.

3.1 Historique

En 1956, Morris étudie des rhumes et des infections respiratoires hautes chez les chimpanzés (Morris, Blount, and Savage 1956). Il isole alors un virus qu'il nomme CCA (« *Chimpanzee Coryza Agent* »). Après avoir identifié un taux d'attaque de 100% chez 14 singes par sérologie, et donc une transmissibilité importante, Morris décide de tester également son personnel et a la surprise de découvrir qu'un de ses techniciens possède des anticorps contre ce virus que l'on imaginait ne pas concerner les humains.

L'origine humaine de ce virus est finalement confirmée un an après (Chanock, Roizman, and Myers 1957). Il est détecté dans des sécrétions respiratoires de nourrissons hospitalisés pour bronchopneumonie. Cependant, le lien pathophysiologique entre le virus et l'infection n'est pas encore fait à ce stade. Chanock propose de renommer cette souche virale en RSV (Respiratory Syncytial Virus) en raison de l'effet cytopathique du virus *in vitro* faisant apparaître de grandes cellules multinucléées, rassemblées par la protéine de fusion du virus que l'on appelle syncytium.

3.2 Microbiologie

Le RSV, un *Orthopneumovirus*, appartient à la famille des *Pneumoviridae*. C'est un virus enveloppé à ARN monobrin de polarité négative. Son génome (15 200 paires de bases) a maintenant été entièrement séquencé. (Collins and Graham 2008).

Cinq protéines du RSV jouent un rôle dans la structure de la nucléocapside ou dans la synthèse d'ARN. La protéine N de la nucléocapside encapsule l'ARN génomique avec un intermédiaire de réplication en sens inverse, ce qui conduit à une plus grande difficulté d'identification par les TLR de l'hôte. Les protéines L (Large) et P (Phosphoprotein) participent respectivement à la structure et à la synthèse de l'ARN. Les protéines M2-1 et M2-2 participent à la transcription.

Quatre autres protéines du virus sont associées à la couche lipidique pour former l'enveloppe du virus. La protéine M (Matrix) joue un rôle essentiel dans la structure. La protéine G (Glycosylated) et F (Fusion), ainsi que la SH (Small Hydrophobic) sont des glycoprotéines de surfaces transmembranaires. Les protéines G et F sont d'une importance particulière, car ce sont les deux cibles exclusives de la réponse antigénique humaine.

La protéine G, la plus grosse, est responsable de l'attachement du virion à la cellule hôte. Contrairement aux autres paramyxovirus, elle n'utilise pas d'hémagglutinine ou de neuraminidase. La protéine F permet la pénétration du virus dans la cellule en fusionnant sa membrane avec celle de la cellule cible pour former des syncytia.

D'autres protéines NS1 et NS2 ne semblent pas jouer de rôle particulier et être des reliquats de l'évolution avec peut-être une modulation et une régulation modérée de la réponse infectieuse.

Il existe plusieurs souches de RSV, dont l'impact sur la sévérité de la maladie a été questionné (Anderson et al. 1991). Les types A et B diffèrent notamment par la nature antigénique des protéines G et N. Ces souches co-circulent généralement, et il n'a pas été clairement mis en évidence de différence de prédominance de l'une ou de l'autre.

Il existe bien sur des variants animaux du RSV (de la souris, des bovins, des furets). Les chats et les chiens domestiques disposent d'anticorps anti-RSV sans que l'explication à ce phénomène ne soit très claire. Le RSV humain peut infecter les primates, des bébés babouins pouvant déclarer la maladie et en décéder. A ce jour, on considère toutefois qu'il n'y a pas de réservoir animal du virus humain.

3.3 Épidémiologie

Le RSV est responsable de 33,1 millions d'infections des voies respiratoires de l'enfant de moins de 5 ans dans le monde (Shi et al. 2017), avec trois millions d'hospitalisations (9,6% des cas) et 60 000 morts (1,8% des hospitalisations). Il s'agit donc d'un virus majeur dans le cadre des infections des voies respiratoires basses de l'enfant.

On estime qu'environ 70% des enfants ont contracté le RSV à la date de leur premier anniversaire, et que pratiquement tous l'ont rencontré à deux ans (Glezen et al. 1986).

Le RSV est ubiquitaire, atteignant toutes les zones de la planète. Cependant, il a une activité saisonnière et la répartition de l'infection sur l'année diffère selon les zones géographiques.

Dans les zones tempérées, l'activité du RSV est essentiellement hivernale, avec des pics infectieux très intenses et d'une durée globale de 13 à 23 semaines en moyenne. Dans les zones équatoriales, l'activité du RSV est continue, mais on remarque que celle-ci est majorée lors des épisodes plus froids, même si la température absolue reste élevée par rapport aux zones tempérées.

Ces observations sont en faveur d'une interaction forte de l'activité du RSV avec les conditions météorologiques (Welliver 2009). Cependant, les données sont difficiles d'interprétation, avec des modèles qui se complexifient au gré des paramètres nécessaires à la compréhension (température moyenne, point de rosée, humidité absolue et relative, rayonnement ultraviolet, précipitation ...). Ces problématiques sont renforcées par le fait que les conditions météorologiques peuvent également influencer directement les comportements humains : un temps plus froid et pluvieux incite les gens à rester dans des espaces clos, où les virus se transmettent mieux.

La raison de cette répartition épidémiologique est encore mal comprise, mais il y a un lien avec les comportements humains. La survenue de la grippe H1N1 en 2009 et 2011 (Yang et al. 2015) a entraîné

une majoration des gestes barrières dans la population et l'épidémie de RSV a été très modeste ces années-là.

3.4 Manifestations cliniques

La première rencontre de l'enfant avec le RSV est habituellement symptomatique, mais l'intensité de ces symptômes varie de la simple rhinite sans fièvre jusqu'à la forme typique de bronchiolite ou de pneumonie, parfois sévère.

La bronchiolite, dans sa forme typique épidémique des pays tempérés du nourrisson de moins de 12 à 18 mois (deux ans en France) est caractérisée par une détresse respiratoire sifflante secondaire à une atteinte des voies respiratoires hautes. Le tableau associe une obstruction nasale haute à une atteinte profonde extrêmement distale des petites bronchioles, juste avant l'alvéole dans l'arbre respiratoire, ce qui complique les échanges gazeux (Hall, Hall, and Speers 1979). L'atteinte peut être diffuse ou segmentaire, mais la conséquence clinique en est une augmentation du travail respiratoire, parfois très importante pouvant avoir un retentissement sur l'alimentation du l'enfant. Après quelques jours, certains enfants « s'épuisent » et arrêtent de forcer pour respirer, ce qui conduit à une hypoxie, une hypercapnie, une narcose et peut conduire au décès. A ce stade, un support ventilatoire, dont l'objectif n'est que de « soulager » l'enfant, s'avère nécessaire.

La bronchiolite dure en moyenne 3 à 5 jours avant une amélioration spontanée. La fièvre est inconstante. Le meilleur traitement dans la population générale est en réalité la désobstruction rhinopharyngée car, en débloquent les voies respiratoires hautes (sans aucun effet sur les bronchioles), elle permet de diminuer les efforts respiratoires globaux et redonne à l'enfant la liberté de respirer avec moins d'efforts, ce qui lui permet le plus souvent de « passer le cap » sans avoir besoin d'un soutien ventilatoire.

La pneumonie virale à RSV et la bronchiolite « clinique » sont en réalité fortement intriquées et indiscernables cliniquement ou radiologiquement. La différence entre ces deux entités repose en fait sur l'anatomopathologie et n'est évidemment jamais disponible en pratique. De fait, la majorité des infections à RSV de l'enfant sont en fait l'atteinte pulmonaire globale et polymorphe de zones d'inflammation bronchiolaires avec de vastes plages d'atteintes alvéolaires ou interstitielles aggravant la difficulté des échanges gazeux. Séparer ces deux entités n'a probablement pas de sens ni en termes de prédiction d'évolution ni en termes de prise en charge.

Des complications de l'infection respiratoire à RSV sont fréquemment rencontrées. Les apnées, d'origine centrale et non secondaires à des troubles hypoxiques ou hypercapniques, sont particulièrement bien décrites (Ralston and Hill 2009). Touchant plus fréquemment les anciens

prématurés et les très jeunes enfants (moins de trois mois), elles peuvent survenir avant même l'apparition d'une détresse respiratoire et requièrent une surveillance hospitalière continue car elles peuvent être responsables de mort subite.

Les complications les plus fréquentes restent cependant les surinfections (Nair et al. 2010). Dans les pays en voie de développement, les surinfections bactériennes (pneumocoques) sont les plus redoutables. Cependant les surinfections et co-infections virales sont bien plus fréquentes (Mansbach et al. 2012), mais leur interprétation reste encore difficile (Asner et al. 2014; Cebey-López et al. 2016).

3.5 Pathophysiologie des infections à RSV

3.5.1 *Vue globale*

Les atteintes anatomopathologiques retrouvées chez les enfants décédés d'infection à RSV (Johnson et al. 2007) sont des infiltrations mononucléaires péri bronchiolaires, des nécroses de l'épithélium des petites voies aériennes, une hyperinflation avec des zones d'atélectasies notamment secondaire à une obstruction des voies distales par des cellules épithéliales nécrosées, de la fibrine et des leucocytes altérés. Le déroulé de survenue de ces manifestations est linéaire et progressif (Visscher and Myers 2006). L'inflammation débute sur les bronchioles (75-200 μm de diamètre). L'infiltration macrophagique et l'œdème en résultant sont responsables d'une obstruction luminale, puis d'une nécrose épithéliale, rajoutant de la gêne à la circulation des gaz dissous. La présence de ce matériel nécrotique, puis secondairement de pus, est responsable d'un « trapping », d'un piégeage de l'air en pression, aggravé à chaque cycle inspiratoire par un mécanisme de valve qui se met en place. L'hyperinflation ainsi en place, la résistance globale des voies aériennes augmente, compliquant le travail respiratoire de l'enfant. Des zones d'atélectasie apparaissent alors et la situation s'aggrave jusqu'au contrôle immunologique de l'infection.

3.5.2 *Immunité innée*

La protéine G du RSV s'attache aux cellules épithéliales de surface, mais c'est la protéine F qui déclenche l'activation des cellules présentatrices d'antigènes (macrophages, cellules dendritiques) à travers sa reconnaissance par TLR-4. Cela déclenche la cascade inflammatoire par des cytokines (IF- α , IF- β , IF- γ et diverses interleukines), mécanisme partiellement contrôlé par les protéines NS1 et NS2 du RSV. Se fait ensuite l'afflux de PNN, cellules NK, CD4+ et CD8+. Sous l'influence d'IF- γ et IL-12, un mécanisme TH-1 se met en place, avec un mécanisme TH-2 en parallèle en réponse à IL-4 et IL-13. La réponse TH-2 est responsable d'une sécrétion d'IgE et d'éosinophiles.

S'il est séduisant de considérer que ce mécanisme TH2 pourrait être responsable du lien que l'on fait entre répétition de bronchiolites dans l'enfance et apparition d'un asthme chez l'enfant, aucune donnée n'a pu confirmer ce lien à ce jour (Giuffrida et al. 2014).

En outre, le profil de réponse cytokinique varie d'une personne à l'autre, expliquant les différences de sévérité de la maladie entre enfants par ailleurs sains. Une réponse cytokinique particulièrement forte semble corrélée à une infection bien moins sévère (Bennett et al. 2007).

3.5.3 Réponse lymphocytaire B

Après une infection à RSV, les enfants développent des anticorps contre plusieurs cibles antigéniques spécifiques, les plus importants étant dirigés contre les protéines G et F. Ce sont des anticorps neutralisants et ils sont sécrétés quelle que soit l'intensité de l'épisode viral (Welliver et al. 1980). Ils sont cependant moins présents lorsque l'infection a lieu dans les 6 premiers mois de la vie ou lorsque la mère dispose de taux d'anticorps élevé qu'elle transmet par immunité passive. Dans tous les cas, la primo-infection est associée à une relativement faible réponse immune, qui sera amplifiée au gré des réinfections secondaires les hivers suivants (Wagner et al. 1989). Le titre d'anticorps devient parfois indétectable chez l'adulte, et la sensibilité de la personne âgée au RSV est un sujet de recherche actuellement très en pointe.

Des anticorps de classe IgA sont retrouvés dans la muqueuse nasale pendant la durée d'une infection et semblent disparaître avec le virus. Des anticorps de classe IgE sont retrouvés chez certains enfants dans la muqueuse nasale pendant l'infection, et leur présence en quantité serait corrélée au risque ultérieur de maladie asthmatique ultérieure (Welliver et al. 1981).

3.5.4 Réponse lymphocytaire T

Le RSV, quand il est mis en contact in vitro avec des cellules lymphocytaires, inhibe la croissance des lymphocytes T (Munir et al. 2011). Cela est probablement en relation avec la protéine NS1 qui module la réponse immunitaire, comme déjà vu plus haut.

In vivo, toutefois, la résultante globale d'une infection à RSV est la stimulation d'une production de lymphocytes T, soit par la voie TH1, qui semble plus adaptée à la réponse immune, soit par la voie TH2 qui pourrait être associée à un surrisque d'hypersensibilité allergique secondaire, sans que cela ne soit prouvé à ce jour. Ces réponses sont cependant globalement assez faibles en termes d'intensité chez l'enfant humain (Mbawuiké et al. 2001).

Il est intéressant de noter que dans les cas d'infection les plus sévères, la réponse T disparaît complètement (Welliver 2008; Welliver et al. 2007). Cela est en faveur de l'hypothèse voulant que la bronchiolite aiguë du nourrisson soit plus une maladie de l'incompétence encore naïve d'un système

immunitaire immature plutôt que d'une dérégulation cytokinique causée par le virus lui-même. La réapparition de ce virus à l'autre extrême de la vie, lors de la sénescence immunologique, est également en faveur de cette hypothèse.

3.6 Vaccin et prévention

3.6.1 Immunoprophylaxie

En 1998 a été mis sur le marché un anticorps monoclonal anti-RSV, le pavalizumab, qui cible une fraction hautement conservée de la protéine F. Basé sur un anticorps de souris modifié, ce médicament a été testé en prophylaxie dans une vaste étude randomisée (The IMpact-RSV Study Group 1998) avec des taux de succès très importants, réduisant de 55% le taux d'hospitalisation versus placebo. Le pavalizumab agit en bloquant la modification de conformation de la protéine F lorsqu'elle tente de faire fusionner les membranes de la cellule et du virus. Ce médicament est aujourd'hui recommandé à tous les enfants fragiles en prophylaxie dans différents pays du monde, malgré un coût élevé et la nécessité de répéter l'injection tous les mois pendant la saison hivernale. Des premiers cas de résistance ont été décrits *in vitro*, et retrouvés chez certains enfants en situation d'échec de prévention, mais il s'agit d'un nombre de cas faible et cela ne semble pas avoir de traduction épidémiologique à ce jour (Zhu et al. 2011).

Un second anticorps monoclonal a été étudié, le motavizumab, aussi efficace que le pavalizumab, mais qui aurait été responsable de réactions d'hypersensibilité. Il n'a jamais été mis sur le marché. La recherche se poursuit vers d'autres anticorps monoclonaux, avec en particulier une durée de vie plus longue.

3.6.2 Vaccination

A ce jour, aucun vaccin n'est disponible en pratique clinique. Mais la recherche autour d'un vaccin est actuellement très active. En effet, l'immunoprophylaxie est très utile à l'échelle individuelle pour certains enfants fragiles (prématurés, maladie chronique), mais elle s'avère sans impact en pratique sur l'ampleur de l'épidémie. Permettre une immunisation de la population serait nécessaire pour casser cette dynamique hivernale.

Les premiers essais vaccinaux datent de 1967, avec des vaccins inactivés. Ils ont été un échec, avec une hospitalisation plus fréquente (80% des enfants vaccinés) et une surmortalité (Kapikian et al. 1969). Cela a été mis sur le compte d'un blocage de la voie TH1, mais c'est une suractivité TH2 (CD4+ spécifiques) qui serait responsable de la surmortalité (Kim et al. 1969). Cela a mis en exergue la

nécessité de conduire des modèles vaccinaux capables d'équilibrer les différentes voies de la réponse immunitaires, compliquant considérablement le processus.

Une première piste de recherche a été l'immunisation maternelle en fin de grossesse afin de rallonger la durée de l'immunisation passive après la naissance. Cela ne résout cependant pas le problème de la fragilité excessive des prématurés, le transfert d'anticorps ayant surtout lieu en fin de grossesse.

Des vaccins protéiques ont été expérimentés, principalement à partir d'une forme purifiée de la protéine F (PFP 1-3), sans succès à ce jour malgré des premiers résultats encourageants (Paradiso et al. 1994), probablement en raison d'une sécrétion appropriée d'IgG, mais d'une absence d'IgA muqueuses ...

D'autres technologies vaccinales sont en cours d'étude. Des vaccins à plasmide ADN semblent n'avoir que peu d'efficacité (Li et al. 1998). De même que les vaccins à vecteurs viraux (virus Sendai, adénovirus, parainfluenza). De nouveaux adjuvants, moins stimulants pour TH2 sont actuellement en développement. Des vaccins à base de nanoparticules semblent beaucoup plus prometteurs (Lee et al. 2015). Un de ces vaccins est actuellement en phase 3, mais aucune mise sur le marché n'est attendue avant au moins 5 à 10 ans ...

4 Entérovirus & Rhinovirus

4.1 Introduction

« Les entérovirus » reflète la dénomination médico-biologique d'une vaste catégorie de virus appartenant à la famille des *Picornaviridae*. Ils sont caractérisés par des infections humaines multiples, allant du système nerveux central (le poliovirus, d'une importance historique majeure), d'atteinte ORL (herpangine), cardiaque (cardiovirus, ou virus Saffold) et respiratoire (certains entérovirus, notamment D68 récemment) pour ce qui nous intéresse ici. La classification taxonomique est complexe (Maël et al. 2018). Ces virus sont très répandus.

4.2 Classification, historique et taxonomie.

Historiquement, le poliovirus a été le premier virus identifié. Responsable de la poliomyélite, dont on retrouve des traces dans l'Égypte ancienne (Chastel 2004), il a été isolé en 1909 et cultivé en 1949, ouvrant la voie à un vaccin (Enders, Weller, and Robbins 1949).

Les premiers coxsackievirus ont été isolé – dans le village de Cocksackie dans l'état de New York – en 1948 chez des enfants suspects de poliomyélite. Ils ont été rapidement divisés en coxsackievirus A et B avec des profils cliniques et sérologiques un peu différents.

Enfin, les écovirus ont été identifiés de manière non intentionnelle par l'analyse de LCS d'enfants atteints de poliomyélite non paralytique. Non reliés à une maladie bien précise donc « orphelins », ils ont reçu ce terme qui est un acronyme (*Enteric Cytopathic Human Orphan viruses*).

La classification à ce stade était sérotypique. Si un sérum identifié neutralisait le virus, alors on identifiait ainsi la souche. Si aucun sérum ne le neutralisait, alors il s'agissait d'une nouvelle souche, que l'on nommait et contre lequel un sérum spécifique était créé.

Ces virus ont été regroupés sous le terme entérovirus en raison de leur proximité physicochimiques : ils sont tous résistants en milieu acide, denses en chlorure de césium et se multiplient dans le tractus digestif de l'hôte (la résistance acide aidant à franchir l'estomac).

Les choses se sont complexifiées au gré de la découverte de nouveaux virus. Certains sérotypes passaient outre les définitions initiales ; des sérotypes identiques sont responsables de maladies très différentes, alors que des sérotypes très différents peuvent causer le même tableau clinique typique (l'herpangine, par exemple). Vers les années 70, cette distinction taxonomique par sérotype a été abandonnée. Les nouveaux entérovirus découverts ont été simplement nommés par numéro successifs. Soixante-sept sérotypes ayant déjà été définies, on commença la numérotation avec l'entérovirus 68. Dans un souci de cohérence, l'ancienne nomenclature continua toutefois à être utilisée en pratique biologique courante. L'attribution des nouveaux numéros se fait sous l'égide d'une commission centralisée à l'ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*).

Parallèlement, de nouveaux picornavirus ont été identifiés, les rhinovirus. Il s'agit de virus très proche des entérovirus connus à cette époque, mais plus adaptés aux voies respiratoires, avec une température de prolifération optimale à 33°C au lieu de 37°C et une absence de résistance aux pH acides. Un genre distinct des Entérovirus, les Rhinovirus fut alors créé, qui fut abandonné plus tard.

En raison d'une complexification de plus en plus grande au gré des nouvelles découvertes de virus, il fut bientôt trop compliqué pour les laboratoires d'identifier les nouvelles souches – la méthode de séroneutralisation nécessitant de tester chaque sérum déjà connu contre le nouveau candidat virus – au profit d'une analyse par génotypage.

Le typage moléculaire est maintenant la norme. Afin de préserver une cohérence entre les sérogroupes et l'analyse génomique, il fut décidé de classer les virus en fonction de la portion conservée de la capsid, VP1, commune à tous ces virus et dont la variabilité était pour partie responsable de la variabilité sérotypique (Oberste et al. 1999).

Une nouvelle classification émergea, séparant les entérovirus en espèces désignées par des lettres. Les entérovirus humains sont les entérovirus A à D (il en existe jusqu'à « L »). Les poliovirus sont répartis dans les Entérovirus C, les coxsackievirus dans les B principalement, mais aussi pour certains dans les

A et C, les échovirus dans les B, etc ... Cette classification a permis de regrouper certaines souches très proches (A11 et A15 par exemple)

Par ailleurs, les Rhinovirus disparurent en tant que groupe individualisé au côté des entérovirus pour devenir des sous catégories d'entérovirus, nommé Rhinovirus A B et C, aux côtés des entérovirus A à D, en raison de leur proximité génomique. Cela induit des changements de groupes parfois compliqués pour les non spécialistes, comme une souche de rhinovirus initialement classifié comme telle avant que l'on ne s'aperçoive qu'il s'agissait génétiquement d'un entérovirus D68 ...

Cette nouvelle classification pose encore d'autres soucis, notamment en raison de l'absence de pertinence clinique de cette classification qui n'est que biologique, en particulier pour prédire l'évolution vers la sévérité d'une infection. De nombreux travaux restent à mener dans cette thématique.

4.3 Microbiologie

Les entérovirus sont des virus à ARN, nus c'est-à-dire en contact avec l'extérieur par une capsid icosaédrique (20 faces triangulaires).

La reconnaissance cellulaire se fait à travers des protéines d'attachement différentes selon l'espèce (des intégrines ou des protéines *immunoglobulin-like*). Après relargage du génome viral, l'ARN positif (5' -> 3') se comporte comme un ARN messager et va induire la constitution d'un polypeptide unique, qui contient 3 domaines, P1 à P3 qui seront clivés en trois à quatre protéines chacun. Le domaine P1 va donner les protéines de capsides, VP0, VP1 et VP3 qui seront utilisées pour encapsider les nouveaux ARN messagers synthétisés par la cellule infectée. P2 et P3 donnent lieu d'abord aux protéines de synthèse diverses (2A, 3C, etc ...) qui vont restructurer VP0, VP1 et VP3 (l'assemblage de ces 3 peptides donnant une conformation en triangle, dont vingt sont ensuite regroupés pour faire l'icosaèdre). P2 et P3 donneront également les protéines de réplication qui vont induire la synthèse de nouveaux ARN messagers viraux avant leur encapsidation dans l'icosaèdre (van der Linden, Wolthers, and van Kuppeveld 2015).

L'excrétion virale se fait dans la majorité des cas par lyse de la cellule hôte, une fois l'ensemble de ses ressources épuisées, de façon très rapide (5 à 10 heures). Certains auteurs ont cependant identifié des voies de libération sans lyse cellulaire, notamment par empaquetage dans des clusters lipidiques (Chen, Du, et al. 2015).

4.4 Pathophysiologie

Après infection, 90% des cas sont asymptomatiques, ou tellement paucisymptomatique qu'ils ne donnent pas lieu à une consultation médicale. Quatre à huit pourcents des sujets font une maladie bénigne, avec un pic à J5 qui ne donne pas forcément lieu non plus à une consultation. En revanche, 1 à 2% des cas font une maladie bénigne à J5, puis une deuxième maladie plus sévère à J10-J15, respiratoire ou neurologique. Les anticorps neutralisants post infections persistent à vie.

Globalement (Zhang, Li, and Li 2018), les entérovirus interagissent avec les TLR 1,2,4,5,6, l'IL-17, les IFN de type I et III. La reconnaissance cellulaire habituelle se met en place mais de nombreux moyens d'esquives existent. Les entérovirus interagissent avec la voie Th17 et NLRP3 pour diminuer fortement la réponse immunitaire. Ils diminuent également la réponse IFN, bloquent la voie des NOD et des changements de conformation de la capsid empêchent la reconnaissance du virion. L'autophagie rapide des antigènes sécrétés en dehors de la cellule empêche les cellules présentatrices d'antigène de fonctionner ... Tout ces mécanismes concourent à rendre certaines infections asymptomatiques. De nombreux mécanismes moléculaires sont à ce jour encore inconnus.

4.5 Epidémiologie

La transmission des entérovirus se fait majoritairement par voie orale et oro-fécale. Cependant une transmission gouttelette a pu être authentifiée, et elle est la voie principale dans le cas des rhinovirus. La transmission se fait également par contamination croisée à travers les surfaces, notamment en milieu de soins. Les enfants sont, comme souvent, les vecteurs privilégiés.

Contrairement aux virus à tropisme respiratoire exclusif épidémiques, les entérovirus ont un profil atypique d'épidémie printanière ou estivale. Les piscines sont notamment des lieux de contamination privilégiés (Keswick, Gerba, and Goyal 1981).

Les sérotypes dominants varient selon l'année et le lieu. Habituellement, de petites épidémies d'entérovirus ont lieu chaque année en France, en relation avec plusieurs virus différents, et la dominante est rarement la même d'une année sur l'autre.

Un paramètre important est que plus de 90% des infections à entérovirus sont considérées comme asymptomatiques. Comme illustré avec la poliomyélite, cela rend difficile, voire impossible le suivi de chaînes de contamination en cas d'épidémie. C'est également une des raisons pour laquelle le taux d'infection est extrêmement large dans la population. Pour les poliovirus, 100% des enfants avaient rencontrés le virus à l'âge de 5 ans à l'ère pré-vaccinale.

4.6 Manifestations cliniques

La majorité des infections à entérovirus sont plutôt de nature neurologiques, ORL et digestive. Les coxsackievirus sont responsables du syndrome pied-main-bouche, des herpangines et de plusieurs maladies éruptives banales de l'enfant. Il y a également des tableaux – beaucoup plus rares – d'atteinte neurologique graves avec des paralysies centrales, comme dans la poliomyélite.

Cependant, c'est un agent reconnu d'infections respiratoires, autant crises d'asthme que de pneumopathies infectieuses authentiques. Des infections à types de bronchites, bronchiolites ou pneumonies sont régulièrement observées, avec différents type (B1, B5, A16, B6, etc.). Les tableaux cliniques respiratoires sont ceux d'une pneumopathie lobaire aigue, avec condensation radiologique, fièvre, toux et difficultés respiratoires, oxygénorequérantes une fois sur deux. Une attention spécifique doit être portée à l'entérovirus D68 (voir ci-dessous).

Les rhinovirus sont également fréquemment en cause dans des tableaux de pneumonies. Ils peuvent donner des tableaux sévères, plus axés sur la détresse respiratoire (Wang et al. 2017), là où les autres entérovirus donnent une atteinte parfois très inflammatoire.

Un résultat remarquable est le taux de virémie chez les enfants porteurs de rhinovirus lors d'une PAC, qui peut dépasser 10% (Lu et al. 2017), particulièrement entre 1 et 5 ans (20%). Cela est très en faveur de l'origine virale directe de l'infection ou de l'implication de ce virus dans la pathogénie, isolément ou en co-infection. Les rhinovirus sont ainsi la première cause de décompensation d'un terrain asthmatique.

Au-delà de ça, les entérovirus et les rhinovirus sont assez fréquemment identifiés comme agent des rhinites et rhinopharyngites banales de l'enfant.

4.7 Entérovirus D68

Ce virus a été isolé en 1962 en Californie chez des enfants présentant une infection des voies respiratoires basses. Depuis 40 ans, il est régulièrement identifié comme étant à l'origine de cas sporadiques ou de petites épidémies (Schuffenecker et al. 2016). Entre 2005 et 2011, des épidémies plus importantes ont été relevées en Asie, Europe et aux USA. En 2014, une épidémie importante a impacté le Canada et les USA, et une autre l'Europe et l'Amérique du Sud.

Les caractéristiques cliniques de ces deux épidémies respiratoires (Holm-Hansen, Midgley, and Fischer 2016; Orvedahl et al. 2016; Midgley et al. 2014) ont été établi comme étant des pneumonies fébriles sévères, avec 59% des patients en soins intensifs et 28% de ventilation mécanique. Ces deux épidémies respiratoires ont été caractérisées par des complication neurologiques secondaires à type de myélite inflammatoire. Cela a donné lieu à une surveillance internationale des épidémies et de ce pathogène.

4.8 Vaccin et prévention

Outre la poliomyélite et son vaccin trivalent spécifique, qui a abouti à la quasi-disparition de cette pathologie redoutable ; des études sont très avancées en Chine avec des vaccins dirigés contre l'entérovirus A71, qui ont été approuvés par les autorités sanitaires (Zhou et al. 2016). Mais aucun autre projet n'est actuellement en cours dans les pays occidentaux.

Il est à noter l'efficacité marquée des immunoglobulines polyvalentes dans la lutte contre les infections sévères à entérovirus non-polio. Ce qui représente une possibilité thérapeutique très intéressante et une piste certaine pour la mise au point d'une sérothérapie.

Enfin, ce sont principalement les mesures d'hygiène et la surveillance des sujets fragiles qui constituent aujourd'hui l'essentiel des possibilités de prévention dans la lutte contre les infections à entérovirus et à rhinovirus.

5 Coronavirus

Les coronavirus sont un groupe de virus à l'origine d'infections respiratoires et parfois entériques. On en connaît quelques variants peu virulents, mais en 2002, en 2012 puis en 2019, des variants hautement pathogènes sont apparus, le SARS-CoV, le MERS-CoV puis le SARS-CoV-2. Les deux premiers ont donné lieu à des épidémies contrôlées, au contraire de son représentant le plus récent, le SARS-CoV-2, à l'origine de la pandémie mondiale et de la crise économique qui a suivi en 2019-2021.

5.1 Historique

Les coronavirus sont des virus de découverte récente, le premier coronavirus humain (HCoV) ayant été identifié en 1965 (Tyrrell and Bynoe 1965). Initialement, les HCoV étaient considérés comme des virus du rhume banal et possiblement de diarrhées chez la personne âgée. Ils ont été également identifiés dans des pneumonies de l'enfant. Rapidement, il est apparu qu'ils étaient d'origine animale. La souche 229E était en réalité le virus aviaire de la bronchite infectieuse (Almeida and Tyrrell 1967) et la souche OC43 celui de l'hépatite de souris, par exemple. Ils ont rapidement été nommés « coronavirus » en raison de leur aspect en microscopie électronique. La recherche sur les coronavirus a été ensuite assez ralentie à cause des difficultés de mise en culture et de leur absence d'effet cytopathique. L'émergence du SARS-CoV en 2002 et l'apparition des techniques moléculaires de diagnostic a permis une reprise de l'activité autour de ces virus. En 2004 et 2005 deux autres souches communautaires, NL63 et HKU1 ont été identifiées (Esper et al. 2005). On a identifié ainsi que NL63 et 229E ont une origine animale assez ancienne, ayant divergé il y a approximativement 1000 ans d'une souche inconnue. OC43 en revanche serait récent, ayant divergé il y a à peine une centaine d'années d'une souche bovine. SARS-

CoV aurait divergé d'un virus de chauve-souris (Forni et al. 2017). En 2012, une nouvelle épidémie a permis l'identification du MERS-CoV, virus originaire de la chauve-souris avec le dromadaire comme hôte intermédiaire (Cui, Li, and Shi 2019). Enfin, en 2019 a émergé la souche de SARS-CoV-2, responsable de la pandémie de COVID-19 et de la crise mondiale qui en a suivi a été rapidement identifié (janvier 2020), augmentant considérablement nos connaissances sur ce groupe de virus.

5.2 Microbiologie

Les coronavirus sont des virus à ARN enveloppés, de taille moyenne (80-220 nm) présentant en microscopie électronique des projections de surface de 20 nm de longueur, lui donnant son aspect en « couronne », d'où le nom du groupe. Ils sont sensibles à la chaleur, aux solvants et aux pH acides (Davies and Macnaughton 1979). Dans le virion, une nucléoprotéine N entoure l'ARN, recouvert par l'enveloppe lipidique à deux couches, qui contient deux ou trois glycoprotéines. La protéine M, de matrice, structurelle de l'enveloppe, une protéine S (« spicule ») de surface qui est à la base des excroissances ayant donné son nom cette famille, et une cible d'anticorps ; et la protéine HE (*Hemagglutinine Esterase*), inconstante. Une petite protéine E est également présente dans la membrane de certains coronavirus. Ils ont une chaîne d'ARN monocaténaire de polarité négative exceptionnellement longue (32000 paires de bases).

Les coronavirus sont classés en quatre genres, dont seuls les deux premiers comprennent les virus humains. Les alphacoronavirus regroupent les coronavirus 229E et NL63 tandis que les betacoronavirus regroupent tous les autres (SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, OC43 et HKU1).

5.3 Pathophysiologie

5.3.1 Réplication virale

La physiopathologie des coronavirus est assez bien comprise en raison de l'importance qu'ils ont pris dans le cadre d'épidémies humaines (Fung and Liu 2019).

La protéine S, dimérique, sert de molécule d'attachement par changement conformationnel de sa sous-unité S2. Selon le type de coronavirus, le récepteur d'accroche est différent. Le 229E se lie à l'aminopeptidase N, SARS-CoV, SARS-CoV-2 et NL-63 au récepteur de l'angiotensine ACE2, le MERS-CoV à la dipeptyl-peptidase 4 (DPP4) et OC43 et HK-U1 à l'acide sialique. Certains facteurs de l'hôte prédisposent ou inhibent l'entrée du matériel viral dans la cellule (Huang et al. 2011). La réplication et la transcription sont faites par un complexe spécifique (RTC), protégé lui-même par une membrane, et synthétisé à partir des premières protéines (polyprotéine 1 et suivantes) codées par le virus (van Hemert et al. 2008). Les protéines de structures (S, E, M et HE) sont codées dans le réticulum endoplasmique et assemblées dans l'appareil de Golgi par l'intermédiaire de la protéine M autour de

laquelle la conformation se fait. Finalement, les particules virales sont excrétées de la cellule par exocytose.

5.3.2 Réponse immunitaire

Des TLRs spécifiques (préférentiellement 7 et 8) sont capables de reconnaître le virus et entraînent une réponse IFN-1 (Lim et al. 2016). SARS-CoV et MERS-CoV sont capables de supprimer la réponse IFN, au contraire de 229E et surtout SARS-CoV-2 qui peuvent parfois être responsable d'un « orage cytokinique » avec un relargage massif d'IFN-1 dépassant son but. Les voies de signalisation de la réponse inflammatoire cellulaire et le stress afférent du réticulum endoplasmique, lieu d'assemblage du virion ont été identifiés (PERK, ATF6, IRE1, par exemple). Enfin, on notera que la voie d'activation NF-κB est stimulé et contrôlé par SARS-CoV et 229E.

5.4 Epidémiologie

Les coronavirus sont ubiquitaires et plus de 90% des adultes ont des anticorps spécifiques d'au moins un des quatre coronavirus communautaires. Les taux d'infection les plus élevés pour ces virus se retrouvent en fin d'hiver et au début du printemps. De petites flambées épidémiques locales peuvent être vues (Hamre and Beem 1972), y compris en néonatalogie (Sizun et al. 1995). Par ailleurs, dans une population communautaire, jusqu'à 50% des cas sérologiques peuvent être asymptomatiques (McIntosh et al. 1973).

5.5 Manifestations cliniques

La manifestation la plus fréquente est de loin le rhume banal pour les coronavirus communautaires, comptant pour jusqu'à 8 à 10% des cas d'une population pédiatrique (Mäkelä et al. 1998). Les coronavirus ont été identifiés comme agents pathogènes dans des pneumonies virales de l'enfant avec des tableaux de dyspnée sifflante. Ils étaient même les troisièmes plus fréquents après le RSV et le parainfluenza de type 3. Ils sont par ailleurs fréquemment rencontrés en co-infection lors des infections respiratoires pédiatriques hospitalisées.

Les coronavirus ont été détectés par ailleurs dans les selles lors d'épidémies de diarrhées infantiles (Risku et al. 2010), souvent en concomitance avec le norovirus ou le rotavirus, l'imputabilité des coronavirus posant question. Enfin, des cas d'atteintes neurologiques ont été décrites, comme une encéphalite à OC43 (Yeh et al. 2004) ou des polyradiculonévrites.

5.6 Coronavirus épidémiques

Récemment, trois nouvelles souches de coronavirus ont été successivement responsables d'épidémie d'infections respiratoires sévères chez l'homme, la dernière (SARS-CoV-2) étant responsable d'une pandémie massive avec une crise économique sans précédent.

5.6.1 SARS-CoV

Le SARS-CoV est un coronavirus ayant émergé en 2002 en Chine (province du Guangdong). Après quelques cas sporadiques, il a diffusé à l'occasion d'un épisode de supercontamination en février-mars 2003, à l'hôtel Métropole à Hong-Kong, puis dans toute l'Asie du sud-est et même au Canada, aux USA et en Europe. A la fin de l'épidémie en juillet 2003, le virus était responsable de 8096 contaminations et 774 morts (taux de mortalité de 9,6%) (Abdullah et al. 2003). Il s'agit d'un betacoronavirus, issu d'une mutation d'un virus de chauve-souris dont l'hôte intermédiaire reste encore inconnu à ce jour. Les enfants ont été semble-t-il très peu atteints. Dans 20% des cas pédiatriques, il s'agissait notamment d'une forme digestive (Leung et al. 2004), les autres étant des syndromes grippaux. La pneumonie a été bien plus rare que chez l'adulte.

5.6.2 MERS-CoV

Le MERS-CoV a été détecté chez un homme mort d'une pneumonie sévère en 2012 en Arabie Saoudite (Zaki et al. 2012). Par petites épidémies, il a été détecté au total dans 26 pays pour 1698 cas et 609 décès, soit un taux de mortalité de 36%. Pour la plupart, les victimes sont immunodéprimées ou fragilisées. Ce betacoronavirus aurait muté depuis une souche de chauve-souris passée au dromadaire. A noter qu'un épisode de « supercontamination » a été décrit pour la première fois chez un coronavirus à l'occasion de la survenue de l'épidémie en Corée du Sud, alors que ce virus est de transmissibilité globalement médiocre pour l'homme.

5.6.3 SARS CoV-2

En septembre 2019, des épisodes de pneumonies virales évocatrices du SARS-CoV sont survenus en Chine. L'épidémie a rapidement progressé, conduisant à la fermeture administrative totale (« confinement ») d'une vaste partie du pays, puis du pays dans son ensemble. Après une période de transition, l'épidémie a poursuivi sa progression en Europe en février 2020, puis aux USA en avril-mai, conduisant à des confinements nationaux intenses, responsables d'une des plus grave crise économique et sociale mondiale à ce jour.

Le SARS-CoV-2 a rapidement été identifié, puis son génome décrypté intégralement dès janvier 2020. Il est responsable de pneumonies sévères, touchant plutôt les personnes âgées fragile et épargnant

les enfants, comme le SARS-CoV. A l'instar du SARS-CoV et du MERS-CoV, il est responsable d'épisodes de supercontamination, mais sa transmissibilité de base est importante. Il est issu d'un virus de chauve-souris avec des réarrangements chez le pangolin, mais les conditions précises de son évolution sont encore inconnues.

En octobre 2021, l'épidémie approche les 250 millions de cas avec près de 5 000 000 morts (taux de mortalité de 2%) et continue à progresser par vagues successives. L'humanité a réagit extrêmement rapidement en synthétisant, puis en injectant plus de cinq milliards de doses de vaccin en moins d'une année, produisant un début de ralentissement de l'épidémie.

6 Adénovirus

Les adénovirus sont un groupe de virus responsables d'une grande variété de pathologies chez l'homme, principalement respiratoire et digestive. Les adénovirus comptent pour 15% des diarrhées infectieuses de l'enfant dans les pays développés, et jusqu'à 10% des pneumopathies hospitalisées, et leur impact dans les communautés de jeunes adultes – dont les militaires sont l'exemple historique – est important. Il est à noter que la recherche récente sur les adénovirus concerne assez peu les maladies qu'ils déclenchent, mais plutôt leur usage en ingénierie génétique comme vecteurs de matériel génétique (vaccins, thérapie génique, etc ...)

6.1 Historique

La première souche d'adénovirus n'a été isolée qu'en 1953, lorsque les techniques de culture cellulaire ont été affinées. Mais des descriptions cliniques se référant à une forme cliniquement pathognomonique, la kérato-conjonctivite hémorragique, ont été rapportées bien avant, à Bombay en 1901, à Madras en 1920 et 1928 (Wright 1930) ou à Hawaï en 1941 (Holzel et al. 1965). C'est en réalité chez des jeunes recrues militaires que les formes respiratoires ont été identifiées, sévissant avec un certain taux de mortalité sous la forme d'épidémies de pneumonie atypique. Les adénovirus ont d'abord été nommé AD-67 (« *adenoid degeneration* », et 67 pour la matricule de la recrue). Ce n'est qu'en 1956 que le terme « adénovirus » a été suggéré, sur la base de son effet cytopathique sur le tissu lymphoïde.

Chez les jeunes recrues militaires, l'impact des épidémies d'adénovirus a été absolument majeur. Plus de 80% des soldats étaient infectés et 20% d'entre eux nécessitaient une hospitalisation (Dudding et al. 1973). Jusqu'à 40% des soldats en formation perdaient deux semaines de présence et devaient souvent recommencer leur formation à zéro.

Depuis, des adénovirus à tropisme exclusivement digestif (type 40 et 41) ont été découverts et l'intérêt pour ces virus a glissé également vers la protection des immunodéprimés et des greffes d'organes. Leur rôle oncogène est également débattu pour certains sérotypes.

6.2 Microbiologie

Les adénovirus sont des virus de la famille des *Adenoviridae*, du genre *Mastadenovirus*. A ce jour, plus de 70 types d'adénovirus humains ont été mis en évidence, classés en sous-types identifiés par une lettre de A à G selon des propriétés chimiques (proportion de guanine et cytosine dans l'ADN). Ils sont facilement identifiables par ELISA, en raison d'un antigène de surface très conservé chez tous les adénovirus mammaliens (Lion 2014).

Les adénovirus sont des virus à ADN non enveloppés, composés d'une capside de 252 capsomères et d'un cœur nucléoprotéique contenant le matériel génétique et de deux à quatre protéines (Prager, Pettersson, and Philipson 1968). Le virion, de forme icosaédrique (soit 20 faces) est composé de multiples capsomères, dont certains, regroupés en hexamères, portent l'antigène de fixation du complément générique. D'autres capsomères sont regroupés en pentamères, voire en « fibres » qui se rattachent aux pentamères. L'ADN du virus, double brin linéaire, est encapsidé dans le cœur du virion.

L'antigène spécifique des adénovirus de mammifères, rattaché à l'exon, s'appelle « composant alpha ». Il y a d'autres antigènes spécifiques de chaque virus rattachés aux exons, notamment les composants epsilon qui distinguent les différents virus, et des antigènes spécifiques aux fibres qui servent à neutraliser le virus dans la réaction immunitaire (Valentine and Pereira 1965).

Les adénovirus sont stables dans l'environnement. Ils sont résistants aux solvants des lipides et aux pH entre 2 et 10. Ils résistent également aux ultraviolets. L'infectiosité est supprimée à 56°C pendant 30 minutes, mais dans l'environnement ils peuvent persister pendant des temps très longs.

6.3 Pathophysiologie

6.3.1 Infection des cellules

L'attachement du virus aux cellules est relativement long (jusqu'à 6h). C'est la « fibre » du virus qui initie ce mécanisme (Fields, Knipe, and Howley 2013), par l'intermédiaire d'un récepteur CAR (*Coxsackie and Adenovirus Receptor*). La pénétration dans la cellule se fait ensuite rapidement, par internalisation. L'ADN viral est relargué, puis pénètre dans le noyau où il est dissocié par des protéines internes. Huit à 24h après infection, un effet cytopathique commence à apparaître. Il prend la forme d'inclusions intranucléaires éosinophiles tout d'abord, puis plus tard d'inclusions basophiles géantes, pouvant représenter jusqu'à 10 fois la taille du noyau (Boyer et al. 1960).

6.3.2 Réponse immunitaire

La réponse immunitaire aux adénovirus est relativement connue, bien que certaines voies d'activation soient encore à préciser. Basiquement, la réponse immunitaire se fait en trois temps. L'activation initiale de l'état inflammatoire systémique passe par la voie habituelle des cytokines pro-inflammatoires IL-6, TNF- α et IL-1 β dans la circulation sanguine (Mistchenko et al. 1994). Les macrophages de l'immunité innée locaux comme systémiques jouent alors un rôle dans la diminution de la charge virale et stimulent l'activation des cellules cytotoxiques. L'attraction des cellules cytotoxiques secondaires passe par la voie IL-1 β / IL-1R1 (Kolaczowska and Kubes 2013). Enfin, les cellules infectées émettent des signaux incitant les cellules proches à se mettre en état antiviral par le relargage d'IFN de type 1 (α et β) activant un certain nombre de gènes antiviraux (Randall and Goodbourn 2008).

6.4 Epidémiologie

Les adénovirus compteraient au total pour 2 à 10% des infections respiratoires (Lynch and Kajon 2016). Les infections semblent plus fréquentes chez les enfants de moins de cinq ans, et à l'occasion de regroupement sociaux (crèches, garderies, écoles etc.). On constate aussi de nombreuses chaînes de transmission dans les piscines (probablement par voie conjonctivale).

Les nouveau-nés ont des anticorps maternels neutralisant actifs durant les six premiers mois de vie. Une infection à cet âge est sévère et souvent létale. A 6 mois, seuls 14% des enfants ont des anticorps anti-adénovirus. A un an, ce taux remonte à 44%, montrant que l'infection est fréquente (Huebner et al. 1954). A cinq ans, le taux atteint 70% et stagne ensuite chez l'enfant plus grand. Les infections à l'adolescence sont aussi fréquentes que chez l'adulte jeune. Enfin, on note des épidémies très intenses chez les recrues militaires avec une propagation majeure du virus assez fréquente, due probablement à la promiscuité et aux conditions d'hygiènes médiocres (*cf. infra*).

Des infections sporadiques surviennent toute l'année, mais les cas groupés ont plutôt lieu de la fin de l'hiver au début de l'été.

La contagiosité du virus est importante, mais elle n'égale pas celle d'autres virus comme la rougeole ou la grippe (Chanock and Parrott 1965). Cependant, les chaînes de contamination sont assez difficiles à mettre en évidence. Outre la voie respiratoire, le virus diffuse par voie oro-fécale, et peut persister dans les selles plusieurs semaines après infection. En outre il survit très longtemps sur les surfaces et est difficile à éliminer, du fait de sa résistance dans le milieu extérieur (virus nu). Ainsi, on a pu le retrouver dans 38% des prélèvements environnementaux effectués de manière longitudinale dans un service de pédiatrie générale (Ganime et al. 2016).

6.5 Manifestations cliniques

Les infections à adénovirus sont extrêmement fréquentes et très polymorphe dans leurs présentation. Autant certaines maladies spécifiques existent (kératoconjonctivite allergique), autant l'infection se traduit généralement par une simple atteinte aspécifique de l'organe concerné (éruption ou diarrhée ou rhinite). Pour ce qui est des infections ORL, on relève que les adénovirus sont responsable d'un tiers des angines non streptococciques, et que certains adénovirus (types 1, 2, 3, 5 ou 7) représentent 86% des pharyngites fébriles de l'enfant (Moffet, Siegel, and Doyle 1968).

La présentation clinique du syndrome respiratoire est bien connue à cause des descriptions précises des cas chez les militaires américains (Dascomb and Hilleman 1956). L'infection commence après une incubation de 5 à 7 jours, par une fièvre élevée (39,5°C de moyenne), une pharyngite, une laryngite, des adénopathies et une conjonctivite. Une toux sèche se développe, qui évolue par quintes. Une sensation de malaise, des myalgies et une asthénie profonde complètent alors le tableau. A ce stade apparait chez deux malades sur trois des signes d'obstruction respiratoire avec une gêne respiratoire, un wheezing, parfois une oxygénorequérance. Enfin, chez 10 à 20% des malades, une pneumonie lobaire se constitue, signe d'une atteinte parenchymateuse. La récupération se fait en 8 à 36 jours. De façon moins précise, l'adénovirus compterait pour 5 à 18% des bronchiolites (80% des bronchiolites sont secondaires au RSV). L'association avec *Streptococcus pneumoniae* n'est pas claire. En effet, il a été montré que la présence d'adénovirus facilitait l'adhérence tissulaire du pneumocoque (Håkansson et al. 1994). Plus rarement sont observées des formes cliniques coqueluchoïdes, de bronchite chronique ou même d'atrophie pulmonaire (Macpherson, Cumming, and Chernick 1969).

Concernant plus spécifiquement les pneumonies de l'enfant, les adénovirus sont fréquemment identifiés dans les cas de pneumonie, bien que moins souvent que le RSV ou les virus parainfluenza. Cependant, ils sont bien plus fréquemment associés aux formes graves avec un nombre de décès non négligeable (Pinkerton and Carroll 1971), en particulier avec le type 7 (Mitchell et al. 2000). Le tableau est celui d'une pneumonie brutale avec une fièvre élevée chez un enfant de 6 à 18 mois. Des signes associés ne sont pas rares, notamment neurologiques (encéphalites), mais aussi myocardiques. Des éruptions sont fréquentes. Chez les enfants survivants, la récupération se fait en 2 à 4 semaines, avec des séquelles respiratoires dans 14 à 60% des cas (Similä et al. 1981).

6.6 Vaccination

A cause de son coût important, notamment chez les jeunes recrues militaires, une attention particulière a été portée sur la mise au point d'un vaccin (Lee and Hung 1993) dans les années 60. En 1971, après de multiples difficultés, les nouvelles recrues ont commencé à recevoir un vaccin vivant oral contre l'adénovirus 4 et 7, qui s'est avéré sûr et efficace (Gaydos and Gaydos 1995). En 1996,

l'entreprise qui fabriquait ces vaccins a arrêté sa production pour des raisons exclusivement économique. Le stock s'est définitivement épuisé en 1999, et les techniques industrielles de fabrication ont été perdues (Gray and Erdman 2018). Depuis, les cas d'infection sont repartis à la hausse dans cette population et avec même des décès (Russell et al. 2006). Sous la pression de sociétés savantes, un vaccin de seconde génération contre les mêmes souches a pu être mis au point en 2011 et est actuellement utilisé chez les jeunes recrues militaires (Choudhry et al. 2016).

De façon tout à fait intéressante, il a été mis en évidence à l'occasion de la perte de ce vaccin que les mesures barrières et l'hygiène des mains, y compris chez des soldats disciplinés, n'était pas suffisante pour endiguer une épidémie d'adénovirus (Ryan, Christian, and Wohlrabe 2001).

7 Virus parainfluenza

Les parainfluenzavirus humains (hPIVs) sont des virus ubiquitaires, très répandus, et comptant parmi les principales causes d'infections respiratoires de l'enfant. Bien qu'ils ne soient pas cependant responsables des infections les plus sévères, leur coût pour le système de santé est élevé.

7.1 Historique

Les parainfluenzavirus ont d'abord été découvert chez l'animal. Le tout premier, nommé virus Sendai, a été découvert chez une souris japonaise. La première souche humaine a été identifiée en 1965 (Chanock 1956) chez un enfant présentant un croup (laryngo-bronchite aiguë). Ce virus a donc été nommé CA virus (« Croup Associated Virus»). D'autres hPIVs ont été reconnus à la même période qui, contrairement au CA virus, capable de produire des syncytia en culture, ne provoquaient pas ou peu d'effet cytopathique, mais une capacité d'hémadsorption sur les érythrocytes de cobayes (Chanock et al. 1963), et baptisée HA-1 et HA-2. Compte tenu de leur proximité avec le CA-virus, les trois virus ont été renommés parainfluenzavirus de type 1 (HA-2), de type 2 (CA-Virus) et de type 3 (HA-1). Un hPIV 4 a par la suite été découvert, avec deux sous-types A et B.

Il existe une bien plus grande variété de virus parainfluenza chez l'animal, notamment d'élevage. Des épidémies de « fièvre des transports » sont survenues chez du bétail, ou la « fièvre morbilliforme équine » chez des chevaux. Occasionnellement, sur un mode sporadique, ces virus peuvent s'adapter à l'homme et être responsable de décès comme en Malaisie en 1998 avec le virus Nipah (Goh et al. 2000) ou chez des éleveurs de chevaux en Australie avec le virus Hendra (Paterson, Murray, and McCormack 1998).

7.2 Microbiologie

Les quatre hPIVs (1, 2, 3 et 4) font partie de la famille des *Paramyxoviridae*, où ils se répartissent en deux sous-familles, les *Orthoparamyxovirinae* (ex PIV-1 et PIV-3) et les *Rubulavirinae* (ex PIV-2 et PIV-4).

Les hPIVs sont des virus enveloppés à ARN simple brin, non segmenté, de polarité négative. Leur génome code six protéines structurales (N, P, M, F, HN, L) et quelques protéines non structurales (C, V, D). L'ARN viral est encapsidé dans une nucléoprotéine NP et entouré d'une enveloppe qui provient de la cellule hôte. L'enveloppe est recouverte de glycoprotéines de surface, dont le complexe HN (Hémagglutinine – Neuraminidase) et la protéine de fusion F qui sont les antigènes majeurs de ce virus. La polymérase L et la protéine phosphorylée de capsid P forment également la structure de la nucléocapside. La dernière protéine, M, est la matrice non glycosylée, qui joue un rôle de structure.

La reconnaissance de la cellule hôte a lieu par le complexe HN, médié par le changement conformationnel secondaire à l'attachement à l'acide sialique. La protéine F est présente sous forme d'un précurseur F0, qui est clivé par les protéines de l'hôte en F1 et F2 qui permettent la pénétration du virion dans la cellule en fusionnant sa paroi avec celle de l'hôte.

La réplication a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte (Karron et al. 1993). L'ARN viral est transcrit en ARN messager qui permet de produire les protéines virales. L'assemblage a lieu à la surface de la cellule hôte, autour de la protéine M, la plus abondante, qui attire les autres composants pour permettre la construction du virion entre la nucléocapside et les glycoprotéines de surface. Le relargage du virion se fait par évagination de la membrane plasmatique.

Les protéines C, V et D ne sont pas produites par tous les types d'hPIVs. Elles auraient un rôle dans la transcription, encore mal défini (Bowden et al. 2010).

Aux USA (Counihan et al. 2001), ces virus seraient responsables de près de 100 000 hospitalisations par an, avec un taux de prise en charge ambulatoire dix fois supérieur (dont la moitié pour hPIV-3). Les coûts annuels de prise en charge de ces pathologies peuvent monter jusqu'à 56 millions de dollars par an.

7.3 Physiopathologie

Les hPIVs ont comme lieu préférentiel de réplication les voies respiratoires supérieures, avec notamment les cellules ciliées épithéliales. L'incubation est de 2 à 4 jours. L'atteinte secondaire possible des bronches et des bronchioles est responsable des formes graves.

C'est un virus dont la magnitude de réplication est importante, et la charge virale semble directement corrélée à la sévérité de la maladie (Grubor et al. 2004). Le portage peut également être prolongé, jusqu'à des durées de plusieurs semaines.

Comme dans d'autres infections virales, la reconnaissance de l'infection virale passe par les TLRs qui vont activer la cascade cytokinique et les médiateurs pro inflammatoires (Crowe and Williams 2003). Cependant d'autres voies d'activation de l'immunité, non médié par les TLRs, sont suspectées (López et al. 2004). Les macrophages tissulaires phagocytent les cellules infectées et présentent les antigènes viraux aux cellules cytotoxiques et aux monocytes circulants. Les cellules dendritiques identifient les antigènes réactifs et activent les lymphocytes cytotoxiques. Les antigènes principaux de la réponse immunitaire sont le complexe HN et la protéine F.

La voie des CD8 cytotoxiques est médié principalement par l'interféron $IFN\gamma$, et les $IFN\alpha$ et $IFN\beta$ ont également été identifiés. Certains hPIVs semblent précisément bloquer cette régulation par l'intermédiaire des protéines C et V (Gotoh et al. 2002). Un autre mécanisme de protection de hPIV-3 est l'utilisation de IL-10 pour bloquer la réplication lymphocytaire T (Sieg et al. 1996).

La principale source de protection contre les réinfections secondaires est l'immunité B. Les IgG1 jouent le rôle essentiel, à côté des IgG3 et IgG4. Les IgA semblent jouer un rôle muqueux primordial mais encore mal précisé. Enfin, des IgM sont détectées chez l'enfant, au stade précoce de la maladie.

7.4 Epidémiologie

Les hPIVs sont ubiquitaires, atteignant toutes les populations du monde, sous tous les climats (Welliver et al. 1982). Les hPIVs sont des virus parmi les plus fréquemment responsables d'infections respiratoires chez l'enfant, au moins en nombre (Henrickson, Kuhn, and Savatski 1994).

Comme le RSV, hPIV-3 est de survenue préférentielle dans les premiers mois de vie. A un an, à peu près deux enfants sur trois ont acquis une immunité contre ce virus, et 92% à deux ans (Glezen et al. 1984). Les infections à hPIVs 4 surviennent plus tardivement dans la vie, l'immunisation n'arrivant que vers 5 ans, et les pathologies sont parfois plus sévères.

Il n'y a pas véritablement de saison dominante, le virus circule plus ou moins toute l'année, les différents types ayant chacun leur préférence, différente selon les localités géographiques mais plus ou moins reproductible d'une année sur l'autre (Forster et al. 2004). Le hPIV 1 prédomine plutôt à l'automne, le hPIV3 plutôt en fin de printemps. Le hPIV2 est plus instable et hPIV 4 survient habituellement l'hiver en Europe et aux Etats-Unis, mais l'été en Chine (Ren et al. 2011).

De façon intéressante, l'infectiosité des hPIVs n'est pas dépendante de la sévérité de l'infection (Hall 2001). Un très faible inoculum est suffisant pour provoquer la maladie, qui passe habituellement par des gouttelettes, le virus peut survivre sur des surfaces non poreuses jusqu'à 10 heures. Les enfants sont porteurs d'une charge virale très élevée dans les voies respiratoires qui semblent être la voie principale d'inoculation.

7.5 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques dépendent à la fois de l'âge de l'enfant et du type de hPIV.

Globalement, les hPIVs sont très fréquemment en cause dans les infections des voies respiratoires supérieures de l'enfant de moins de cinq ans. Ils comptent pour deux tiers des croups (laryngotrachéobronchites), un quart des bronchites et la moitié des rhinite et pharyngites.

Cependant, la majorité des hospitalisations en raison de hPIVS sont des tableaux de pneumonie et de bronchiolite, préférentiellement à hPIV3.

Les infections à hPIVs débutent généralement brutalement avec une fièvre modérée et des signes ORL (rhinite, pharyngite). Après 3 à 4 jours d'évolution, des signes de pneumonies (principalement avec hPIV3) ou de croup peuvent apparaître. Les pneumonies ne sont pas forcément sévères, certaines étant prise en charge en ambulatoire. Une condensation radiologique est présente si recherchée. L'état général est parfois conservé, mais des crépitations, une polypnée et un wheezing peuvent apparaître.

Le « croup », maladie caractéristique et autrefois mortelle, mais bien mieux prise en charge de façon non spécifique aujourd'hui, est une atteinte laryngotrachéale sévère, avec une toux rauque, une laryngite et un stridor. L'amélioration est notable durant la journée, avec une aggravation nocturne. Dix pour cent des enfants présentant un croup font une hypoxie durant la maladie, mais la variabilité inter-individuelle est importante. L'utilisation intense de corticoïdes dans toutes les formes de laryngite a diminué drastiquement la mortalité due à cette maladie, empêchant la réaction inflammatoire excessive de réaliser une obstruction des voies aériennes. Il n'existe à ce jour ni vaccin, ni antiviral spécifique.

8 Human Métapneumovirus

Le metapneumovirus humain (HMPV) est un paramyxovirus de découverte récent, ubiquitaire et responsable de pathologies respiratoires exclusivement. Il est encore relativement mal connu.

8.1 Histoire

Le HMPV a été découvert en 2001 à partir de l'analyse de sécrétions d'enfants atteints d'infections respiratoires sur une période de 20 ans (van den Hoogen et al. 2001). Les cas étaient des tableaux de bronchiolites ou de dyspnée sifflantes. Ce virus produit un effet cytopathique, y compris avec la formation de syncytia. Il ne produit pas d'héماغglutination, et est de culture difficile. C'est finalement l'ingénierie génétique qui a permis de l'identifier et de le classer comme un pneumovirus à l'aide d'une méthode originale à partir d'amorces aléatoires. Il fait partie des pneumovirus, originellement une sous-famille de la grande famille des paramyxoviridae, finalement reclassifié en 2016 comme une famille à part entière dénommée *Pneumoviridae* (Rima et al. 2017). Le virus connu le plus proche est un virus aviaire (Avian Metapneumovirus) dont il aurait divergé voici 200 ans (de Graaf et al. 2008). Des anticorps spécifiques du virus ont été identifiés dans le sérum datant de 1958, preuve que ce virus circulait bien avant sa découverte (van den Hoogen et al. 2001).

8.2 Microbiologie

Les métapneumovirus sont des virus à ARN simple brin, non segmenté, de polarité négative, entourés d'une enveloppe lipidique. De la même famille que le RSV, ils diffèrent cependant sur certains points. Ils ne possèdent pas les protéines de structures NS1 et NS2. Leur génome code un certain nombre de protéines dont on commence à connaître les fonctions. La nucléoprotéine N joue un rôle dans l'encapsidation protectrice du génome viral afin de lutter contre les ARNases, et elle serait également impliquée dans la réplication. La protéine de matrice M est située sur la face interne de la bicouche lipidique, elle joue le rôle de protéine de structure. La glycoprotéine de fusion F permet l'attachement cellulaire sur le modèle de celle du RSV. Une deuxième protéine de matrice M2, divisée en sous-unité M2-1 et M2-2 sont impliquées de façon importante dans la synthèse d'ARN. Il y a enfin une protéine SH (small hydrophobic), petite protéine transmembranaire au rôle encore mal connu et une protéine de la polymérase L.

Ce sont de gros virus de 180 à 600 nm, avec 13300 paires de bases. Bien que différents groupes existent sur le plan génomique (A1a à B2b), il semble y avoir une réactivité antigénique croisée permettant de considérer sur un plan clinique ce virus comme une entité unique.

8.3 Pathophysiologie

Les données sont assez parcellaires pour ce virus. L'incubation dure deux jours, et l'atteinte respiratoire exclusive se traduit par des lésions assez similaires sur le plan histologique à celles du RSV. La déplétion de l'activité macrophagique chez des souris réduit la sévérité de l'infection (Kolli et al. 2014), argument en faveur d'un rôle important de la réponse inflammatoire de l'hôte dans la pathogénie.

En comparant les infections à RSV et celles à HMPV, on remarque une modification du profil cytokinique, avec moins d'IL-12, d'IL-6, d'IL-8, de TNF- α et d'IL-1 β mais autant d'IL-10 dans l'infection à hMPV (Laham et al. 2004). Il semblerait que HMPV soit capable de bloquer la réponse interféron de type 1 et que ceci soit relié à un dysfonctionnement des réactions T CD8+ dans le poumon.

Une protection sérique existe post-infection, mais celle-ci est de courte durée et des réinfections sont fréquentes.

8.4 Epidémiologie

Le virus est ubiquitaire, circulant chaque année dans tous les pays du monde. Le pic épidémique d'HMPV survient juste après le pic d'infections à RSV, vers le début du printemps, en général de moindre incidence.

Le virus a surtout été étudié en pédiatrie. Les enfants infectés tendraient à être plus âgés que ceux contaminés par le RSV (22 mois versus 10,5) (Ji et al. 2009).

8.5 Manifestations cliniques

Le métapneumovirus peut être responsable d'infections ORL comme d'infections profondes, pneumonies ou bronchiolites. La fièvre est souvent présente, un rash cutanéomuqueux a été rarement rapporté. Cliniquement les symptômes sont assez similaires à ceux du RSV. HMPV serait responsable de 10 à 15 % des tableaux de dyspnée sifflante du nourrisson (Dawood et al. 2016). La durée d'hospitalisation est la même, mais les patients infectés par HMPV seraient plus sévères. La coinfection RSV/HMPV est fréquente et représente un surrisque de passage en soins intensifs.

Il n'existe ni vaccin, ni antiviral spécifique.

9 Bocavirus

Le bocavirus humain (hBoV) n'a été découvert qu'en 2005 (Allander et al. 2005). Beaucoup reste encore à expliquer sur ce virus ubiquitaire, responsable d'infections respiratoires ou digestives, possiblement de coinfections.

9.1 Histoire

La mise en évidence du Bocavirus s'est faite avec de nouvelles méthodes d'identification moléculaires de screening, consistant à mélanger divers prélèvements respiratoires de personnes malades, extraire l'ADN, supprimer l'ADN humain, amplifier l'ADN viral et publier dans de larges bases de données les séquences identifiées pour les comparer aux existantes. Le bocavirus, de la famille des *Parvoviridae*, a été découvert comme étant très proche d'un virus bovin (BO) et d'un virus canin (CA), donnant l'acronyme « bocavirus ». Il a depuis été retrouvé chez d'autres animaux (morses, cochons, etc.)

9.2 Microbiologie

Il s'agit d'un virus à ADN linéaire simple brin, non enveloppé, assez petit (22 à 28 nm) (Gurda et al. 2010). Sa structure est assez proche des autres parvovirus. Son code génétique code une protéine non structurale (NS1) et deux protéines de capsid (VP1 et VP2) principalement, mais il y a une autre région, significativement différente des autres parvovirus qui est encore mal identifiée. Sa méthode de fixation et de réplication est encore inconnue, mais il ne cause pas d'effet cytopathique. Aucun modèle animal n'existe à ce jour pour étudier le virus, mais un système d'ingénierie inverse a été créé pour permettre l'avancée de la compréhension de son mode de réplication (Huang et al. 2012).

9.3 Physiopathologie

La méthode de transmission n'est pas connue, mais le virus est présent dans les voies respiratoires supérieures, et un mode de transmission « gouttelettes » semble probable (Jartti et al. 2012).

Une particularité pathophysiologique de bocavirus est sa présence quasi exclusive dans des cas de co-infections, allant jusqu'à plus de 90% des cas (Fry et al. 2007). Plusieurs hypothèses ont été évoquées à propos de ce phénomène. Il pourrait s'agir d'un agent passager inoffensif (« innocent bystander ») de découverte fortuite ? Virus « helper » renforçant la pathogénie d'autres virus (Schildgen et al. 2008) ? La question de sa pathogénie peut se poser, mais certaines études rapportent une découverte concomitante dans le sang et dans les sécrétions respiratoires, allant dans le sens d'une infection profonde dans les cas de pneumonies (Christensen et al. 2010).

Enfin, on sait que hBoV persiste dans les sécrétions respiratoires de façon très prolongée, 50 jours en médiane et jusqu'à 402 jours (Martin et al. 2015).

On sait qu'une réponse immune avec des CD4+ spécifiques et des anticorps dédiés existent (Lindner et al. 2008). Les épitopes ont même pu être identifiés récemment (Kailasan et al. 2016).

9.4 Epidémiologie

Le bocavirus a été identifié dans toute les régions du monde, plus fréquemment chez des enfants de moins de deux ans.

Une étude a suivi longitudinalement des enfants pendant 18 mois et a pu mettre en relation l'apparition du bocavirus et l'apparition d'une toux modérée dans les 7 jours précédents, association d'autant plus forte qu'on la mettait en lien avec la quantification virale, laissant présager une corrélation entre charge virale et sévérité des symptômes.

De façon générale, lorsqu'il est recherché au moyen de PCR multiplex, y compris chez des sujets asymptomatiques, on le trouve environ dans 2 à 20% des cas. Il ne semble pas y avoir dans les données dont on dispose de saisonnalité particulière, il est détecté plus souvent l'hiver mais ce sont les mois où le plus de tests sont réalisés.

9.5 Manifestations cliniques

La plupart des études incluent le bocavirus dans des panels multiplex chez des enfants ayant une infection des voies aériennes. Dans l'immense majorité des cas, le bocavirus est associé à d'autres agents, ce qui rend complexe l'identification de son rôle précis.

Le bocavirus semble responsable d'abord d'infection des voies aériennes supérieures, rhume, laryngite, pharyngite, parfois croup. Il existe également des atteintes plus profondes,. 42% des cas d'identification de bocavirus sont chez des enfants atteints de pneumonie, et 42% chez des enfants atteints de bronchiolites (Longtin et al. 2008). Les manifestations de pneumonies sont typiques, et rarement sévères, hormis quelques cas sporadiques chez l'immunodéprimé.

Des cas d'infections digestives ont également été rapportés fréquemment, et même quelques exanthèmes.

E. Agents étiologiques bactériens

1 Pneumocoque

Le pneumocoque est l'agent pathogène le plus mortel et le plus fréquent dans les infections respiratoires basses de l'enfant, du moins si l'on prend l'ensemble des pays du monde. Bien connu, ce pathogène bénéficie d'un vaccin efficace accessible aux pays développés qui a profondément son épidémiologie.

1.1 Histoire

Le pneumocoque a été identifié en 1880 et 1881 par Pasteur et Sternberg, indépendamment l'un de l'autre (Watson et al. 1993). Pasteur injectait à des lapins de la salive humaine et a donc nommé l'agent pathogène responsable de la septicémie afférente le « microbe septicémique de la salive ». Sternberg l'a nommé quant à lui « *Micrococcus pasteri* ». C'est Friedlander, dès 1882 qui l'a identifié dans les tissus humains atteints de pneumopathie et qui décrira sa capsule caractéristique. Vers 1890, le terme « pneumocoque » émerge compte tenu de son rôle important dans les infections respiratoires. En 1926 il est nommé officiellement *Diplococcus pneumoniae*, puis *Streptococcus pneumoniae* en 1974.

Dès 1891, des techniques de traitement par sérothérapies ont été mise au point. Le sérum obtenu à partir d'animaux infectés par le pneumocoque – et qui produisaient alors des anticorps protecteurs – était injectés aux patients malades, ce qui permettait une guérison. Cependant, les résultats étaient encore inconstants. Ces travaux ont permis d'avancer sur la reconnaissance des sérogroupes spécifiques, notés alors I, II et III (il en existe 94 aujourd'hui). Avec ces techniques, le taux de mortalité pouvait passer de 30% à 10,5%. Il a fallu attendre 1924 (Felton 1924) pour que des résultats satisfaisants commencent à être atteints avec l'usage de sérums de chevaux réinfectés plusieurs fois par des sérogroupes spécifiques ou l'usage de sérum poolés.

La recherche pour un vaccin et une sérothérapie efficace qui prenait alors de l'ampleur a été brutalement stoppé avec l'apparition des premiers antibiotiques. Les succès thérapeutiques étaient tels y compris sur les infections sévères que les autres pistes de recherche furent abandonnées et que les industriels ont stoppé la fabrication de sérums et les ont retirés du marché. Ce n'est que quelques décennies plus tard, avec l'émergence de l'antibiorésistance, que l'intérêt pour ces traitements est revenu sur le devant de la scène.

1.2 Microbiologie

Le pneumocoque est un cocci à Gram positif. Les cellules sont entourées d'une membrane lipopolysaccharidique trilamellaire. La membrane cytoplasmique, la plus interne des trois couches, est recouverte du peptidoglycane, qui forme la deuxième couche structurale. On retrouve à ces niveaux les acides téichoïque et lipoteichoïque connus respectivement comme le polysaccharide C et d'antigène F, respectivement. La troisième couche, la capsule polysaccharidique, est d'une importance capitale. C'est elle qui détermine le séro groupe et la virulence du germe (Avery and Dubos 1931). Elle a un rôle fondamental dans la protection contre l'immunité en luttant contre la phagocytose (Hyams et al. 2010).

Les protéines de surface qui traversent ces couches ont été bien étudiées. PspA (protéine A de surface des pneumocoques) protège le pneumocoque de la lactoferrine et est une cible antigénique pour le système immunitaire (Shaper et al. 2004). PsaA (adhésine de surface A du pneumocoque) joue un rôle dans l'invasion des cellules épithéliales (Jedrzejewski 2001), CbpA est une adhésine qui joue un rôle dans l'attachement aux cellules humaines, RrgB (Pilin protein) joue également ce rôle.

Le génome du pneumocoque a été séquencé (Dopazo et al. 2001). Il mesure 2,1 millions de paires de bases, soit la moitié de celui d'*E. coli*, par exemple. Des recombinaisons sont possibles et sont déjà survenues.

1.2.1 Facteurs de virulence

La capsule est le déterminant principal de la virulence du germe. Elle bloque la phagocytose des PNN et des macrophages, rendant inefficace cette partie de la réaction immunitaire (Austrian 1981). Elle est directement responsable de la différence de virulence entre les séro groupes, puisque chaque séro groupe est défini par une organisation particulière de la capsule. Cependant, des protéines particulières sont également impliquées dans la virulence du pneumocoque. PspA, par exemple, bloque le complément et inhibe l'opsonisation. PspA est possiblement une cible antigénique pour un vaccin universel. Hyl, la Lyase Hyaluronique est une enzyme présente à la surface du pneumocoque qui est capable de dissoudre la matrice extracellulaire, permettant l'entrée de la bactérie à travers la barrière épithéliale. La pneumolysine est une enzyme cytoplasmique qui est excrétée pour détruire les cellules épithéliales et forcer les jonctions serrées qui maintiennent ce maillage imperméable, permettant l'entrée de la bactérie dans le tissu. D'autres autolysines, comme LytA, existent également. CbpA joue un rôle dans l'adhérence. Enfin, le pneumocoque possède deux neuraminidases NanA et NanB. Ces enzymes clivent l'acide sialique des cellules de l'hôte, contribuant vraisemblablement à la destruction d'une large part de celles-ci. La question se pose de son lien avec la grippe, dont c'est le mécanisme de libération cellulaire.

1.3 Pathophysiologie

La réponse immunitaire principale et majeure contre le pneumocoque tient aux anticorps dirigés contre la capsule. Outre ce mécanisme – malheureusement spécifique d'un sérotype à la fois – plusieurs réactions immunitaires surviennent en réponse à l'agression pneumococcique.

On note la présence d'IgG anti-capsule à différents taux difficilement interprétable en pratique clinique en raison de l'étendue du répertoire. On trouve également des IgA spécifiques multimériques qui, en présence d'un complément fonctionnel, sont capables d'activer la phagocytose par les macrophages muqueux. Des anticorps spécifiques ont également été identifiés contre PspA, PsaA et la pneumolysine. Leurs taux augmentant lors de la convalescence après une infection, y compris modérée comme les otites (McCormick et al. 1972).

C'est la rate qui assure la majorité de la réponse immunitaire au pneumocoque, avec un rôle spécifique dans la synthèse d'anticorps (Ammann et al. 1977), l'activation du complément (Nowak-Wegrzyn et al. 2000) et l'élimination des particules non opsonisées (Brown, Hosea, and Frank 1981).

Beaucoup de cytokines sont impliquées dans la réponse inflammatoire à l'infection pneumococcique, TNF- α et IL-1, en particulier dans les méningites, mais aussi IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, l'interféron γ et le GCSF.

Le pneumocoque est reconnu par différentes voies. Le peptidoglycane est identifié par TLR-2, la « LPS binding protein », la pneumolysine par TLR-4 et son ADN par TLR-9. La réponse inflammatoire suit la voie de NF- κ B et des variantes individuelles génétiques dans cette voie expliquent peut-être certaines réactions dysimmunitaires (Brouwer et al. 2009) comme le choc septique ou la méningite. NF- κ B induit la sécrétion d'IL-6 et d'IL-1 β et l'appel de neutrophiles et de macrophages. Le tissu pulmonaire est unique par sa capacité à appeler spécifiquement des neutrophiles par la voie CD11/CD18 (Doerschuk, Tasaka, and Wang 2000). Bien que nécessaire pour contrer l'infection, cette inflammation massive est délétère pour le tissu pulmonaire. De fait, la neutropénie atténue les symptômes de pneumopathies sévères à pneumocoques (Marks et al. 2007).

Enfin, quand la bactériémie devient importante, le pneumocoque se retrouve au contact de la barrière hémato-méningée. S'il passe cette barrière, il prolifère alors à une vitesse très importante dans le LCS. L'appel de cellules de l'inflammation entraîne une augmentation de pression massive au niveau cérébral avec des dommages très importants, plus sévères que ceux causés par la bactérie. C'est le rationnel pour traiter avec des corticoïdes dans le cas des infections méningées à pneumocoques, en plus des antibiotiques.

1.4 Epidémiologie

On peut aujourd'hui séparer les épidémiologies nationales entre les pays qui n'ont pas encore accès aux vaccins et ceux qui ont pu protéger leur population.

Avant l'introduction de la politique vaccinale massive, les infections à pneumocoque touchaient surtout les enfants de moins de cinq ans, avec les cas les plus sévères chez les moins d'un an. Ces infections, bien que plus fréquentes chez les enfants fragilisés (drépanocytose, etc.), touchaient en nombre majoritairement des enfants sains sans comorbidités.

Le portage est très précoce et quasi constant dans cette tranche d'âge. A deux mois, 60% des enfants sont porteurs de la bactérie au niveau des sécrétions nasales. Virtuellement tous les enfants ont porté le pneumocoque au moins une fois avant leur anniversaire de cinq ans (Aniansson et al. 1992). Passé cet âge, le portage décroît. Chez l'adulte qui ne vit pas avec des enfants, le portage est estimé à 6% (et 29% si des enfants sont présents dans le foyer) (Turner et al. 2012).

De façon intéressante, indépendamment du statut vaccinal, des anticorps muqueux IgA spécifiques de PsaA commencent à apparaître au fur et à mesure que le portage décroît, et cette immunité modérée explique probablement la baisse du portage chez l'adulte (Rapola et al. 2003).

Les infections à pneumocoque ont une saisonnalité, superposée à celle des infections virales respiratoires. Le pic va de décembre à février dans l'hémisphère nord.

1.5 Manifestations cliniques

Le pneumocoque peut être responsable d'une très large gamme d'infections cliniques, allant du choc septique du nouveau-né sur bactériémie à la méningite avec purpura fulminans en passant par la pneumopathie sévère ou d'autres pathologies plus banales comme l'otite moyenne aiguë.

La forme typique correspond à la description historique de « la » pneumonie franche lobaire aiguë. Une forte fièvre, supérieure à 40°C, avec une asthénie marquée débute le tableau. Une toux et une dyspnée d'apparition progressive le complètent. Une douleur thoracique – ou abdominale lors des atteintes lobaires inférieures – est fréquente. La CRP et le taux de leucocytes sont très élevés. Sur la radiographie du thorax, une condensation lobaire est visible. Jusqu'à 40% ont une effusion pleurale, mais seuls 2% font un empyème.

En réalité, les infections à pneumocoques ne se présentent pas systématiquement avec ce tableau complet et caricatural. Les études systématiques montrent que la présentation peut se superposer aux infections à RSV ou à la grippe ; cela étant encore complexifié par l'intrication fréquente des infections

grippales et pneumococciques. C'est l'efficacité de la vaccination et la quasi-disparition du pneumocoque qui a été le plus utile pour établir à posteriori sa fréquence relative.

Le pneumocoque était également responsable de 20 à 60% des otites moyennes aiguës à l'ère pré vaccinale, et de beaucoup d'autres infections en dehors de la sphère respiratoire (sinusites, arthrites, mastoïdites, méningites, bactériémie, endocardite).

1.6 Vaccins

La vaccination contre le pneumocoque se heurte à la variabilité de sa capsule. Celle-ci diverge sur le plan antigénique, d'où la multiplicité des sérogroupes différents, obligeant un vaccin à avoir autant de valences vaccinales que de sérogroupes à couvrir. Un vaccin universel n'existe pas encore, même si des pistes de recherche sont explorées, notamment à l'encontre des protéines de surface (Chen, Mann, et al. 2015).

Actuellement, deux vaccins sont sur le marché. Le PCV 13 et le PPSV23.

Historiquement, les premiers vaccins étaient des vaccins polysidiques, couvrant 14 valences en 1977. Ils ont été remplacés par des vaccins polysidiques couvrant 23 valences en 1983. Ils sont administrés préférentiellement aux patients de plus de 65 ans.

Ces vaccins avaient peu d'efficacité en pédiatrie ; or le pneumocoque tue principalement avant l'âge d'un an. La raison en est une certaine immaturité du système immunitaire et surtout l'absence de réaction T. En effet, la présentation simple d'un antigène de capsule – comme dans les vaccins polysidiques - produit chez les lymphocytes B une sécrétion immédiate et isolée de l'anticorps correspondant, ce qui est assez différent de ce qui se produit lors d'une infection naturelle avec la cascade cytokinique afférente.

Ce problème a été résolu en conjuguant l'antigène de capsule à une protéine qui va activer la cascade immunitaire. Cela a été fait avec une variante de la toxine diphtérique inactivé, la protéine CRM197. Lorsque cette protéine est identifiée par les lymphocytes T helper, ceux-ci viennent eux-mêmes activer les lymphocytes B, conduisant à leur stimulation pour la production d'anticorps spécifiques d'une part mais surtout à une différenciation d'une partie d'entre eux en cellules B mémoire, capables de persister théoriquement la vie entière dans l'organisme et procurant une immunité durable, ainsi qu'une sécrétion d'IgA et donc une immunité muqueuse avec moins de portage, moins d'infections modérées (comme les OMA) et surtout moins de transmissibilité de la bactérie avec un effet groupe sur le reste de la population.

Un vaccin conjugué à 7 valences – les plus pathogènes - a donc été mis sur le marché dès les années 2000. Une chute spectaculaire des infections à pneumocoque s'en est suivie, mais un mécanisme

vieux s'est mis en place : le remplacement sérotypique. En effet, les sérotypes contre lesquels le vaccin protégeait ont quasiment disparus, mais le nombre d'infections à pneumocoque n'a que peu diminué, les sérotypes non couverts par le vaccin ayant partiellement remplacé les 7 valences historiques. Un vaccin à 13 valences a été mis sur le marché en 2011, permettant alors une diminution quasi complète des infections à pneumocoques. Un vaccin à 15 valences est actuellement en phase 3 pour couvrir les deux sérotypes restants, qui pourrait d'ailleurs être associé au vaccin antigrippal tétravalent.

Les limites de cette vaccination sont liées au fait qu'un pneumocoque virulent puisse subir une mutation de sa capsule ou qu'émergent des facteurs de virulence non capsulaires chez un pneumocoque non couvert par le vaccin, en particulier sous la pression de sélection qu'implique une vaccination de masse. Les recombinaisons capsulaires possibles dépassent de loin les sérotypes existants, et l'émergence d'un nouveau type est possible. Il faudra attendre la mise au point d'un vaccin universel non capsulaire pour être à l'abri des mutations au niveau de cette région hypervariable du fait de son exposition au système immunitaire de l'hôte.

2 *Mycoplasma pneumoniae*

Mycoplasma pneumoniae est un pathogène humain responsable de pneumonies de l'enfant, en particulier des pneumonies dites « atypiques ».

2.1 Histoire

En 1898, Nocard découvre un agent pathogène chez des bovins atteints de pleuro-pneumonies. Ce germe et ceux de sa famille découverts ensuite ont été nommé PPLO (*Pleuro Pneumonia Like Organisms*), dénomination qui est restée usitée jusque dans les années 1960. La première souche humaine est identifiée en 1944 (Eaton, Meiklejohn, and van Herick 1944). Ce germe s'est avéré très complexe à cultiver, ce qui a longtemps laissé le doute sur sa nature virale ou bactérienne. En réalité, il n'a été possible de le cultiver qu'en le faisant incuber dans des sacs de collodion à paroi fine, mis en « couveuse » dans le péritoine d'un animal de laboratoire. Le sac isole de la phagocytose, mais les nutriments (dont les stérols, nécessaires au mycoplasme) le traverse et la bactérie prolifère. Ce succès a d'ailleurs eu un impact de long terme en France, car on a cru alors que cultiver des virus sur un milieu inerte de bactériologie était possible et qu'il suffisait de trouver le « bon » milieu ... Eaton constata par ailleurs que le sérum de patients guéris de la maladie due à « l'agent d'Eaton » (*Mycoplasma pneumoniae*) guérissait les malades. Le pouvoir pathogène de *Mycoplasma pneumoniae* fut ensuite confirmée, notamment par des tests sur volontaires humains dans l'armée américaine dans les années

40 à 60 (Saraya 2016), ce germe étant responsable d'épidémies respiratoires handicapantes pour l'organisation des armées. La nature bactérienne a été bien établie à la fin du XX^{ème} siècle et le génome a été entièrement décrypté en 2010 (Gibson et al. 2010).

2.2 Microbiologie

Mycoplasma pneumoniae est une petite bactérie, dépourvue de paroi cellulaire, de 500 nm de diamètre en moyenne. Son génome est court (0,8 million de bases, versus 4,6 pour *E. coli*). Ce sont les plus petits être vivants connus capables de réplication autonome. La bactérie est constituée globalement d'un corps cytoplasmique et d'extensions qui semblent servir à l'attachement aux cellules. C'est un germe intracellulaire facultatif.

L'être humain développe des IgG contre au moins 8 protéines spécifiques de *Mycoplasma pneumoniae*. L'une d'elle est connue comme la protéine P1. Elle correspond à l'adhésine qui sert à l'attachement. La toxine CARDS est une protéine de découverte récente, spécifique de *Mycoplasma pneumoniae* et qui partage des éléments de conformité avec la toxine de la coqueluche (Medina et al. 2012).

2.3 Pathophysiologie

Mycoplasma pneumoniae se transmet par voie respiratoire. Présent dans les gouttelettes, il arrive dans le nasopharynx de l'hôte. La multiplication se fait en milieu extracellulaire, pour une durée de 4 jours à 3 semaines, selon la taille de l'inoculum initial. Il se propage également dans les voies respiratoires, probablement par volatilité lors de la respiration compte tenu de sa petite taille.

Des dommages cellulaires sont causés lors de la procédure d'attachement cellulaire. Le mycoplasme utilise des récepteurs à l'acide neuraminique (Sobeslavsky, Prescott, and Chanock 1968). Une fois internalisé dans la cellule, il libère du peroxyde d'hydrogène agressif ainsi que la toxine CARDS qui est responsable de lésions cellulaires.

En plus de ces mécanismes, un phénomène d'auto-immunité par réaction croisée entre les antigènes du mycoplasme et des protéines de l'hôte (antigènes de groupe sanguin, notamment) peut survenir, ce qui explique les atteintes extra pulmonaires.

2.4 Epidémiologie

M. pneumoniae est endémique, les infections pouvant survenir toute l'année. Cependant, il semble y avoir un schéma particulier dans les grandes villes, avec des épidémies locales durant 18 à 30 mois, répétitives tous les 3 à 7 ans. La dernière de ce genre a eu lieu en France en 2010-2012. Pendant ces

épidémies, un portage est possible. Le mycoplasme est en outre persistant dans les voies respiratoires plusieurs semaines après l'infection, ce qui complique l'évaluation diagnostique.

Les enfants les plus touchés sont ceux de la classe d'âge scolaire, de 5 à 9 ans, suivi des enfants de 10 à 14 ans.

2.5 Manifestations cliniques

La pneumonie à *M. pneumoniae* commence progressivement par un état subfébrile, avec une altération de l'état général et fréquemment des céphalées. Il n'y a pas de rhinite inaugurale, mais une pharyngite concomitante est fréquente (un cas sur deux). La toux apparaît au bout de 3 à 5 jours, d'abord sèche et non productive. La fièvre monte ensuite autour de 39,5°C et peut dépasser 40°C. Un rash cutané transitoire peut être présent. La toux devient productive avec des sécrétions blanches et va persister 3 à 4 semaines après la disparition de la fièvre.

L'examen physique retrouve à l'auscultation des râles crépitants secs diffus. Il peut être normal.

La radiographie thoracique montre classiquement un aspect de « pneumonie atypique » caractérisée par un infiltrat interstitiel diffus sans signes de focalisation. Cette description historique est en réalité probablement inconstante, et les pneumonies lobaires peuvent représenter jusqu'à 40% des cas (Brolin and Wernstedt 1978).

2.6 Vaccins et traitements

Des tentatives ont été faites pour mettre au point un vaccin, dirigé notamment contre la protéine P1, l'adhésine de l'attachement cellulaire. Ces recherches n'ont pas abouti à ce jour.

Il est important de noter que, du fait de l'absence de paroi, *M. pneumoniae* n'est pas sensible aux bêta-lactamines ; les macrolides, les quinolones ou les tétracyclines constituent le traitement étiologique de référence.

3 *Haemophilus Influenzae* de type B

Assez peu d'espèces du genre *Haemophilus* sont pathogènes pour l'homme à l'exception d'*Haemophilus influenzae* et *H. parainfluenzae*. Hib est une petite bactérie considérée comme commensale de la flore nasopharyngée humaine. Avant l'époque du vaccin, elle était responsable d'une importante morbidité et mortalité, notamment chez l'enfant avec des méningites et des épiglottites sévères.

3.1 Histoire

La bactérie a été découverte en 1892 par Pfeiffer, qui l'isola de patients présentant des symptômes grippaux. Ce germe fut nommé le bacille de la grippe de Pfeiffer (Pfeiffer influenza bacillus) (Pfeiffer 1892). L'agent fut retrouvé dans les méninges d'enfants souffrant de méningite. Progressivement, un doute apparut sur son lien avec la grippe, mais ce n'est qu'en 1918 qu'il fut clairement établi qu'il s'agissait de deux entités différentes. Le germe fut alors renommé « *Haemophilus influenzae* » pour illustrer son lien historique avec la grippe ainsi qu'en rapport avec le fait qu'il nécessitait du sang pour être mis en culture (Haemophilus, qui aime le sang). Ce sont ensuite les travaux de Pittman (Pittman 1933) qui permettront d'identifier les sérotypes, puis de mettre au point un antiserum vers 1933. L'efficacité de l'antisérum ouvre la porte à des réflexions sur un potentiel vaccin.

Malheureusement, comme souvent dans l'histoire de la microbiologie, les recherches sur les antisérums ont été brutalement stoppées lors de l'apparition des premiers antibiotiques, qui possédaient une efficacité nettement supérieure. Ce n'est que lors de l'apparition des premières antibiorésistances que le sujet est redevenu une préoccupation des chercheurs, d'autant que l'efficacité des antibiotiques contre Hib était incomplète. Il persistait jusqu'à 5% de mortalité et surtout 20% de morbidité avec séquelles lourdes (Swartz and Dodge 1965). La mise au point du vaccin contre Hib a débuté dans les années 1970, pour s'achever avec le succès que l'on connaît, au moins dans les pays développés.

3.2 Microbiologie

H. influenza est un petit coccobacille à Gram négatif. Les espèces pathogènes pour l'homme sont encapsulées, et cette capsule est le principal facteur de virulence. Selon sa conformation, on dénombre six types de souches, de a à f. La capsule de la souche b, responsable de 95% des infections dans les populations naïves, est différente des autres. Il s'agit d'une polymérisation de ribosyl et ribitol-phosphate chaîné en 1-1, et codé par un gène de 17 kb dupliqué chez tous les Hib.

Le Hib possède également plusieurs molécules de surface spécifiques. On note le LipoOligoSaccharide (LOS) qui est assez similaire au LPS des entérobactéries, qui active une hypercoagulation en contact avec des leucocytes humains (Miragliotta et al. 1981), ce qui pourrait expliquer le mécanisme des CIVD des formes compliquées de cette maladie. Des protéases spécifiques des IgA ont été également identifiées qui jouent un rôle majeur dans la virulence du germe en permettant la lutte contre la première barrière de défense en augmentant le portage des souches concernées.

3.3 Physiopathologie

Haemophilus influenzae de type b (Hib) est acquis par transmission respiratoire. Le portage était fréquent à l'époque pré-vaccinale, et il y a assez peu de réaction inflammatoire locale lors de la colonisation, les protéases à IgA étant vraisemblablement en cause. *Haemophilus*, toutes souches confondues, peut être retrouvé chez plus de 80% des adultes. Les infections respiratoires surviennent par contiguïté, la bactérie se déplaçant vers les trompes d'eustache, causant des otites moyennes aiguës, et vers les bronches, causant des bronchites et pneumonies. L'infection de la muqueuse a lieu par le biais des protéines P2 et P5, les protéases à IgA bloquant une part de la réaction et l'infection étant facilitée par des agressions extérieures [fumée de cigarettes, infections virales et bactériennes notamment (Takala et al. 1993)]. Ce n'est qu'ensuite qu'une phase bactériémique s'installe, Hib procédant par rupture des jonctions serrées épithéliales et par glissement intercellulaires (Stephens and Farley 1991). C'est un processus long car l'inoculum sanguin initial faible augmente progressivement. Quand l'inoculum dépasse 10^4 CFU/ml, des métastases infectieuses apparaissent dans d'autres organes, principalement les méninges par le biais des plexus choroïdes (mais aussi les articulations ou le péricarde). Dans les méninges, Hib se fixe principalement sur les plexus choroïdes où il prolifère et bouche en retour la résorption du LCS, ce qui augmente la pression intracrânienne. Une réaction inflammatoire se met en place avec constitution d'une pachyméningite qui réduit encore la résorption du LCS et augmente encore la pression intracrânienne. Dans les formes graves, le décès survient par HTIC avec diminution de la perfusion cérébrale, la bactérie n'atteignant jamais le parenchyme cérébral.

La majorité des défenses immunologiques contre Hib vient de la réaction anticorps contre la capsule, ce qui a été la piste privilégiée pour la vaccination. L'activation du complément et la phagocytose facilitée par l'opsonisation sont suffisantes pour prévenir quasi intégralement la maladie.

3.4 Epidémiologie

Avant l'apparition du vaccin, Hib colonisaient à peu près tous les enfants avant l'âge de 5 ans. On compte 85% des cas sévères avant cet âge. En fait, 1 enfant sur 200 allait faire une infection invasive à Hib dans ses cinq premières années de vie (Peltola 2000). Les infections suivaient un pic bimodal avec une suractivité de septembre à décembre et de mars à mai.

Le premier vaccin a été mis sur le marché en 1987. Il s'est avéré d'une efficacité exemplaire, d'abord sur la cible vaccinale (les moins de 18 mois initialement), puis sur l'ensemble des groupes d'âges, y compris les enfants plus grands et les enfants non vaccinés. Cela a été mis sur le compte de la diminution massive du portage et donc de la transmissibilité. Dans les pays où la vaccination est obligatoire, les infections à Hib ont aujourd'hui quasiment disparues.

3.5 Manifestations cliniques

Outre la méningite et l'épiglottite typique, déjà abordées plus haut, Hib était responsable de pneumonies. Toujours secondaires à une bactériémie occulte – parfois identifiés à ce stade, c'était la deuxième cause de bactériémie occulte chez l'enfant – la pneumonie était parfaitement similaire en termes de présentation à celles des autres agents pathogènes. La fièvre élevée et la toux étaient présentes, une histoire d'infection ORL précédait le tableau, un syndrome inflammatoire biologique était présent. La radiographie pouvait montrer tous les types d'atteintes, lobaire, interstitiel ou même pleural. La fièvre pouvait par ailleurs persister longtemps après une antibiothérapie appropriée. Ces pathologies ont quasiment disparu dans le monde post vaccinal, mais des sérotypes non-b d'*Haemophilus influenzae* sont parfois responsables de pneumopathies.

3.6 Vaccin

Le premier vaccin était dirigé contre le polysaccharide de la capsule d'Hib, mis sur le marché en 1985. L'efficacité était limitée et de courte durée. Il a rapidement été cherché un moyen d'améliorer l'antigénicité de ce vaccin. La possibilité de conjuguer l'antigène à une protéine très immunogène afin de suractiver la réponse immunitaire a été évoquée. Plusieurs molécules ont été testées, dont la toxine diphtérique (CRP197, vaccin HbOC), la toxine tétanique (PRP-T) ou une protéine du méningocoque (PRP-OMP). PRP-OMP s'est avéré être le plus immunogène, procurant une couverture satisfaisante après une seule dose, mais cette couverture était de courte durée. C'est HbOC avec la toxine diphtérique CRM-197 (qui sera plus tard réutilisée pour le pneumocoque) qui s'est avéré le plus efficace à long terme, après trois doses. En 2008, ce vaccin a été couplé à d'autres (DTP-Ca) afin de faire des vaccins combinés. Le succès de ce vaccin a été considérable, car il a quasiment fait disparaître totalement la maladie.

Curieusement, ce vaccin a rarement été la cible des détracteurs des vaccins et peut être considéré comme un modèle de réussite médicale. Aujourd'hui, la valence Hib a été rajoutée pour constituer un vaccin hexavalent qui est la base de la vaccination rendue obligatoire en France en 2018.

Travaux personnels

L'articulation de notre recherche sur le diagnostic étiologique des infections respiratoires aux urgences pédiatriques s'est faite autour de six études, rapportées dans la présente section de ce travail. On peut diviser les articles présentés en deux volets : Les deux premières études s'intéressent au diagnostic étiologique par tests moléculaires d'une pneumopathie aux urgences pédiatriques, notamment à travers l'usage d'une PCR multiplex. Quatre autres publications s'attachent à proposer des pistes pour raccourcir le diagnostic microbiologique pour des pathologies ciblées, à travers notamment l'analyse de l'usage des tests antigéniques rapides ciblant quatre pathogènes : le pneumocoque, les virus de la grippe, le RSV et le SARS-CoV-2.

L'ensemble de ces travaux sont présentés successivement ici. Chaque article, soumis ou en cours de soumission est rapporté intégralement. Une discussion générale leur fait suite, ou l'ensemble des grandes problématiques abordées sont rassemblées et discutées. La critique détaillée des limites et des intérêts de chaque étude est abordée dans le corps de l'article, notamment dans les sections « discussions » de chacun d'entre eux.

A. Diagnostic moléculaire des pneumopathies aux urgences pédiatriques

L'usage d'une PCR multiplex pour analyser les prélèvements respiratoires d'enfants atteints de pneumopathie et se présentant aux urgences pédiatriques procure de nombreux avantages. La compréhension des agents pathogènes en cause permet de prévoir avec plus de souplesse l'évolution potentielle des enfants et permet de communiquer sur les causes de l'infection avec les parents. Cette connaissance améliore également la compréhension de la physiopathologie, ainsi que du rationnel de prise en charge auprès de toute l'équipe.

Nous avons structuré cette partie du travail autour de deux études centrées sur l'usage de la PCR multiplex aux urgences pédiatriques dans les pneumopathies aiguës de l'enfant.

L'étude Epi-Paups, historiquement la première, à visée exploratoire, consistait à réaliser une PCR multiplex à tous les enfants se présentant aux urgences pédiatriques avec une pneumopathie aiguë. Les caractéristiques des enfants et de leur maladie ont été systématiquement recueillies, et nous avons pu décrire plus finement les types de présentation pathologiques, les germes identifiés et le devenir de ces enfants. Cette étude était non interventionnelle, prospective et exploratoire.

L'étude OPTIPAC, qui lui a fait suite, était une étude interventionnelle multicentrique, randomisée en ouvert. Nous avons voulu comparer l'impact sur l'antibiothérapie probabiliste initiée aux urgences dans les pneumopathies aiguës de l'enfant d'une attitude incluant la réalisation d'une PCR multiplex et le rendu de ses résultats dans le temps même de la consultation aux urgences pédiatriques.

1 Etude Epi-Paups

Cette étude préliminaire à l'étude OPTIPAC, monocentrique sur le CHU de Saint-Etienne, avait pour but de décrire l'épidémiologie et la microbiologie générale des pneumopathies infectieuses de l'enfant. Pendant 6 mois de novembre 2012 à avril 2013, tous les enfants consultant aux urgences pédiatriques présentant une pneumopathie aiguë sur la base de critères cliniques et radiologiques ont été inclus. Des prélèvements exhaustifs ont été réalisés à la recherche de l'étiologie, notamment des prélèvements respiratoires avec une série de PCR biplext afin de rechercher une large variété de virus respiratoires ainsi qu'une mise en culture des sécrétions avec un seuil de positivité à 10^7 UFC/ml. Sur les prises de sang, les analyses biochimiques à la recherche de syndrome inflammatoire notamment ainsi que des hémocultures ont été réalisées. Cette étude épidémiologique descriptive monocentrique n'impactait pas la prise en charge. Les objectifs secondaires étaient de caractériser le plus finement possible les différents types de présentation clinique, mais aussi la place des co-infections, des portages éventuels et de discuter la responsabilité de chaque pathogène dans le processus infectieux



Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital

Aymeric Cantais^a, Olivier Mory^a, Sylvie Pillet^b, Paul O. Verhoeven^b, Julie Bonneau^b, Hugues Patural^c, Bruno Pozzetto^{b,*}

^a Department of Pediatric Emergency, University-Hospital of Saint-Etienne, CHU de Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

^b Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA3064, Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, 42023 Saint-Etienne Cedex 02, France

^c Pediatric Intensive Care Unit, University-Hospital of Saint-Etienne, CHU de Saint Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2014

Received in revised form 2 May 2014

Accepted 12 May 2014

Keywords:

Children
Community-acquired-pneumonia
PCR
Viral pneumonia
Epidemiology

ABSTRACT

Background: The management of children with community-acquired pneumonia (CAP) is largely influenced by the development of new molecular diagnostic tests that allow the simultaneous detection of a wide range of pathogens.

Objectives: Evaluation of a diagnostic approach including multiplex PCR assays for revisiting the epidemiology and etiology of CAP in children at hospital.

Study design: Children of all ages consulting at the Emergency Department of the University hospital of Saint-Etienne, France, during the 2012–2013 winter period were included. In addition to bacterial cultures, the following pathogens were detected using biplex commercially-available rt-PCR tests: adenovirus, respiratory syncytial virus, human metapneumovirus, bocavirus, rhinovirus/enterovirus, coronavirus, influenza viruses A and B, parainfluenza viruses, *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*.

Results: From 85 patients with CAP, at least one pathogen was identified in 81 cases (95.3%), including 4 bacterial exclusive infections (4.7%), 53 viral exclusive infections (62.4%) and 24 mixed infections (28.2%). Coinfection by at least two viruses was observed in 37 cases (43.5%). Mean age was higher in the case of documented bacterial infection ($P < 0.05$). In the subgroup of viral exclusive infection, the mean age of severe cases was 2.0 years vs 3.8 years in mild and moderate cases ($P < 0.05$).

Conclusions: These findings highlight the huge proportion of CAP of viral origin, the high number of coinfection by multiple viruses and the low number of bacterial CAP, notably in children under 5 years, and address the need to re-evaluate the indications of empiric antimicrobial treatment in this age group.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Background

Community-acquired pneumonia (CAP) is the leading cause of death in children under five years of age in the world [1]. In developed countries, the systematic prescription of antimicrobial drugs to patients with CAP has led to a dramatic reduction in mortality

* Corresponding author at: Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes, EA3064, Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, 15 rue Ambroise Paré, 42023 Saint-Etienne Cedex 02, France. Tel.: +33 4 77 82 84 34; fax: +33 4 77 82 84 60.

E-mail addresses: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr, bruno.pozzetto@chu-st-etienne.fr (B. Pozzetto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.05.006>

1386-6532/© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

linked to this pathology [2,3]. However, a bacterial origin of CAP has not been documented in a large proportion of cases despite extensive aetiological investigations. The current recommendations [4–6] encourage pediatricians to prescribe a probabilistic antimicrobial treatment, even when no bacterial infection is documented, which results in prolonged use of antibiotics and in the possible selection of resistant strains within the endogenous flora [7].

Until the beginning of the current century, the absence of documented bacterial infection was attributed to the difficulty in obtaining deep respiratory specimens that are not contaminated by bacteria from the local flora [8] together with the lower sensitivity of blood cultures in proving bacterial sepsis [9]. At this time, most of the epidemiological data from pediatric CAP relied

on traditional bacteriological cultures. With the occurrence of new diagnostic tools and notably of multiplex PCR assays able to simultaneously detect a large panel of viruses and atypical bacteria, it now appears that a large proportion of CAP could be related to viral infection [10–12]. Many studies have evaluated these new tools but most of them were limited to subgroups of children notably to the young [13,14], to hospitalized children [11,13–17], or for selected pathogens [10,12,18,19].

2. Objective

The aim of the present study was to document the presence of a large variety of pathogens in respiratory specimens from children attending the Pediatric Emergency Department of the University hospital of Saint-Etienne, France, during a six-month period and presenting a CAP based on clinical and radiological evidence. The microbiological diagnostic approach combined bacterial cultures and biplex commercially available rt-PCR tests detecting a wide range of respiratory pathogens.

3. Study design

3.1. Clinical data

A single center epidemiological observational study was conducted over a six-month period (November 2012 to April 2013) on children aging from one month to 16.5 years and presenting with CAP at the Pediatric Emergency Department of the University hospital of Saint-Etienne, France. The study was submitted for approval to the local Ethics Committee. After oral information was given together with a form explaining the content of the research, a consent form was signed by a parent or legal tutor before inclusion of each patient.

A CAP case was defined [6] as a subject with fever of at least 38.5 °C, an age-corrected polypnea [20] and a chest radiograph showing images of acute pneumonia confirmed by a second examiner (a pediatric radiologist for ambulatory children or a pediatrician for hospitalized patients). A few subjects were excluded after this second reading, notably in the case of associated bronchitis.

The data collected at inclusion comprised the demographic characteristics of the child, their vaccine status, the smoking habits of parents, the date of the beginning of the current respiratory episode and the drugs, including antimicrobials, that they received during this period. According to the current guidelines [4–6], a pneumonia was defined as severe for this study if the patient presented at least one of the following criteria: respiratory rate above 70 per minute in infants less than 1 year of age and above 50 per minute for older children, a tachycardia adjusted to age, a capillary refill time >3 s and an oxygen saturation <92%.

A control visit was systematically carried out at days 2 and 5 either by phone call for ambulatory-treated children or after a physical examination in the service of hospitalization for children admitted to hospital.

3.2. Biological investigations

A number of biological parameters were recorded systematically, including C reactive protein (CRP), procalcitonin (PCT), white blood cell count and natremia.

Nasopharyngeal secretions obtained by sputum induction [21,22] were sampled at entry for all the participants. The following tests were performed at inclusion: standard detection of conventional bacteria by culture, detection of five different viruses (respiratory syncytial virus (RSV), influenza viruses A and

B, parainfluenza viruses, metapneumovirus and adenovirus) by indirect immunofluorescence (IFI) assay and detection of atypical bacteria by PCR as previously described [23].

In parallel, blood cultures and pneumococcal antigenuria were tested if prescribed by the clinician, notably in the case of hospitalization.

In addition to the test listed above that were performed at the time of hospital attendance, a rtPCR assay was performed at the end of the study on an aliquot fraction kept frozen at –80 °C for the whole panel of nasopharyngeal aspirates, as previously described [24]. Briefly, 200 µl of aspirate was extracted on NUCLESENS® easyMAG™ (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). The Respiratory Multi Well System (MWS) r-gene™ (Chla/Myco pneumo, Influenza A/B, RSV/hMPV, AD/hBoV, HCoV/HPIV, and Rhino&EV/CC) from bioMérieux was used for molecular testing. It consists of a series of biplex assays detecting either a couple of pathogens or a single pathogen and a cell control (CC) attesting for the presence of cellular nucleic acids within the specimen. The following pathogens were tested: *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*, influenza viruses A and B, RSV and human metapneumovirus (hMPV), adenovirus (ADV) and bocavirus (BoV), parainfluenza viruses and coronaviruses, rhinovirus/enterovirus (hREV) and a cell control.

3.3. Statistical comparison of bacterial and non-bacterial cases

An univarié analysis was performed to compare the cases documented as probably related to a bacterial infection (threshold of 10⁷ CFU/ml for conventional cultures [25,26] or the presence of atypical bacterium by PCR in nasopharyngeal aspirates), and the others. Comparisons adjusted for age, severity of pneumonia and mono/multiple infection were also performed. The chi-square test or the Fisher exact test was used to compare qualitative variables whereas the Student *t* test was used for quantitative variables. A *P* value of 0.05 was considered as statistically significant.

A multivariate analysis of factors independently associated with detection of bacterial was secondarily performed; the parameters included in the logistic regression model were those with *P* < 0.10 by univarié analysis.

4. Results

4.1. Clinical characteristics of included cases

Over the six-month period of the study, 95 children thought to have CAP were included; 10 of them were excluded secondarily, comprising 7 cases with non-CAP infection, 2 cases without nasopharyngeal aspirate and one case of CAP whose inclusion was not consented by the child's family. With reference to the total number of cases of CAP recorded over the same period in the Pediatric Emergency Department (*n* = 97), the representation rate was of 87.6% (85/97).

The demographic and clinical characteristics of the 85 included cases together with the mode of management (ambulatory or hospital) and the probabilistic antimicrobial treatment are listed in Table 1.

Apyrexia was observed in 85.9 and 98.8% of cases at day 2 and 5, respectively. From the 35 children hospitalized at entry, 33 (94.3%) and 5 (14.3%) were still hospitalized at day 2 and 5, respectively. Only one child needed intensive care within the Pediatric Intensive Care Unit. The antimicrobial treatment was modified in only three cases. Neither fatal cases nor immediate sequelae were observed during the study. Twenty-six cases (30.6%) were classified as severe CAP.

Table 1
Demographic and clinical characteristics of the 85 patients included in the study.

Characteristics (unit)	Numerical data
Median age (years)	2.8
Interquartile range (years)	1.5–5.7
Categories by age	
Infants (<2 years old) – No. (%)	30(35.3)
Preschool children (2 – 5 years old) – No. (%)	32(37.6)
Children (5 – 12 years old) – No. (%)	19(22.3)
Teenagers (12 – 18 years old) – No. (%)	4(4.7)
Gender – No. females (%)	39(46)
Vaccinal status	
Up-to-date pneumococcal vaccine – No. (%)	61(71.7)
Up-to-date <i>Haemophilus influenzae</i> B vaccine – No. (%)	68(80)
Medical history	
Previous hospitalization – No. (%)	17(20)
Pulmonary disease – No. (%)	26(30.5)
– Bronchiolitis – No. (%)	9(10.5)
– Asthma – No. (%)	9(10.5)
– Pneumonia – No. (%)	4(4.7)
Parental smoking habits	
No smoking parent – No. (%)	44(51.7)
At least one smoking parent – No. (%)	28(32.8)
Medication before emergency's consultation	
None – No. (%)	16(18.8)
Acetaminophen – No. (%)	58(68.2)
Non-steroidal anti-inflammatory drug – No. (%)	15(17.6)
Antimicrobial treatment – No. (%)	18(21.2)
Average duration of symptoms before emergency consultation (days)	4
Radiological localization of lesions	
Right upper lobe – No. (%)	12(14.1)
Right lower lobe – No. (%)	21(24.7)
Right middle lobe – No. (%)	13(15.3)
Left upper lobe – No. (%)	8(9.4)
Left lower lobe – No. (%)	24(28.2)
Interstitial syndrome ^a – No. (%)	13(15.3)
At least one criterion of severe pneumonia at entry	26(30.6)
Hospitalization at entry – No. (%)	36(42.4)
Antimicrobial treatment	
Amoxicillin – No. (%)	50(58.8)
Co-amoxiclav – No. (%)	18(21.2)
Erythromycin – No. (%)	8(9.4)
Amoxicillin + erythromycin – No. (%)	4(4.7)
None – No. (%)	4(4.7)
Others – No. (%)	1(1.2)

^a Interstitial syndrome was associated with lobar lesions in 6 cases and was the only radiological sign in 7 cases.

The general biological characteristics of the included cases were as follows: the median count of leukocytes was 14.7 10⁹ per liter (interquartile range 10.84–20.08), with 66.5% of neutrophils; the CRP median rate was of 64.5 mg/L (interquartile range: 19–163), the PCT median rate was of 0.87 µg/L (interquartile range: 0.17–5.14); an hyponatremia (<135 mEq/L) was observed in 23 cases (27%).

4.2. Microbiological results

By using IFI prospectively, only 26 of the 85 nasopharyngeal aspirates (30.6%) were found positive, including 17 RSV, 9 ADV and 4 influenza virus B; all of these infections were confirmed by the retrospective rt-PCR assay. The pneumococcal antigenuria, available in 60 cases, was positive in 13 patients, 3 of them exhibiting a threshold of 10⁷ CFU/ml by conventional culture. In the three other pneumococcal infections, no antigenuria was available. Blood culture, performed in 38 cases (44%), was found positive for *Streptococcus pneumoniae* in only one case.

By combining bacterial culture and retrospective rt-PCR assays, at least one pathogen was identified in 81 cases (95.3%). The number of detected pathogens was of 0, 1, 2, 3, 4 and 5 in 4 (4.7%), 30

Table 2
Distribution of the 85 cases of CAP according to the number of detected bacteria and viruses.

Number of bacteria	Number of viruses				
	0	1	2	3	5
0	4	28	22	2	1
1	2	10	10	2	–
2	2	1	1	–	–

(35.3%), 34 (40.0%), 13 (15.3%), 3 (3.5%) and 1 (1.2%) specimens, respectively (Table 2). From the 85 cases of CAP, 4 bacterial exclusive infections were observed (4.7%), 24 infections with at least one bacterium and one virus (28.2%) and 53 viral exclusive infections (62.4%). Coinfection by at least two viruses was observed in 37 cases (43.5%). Table 3 displays the distribution of the identified pathogens and specifies the various associations, the most common being ADV/RSV (10 cases), *Haemophilus influenzae*/ADV (8 cases) and hREV/BoV (8 cases).

The monthly distribution of microbiological infections is depicted in Fig. 1.

4.3. Statistical analysis

As shown in Table 4, none of the variables tested was statistically correlated to the presence of a bacterial pathogen by univariate analysis, with the exception of age that was higher in the case of documented bacterial infection (mean age of 5.45 vs 3.49 years; $P < 0.05$ by Student t test) and the presence of abdominal pain at clinical examination at entry ($P = 0.02$). Concerning biological parameters, no correlation was observed between bacterial and non-bacterial cases for the most of them, notably for CRP and PCT, with the exception of the white blood cell count that was higher in case of viral infection. Severity was statistically associated neither to the bacterial or non bacterial etiology of CAP, nor to a younger age, except in the subgroup of viral exclusive infection ($n = 53$), in which the mean age of severe cases was 2.0 years vs 3.8 years in mild and moderate cases ($P < 0.05$ by Student t test). Coinfection was not associated to a younger age or a more severe disease, even if the number of detected pathogens tended to be related to the severity of CAP (2.1 infected agents in severe cases vs 1.7 in non-severe cases, $P = 0.09$ by Student t test).

By multivariate analysis, none of the tested variables was independently associated with bacterial infection.

5. Discussion

The demographic characteristics of the included patients were coherent with those of the literature [6] in terms of age (median age of 2.8 years; interquartile range: 1.5–5.7 years) and sex ratio (1.18 to the benefit of males). Those patients with CAP were shown to exhibit different risk factors as illustrated by a lower vaccination coverage as compared to that of the French population, an elevated rate of previous hospitalization (17/85, 20.0%), a history of frequent respiratory disease (26/85; 30.6%) and a high level of smoking habits in parents (Table 1).

Approximately 4 children out of 5 reached hospital without having consulted another physician; most of them had already received an antipyretic treatment, mainly acetaminophen but also non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), despite the fact that the use of NSAID may be harmful [27].

At entry, 95.3% (81/85) of children had received an antimicrobial treatment. In most cases, the first choice for antimicrobial drug was amoxicillin, as currently recommended [4–6].

Despite the limited size of the present study and its restriction to a single center, its originality lies in the diversity of the included

Table 3

Detailed presentation of cases of community-acquired pneumonia exhibiting an infection with at least 2 pathogens. Gray boxes indicate the total number of positive cases for each pathogen. White boxes corresponds to the cases with co-infection.

Infectious agents	ADV	RSV	BoV	Hi	IVB	hMPV	HREV	Mc	Spn	PIV	IVA	Mp	Spy	Mn	hCoV
Adenovirus (ADV)	32														
Respiratory syncytial virus (RSV)	10	28													
Bocavirus (BoV)	4	5	18												
<i>Haemophilus influenzae</i> (Hi)	8	6	0	11											
Influenzavirus (IVB)	3	1	1	1	11										
Human metapneumovirus (hMPV)	5	1	1	2	0	11									
Human rhinovirus or enterovirus (HREV)	2	3	8	1	0	1	11								
<i>Moraxella catarrhalis</i> (Mc)	2	1	4	0	2	0	2	9							
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (Spn)	2	0	1	1	1	1	1	1	6						
Parainfluenza virus (PIV)	1	1	2	0	0	0	0	0	0	5					
Influenzavirus A (IVA)	2	0	1	1	0	1	1	1	0	0	5				
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (Mp)	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4			
<i>Streptococcus pyogenes</i> (Spy)	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1		
<i>Moraxella nonliquefaciens</i> (Mn)	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	
Coronavirus (CoV)	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total of coinfections (%)	26 (81.2)	19 (67.9)	18 (100)	11 (100)	6 (54.5)	10 (90.9)	6 (54.5)	9 (100)	5 (83.3)	4 (80)	4 (80)	3 (75)	1 (100)	1 (100)	1 (100)

population in terms of age and mode of management (ambulatory and hospitalization), together with the detection of a large range of pathogens including viruses and bacteria.

From a microbiological point of view, it is first useful to justify the definition of what level of detection constitutes a causative agent in children with CAP included in this study. Concerning bacterial loads, the threshold of 10^7 CFU/ml was retained as recommended by European experts when induced sputum specimen are used [25]. It helps the discarding of pneumococcal colonization with prevalence of up to 57–65% in children of less than 5 years old [28,29] from true infection. By contrast, “the asymptomatic carrier state of viruses is rather uncommon for most respiratory viruses [12,30], apart from the post active phase of respiratory virosis” [25], which justifies to consider the detection of viral genome in respiratory specimens as a marker of probable viral infection.

In the more exhaustive studies performed earlier, the percentage of elucidated cases from a microbiological point of view ranged from 72% to 86% [6,11,30] whereas it was of 95.3% in the present

study detecting a wide spectrum of infectious agents with respiratory tropism. As reported earlier [30], viral infections were shown to be predominant in children under 5 years of age and only 32% of all CAP were found to be of bacterial origin.

Eighteen children received antimicrobial therapy before emergency consultation, which could be considered as a source of false-negative culture. However, all of them were always symptomatic at entry, which implies that a bacterium, if present, had a significant opportunity to be recovered by culture.

An interesting finding of this study is the large proportion of viral coinfection (43.5%), much higher than that previously reported [10,12,30], notably for bocavirus, metapneumovirus and adenovirus that were detected in association with at least one other virus in more than 80% of the CAP cases involving these agents (Table 2). It has been suggested that infection by several viruses could enhance the severity of CAP [12,30–32]. In the present study, a trend was observed in the association between the mean number of infectious agents and the severity of CAP as defined above ($P=0.09$); a larger

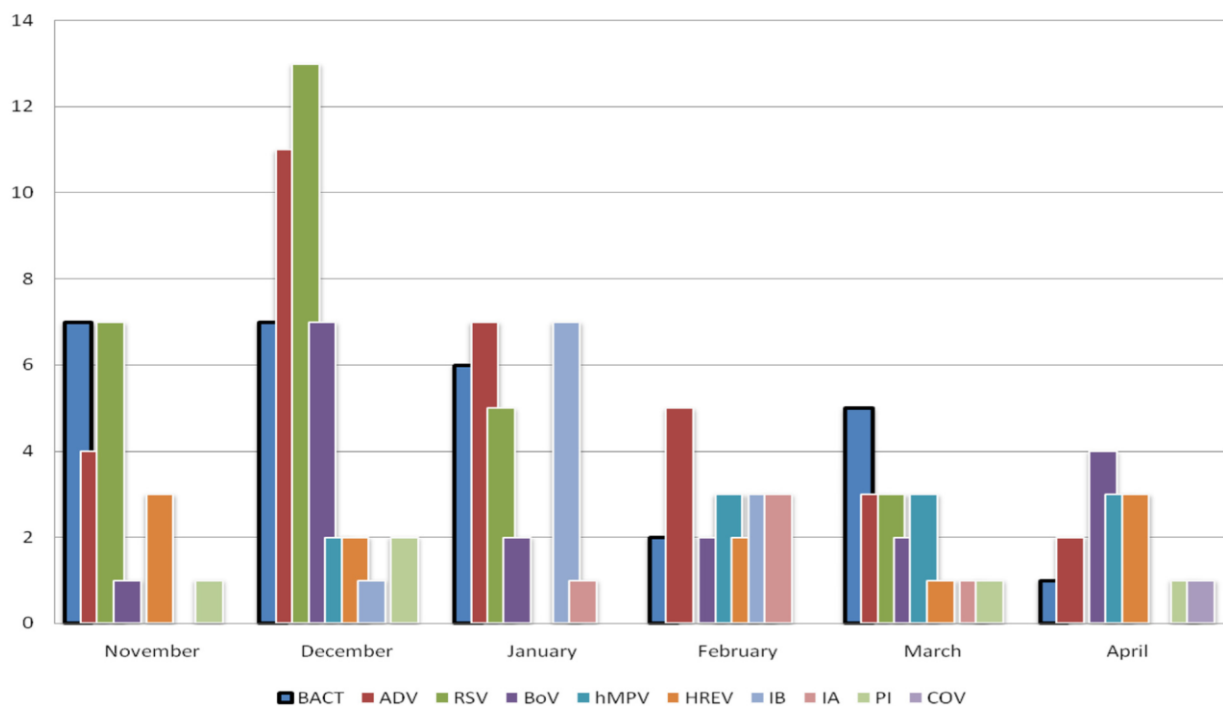


Fig. 1. Monthly distribution of microbiological infection. BACT: bacteria. ADV: adenovirus; RSV: respiratory syncytial virus; BoV: bocavirus; hMPV: human metapneumovirus; HREV: human rhinovirus and enterovirus; IB: influenza B; IA: influenza A; PI: parainfluenza virus; COV: coronavirus.

Table 4

Data from individuals with versus without bacterial infection.

Characteristics (unit)	Bacterial infection (n = 28)	Non bacterial infection (n = 57)	p ^a
Mean age (years)	5.45	3.49	0.0210
Gender (No. females)	13	26	1
Vaccinal status (No.)			
Up-to-date pneumococcal vaccine	17	44	0.3744
Up-to-date <i>Haemophilus influenzae</i> B vaccine	24	44	1
Medical history (No.)			
Previous hospitalization	7	10	0.5647
Pulmonary disease	7	19	0.4662
Parental smoking habits (No.)			
At least one smoking parent	8	20	0.6105
Medication before emergency's consultation (No.)			
None	6	11	1
Acetaminophen	19	41	0.6176
Non-steroidal anti-inflammatory drug	5	10	1
Corticosteroids	3	2	0.3526
Average duration of symptoms before emergency consultation (days)	4.3	3.9	0.4829
At least one criterion of severe pneumonia at entry (No.)	10	16	0.6170
Hospitalization at entry	9	26	0.2466
Still hospitalized at day 2	10 ^b	23	0.8137
Clinical examination at entry (No.)			
Asthma	21	38	0.4662
Chest pain	4	7	1
Abdominal pain	11	9	0.0279
Cough	22	45	1
Wheezing	5	9	1
Crackles	11	11	0.0656
Biology at entry			
White blood cells (G/L)	13.45	17.67	0.0181
Polynuclears neutrophils (%)	66.7	62.3	0.3607
Platelets (G/L)	293	350	0.0513
CRP (mg/L)	105	111	0.8366
Procalcitonin (μg/L)	6.3	4.9	0.5783
Natriemia (mEq/L)	135.2	136.3	0.0809

^a Fisher's exact test for categorical data and Student t-test for continuous values.^b By comparison to the precedent line, a patient was hospitalized after coming back home.

effective size would have been needed to determine a statistically significant difference.

In terms of clinical evolution, neither death nor major complications were reported in this study, despite rates of 30.6% for severe pneumonia and 42.4% for hospitalization. There was no statistical difference in the severity of CAP between viral and bacterial infections. Almost all of the children received antibiotics, which was unnecessary in a large proportion of cases (62.4%) for which only viruses were detected. This finding raises the question of the systematic use of antimicrobials to treat childhood CAP, which is still recommended in different guidelines [4–6].

The present findings, together with those of others, allowed the identification of a subpopulation of children less than 5 years of age with mild or moderate symptoms for which a viral etiology of CAP is highly probable. This situation represents half of the cases recorded in this study: 62 children (72.9%) were less than five-years old, and 40 of them presented a mild or moderate CAP, which corresponds to 47.1% of all cases. The use of a rapid molecular test detecting a large set of viral and bacterial pathogens within 2 or 3 hours, such as that described in [33], would allow an improvement in the management of the antimicrobial treatment. In the case of positive result, it would be recommended to avoid the use of amoxicillin as a first-intent therapy (or to prescribe erythromycin in the case of detection of an agent of atypical pneumonia) and to reconsider the use of antimicrobial treatment 24–48 h later according to the clinical evolution and to the results of bacterial cultures. Conversely, the negativity of the rapid test would lead to the empiric prescription of amoxicillin, as currently recommended [4–6]. It is obvious that this attitude would be dedicated to CAP with mild or moderate symptoms and that CAP with severe presentation at entry should include a systematic probabilistic antimicrobial

therapy, whatever the results of PCR assay. The present results are indicative that this strategy could dramatically reduce the proportion of unnecessary antimicrobial treatments in mild or moderate child CAP. Wider studies are needed to prospectively evaluate the benefits of this approach in terms of patient recovery, prevention of antibiotic resistance and medical economy.

Funding

The reagents used for the retrospective analysis were funded by a grant from the Medical Association of Pediatricians of the University Hospital of Saint-Etienne for research and studies (ADERPS), France.

Competing interests

The authors declare that they have no conflict of interest regarding the object of this study.

Ethical approval

The study was submitted for approval to the local Ethics Committee.

Acknowledgements

The authors are indebted to the patients' families who gave their consent for participating to this study. Philip Lawrence is warmly acknowledged for his careful checking of English language. The reagents used for the retrospective analysis were funded by a grant

from the Medical Association of Paediatrician of the University-Hospital of Saint-Etienne for research and studies (ADERPS).

References

- [1] Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet* 2005;365:1147–52.
- [2] Black RE, Cousens S, Johnson HL, Lawn JE, Rudan I, Bassani DG, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet* 2010;375:1969–87.
- [3] Rudan I, Boschi-Pinto C, Biloglav Z, Mulholland K, Campbell H. Epidemiology and etiology of childhood pneumonia. *Bull World Health Organ* 2008;86:408–16.
- [4] Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011; 53:1.
- [5] Uehara S, Sunakawa K, Eguchi H, Ouchi K, Okada K, Kurosaki T, et al. Japanese guidelines for the management of respiratory infectious diseases in children 2007 with focus on pneumonia. *Pediatr Int* 2011;53:264–76.
- [6] Harris M, Clark J, Coote N, Fletcher P, Harnden A, McKean M, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011;66(Suppl. 2):1–23.
- [7] Esposito S, Cohen R, Domingo JD, Pecurariu OF, Greenberg D, Heininger U, et al. Antibiotic therapy for pediatric community-acquired pneumonia: do we know when, what and for how long to treat? *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:e78–85.
- [8] Murdoch DR, O'Brien KL, Scott JAG, Karron RA, Bhat N, Driscoll AJ, et al. Breathing new life into pneumonia diagnostics. *J Clin Microbiol* 2009;47:3405–8.
- [9] Clements H, Stephenson TJ. Blood culture is poor method of confirming pneumococcus as cause of childhood pneumonia. *Br Med J* 1996;313:757.
- [10] Wolf DG, Greenberg D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Bar-Ziv J, Dagan R. Association of human metapneumovirus with radiologically diagnosed community-acquired alveolar pneumonia in young children. *J Pediatr* 2010;156:115–20.
- [11] Hamano-Hasegawa K, Morozumi M, Nakayama E, Chiba N, Murayama SY, Takayanagi R, et al. Comprehensive detection of causative pathogens using real-time PCR to diagnose pediatric community-acquired pneumonia. *J Infect Chemother* 2008;14:424–32.
- [12] Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral coinfection. *J Med Virol* 2008;80:1843–9.
- [13] Tsolia MN, Psarras S, Bossios A, Audi H, Paldanius M, Gourgiotis D, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized school-age children: evidence for high prevalence of viral infections. *Clin Infect Dis* 2004;39: 681–6.
- [14] Cevey-Macherel M, Galetto-Lacour A, Gervais A, Siegrist C-A, Bille J, Bescher-Ninet B, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *Eur J Pediatr* 2009;168: 1429–36.
- [15] Drummond P, Clark J, Wheeler J, Galloway A, Freeman R, Cant A. Community acquired pneumonia – a prospective UK study. *Arch Dis Child* 2000;83: 408–12.
- [16] Michelow IC, Olsen K, Lozano J, Rollins NK, Duffy LB, Ziegler T, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004;113:701–7.
- [17] Lin P-Y, Lin T-Y, Huang Y-C, Tsao K-C, Huang Y-L. Human metapneumovirus and community-acquired pneumonia in children. *Chang Gung Med J* 2005;28:683–8.
- [18] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005;126:53–63.
- [19] Principi N, Esposito S, Blasi F, Allegra L, Mowgli study group. Role of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in children with community-acquired lower respiratory tract infections. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2001;32:1281–9.
- [20] Palafox M, Guisacfré H, Reyes H, Munoz O, Martínez H. Diagnostic value of tachypnoea in pneumonia defined radiologically. *Arch Dis Child* 2000;82: 41–5.
- [21] Lambert SB, Whitley DM, O'Neill NT, Andrews EC, Canavan FM, Bletchly C, et al. Comparing nose-throat swabs and nasopharyngeal aspirates collected from children with symptoms for respiratory virus identification using real-time polymerase chain reaction. *Pediatrics* 2008;122:e615–20.
- [22] Lahti E, Peltola V, Waris M, Virkki R, Rantakokko-Jalava K, Jalava J, et al. Induced sputum in the diagnosis of childhood community-acquired pneumonia. *Thorax* 2009;64:252–7.
- [23] Ginevra C, Barranger C, Ros A, Mory O, Stephan J-L, Freymuth F, et al. Development and evaluation of Chlamydiae, a new commercial test allowing simultaneous detection and identification of *Legionella*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Mycoplasma pneumoniae* in clinical respiratory specimens by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2005;43:3247–54.
- [24] Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS ONE* 2013;8:e72174.
- [25] Freymuth F, Ieven M, Wallet F. Lower respiratory tract infections. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue Lefeuvre H, Vila J, SFM, ESCMID, editors. *European manual of clinical microbiology*. 1st ed. France: Epernay; 2012. p. 153–61.
- [26] Murdoch DR, O'Brien KL, Driscoll AJ, Karron RA, Bhat N. Pneumonia Methods Working Group, et al. Laboratory methods for determining pneumonia etiology in children. *Clin Infect Dis* 2012;54:S146–52.
- [27] François P, Desrumaux A, Cans C, Pin I, Pavese P, Labarère J. Prevalence and risk factors of suppurative complications in children with pneumonia. *Acta Paediatr* 2010;99:861–6.
- [28] Millar EV, Watt JP, Bronsdon MA, Dallas J, Reid R, Santosham M, et al. Indirect effect of 7-valent pneumococcal conjugate vaccine on pneumococcal colonization among unvaccinated household members. *Clin Infect Dis* 2008;47: 989–96.
- [29] Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JAG. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi District, Kenya. *Pediatr Infect Dis J* 2008;27:59–64.
- [30] Esposito S, Daleno C, Prunotto G, Scala A, Tagliabue C, Borzani I, et al. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses* 2013;7: 18–26.
- [31] Fry AM, Lu X, Chittaganpitch M, Peret T, Fischer J, Dowell SF, et al. Human bocavirus: a novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in Thailand. *J Infect Dis* 2007;195:1038–45.
- [32] Esposito S, Principi N. Unsolved problems in the approach to pediatric community-acquired pneumonia. *Curr Opin Infect Dis* 2012;25:286–91.
- [33] Pierce VM, Elkan M, Leet M, McGowan KL, Hodinka RL. Comparison of the Idaho Technology FilmArray system to real-time PCR for detection of respiratory pathogens in children. *J Clin Microbiol* 2012;50:364–71.

2 Etude OPTIPAC

Cette étude multicentrique et prospective a été financée intégralement par un PHRC National en 2015. Il s'agissait de randomiser tout patient se présentant aux urgences pédiatriques avec une pneumopathie aigue entre deux attitudes cliniques. La première, dite « pratique habituelle » consistait à laisser le clinicien réaliser la prise en charge selon son jugement sans intervention particulière pour l'étude. Les sécrétions respiratoires étaient tout de même prélevées, puis congelées en vue d'une analyse en fin d'étude. Dans la seconde, dit « Groupe PCR Multiplex », il était donné consigne de réaliser la prise en charge habituelle, puis les sécrétions respiratoires étaient prélevées si ce n'était pas déjà fait, et une PCR multiplex urgente (délai de rendu des résultats d'une heure) était effectuée au laboratoire et les résultats communiqués au clinicien avant le départ du patient du service. Les sécrétions étaient congelées en vue de la même analyse en fin d'étude. L'ensemble des examens réalisés et leurs résultats étaient colligés, ainsi que les caractéristiques du patient et son devenir avec un suivi téléphonique jusqu'à J15. L'attitude en termes d'antibiothérapie (initiation, abstention, molécule utilisée, antiviral ou non, modification du traitement à H48 en ville ou à l'hôpital) était en particulier relevée.

Un comité d'adjudication s'est réuni en fin d'étude afin de relire chaque dossier à posteriori, compte tenu de l'ensemble des résultats microbiologiques – y compris la PCR « gold standard » sur l'ensemble des prélèvements congelés en fin d'étude – et de l'évolution clinique des enfants, afin de catégoriser la prise en charge initiale aux urgences en « appropriée » ou « non appropriée » et de comparer les deux groupes.

Au total, dix centres d'urgences pédiatriques en France ont participé à l'étude, et les résultats positifs de ce travail – encore en cours de soumission – ont vocation à souligner la place importante que peut avoir le diagnostic précoce sur la prise en charge dès les urgences pédiatriques dans les PAC de l'enfant.

Impact of detection of respiratory pathogens by a rapid multiplex PCR assay on the management of Community-Acquired Pneumonia for children at the Pediatric emergency department. A randomized controlled trial, the OPTIPAC Study.

Aymeric Cantais, Sylvie Pillet, Josselin Rigail, François Angoulvant, Christele Gras-Le-Guen, Pierrick Cros, Charlotte Thuiller, Molly Claudine, Tripodi Louise, Paul Verhoeven, Anne Carricajo, Thomas Bourlet, Céline Chapelle, Arnauld Garcin, Olivier Mory, Bruno Pozzetto and the OPTIPAC Study Group

3160 mots

Abstract (229 mots)

Background

The aetiology of community-acquired pneumonia (CAP) in children is usually undocumented at the time of initial management. International guidelines recommend a probabilistic antibiotic treatment in all cases. Would the determination of the aetiology of pneumonia at the time of initial management improve the appropriateness of probabilistic treatment?

Methods

We performed a multicentre, prospective, randomized, open-labelled parallel groups study in France, designed to show the superiority of the intervention (multiplex PCR assay : FilmArray Respiratory Panel Assay, bioMérieux) plus standard care *versus* standard care alone at the paediatric emergency department in ~~pediatric~~ pediatric patients consulting for CAP. Patients were followed up for 15 days. The main criterion was “appropriate initial antimicrobial management” as defined by an independent expert group reviewing all the situations.

Findings

We included 499 patients from June 2016 to December 2018 in 10 centres. The main criterion was significantly higher in the multiplex PCR assay group compared to the controls (168/245, 68.6% *versus* 120/249, 48.2%; Relative Risk 1.42 (1.22;1.66), $P < 0.0001$). No adverse event was identified in both groups of the study. Neither the treatment failure nor hospitalisation rate after discharge was different between the two groups.

Interpretation

The availability of the result of a multiplex PCR assay at the time the child consults at the emergency department improves antimicrobial stewardship, both reducing the rate of

prescription of antimicrobials and improving the adequation of the therapy. This attitude is safe and secure.

Funding

This study was financed by public fund exclusively (PHRC NAT 150818)

INTRODUCTION : 473 words

Community-acquired pneumonia (CAP) is one of the leading causes of paediatric emergency department (PED) visits (1) and are often due to viral pathogens (2-6), especially since the wide use of vaccination against *S. pneumoniae* (7). However, current guidelines recommend treating with amoxicillin any CAP with mild or moderate symptoms (8). Considering that antibiotic overuse is associated with an increasing prevalence of antibiotic resistance over the world, the question of the appropriate prescription of antibiotics in front of a CAP, namely antimicrobial stewardship, remains open (9). As viruses are the main cause of CAP(3), the use of antibiotics could probably be reduced (10). But this attitude would require confirmation of a viral aetiology that could help clinicians not prescribing antimicrobial treatment as the initial standard of care.

The identification of the pathogen(s) is rarely set up in routine clinical management. However, the aetiological diagnosis of CAP has dramatically evolved these last years, mainly by the use of multiplex PCR assays that can detect a large panel of viruses as well as atypical bacteria (11) that could not previously be identified by culture. At the time this study started, the utility of these multiplex panel assays as a syndromic approach of microbiological diagnosis remained unclear in clinical practice, especially in paediatric patients. If the impact on the children's length of stay seems to be real (12), one of the main limitations is the time to obtain the result, up to 24-36h in previous studies (13), which led to results that showed no impact of multiplex PCR assays on the prescription of antimicrobial. Because of dramatic progress in miniaturization and friendly-use technologies, new devices are shown to be helpful in patient's management (14), and their analytical performances are quite satisfactory (15-17). In adult patients, it has been demonstrated that the use of such multiplex PCR assays for

respiratory pathogen detection with the availability of a rapid result reduces the prescription of antibiotics (18) and the length of stay (19). However, these studies concern the management of all respiratory infections without focus on CAP.

In paediatric patients, epidemiological studies using a wide range of multiplex tests have shown the critical role of viruses as aetiological agent(s) of CAP (19-22). However, due to the absence of well-designed trials, the impact of rapid multiplex PCR assays is particularly difficult to estimate in paediatrics (23).

To our knowledge, no randomized study has been published to date on the impact of a rapid multiplex PCR assay providing a result while the child is still in the emergency department, on the management of CAP in children, especially on the prescription of antibiotics. We conducted a prospective multicentre study to address the utility of such devices in real-life clinical conditions and to evaluate whether the availability of the result during the consultation would improve antimicrobial stewardship without impacting the quality of medical care.

MATERIAL AND METHODS : 1226 words

Trial design

This was a multicentre, prospective with balanced randomization (1:1) open-labelled parallel groups study conducted in France (10 sites), designed to show the superiority of the intervention (FilmArray Respiratory Panel Assay, bioMérieux) plus standard care *versus* standard care alone. In the absence of guidelines of respiratory infection diagnosis in France, the standard care was left to the discretion of each centre and was the one used routinely by each laboratory

Participants

Eligible participants were all paediatric patients aged from 3 months to 18 years presenting at the paediatric emergency departments for CAP, defined by a fever above 38.5°C and a radiological examination judged compatible with pulmonary infection by the emergency paediatrician in charge of the child's care (24). Exclusion criteria were nosocomial pulmonary infection, immunosuppression, pleuropneumonia and allergy to an antibiotic usually used.

The study took place at the paediatric emergency departments of ten University Hospitals in France, from September 2016 to September 2018. These departments were directly located near the laboratory which performed the intervention test in a time compatible with the objectives of the study.

Intervention

The patients randomised to the "standard care" group received the same care as usual in each centre, as defined by antibiotherapy and hospitalisation or not, without specification for the study, at the decision of the clinician after the examination. Only analyses for the usual care

were performed, except a nasopharyngeal aspirate (NPA) for analysis at the end of the study with the “gold standard” PCR (17).

The patients randomised in the “Intervention” group were sampled with a nasopharyngeal aspirate (NPA) that was sent immediately to the local laboratory. The specimen was analysed by a multiplex PCR assay (Filmarray respiratory panel (RP), bioMérieux) and the results were phoned to the clinician in less than two hours between the sampling and the result. Depending on this result, the paediatric emergency clinician took freely the decision concerning the management of the CAP, without specific recommendations for the study. Detection of *S. pneumoniae* antigen in a urine specimen (BinaxNOW-SP, Abbott, BNX710010) was also performed during the consultation time to not dismiss *S. pneumoniae* infection. As the NPA was routinely used for the care of nasal congestion in most of the centres, this specimen was chosen for this study. A preliminary study comparing nasopharyngeal swab (recommended clinical specimen for the RP) and NPA conducted before this study showed similar results with even a higher number of pathogens detected in NPA (personal data).

The NPA were secondarily frozen at -80°C for analysis by the gold standard PCR at the end of the study. This assay was centralised for all specimens at the laboratory of infectious agents and hygiene of Saint-Etienne University Hospital and was performed as previously described (17). It consists of the use of 5 duplex PCR detecting influenza A, influenza B, RSV, hMPV, rhinoviruses/enteroviruses, coronaviruses, parainfluenza viruses, adenoviruses, bocavirus, *M. pneumoniae* and *C. pneumoniae*. A cell control validated all the processes of the assay as well as the presence of cells in the clinical specimen. This association of duplex PCR assays was chosen because of its previously shown good performances in identifying respiratory pathogens and the lower risk of missed detection in comparison to other multiplex PCR

assays(17, 25). A PCR detecting/quantifying *S. pneumoniae* was also performed on all specimens (26) ; the amplification target was the *ply* gene of *Streptococcus pneumoniae* using primers and probes already described in the literature (27, 28). The same extract for the multiplex PCR gold standard assay was used following a protocol depicted by our team in a previous study (29). This real-time PCR assay displays a sensitivity of 10³ colony forming units (CFU)/ml.

Follow-up

All patients were followed up by phone for up to 15 days by a clinical research professional, with two calls, one on day 2 and one on day 15. The data concerning the hospitalisation status and the modifications of antibiotic prescription were collected.

Outcome

The main outcome of CAP was upon the management of the patient, as defined at the end of the study by the expert group as “appropriate” or “non-appropriate”. The independent expert group was constituted with three independent practitioners, representing different specialities related to this disease and its management: a paediatric emergency specialist, a paediatric pulmonological specialist and a paediatric infectious disease specialist. None of these 3 practitioners included children in this study. All data relative to the medical management of the patient (medical files, the result of every biological or microbiological exam, data concerning the evolution of the patients and the results of the gold standard PCR) were assembled on numerically online software. Blindly to the randomisation group, two of the experts were asked to answer the question “considering all the documents concerning the management and evolution, and the results of the examination, do you consider that the

initial care at the exit of the emergency room was “appropriate” or “not appropriate”? The third expert was asked to answer only in case of discrepancy between the 2 first experts.

Sample size

The literature data showed that in children 40 to 60% of instances of CAP were of viral origin (2). Approximately 40% received a probabilistic antibiotic treatment due to a lack of aetiological identification (2, 30). We expected at best a level of 50% of inappropriate prescriptions of antibiotics with the usual diagnostic strategy. The value of the kit would be clinically relevant if its use enabled a reduction by at least 30% of these inappropriate prescriptions or a move from 50% to 35%. With an alpha risk of 5% and a power of 90%, one would need to include 226 patients per strand.

Randomization

The randomisation was computed numerically, balanced by blocks of variable sizes, and stratified by centre. The randomisation was generated by the clinician who included the patient, during his/her consultation at the emergency, on an internet platform available 24/7. All analyses were performed using the intention-to-treat population, i.e., all randomised patients.

Statistical methods

We used a chi-square test to compare the primary outcome between groups in the intention-to-treat population and reported the result as a relative risk with a 95% confidence interval. Continuous secondary outcomes were assessed with the use of the Student's t-test or the Wilcoxon rank-sum test. We conducted analyses of the secondary outcomes, subgroup analyses, and sensitivity analyses according to the pre-specified statistical analysis plan. We did not adjust for multiple comparisons, and we did not impute for missing values. Prespecified subgroups analyses were performed in subgroups defined according to the following characteristics: centres including more than 20 patients, seasonality (inclusion in summer or winter), patient age (< 2 years / 2-4 years / 5-9 years / 10-17 years), patients who exhibited an inflammatory syndrome (C-reactive protein (CRP) ≥ 60 mg/l or procalcitonin (PCT) ≥ 0.5 μ g/l) and type of pathogen (bacterial or viral). Results in the prespecified subgroups are presented graphically using a forest plot, including the effect size expressed as RR and the corresponding 95% CI.

All analyses were 2-sided and a P value of less than 0.05 was statistically significant. Statistical analyses were performed using SAS software, version 9.4 software (SAS Institute Inc) and graphs were constructed with the use of R software, version 3.6.2.

Ethics

The study was financed by a public fund (PHRC NAT 150818). The ethics committee has granted his approval (CPP Sud-Est 2016-A00483-48). The study was registered in clincialtrials.gov by the number NCT02668237.

RESULTS : 615 words

Participant flow

A total of 499 patients were randomised (Fig 1). They were equally balanced between the intervention group (=multiplex PCR) and the usual practice group. Only five patients (1%) were not analysed with the gold standard PCR at the end of the study because of the lack of respiratory specimen (3 and 2 patients in each group, respectively). The distribution of inclusions among centres is depicted in Table 1.

Figure 1 : Flow chart

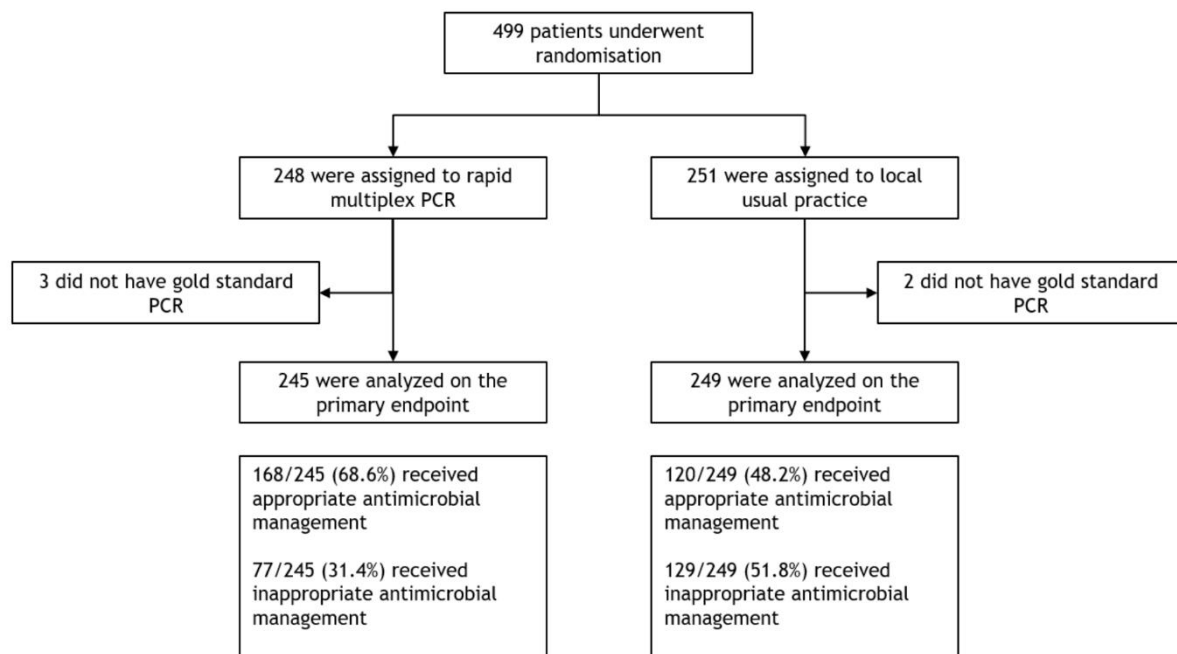


TABLE 1 - Inclusions by centre

	PCR Multiplex	Usual practice	Total
Number of randomized patients	248	251	499
Day of the first randomisation	20/06/2016	18/06/2016	18/06/2016
Day of the last randomisation	12/12/2018	28/12/2018	28/12/2018
Centres			
Saint-Étienne	125 (50.4%)	127 (50.6%)	252 (50.5%)
Toulouse	33 (13.3%)	33 (13.1%)	66 (13.2%)
Brest	21 (8.5%)	20 (8.0%)	41 (8.2%)
Grenoble	21 (8.5%)	20 (8.0%)	41 (8.2%)
Reims	18 (7.3%)	18 (7.2%)	36 (7.2%)
Clermont-Ferrand	14 (5.6%)	15 (6.0%)	29 (5.8%)
Caen	10 (4.0%)	12 (4.8%)	22 (4.4%)
Marseille	2 (0.8%)	2 (0.8%)	4 (0.8%)
Paris - Necker	2 (0.8%)	2 (0.8%)	4 (0.8%)
Paris - Bécélère	2 (0.8%)	1 (0.4%)	3 (0.6%)
Strasbourg	0 (0.0%)	1 (0.4%)	1 (0.2%)

Patients were included from June 2016 to December 2018. All were followed up by phone for up to 15 days, except for 24 (4.81%) who did not respond. The trial stopped after the planned/expected number of patients was included (n=499).

Baseline demographics and clinical characteristics of the randomised patients are reported in Table 2. No differences were found between the groups.

Table 2. Demographic and Clinical Characteristics of the patients. *

	PCR Multiplex group (N = 248)	Usual Practice group (N = 251)
Age - years	3.5 ± 3.0	3.9 ± 3.1
Male sex - no. (%)	141 (56.9)	136 (54.2)
Start of fever - hours	88.7 ± 74.3	88.5 ± 81.2
Maximum temperature - ° C	39.6 ± 0.7	39.5 ± 0.7
Respiratory rate - per minute	37.9 ± 12.5	35.4 ± 12.1
Heart rate - bpm	143.6 ± 28.7	142.1 ± 28.4
SpO2 - %	96.0 ± 3.5	96.0 ± 3.4
Skin recoloration time - seconds	2.0 ± 0.6	2.0 ± 0.7
Cough - no. (%)	218 (87.9)	228 (90.8)
Breathing difficulty - no. (%)	119 (48.0)	99 (39.4)
Severity of the infectious syndrome - no. (%)		
No sepsis	151 (60.9)	167 (66.5)
Sepsis	75 (30.2)	70 (27.9)
Severe sepsis	21 (8.5)	14 (5.6)
Septic chock	1 (0.4)	0 (0.0)
Pneumococcal vaccination - no. (%)		
Up to date	218 (92.8)	209 (90.1)
Incomplete	10 (4.3)	12 (5.2)
Never done	7 (3.0)	11 (4.7)
<i>Haemophilus influenza</i> B vaccination - no. (%)		
Up to date	220 (93.6)	213 (91.8)
Incomplete	13 (5.5)	15 (6.5)
Never done	2 (0.9)	4 (1.7)
At least one hospitalization in the previous year - no. (%)	46 (19.2)	36 (14.9)
Chronic pulmonary pathology - no. (%)	31 (12.7)	27 (10.9)
Amoxicillin in the previous 6 months - no. (%)	89 (39.0)	98 (42.6)
B lactam in the previous 6 months	29 (13.1)	28 (12.8)
C reactive protein - mg/l	78.7 ± 88.0	84.4 ± 94.2
Procalcitonin - µg/l	4.2 ± 12.9	2.8 ± 6.8
Time spent in emergency - hours	6.3 ± 4.7	5.4 ± 3.9
Emergency transfer locations - no. (%)		
Home	122 (49.4)	150 (59.8)
Short-term hospitalization unit	22 (8.9)	13 (5.2)
Hospitalization in paediatric service	95 (38.5)	85 (33.9)
Hospitalization in intensive care unit or continuing care	7 (2.8)	3 (1.2)
Hospitalization in intensive care unit then paediatric service or short-term hospitalization unit	1 (0.4)	0 (0.0)

* Plus-minus values are means ±SD. Percentages may not total 100 because of rounding.

Table 3 lists the main pathogens identified during the study in bacterial cultures of the NPA recorded from each centre and with the reference r-gene assay performed at the end of the study on frozen samples from all included children. No differences were reported between the groups.

Table 3: Total of the pathogens identified in the study

	Identification in respiratory samples N (%)	PCR multiplex group N (%)	Usual Practice group N (%)
Bacterial pathogens			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	85/492 (17.3%)	42/243 (17.3%)	43/249 (17.3%)
<i>Haemophilus influenzae</i>	82/492 (16.7%)	32/243 (13.2%)	50/249 (20.1%)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	82/492 (16.7%)	31/243 (12.8%)	51/249 (20.5%)
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	53/493 (10.8%)	25/243 (10.3%)	28/250 (11.2%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	21/492 (4.3%)	13/243 (17.3%)	8/249 (3.2%)
<i>Chlamydophila pneumoniae</i>	4/493 (0.8%)	3/243 (1.2%)	1/250 (0.4%)
<i>Bordetella pertussis</i>	0/493 (0.0%)	0/245 (0.0%)	0/250 (0.0%)
Viral pathogens			
<i>Rhino/enterovirus</i>	190/493 (38.5%)	115/244 (47.1%)	75/249 (30.1%)
<i>Respiratory syncytial virus</i>	109/494 (22.1%)	67/244 (27.5%)	42/250 (16.8%)
<i>Adenovirus</i>	67/494 (13.6%)	49/244 (20.1%)	18/250 (7.2%)
<i>Parainfluenza virus</i>	39/493 (7.9%)	34/243 (14.0%)	5/250 (2.0%)
<i>Human Metapneumovirus</i>	36/494 (7.3%)	27/244 (11.1%)	9/250 (3.6%)
<i>Coronavirus</i>	30/495 (6.1%)	20/245 (8.2%)	10/250 (4.0%)
<i>Bocavirus</i>	25/495 (5.1%)	8/245 (3.3%)	17/250 (6.8%)
<i>Influenza A virus</i>	21/493 (4.3%)	14/243 (5.8%)	7/250 (2.8%)
<i>Influenza B virus</i>	3/493 (0.6%)	3/243 (1.2%)	0/250 (0.0%)

Streptococcus pneumonia was identified in 3/495 (0.6%) blood samples, 1/245 (0.4%) in the multiplex PCR group and 2/250 (0.8%) in the usual practice group. No other germ was detected by blood culture. The pneumococcal urinary antigen was detected in 216/248 (87.8%) samples in the multiplex PCR group.

Finally, 48/444 (10.8%) of the children were considered as not infected (20/239 (8.4%) in the multiplex PCR group *versus* 28/205 (13.7%) in the usual practice group); 146/444 (32.9%) were infected by only one pathogen (80/239 (33.5%) in the multiplex PCR group and 66/205 (32.2%) in the usual practice group) and 250/444 (56.3%) (139/239 (58.2%)) in the multiplex PCR group and 111/205 (54.1%) in the usual practice group) were infected by multiple pathogens. There was no statistical difference between both groups concerning the presence of identified pathogen(s).

The primary analysis was intention-to-treat and involved all patients who were randomly assigned (N=499). A per-protocol analysis did not change our conclusions on either the primary or secondary outcome. Following the final decision of the adjudication committee, the CAP was considered viral in 265/499 (53.1%) (145/248 (58.5%) in the multiplex PCR group and 120/251 (47.8%) in the usual practice group) and bacterial in the remaining cases. No adverse event was identified during the study.

The results summarised in Table 4 show an appropriate prescription rate increased by 42% in the PCR multiplex group ($P < 0.0001$). This applies mainly to unnecessary probabilistic antibiotic therapy avoided (Table 5). Furthermore, no difference in terms of treatment failure at 48 hours and 15 days was observed between the two groups, and no increase in hospitalisations for patients treated on an outpatient basis was noticed in the PCR multiplex group.

Table 4: Primary and secondary outcomes

	Multiplex PCR group (N=248)	Usual practice group (N=251)	Relative Risk (CI 95%)
Primary outcome			
<i>Appropriate initial antimicrobial management</i>	168/245 (68.6%)	120/249 (48.2%)	1.42 (1.22;1.66) <i>P < 0.0001</i>
Secondary outcome			
<i>Treatment failure at 48 hours</i>	33/238 (13.9%)	29/246 (11.8%)	1.18 (0.74; 1.87)
<i>Treatment failure at 15 days</i>	49/231 (21.2%)	60/242 (24.8%)	0.86 (0.61; 1.19)
<i>Hospitalisation after the consultation at the emergency department</i>	125/247 (50.6%)	101/251 (40.2%)	1.26 (1.04; 1.53)
<i>Hospitalisation during the 15 days after the consultation at the emergency department*</i>	0/113 (0.0%)	5/139 (3.6%)	NA

* For ambulatory patients exclusively

Table 5. Comparison of the two diagnostic strategies (usual practice versus PCR multiplex in emergency) taking into consideration the results of the R-gene molecular test performed at the end of the study.

	Usual practice group (N=251)	PCR Multiplex group (N= 248)	<i>P value*</i>
Appropriate antimicrobial			
Antibiotic for sensitive bacterium	115/135 (85.2%)	96/106 (90.6%)	0.242
- Beta-lactamine	102/106 (96.2%)	72/78 (92.3%)	0.328
- Macrolide	13/29 (44.8%)	24/28 (85.7%)	0.001
Unnecessary antimicrobial			
Antibiotic in viral pneumonia	97/120 (80.8%)	60/145 (41.4%)	< 0.001
- Beta-lactamine	80/120 (66.7%)	53/145 (36.6%)	0.006
- Macrolide	17 /120 (14.2%)	7 /145 (4.8%)	0.010
Unsuitable antibiotic			
Beta-lactamine for non-sensitive bacterium	18/29 (62.1%)	6/28 (21.4%)	0.003
Macrolides for non-sensitive bacterium	21/106 (19.8%)	5/78 (6.4%)	0.010

* The Chi-Square or Fisher test was used for statistical comparisons.

The analysis of detailed prescriptions at the emergency room is reported in Table 6. We highlight the significantly different absolute rate of prescription of antimicrobial, especially for the one that is recommended, amoxicillin, which concentrates most of the cases. We report also a rate of prescription of combined antimicrobial (≥ 2) of 15/247 (6.1%) in the multiplex PCR group *versus* 21/250 (8.4%) in the usual practice group, although the difference is not statistically significant ($P=0.32$).

Table 6: Antimicrobial prescription at the emergency department according to the group of patients

	Multiplex PCR (N=247)	Usual practice (N=250)	Total (N=497)	P value
Antimicrobial prescribed				
<i>Amoxicillin</i>	117 (47.4%)	185 (74.0%)	302 (60.8%)	<0.0001
<i>Amoxicillin – Clavulanic Acid</i>	22 (8.9%)	25 (10.0%)	47 (9.5%)	0.67
<i>Macrolides</i>	31 (12.6%)	35 (14.0%)	66 (13.3%)	0.64
<i>Cephalosporin of third generation</i>	5 (2.0%)	3 (1.2%)	8 (1.6%)	0.48
<i>Others</i>	5 (2.0%)	8 (3.2%)	13 (2.6%)	0.40
<i>Total</i>	165 (66.8%)	235 (94%)	400 (80.5%)	<0.0001

On average, antibiotics, when prescribed, were instituted for a mean of 10.2 days (standard deviation 4.3). This reduction in antibiotic prescribing in the multiplex PCR group represents a theoretical saving of 150 days of antibiotics per 100 children who received multiplex PCR.

The use of other medications, such as NSAIDs (non-steroidal anti-inflammatory drugs) (0/245 [0%] *vs* 2/248 [0.01%], $p=0.5$) nor corticoids ((48/245 [19.6%] *vs* 44/250 [17.6%], $p=0.57$) was significantly different in the multiplex PCR group versus the usual practice group, respectively.

DISCUSSION : 846 words

Our study is the first to show the impact of a rapidly available result of a multiplex PCR on the probabilistic antibiotic at the emergency department prescribing in children. The result shows a great improvement of the medical care, in terms of quality of prescription and from the point of view of the antimicrobial stewardship, without impact on the security of the care paediatric CAP. We report that most of the impact is due to a reduction in unnecessary prescribing of amoxicillin for CAP that is probably viral in origin. There were no negative consequences to this attitude, in particular, no severe infection suffered a loss of chance with a delay in antibiotic therapy.

In complement to the final evaluation of each clinical file by the scientific Committee, which constituted the main end-point of the study, another evaluation was performed based only on the R-gene molecular test performed retrospectively at the end of the study. As shown in Table XX, this approach demonstrated that (i) a macrolide treatment was prescribed more appropriately when the Filmarray test was used in emergency, (ii) that unnecessary antibiotic treatments were less frequent in the same arm for both beta-lactamine and macrolide drugs and (iii) that unsuitable antibiotic treatment was also more frequently avoided in patients who benefited of the Filmarray test in emergency. All the data confirm that the Filmarray test at entry helps to optimize the initial antibiotic regimen.

Some other studies have reported results consistent with ours, but their design did not allow us to state it with certainty. Rogers et al. (22) underlined in a before/after study that the implementation of this kind of device reduces the duration of antibiotic therapy. Lee et al (31).

shows in a non-randomized study that patients tested with RP were less likely to receive empiric antibiotics (OR: 0.45; $p < .001$; 95% CI: 0.39, 0.52).

The major strength of our study is its design, which randomly compares the medical care with and without the availability of the result of a multiplex PCR at the emergency department. However, there are several limitations to our conclusions.

First, the applicability of our approach implies that the results of a multiplex PCR are made available in emergency departments in less than one hour. This was done in research conditions, by optimising the flow of samples and results. Thus, this could be achievable in clinical practice, as it continues to be in participating centres after the study. We highlight that the time spent in the emergency department is only marginally different in the two groups.

Secondly, the result of a multiplex PCR on nasopharyngeal secretions and its interpretation is still a debate. Does the presence of some virus genetic material in this sample (nasopharyngeal) mean a true infection (in lower respiratory tracts) (32)? If yes, what is the responsibility of this pathogenic agent in the disease of the patient (33)? This point was effectively considered in one review (11). The fear here is not to conclude the possibility of a bacterial aetiology in the presence of viral genome(s). And therefore, not to prescribe an antibiotic to a child who needs it. We can serenely conclude that this event did not occur in our study, despite a high rate of antibiotic abstinence. No patient of the intervention group was hospitalised after the discharge of the hospital (and five in the usual practice group). No difference was observed between the two groups in terms of therapeutic failure.

Thirdly, we can observe that most patients included have very moderate manifestations. This is consistent with the evolution of the epidemiology of CAP in developed countries, in the “post–pneumococcal conjugate Vaccine Era” (34). Thus, *S. pneumonia* was identified in 17.3%

of the samples but was considered by the adjudication committee as the main agent responsible for the disease in only two cases.

We can also highlight several limitations. NPA was used in place of NPS (Naso-Pharyngeal Swabs), but this attitude was validated in another study of our team (35). The major centre of the study (University Hospital of Saint-Etienne) has included approximately half of the patients, making possible a centre effect, which could be a bias. However, the randomisation was stratified by centre.

At the start of this study, only one PCR multiplex assay detecting a large panel of respiratory pathogens in a limited turn-around time (<1h) was able on the French market (Filmarray Respiratory Panel, bioMérieux). Since, it has been improved to detect all adenovirus types and the MERS-CoV (16, 36, 37). Other POCT assays have also been released for the detection of pathogens implicated in the upper respiratory tract (Qiasat, Qiagen) and pneumonia (Filmarray Pneumonia Panel, bioMérieux).

The question of the systematic prescription of antimicrobial for pneumonia in children, as recommended in the current guidelines (8) is asked. As other authors noticed, the main part of these infections is of viral origins and did not benefit from antimicrobial use. The availability of the result of a multiplex PCR when the child is consulting at the emergency ward reduces useless antibiotic prescribing without adverse effects and must be encouraged.

Bibliography:

1. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 2018;18(11):1191-210.
2. Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol.* 2014;60(4):402-7.
3. Jain S, Finelli L. Community-acquired pneumonia among U.S. children. *N Engl J Med.* 2015;372(22):2167-8.
4. Everard ML. Paediatric respiratory infections. *Eur Respir Rev.* 2016;25(139):36-40.
5. Ruuskanen O, Lahti E, Jennings LC, Murdoch DR. Viral pneumonia. *Lancet.* 2011;377(9773):1264-75.
6. García-García ML, Calvo C, Pozo F, Villadangos PA, Pérez-Breña P, Casas I. Spectrum of respiratory viruses in children with community-acquired pneumonia. *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(8):808-13.
7. Rinta-Kokko H, Palmu AA, Auranen K, Nuorti JP, Toropainen M, Siira L, et al. Long-term impact of 10-valent pneumococcal conjugate vaccination on invasive pneumococcal disease among children in Finland. *Vaccine.* 2018;36(15):1934-40.
8. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, Alverson B, Carter ER, Harrison C, et al. The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* 2011;53(7):e25-76.
9. van Houten CB, Cohen A, Engelhard D, Hays JP, Karlsson R, Moore E, et al. Antibiotic misuse in respiratory tract infections in children and adults—a prospective, multicentre study (TAILORED Treatment). *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2019;38(3):505-14.
10. Esposito S, Cohen R, Domingo JD, Pecurariu OF, Greenberg D, Heininger U, et al. Antibiotic therapy for pediatric community-acquired pneumonia: do we know when, what and for how long to treat? *Pediatr Infect Dis J.* 2012;31(6):e78-85.
11. Esposito S, Mencacci A, Cenci E, Camilloni B, Silvestri E, Principi N. Multiplex Platforms for the Identification of Respiratory Pathogens: Are They Useful in Pediatric Clinical Practice? *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.* 2019;9(196).
12. Schulert GS, Lu Z, Wingo T, Tang YW, Saville BR, Hain PD. Role of a respiratory viral panel in the clinical management of pediatric inpatients. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):467-72.
13. Wishaupt JO, Russcher A, Smeets LC, Versteegh FG, Hartwig NG. Clinical impact of RT-PCR for pediatric acute respiratory infections: a controlled clinical trial. *Pediatrics.* 2011;128(5):e1113-20.
14. Vos LM, Bruning AHL, Reitsma JB, Schuurman R, Riezebos-Brilman A, Hoepelman AIM, et al. Rapid Molecular Tests for Influenza, Respiratory Syncytial Virus, and Other Respiratory Viruses: A Systematic Review of Diagnostic Accuracy and Clinical Impact Studies. *Clin Infect Dis.* 2019;69(7):1243-53.
15. Gilbert DN, Leggett JE, Wang L, Ferdosian S, Gelfer GD, Johnston ML, et al. Enhanced Detection of Community-Acquired Pneumonia Pathogens With the BioFire® Pneumonia FilmArray® Panel. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2021;99(3):115246.

16. Leber AL, Everhart K, Daly JA, Hopper A, Harrington A, Schreckenberger P, et al. Multicenter Evaluation of BioFire FilmArray Respiratory Panel 2 for Detection of Viruses and Bacteria in Nasopharyngeal Swab Samples. *J Clin Microbiol*. 2018;56(6).
17. Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al. Comparative Evaluation of Six Commercialized Multiplex PCR Kits for the Diagnosis of Respiratory Infections. *PLOS ONE*. 2013;8(8):e72174.
18. Brendish NJ, Malachira AK, Armstrong L, Houghton R, Aitken S, Nyimbili E, et al. Routine molecular point-of-care testing for respiratory viruses in adults presenting to hospital with acute respiratory illness (ResPOC): a pragmatic, open-label, randomised controlled trial. *Lancet Respir Med*. 2017;5(5):401-11.
19. Nascimento-Carvalho AC, Vilas-Boas AL, Fontoura MH, Vuorinen T, Nascimento-Carvalho CM. Respiratory viruses among children with non-severe community-acquired pneumonia: A prospective cohort study. *J Clin Virol*. 2018;105:77-83.
20. Bénet T, Sánchez Picot V, Messaoudi M, Chou M, Eap T, Wang J, et al. Microorganisms Associated With Pneumonia in Children <5 Years of Age in Developing and Emerging Countries: The GABRIEL Pneumonia Multicenter, Prospective, Case-Control Study. *Clin Infect Dis*. 2017;65(4):604-12.
21. Nelson RE, Stockmann C, Hersh AL, Pavia AT, Korgenksi K, Daly JA, et al. Economic analysis of rapid and sensitive polymerase chain reaction testing in the emergency department for influenza infections in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2015;34(6):577-82.
22. Rogers BB, Shankar P, Jerris RC, Kotzbauer D, Anderson EJ, Watson JR, et al. Impact of a rapid respiratory panel test on patient outcomes. *Arch Pathol Lab Med*. 2015;139(5):636-41.
23. Doan Q, Enarson P, Kissoon N, Klassen TP, Johnson DW. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;2014(9):Cd006452.
24. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Revised WHO Classification and Treatment of Pneumonia in Children at Health Facilities: Evidence Summaries. Geneva: World Health Organization

Copyright © World Health Organization 2014.; 2014.

25. Pichon M, Valette M, Schuffenecker I, Billaud G, Lina B. Analytical Performances of the Panther Fusion System for the Detection of Respiratory Viruses in the French National Reference Centre of Lyon, France. *Microorganisms*. 2020;8(9):1371.
26. Brebion A, Mirand A, Regagnon C, Archimbaud C, Chambon M, Peigue-Lafeuille H, et al. Evaluation of real-time RT-PCR Rhino&EV/Cc r-gene[®] (bioMérieux) kit versions 1 and 2 for rhinovirus detection. *J Clin Virol*. 2015;62:110-3.
27. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(4):1553-8.
28. Gracie K, Correa E, Mabbott S, Dougan JA, Graham D, Goodacre R, et al. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chemical Science*. 2014;5(3):1030-40.
29. Haddar CH, Joly J, Carricajo A, Verhoeven PO, Grattard F, Mory O, et al. Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection in respiratory samples from children consulting at hospital. *BMC Microbiology*. 2020;20(1):79.

30. Ning G, Wang X, Wu D, Yin Z, Li Y, Wang H, et al. The etiology of community-acquired pneumonia among children under 5 years of age in mainland China, 2001-2015: A systematic review. *Hum Vaccin Immunother.* 2017;13(11):2742-50.
31. Lee BR, Hassan F, Jackson MA, Selvarangan R. Impact of multiplex molecular assay turn-around-time on antibiotic utilization and clinical management of hospitalized children with acute respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2019;110:11-6.
32. Wishaupt JO, Ploeg TV, Smeets LC, Groot R, Versteegh FG, Hartwig NG. Pitfalls in interpretation of CT-values of RT-PCR in children with acute respiratory tract infections. *J Clin Virol.* 2017;90:1-6.
33. Tenenbaum T, Franz A, Neuhausen N, Willems R, Brade J, Schweitzer-Krantz S, et al. Clinical characteristics of children with lower respiratory tract infections are dependent on the carriage of specific pathogens in the nasopharynx. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2012;31(11):3173-82.
34. Katz SE, Williams DJ. Pediatric Community-Acquired Pneumonia in the United States: Changing Epidemiology, Diagnostic and Therapeutic Challenges, and Areas for Future Research. *Infect Dis Clin North Am.* 2018;32(1):47-63.
35. Cantais A, Mory O, Plat A, Giraud A, Pozzetto B, Pillet S. Analytical performances of the BD Veritor™ System for the detection of respiratory syncytial virus and influenzaviruses A and B when used at bedside in the pediatric emergency department. *J Virol Methods.* 2019;270:66-9.
36. Song E, Wang H, Salamon D, Jaggi P, Leber A. Performance Characteristics of FilmArray Respiratory Panel v1.7 for Detection of Adenovirus in a Large Cohort of Pediatric Nasopharyngeal Samples: One Test May Not Fit All. *J Clin Microbiol.* 2016;54(6):1479-86.
37. Doern CD, Lacey D, Huang R, Haag C. Evaluation and implementation of FilmArray version 1.7 for improved detection of adenovirus respiratory tract infection. *J Clin Microbiol.* 2013;51(12):4036-9.

Remerciements, conflits d'intérêt

Société bioMérieux, PHRC National

Pas d'intervention de bioM

Olivier Paour, Sébastien Spinali et Ilham Barghouti (bioM)

Participating centres and the Optipac's Study Group :

CHU de Saint-Etienne	Dr Aymeric Cantais & Olivier Mory	Pr. Bruno Pozzetto Dr Sylvie Pillet
CHU de Grenoble	Dr Anne Faisant & Anne Pascale Michard Lenoir	Dr Julien Lupo Pr. Patrice Morand
CHU de Caen	Dr Philippe Eckart	Dr Stéphanie Gouarin Pr. Astrid Vabret
CHU Clermont Ferrand	Pr André Labbe & Nicolas Caron	Dr Cécile Henquell
CHU de Marseille	Dr Valérie Bremond & Aurélie Boutin	Pr. Rémi Charrel
CHU de Brest	Dr Lydie Abalea	Dr Adissa Minoui-Tran Dr Sophie Vallet
CHU de Toulouse	Dr Isabelle Claudet	Dr Jean Michel Mansuy Pr Jacques Izopet
CHU de Reims	Dr Béatrice Digeon	Pr. Laurent Andréoletti
CHU de Strasbourg	Dr Didier Eyer & Caroline Caillaud	Pr. Samira Fafi-Kremer
Paris Necker	Pr Gérard Cheron	Dr Marianne Leruez-Ville
Paris Bécélère	Pr Vincent Gajdos	Pr. Florence Doucet-Populaire

B. Utilisation des tests antigéniques rapides pour le diagnostic des infections respiratoires aux urgences pédiatriques

1 Introduction

L'ensemble des travaux menés en rapport avec l'usage des tests antigéniques aux urgences pédiatriques sont rapportés ici. L'objectif de ces travaux a souvent été d'évaluer les performances des tests et de préciser la place de leur usage en situation dématérialisée, au lit du malade, en contexte de service d'urgence pédiatriques.

1.1 Evaluation d'une stratégie utilisant un TDR pneumocoque

Ce travail visait à évaluer l'impact d'un TDR pneumocoque devant une infection des voies respiratoires basses aux urgences pédiatriques. Le pneumocoque est un germe particulier, potentiellement très invasif mais pour lequel un vaccin très efficace existe, et qui a la particularité à notre époque d'être fréquemment rencontré en portage et non en infection, chez une très large part d'enfants. En conséquence, son identification dans les sécrétions respiratoire est peu prédictive d'un lien avec une éventuelle infection concomitante.

Pour dépasser cette problématique, nous proposons une stratégie diagnostique utilisant un TDR pneumocoque sur des sécrétions pures, puis diluée. La négativité sur des sécrétions pures prouve que le pneumocoque n'est pas en cours dans l'infection, et la positivité sur prélèvement dilué prouve que le pneumocoque est bien en cause dans l'infection.

Cette stratégie a été évaluée à posteriori sur dossier, en termes de Se/VPN et Sp/VPP.

1.2 Performances analytiques des TDR *BD-Veritor* en Grippe et RSV

Cet article analyse la performance analytique des tests antigéniques *BD-Veritor*® lorsqu'ils sont utilisés en conditions réelle au lit du malade dans un service d'urgence pédiatriques. La performance était évaluée par rapport au gold-standard du laboratoire à ce moment de l'étude, c'est-à-dire par rapport soit à de l'immunofluorescence (technique encore employé parfois à cette époque) et/ou la PCR. Les résultats ont été exprimés sous forme de sensibilité/spécificité, kappa de Cohen, VPP et VPN. Une analyse secondaire a été effectuée sur les prélèvements discordants afin d'en analyser plus finement les déterminants.

1.3 Impact d'un TDR Grippe sur la prise en charge aux urgences pédiatriques

Ce travail a été réalisé pour évaluer l'impact concret sur la prise en charge de la réalisation de TDR Grippe aux urgences pédiatriques. Durant une vague épidémique, tous les patients se présentant aux urgences pédiatriques avec un syndrome grippal ou une fièvre ont été inclus. Le clinicien était appelé à prévoir les examens complémentaires à réaliser devant le tableau clinique, les renseigner par écrit, puis le TDR était réalisé une fois cette liste mise de côté. La liste des examens réellement réalisés compte-tenu du résultat du TDR Grippe était comparé à postériori avec la liste des examens prévus lors du début de la consultation, avant la réalisation du test, afin de mettre en évidence l'impact de celui-ci. Le but était de vérifier si l'usage des TDR Grippe était associé à une diminution de réalisation des examens invasifs.

1.4 Test antigénique SARS-CoV-2

Devant la pandémie de SARS-CoV-2 qui impacte énormément le système de santé, la nécessité d'obtenir un diagnostic précoce de ce pathogène a été soulignée par les autorités de santé. Peu de données sont disponibles in vivo en situation clinique sur la performance des tests antigéniques chez l'enfant, la majorité des articles montrant des performances en laboratoires ou chez les adultes.

Nous publions ce travail qui évalue la sensibilité/spécificité, VPP/VPN et le Kappa de Cohen dans l'usage des TDR SARS-CoV-2 vérifié en PCR systématiquement. L'analyse de la performance est ensuite poussée en fonction de critères liés au type de malade et de la symptomatologie. Une analyse de Se/Sp en fonction de la Ct est établie et représente un déterminant majeur de la performance diagnostic de ces dispositifs.

2 Evaluation d'une stratégie utilisant un TDR pneumocoque

L'apparition de nouveaux tests antigéniques dirigés contre la capsule polysaccharidique du pneumocoque ouvre la voie à la recherche de ce pathogène dès la prise en charge initiale de l'enfant. Dans cette première étude préliminaire, nous avons étudié la performance diagnostique du test antigénique *à posteriori* sur des prélèvements d'enfants ayant présentés une infection pulmonaire. L'impact potentiel sur la prise en charge a été estimée au regard des performances du test.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection in respiratory samples from children consulting at hospital

Cyrille H. Haddar^{1,2}, Johan Joly³, Anne Carricajo^{1,3}, Paul O. Verhoeven^{1,3}, Florence Grattard^{1,3}, Olivier Mory⁴, Evelyne Begaud², Yves Germani², Aymeric Cantais⁴ and Bruno Pozzetto^{1,3*}

Abstract

Background: Despite vaccination programs, *Streptococcus pneumoniae* remains among the main microorganisms involved in bacterial pneumonia, notably in terms of severity. The prognosis of pneumococcal infections is conditioned in part by the precocity of the diagnosis. The aim of this study was to evaluate the impact of a Rapid Diagnostic Test (RDT) targeting cell wall polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* and performed directly in respiratory samples, on the strategy of diagnosis of respiratory pneumococcal infections in children.

Results: Upper-respiratory tract samples from 196 children consulting at hospital for respiratory infection were tested for detecting *S. pneumoniae* using a newly-designed RDT (PneumoResp, Biospeedia), a semi-quantitative culture and two PCR assays. If positive on fluidized undiluted specimen, the RDT was repeated on 1:100-diluted sample. The RDT was found highly specific when tested on non-*S. pneumoniae* strains. By comparison to culture and PCR assays, the RDT on undiluted secretions exhibited a sensitivity (Se) and negative predictive value (NPV) of more than 98%. By comparison to criteria of *S. pneumoniae* pneumonia combining typical symptoms, X-ray image, and culture $\geq 10^7$ CFU/ml, the Se and NPV of RDT on diluted specimens were 100% in both cases.

Conclusions: In case of negative result, the excellent NPV of RDT on undiluted secretions allows excluding *S. pneumoniae* pneumonia. In case of positive result, the excellent sensitivity of RDT on diluted secretions for the diagnosis of *S. pneumoniae* pneumonia allows proposing a suitable antimicrobial treatment at day 0.

Keywords: *Streptococcus pneumoniae*, Respiratory infection, Rapid diagnostic test, PCR assay, Pneumonia, Child

* Correspondence: bruno.pozzetto@univ-st-etienne.fr

¹GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France

³Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Pneumonia is a major health problem worldwide. It is one of the leading causes of death and morbidity in children, especially in those under 5 years of age [1, 2]. Despite vaccination programs, *Streptococcus pneumoniae* remains among the main microorganisms involved in bacterial pneumonia, notably in terms of severity [3]. The correct management of these infections is helped by a rapid identification of the organism in clinical samples. The microbiological diagnosis of *S. pneumoniae* infection is usually based on the semi-quantitative culture of the bacterium from samples of the respiratory tract (usually sputum or rhino-pharyngeal secretions) [4, 5]. However, several factors may contribute to make the microbiological confirmation difficult: (i) the differentiation between strains of *S. pneumoniae* and of alpha haemolytic streptococci (formerly called viridans) that are part of the commensal oral flora may be difficult [6, 7]; (ii) the correct identification of *S. pneumoniae* compared to other *Streptococcus* species of the mitis group relies usually on the combination of several phenotypic techniques including colony morphology, optochine susceptibility, bile salt lysis and mass spectrometry [6, 8, 9]; (iii) the culture can be falsely negative when the patient has received early antimicrobial treatment. Therefore, the time to get the result of conventional culture, that is usually 18 h, can be delayed, leading to probabilistic antibiotic treatments that impair antibiotic stewardship [10].

In recent years, the search for *S. pneumoniae* urinary antigens has found its place in the bacteriological diagnosis of pneumococcal infections. These tests have a good negative predictive value (NPV) for *S. pneumoniae* pneumonia, but they lack specificity. They are not interesting in paediatrics because of prolonged excretion in case of invasive infections and frequent asymptomatic carriage in this population [11, 12]. Because of these difficulties, it seems necessary to propose new diagnostic approaches for facilitating and shortening the management of pneumococcal infections. The objective of this study was to evaluate the impact of a Rapid Diagnostic Test (RDT) targeting cell wall polysaccharide and performed directly in respiratory samples, on the strategy of diagnosis of respiratory infections potentially caused by this bacterium in children.

Results

Analytical performances of the PneumoResp RDT

Specificity of the PneumoResp RDT

The specificity of the test was evaluated on 52 bacterial strains belonging to 24 different species, including 30 strains of streptococci of the mitis group (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus peroris*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus*

pseudopneumoniae) and 22 strains of bacteria belonging to other genera (*Alloscardovia omnicolens*, *Enterococcus avium*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Parvimonas micra* and *Staphylococcus aureus*) or to non-mitis streptococci (*Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus constellatus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus salivarius* and *Streptococcus vestibularis*) in order to verify the absence of reactivity with the antigens used in the test with regard to the bacteria potentially present in the oral or respiratory microbiota. No cross-reactions were observed for strains belonging to the tested species, except for one of the 3 strains of *P. micra* and for the 3 strains of *S. pseudopneumoniae*. The PneumoResp RDT was positive for the 4 tested strains of *S. pneumoniae* (3 clinical strains and the ATCC reference strain 49,619) that were used as positive controls.

Correlation between qPCR assays and semi-quantitative culture

Using dilutions of the ATCC strain 49,619 of *S. pneumoniae*, a correlation was established between bacterial loads obtained by culture (expressed in CFU/ml) and PCR assays (expressed in Ct); the results are shown in Fig. 1. The sensitivity of the two PCR assays was shown to be 10^3 CFU/ml for the *ply* gene and 10^4 CFU/ml for the *lytA* gene.

Clinical performances of the PneumoResp RDT

Population and study design

The population consisted of 196 children consulting for symptoms compatible with acute respiratory infection at the University Hospital of Saint-Etienne, France, between October 2017 and July 2018. The study was performed on 196 respiratory samples (sputum or nasopharyngeal secretions) sent to the Microbiology Department of this hospital.

For patients with clinical suspicion of lower respiratory infection, a chest X-ray was performed. The diagnosis of pneumonia was defined on the coexistence of evocative clinical criteria and an abnormal parenchymal image on chest X-ray [3]; *S. pneumoniae* was estimated responsible for pneumonia if the bacterial load was greater than or equal to 10^7 CFU/ml for *S. pneumoniae* by semi-quantitative culture of respiratory specimens (sputum or nasopharyngeal secretions), irrespectively of the presence of other pathogen(s) [4, 5].

The demographic and clinical characteristics of included patients are listed in Table 1.

Overall microbiological results from clinical specimens

Table 2 summarizes the results obtained for the 196 collected respiratory specimens using semi-quantitative culture, qPCR and RDT. All the 70 strains of *S.*

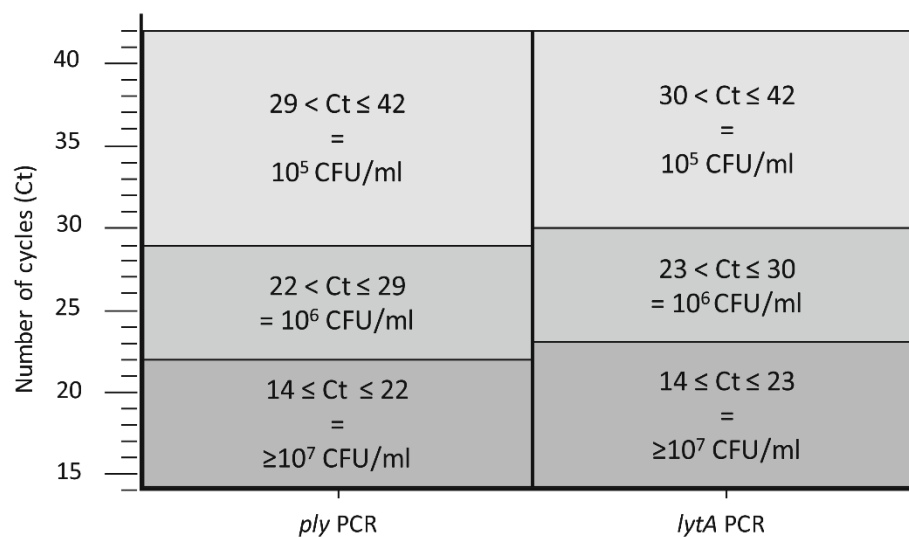


Fig. 1 Correlation between qPCR assays and quantitative cultures. The number of cycle threshold (Ct) of two quantitative PCR assays targeting virulence genes of *S. pneumoniae* was correlated to the number of CFU/ml of *S. pneumoniae* by conventional culture

Table 1 Demographic and clinical characteristics of the studied cohort

Characteristics	Numeric data
Demographic characteristics	
- No. of subjects	196
- mean age in years (range)	1.99 (0–15)
- median age in years	0.83
- interquartile in years	0.18–2.88
- sex ratio M/F	1.23
Main symptom for consulting (%)	
- dyspnea	92 (46.9)
- cough	39 (19.9)
- hyperthermia	77 (39.3)
- other ^a	36 (18.4)
Antibiotic treatment before inclusion (%)	23 (11.7)
Chest radiography (%)	124 (63.3)
- pulmonary condensation	32
- interstitial syndrome	54
- extra-pulmonary abnormal image	17
- no abnormal image	21
Hospital unit at inclusion (%)	
- emergency unit	187 (95.4)
- intensive care unit	9 (4.6)
Hospitalized patients (%)	154 (78.6)
Average length of hospital stay in days	7.8
Biological inflammatory syndrome (%)	63 (31.2)
Pneumonia (%)	86 (43.9)
<i>S. pneumoniae</i> pneumonia (%)	23 (11.7)

^amainly abdominal pain and diarrhoea

pneumoniae that were recovered from culture were susceptible to optochin and positive with the bile salt lysis test.

Performances of the RDT by comparison to culture, PCR assays and clinical data

The same 196 respiratory specimens were used to evaluate the performances of the PneumoResp RDT. The RDT was first tested on undiluted fluidized samples; in case of positive result, the test was repeated after a 1:100 dilution. Table 3 shows the performances of the RDT by comparison to the semi-quantitative culture and to the two PCR assays with high bacterial load (Ct corresponding to 10⁷

Table 2 Microbiological results concerning the search for *S. pneumoniae* on the 196 samples of the study

Microbiological tests	Number of positive (%)
Semi-quantitative culture	70 (35.7)
- < 10 ⁷ CFU/ml	20 (10.2)
- ≥ 10 ⁷ CFU/ml	50 (25.5)
Positive PCR tests (<i>ply</i> and/or <i>lytA</i>)	169 (86.2)
- <i>ply</i> gene	167 (85.2)
• Ct < 22 ^a	63 (32.1)
• Ct ≥ 22	104 (53.1)
- <i>lytA</i> gene	123 (62.7)
• Ct < 23 ^a	32 (16.3)
• Ct ≥ 23	91 (46.4)
Positive PneumoResp RDT	
- undiluted sample	133 (67.8)
- 1:100 diluted sample	76 (38.7)

Ct cycle threshold

^aThese thresholds were shown to correspond to approximately 10⁷ CFU/ml by qPCR for the considered PCR assay (see Fig. 1)

Table 3 RDT performances compared to various parameters on 196 and 133 undiluted and 1:100-diluted specimens, respectively

RDT results	<i>S. pneumoniae</i> positive culture		Sensitivity % (IC 95%)	Specificity % (IC 95%)	PPV % (IC 95%)	NPV % (IC 95%)
	Positive	Negative				
RDT undiluted			100 (94.8–100)	50.4 (41.4–58.6)	52.6 (48.3–56.9)	100 (94.3–100)
Positive	70	63				
Negative	0	63				
RDT diluted			91.4 (82.5–96)	80.9 (69.6–88.7)	84.2 (76.1–89.9)	89.5 (79.8–94.9)
Positive	64	12				
Negative	6	51				
	<i>S. pneumoniae</i> culture $\geq 10^7$ CFU/ml					
	Positive	Negative	100 (92.9–100)	43.1 (35.4–51.2)	37.6 (34.3–41)	100 (94.3–100)
RDT undiluted						
Positive	50	83				
Negative	0	63				
RDT diluted			94.6 (92.9–100)	68.7 (58.1–77.4)	65.8 (58.3–72.6)	100 (93.7–100)
Positive	50	26				
Negative	0	57				
	Quantitative PCR for <i>ply</i> gene Ct < 22					
	Positive	Negative	98.4 (91.5–99.7)	46.6 (38.3–55.1)	46.6 (42.7–50.7)	98.4 (89.8–99.8)
RDT undiluted						
Positive	62	71				
Negative	1	62				
RDT diluted			91.9 (82.5–96.5)	73.2 (61.9–82.1)	75 (67–81.6)	91.2 (82–96)
Positive	57	19				
Negative	5	52				
	Quantitative PCR for <i>lytA</i> gene Ct < 23					
	Positive	Negative	100 (87.5–100)	37.3 (30.3–44.8)	20.3 (18.5–22.3)	100 (94.3–100)
RDT undiluted						
Positive	27	106				
Negative	0	63				
RDT diluted			96.3 (81.7–99.3)	52.8 (43.4–62.1)	34.2 (29.6–39.2)	98.3 (89–99.7)
Positive	26	50				
Negative	1	56				
	<i>S. pneumoniae</i> pneumonia					
	Positive	Negative	100 (85.7–100)	36.4 (29.6–43.8)	17.3 (15.7–19)	100 (94.3–100)
RDT undiluted						
Positive	23	110				
Negative	0	63				
RDT diluted			100 (85.7–100)	51.8 (42.6–60.9)	30.3 (26.3–34.5)	100 (93.7–100)
Positive	23	53				
Negative	0	57				

PPV positive predictive value, NPV negative predictive value

CFU/ml or more); it was also tested with regard to the criteria of *S. pneumoniae* pneumonia that were listed above.

The sensitivity and negative predictive value (NPV) of the RDT on undiluted specimens were shown to be both of 100% by comparison to all the tested conditions depicted in Table 3, except for the *ply* PCR assay, which were both of 98.4. This means that no sample exhibiting a high bacterial load was missed by the RDT and that a negative RDT result was highly predictive of a weak or negative pneumococcal load. Another illustration of the correlation between bacterial loads evaluated by the two PCR assays and the results of RDT is shown on Fig. 2.

With regard to the criteria of *S. pneumoniae* pneumonia, the results of Table 3 show that, if the RDT was negative on an undiluted specimen, pneumococcal pneumonia could be ruled out at day 0; in addition, all the 23 presumed pneumococcal pneumonia were tested positive by using the RDT on diluted specimen at day 0 (Fig. 3).

Discussion

The newly-designed PneumoResp RDT presented in this study was shown able to detect rapidly *S. pneumoniae*

antigens with excellent clinical sensitivity in non-invasive respiratory specimens from children suspected of respiratory infection. Moreover, the test was used to give an early measure of the *S. pneumoniae* load in these samples in order to anticipate the treatment of the most serious infections while sparing anti-pneumococcal therapy in case of negative result.

Although the rapid detection of *S. pneumoniae* antigens is currently performed in many body fluids, including urine, cerebrospinal fluid and pleural fluid [3, 7, 11, 12], the specimens from the respiratory tract have been excluded from this clinical practice. A few years ago, a sputum antigen kit was developed in Japan and tested in adult patients for the rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia with an excellent sensitivity, exceeding largely that of the urinary tests [13–15]. However, this diagnosis strategy has remained confidential and was never tested in children known to exhibit a high level of pneumococcal asymptomatic carriage [3, 7, 16].

The main strengths of this study can be summarized as follows. First, the present RDT is highly specific for *S. pneumoniae*, notably with regard of the other members of the mitis group. The only cross-reactive results in this group were obtained with *S. pseudopneumoniae*, a species considered to be a respiratory pathogen and having a similar susceptibility profile to antibiotics than *S. pneumoniae* [17–20]. Cross-reaction was also observed with *P. micra*, which was recently reported for another RDT directed against *S. pneumoniae* [21]; this agent is an anaerobic gram-positive bacterium of the oral microbiota that could be responsible for opportunistic infections of the respiratory area. Second, the sensitivity and NPV of the PneumoResp RDT were excellent with regard to semi-quantitative culture and PCR assays targeting virulence pneumococcal genes, which allowed ruling out all the negative results for *S. pneumoniae* at day 0 without risk of missing highly positive samples. Finally, the RDT used on 1:100 diluted samples was able to identify at day 0 all the presumptive cases of pneumococcal pneumonia identified in this study.

This exploratory work has some limitations. First, *S. pneumoniae* is the only microorganism that has been analysed. Although this germ is frequently involved in bacterial pneumonia, other respiratory bacteria such as *H. influenzae* or *Moraxella catarrhalis*, but also “atypical bacteria” (especially *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae*) and viruses need to be taken into consideration, notably in children [3, 22–26]. Although not reported in this study, these agents were sought for in all the cases of ascertained pneumonia. Second, it is a retrospective study that was merely dedicated to explore the performances of the test; consequently, the diagnosis strategy that emerged with this two-step RDT would need to be validated prospectively. Third, we considered

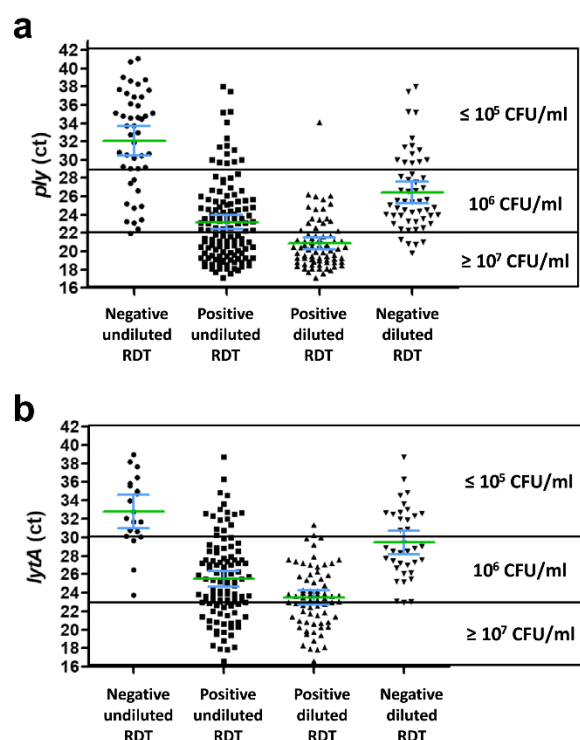
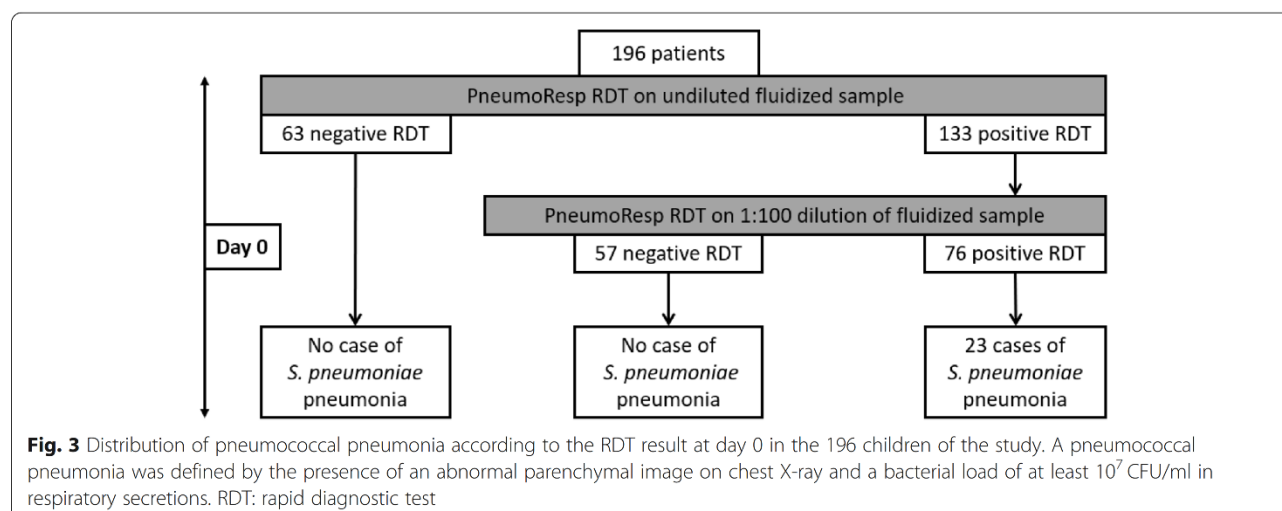


Fig. 2 Correlation between qPCR assays and RDT. The approached quantification using *ply* (a) or *lytA* (b) quantitative PCR assays, as evaluated by cycle threshold (Ct), was correlated to the results obtained with the PneumoResp Rapid Diagnostic Test (RDT) on undiluted and diluted respiratory specimens found either negative or positive. The green bar corresponds to the median and the blue bars to the 95% confidence interval. CFU: colony forming unit



that a high pneumococcal load in upper respiratory secretions ($\geq 10^7$ CFU/ml or equivalent by PCR) was indicative of an invasive pneumococcal infection; even if this threshold has been recommended in upper respiratory secretions by European guidelines [4, 5], other guidelines discouraged their use [3]. However, the good correlation between quantitative results obtained by culture and PCR (see Fig. 1) indicates that these measures may have a clinical pertinence.

The PneumoResp kit, by allowing a two-step analysis, first on undiluted secretions and, if positive, on 1:100-diluted secretions, can be used as a semi-quantification tool. In the conditions of the second step, the sensitivity of the RDT was close to the threshold of 10^7 CFU/ml considered significant for recognizing the involvement of this bacterium in the aetiology of a pulmonary parenchymal infection [4, 5]. In accordance with the overall results of the study, an algorithm depicted in Fig. 4 summarizes the benefit of the PneumoResp RDT for managing active pneumococcal infections in children. When the RDT is negative on undiluted secretion, the probability of active pneumococcal infection is very low and other aetiology must be looked for. When the RDT is positive on diluted secretion, this probability is high and an anti-pneumococcal treatment must be discussed. In intermediate situations (positive RDT on undiluted secretion and negative on diluted one), the semi-quantitative culture remains essential for deciding between carriage and active infection, as well as the implementation of other tests such as molecular multiplex approaches seeking at the same time the respiratory viruses (the first cause of pneumonia in children) and intracellular atypical bacteria which are difficult to grow and need a different antimicrobial treatment [22–26].

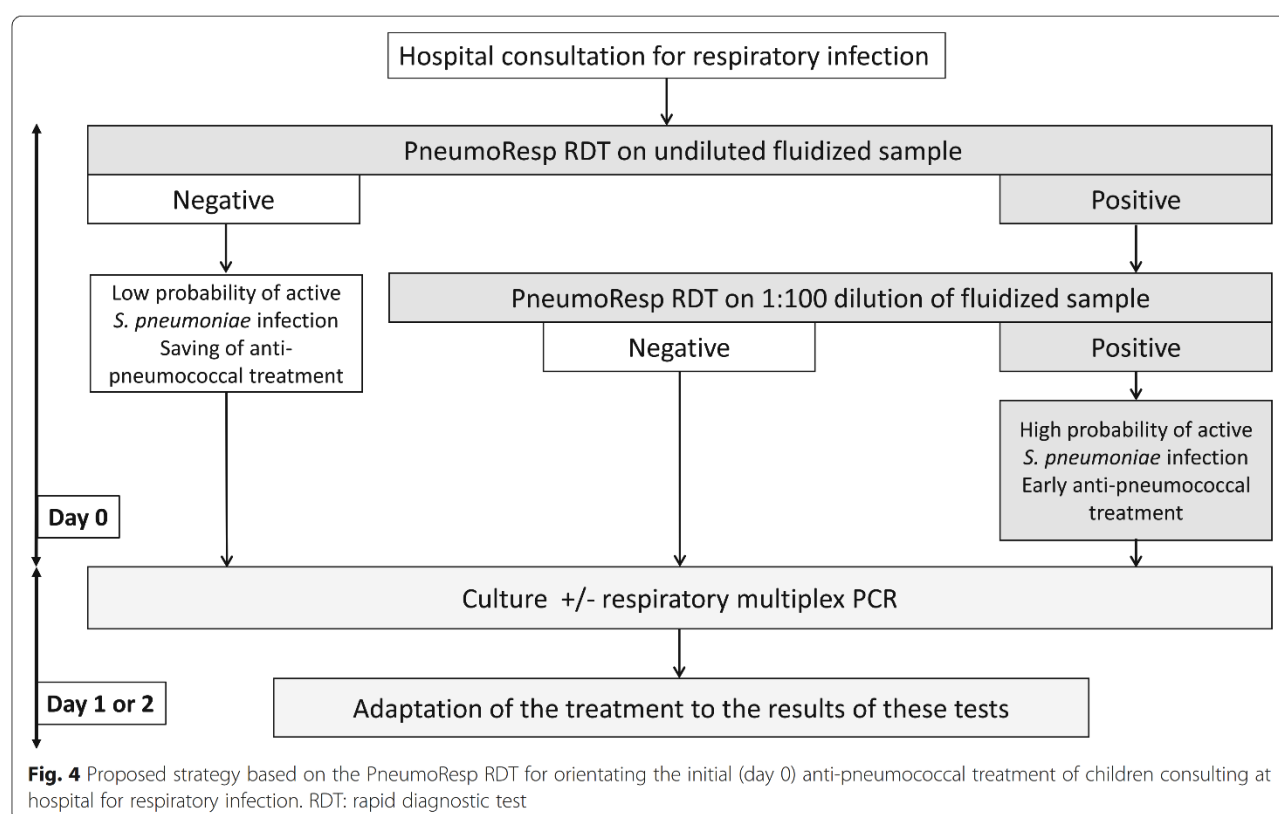
Conclusions

This pilot study is indicative of the value of the new PneumoResp RDT in children for the early management of active respiratory pneumococcal infection whose incidence is declining with vaccination but whose clinical severity remains high [3, 22, 23]. The strategy described above would help to save useless anti-pneumococcal treatment while identifying rapidly highly active infections. A prospective study on a large cohort of children would be useful to ascertain the present algorithm. Other future research would consist in developing a point-of-care format of this test that would be usable at bedside of emergency units, and in validating this strategy in adult patients whose prevalence of pneumococcal carriage is much more lower than in children.

Methods

Microbiological methods

The samples were treated with an equivalent volume of a sterile solution of dithiothreitol (Digest-EUR®, Eurobio) for the realization of semi-quantitative culture. The undiluted pretreated sample and a 1:100 dilution were plated on blood agar (COS, BioMérieux) including an optochin disc (OPTO-F, BioMérieux), Columbia CNA agar (BBL™ Columbia agar, Beckton-Dickinson) and were incubated at 37 °C under 5% CO₂ atmosphere [17]. The identification of presumptive colonies was based on phenotypic characters (i.e. flat surface and alpha-haemolysis associated or not to optochin susceptibility), then confirmed by Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight (MALDI-TOF) (Microflex LT, Bruker Daltonics), after careful analysis of the mass peak profiles, according to the algorithm described by Werno et al. [9]. A positive lysis test using bile salts (BBL Desoxycholate Reagent Droppers, Beckton-Dickinson) was



required for validating the MALDI-TOF identification on each isolated strain in order to avoid false-positive results.

RDT procedure

The newly-designed PneumoResp kit (BioSpeedia) was used. First, 250 µl of sample specimen fluidized by an equal volume of Digest-EUR® was added to tube 1 of the kit and vortex-agitated. One drop of this solution was deposited on the RDT plate, and 3 drops of diluent were immediately added. If no band appeared in the test line and the control band was present within 15 min, the RDT was considered negative and the analysis was stopped. If no band appeared in both marks within 15 min, the RDT was considered invalid. If two bands appeared, the test was

considered positive; 10 µl of the sample present in tube 1 and 990 µl of the solution of tube 3 were transferred to tube 2 and vortex-agitated; then, a second RDT was performed on this 1:100 dilution using the same protocol and the same interpretations for the reading. The specificity of the RDT was also tested on 52 bacterial strains (inoculum adjusted to 0.5 McFarland) including 30 streptococci belonging to the mitis group.

Real-time PCR assays

Two hundred microliters of samples were pretreated with 20 µl of proteinase K (Eurobio) and incubated for 10 min at 50 °C. The samples were then extracted using the EasyMag machine (BioMérieux). Two PCR techniques were used to

Table 4 Sequences of primers and probes used in this study for detection of *S. pneumoniae* *ply* and *lytA* genes

Primer name	Type	Sequences (5' to 3')	Length (bp)	Tm (°C) (GC%)	Reference
<i>ply</i>					
SPply F	Forward	TGCAGAGCGTCCTTTGGTCTAT	22	66 (48)	[27]
SPply R	Reverse	CTCTACTCGTGTTTCCAACTGA	25	72 (44)	[27]
SPply TP	Probe	TTGAGTGTGCTTATGGGCGCCA	24	74 (54)	[28]
<i>lytA</i>					
LytA F	Forward	CGCAATCTAGCAGATGAAGCAG	22	50 (50)	Adapted from [29]
LytA R	Reverse	AAGGGTCAACGTGGTCTGAGT	21	52 (55)	Adapted from [30]
LytA Pr	Probe	TTTGCCGAAACGCTTGATACAGGG	25	53 (48)	[29]

detect *S. pneumoniae* DNA, one targeting the *ply* gene and the other the *lytA* gene. The primers and probes (Eurogentec) were those used in previous works with minor changes [27–30] (Table 4).

For amplification of the *ply* gene, the PCR assay was performed under a volume of 20 µl containing 12.5 µl mastermix (1X QuantiTect multiplex PCR kit, Qiagen), 16 pmol each of forward and reverse primers, 6 pmol of probe and 5 µl of DNA template. Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation (10 min at 95 °C) followed by 45 cycles of denaturation (15 s at 95 °C) and annealing/extension (60 s at 60 °C) on the Smartcycler instrument (Cepheid).

For amplification of *lytA* gene, the PCR assay was performed under a volume of 20 µl containing 12.5 µl of mastermix (2X FAST qPCR Mastermix, Eurogentec), 20 pmol each of forward and reverse primers, 6 pmol of probe and 5 µl of DNA template. Thermal cycling reactions consisted of an initial denaturation (10 min at 95 °C) followed by 45 cycles of denaturation (15 s at 95 °C) and annealing/extension (40 s at 59 °C) on the ABI7500 Fast instrument (Applied Biosystems).

Correlation between bacterial loads obtained by PCR assays and quantitative culture

Using 10-fold serial dilutions of an ATCC reference strain of *S. pneumoniae* (strain 49,619), a correlation was established between the cycle threshold (Ct) of both PCR assays (which is inversely proportional to the DNA bacterial load) and quantitative culture expressed in CFU/ml using a colony counter (Scan 1200, Interscience).

Statistical analysis

Descriptive variables, sensitivity, specificity and predictive values were reported with their 95% confidence interval (CI) using GraphPad Prism 5 software.

Abbreviations

ATCC: American type culture collection; CFU: Colony forming unit; Ct: Cycle threshold; NPV: Negative predictive value; PPV: Positive predictive value; qPCR: Quantitative PCR; RDT: Rapid diagnostic test

Acknowledgements

The investigators thank the technical staff of the Laboratory of Infectious Agents and Hygiene of the University Hospital of Saint-Etienne involved in the sampling collection and culture. Alexis Labbe, Elsa Modrzewski and Marua Sellamna are acknowledged for skilful technical assistance.

Authors' contributions

CHH performed most of the microbiological experiments of the study, was associated to the design of the study, elaborated the illustrations and contributed to the analysis of data. JJ collected the clinical data and contributed to their analysis. AnneC, POV and FG supervised the microbiological part of the study, including cultures and molecular tests. AnneC participated to the design of the study and to the analysis of the results. OM and AymericC supervised the clinical part of the study and authorised the access to the patients' files. AymericC participated to the analysis of the clinical results. EB and YG conceived and developed the RDT; they were also involved in the analysis of results. BP conceived the design of the study, contributed to the analysis of results and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read, amended and approved the manuscript.

Funding

The PneumoResp kits were a gift of the company BioSpeedia. The funders had no role on the design of the study but the conceivers of the test were associated to the retrospective analysis of the results.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Since it was a pilot study for method validation without impact on the management of patients, no patient consent was needed according to the French regulation on non-interventional studies (Code de la santé publique - Article L1121-1). Clinical data were analysed retrospectively and anonymously from the files (Emergency Resume Summary and Hospital Report) consulted by the paediatricians who managed the children. The present study obtained a favourable advice from the Ethic Committee of the University-Hospital of Saint-Etienne (ref. IRBN872019/CHUSTE).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

CHH is a PhD student of the University of Saint-Etienne whose thesis was cofounded by the CIFRE French Ministry of Higher Education and Research (CIFRE fellowship No 1283/2014) and BioSpeedia. EB and YG are working at BioSpeedia. The other authors have no conflict of interest to declare in relation with the matter of this study.

Author details

¹GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes), University of Lyon, 42023 Saint-Etienne, France. ²BioSpeedia, Institut Pasteur, 75015 Paris, France. ³Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France. ⁴Pediatric Emergency Department, University Hospital of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne Cedex 02, France.

Received: 22 October 2019 Accepted: 23 March 2020

Published online: 07 April 2020

References

- Bryce J, Boschi-Pinto C, Shibuya K, Black RE. WHO estimates of the causes of death in children. *Lancet*. 2005;365:1147–52.
- Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu HH, et al. Child and adolescent health from 1990 to 2015: findings from the global burden of diseases, injuries, and risk factors 2015 Study. *JAMA Pediatr*. 2017;171:573–92. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0250>.
- Harris M, Clark J, Coote N, et al. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*. 2011;66(S2):1–23.
- Freymuth F, Leven M, Wallet F. Lower respiratory tract infections. In: Cornaglia G, Courcol R, Herrmann JL, Kahlmeter G, Peigue-Lafeuille H, Vila J, SFM, ESCMID, editors. *European manual of clinical microbiology*. 1st ed. France: Epernay; 2012. p. 153–61.
- Botterel F, Cattoen C, Pozzetto B. Infections broncho-pulmonaires. *REMIC Société Française de Microbiologie Ed*; 2018. p. 199–212.
- Mundy LS, Janoff E, Schwebke KE, Shanholtzer C, Willard KE. Ambiguity in the identification of *Streptococcus pneumoniae*. Optochin, bile solubility, quellung, and the AccuProbe DNA probe tests. *Am J Clin Pathol*. 1998;109:55–61.
- Murdoch DR, O'Brien KL, Driscoll AJ, et al. Laboratory methods for determining pneumonia etiology in children. *Clin Infect Dis*. 2012;54:146–52.
- Marín M, Cercenado E, Sánchez-Carrillo C, et al. Accurate differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from other species within the *Streptococcus mitis* group by peak analysis using MALDI-TOF MS. *Front Microbiol*. 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00698>.
- Werno AM, Christner M, Anderson TP, Murdoch DR. Differentiation of *Streptococcus pneumoniae* from non pneumococcal streptococci of the *Streptococcus mitis* group by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2012;50:2863–7.

10. Srinivasan A. Antibiotic stewardship: why we must, how we can. *Cleve Clin J Med*. 2017;84:673–9.
11. Hamer DH, Egas J, Estrella B, MacLeod WB, Griffiths JK, Sempértegui F. Assessment of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen test in children with nasopharyngeal pneumococcal carriage. *Clin Infect Dis*. 2002;34:1025–8.
12. Viasus D, Calatayud L, McBrowne MV, Ardanuy C, Carratalà J. Urinary antigen testing in community-acquired pneumonia in adults: an update. *Expert Rev Anti-Infect Ther*. 2019;17:107–15.
13. Ehara N, Fukushima K, Kakeya H, et al. A novel method for rapid detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum and its application in adult respiratory tract infections. *J Med Microbiol*. 2008;57:820–6.
14. Izumikawa K, Akamatsu S, Kageyama A, et al. Evaluation of a rapid immunochromatographic ODK0501 assay for detecting *Streptococcus pneumoniae* antigen in sputum samples from patients with lower respiratory tract infection. *Clin Vaccine Immunol*. 2009;16:672–8.
15. Ikegame S, Nakano T, Otsuka J, et al. The evaluation of the sputum antigen kit in the diagnosis of pneumococcal pneumonia. *Intern Med*. 2017;56:1141–6.
16. Abdullahi O, Nyiro J, Lewa P, Slack M, Scott JAG. The descriptive epidemiology of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* nasopharyngeal carriage in children and adults in Kilifi District, Kenya. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:59–64.
17. Arbique JC, Poyart C, Trieu-Cuot P, et al. Accuracy of phenotypic and genotypic testing for identification of *Streptococcus pneumoniae* and description of *Streptococcus pseudopneumoniae* sp. nov. *J Clin Microbiol*. 2004;42:4686–96.
18. Laurens C, Michon AL, Marchandin H, Bayette J, Didelot MN, Jean-Pierre H. Clinical and antimicrobial susceptibility data of 140 *Streptococcus pseudopneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56:4504–7.
19. Mohammadi JS, Dhanashree B. *Streptococcus pseudopneumoniae*: an emerging respiratory tract pathogen. *Indian J Med Res*. 2012;136:877–80.
20. Wen SCH, Anderson T, Murdoch D. *Streptococcus pseudopneumoniae*. *Clin Microbiol Newsl*. 2014;36:65–71.
21. Ploton MC, Caseris M, Jost C, et al. Likely false-positive pneumococcal antigen yeast BinaxNOW due to *Parvimonas micra*: a four-case series. *Chest*. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2017.12.026>.
22. Bénet T, Sánchez Picot V, Messaoudi M, et al. Microorganisms associated with pneumonia in children <5 years of age in developing and emerging countries: the GABRIEL pneumonia multicenter, prospective, case-control study. *Clin Infect Dis*. 2017;65:604–12.
23. Leung AKC, Wong AHC, Hon KL. Community-acquired pneumonia in children. *Recent Patents Inflamm Allergy Drug Discov*. 2018;12:136–44.
24. Cilla G, Oñate E, Perez-Yarza EG, Montes M, Vicente D, Perez-Trallero E. Viruses in community-acquired pneumonia in children aged less than 3 years old: high rate of viral coinfection. *J Med Virol*. 2008;80:1843–9.
25. Esposito S, Daleno C, Prunotto G, et al. Impact of viral infections in children with community-acquired pneumonia: results of a study of 17 respiratory viruses. *Influenza Other Respir Viruses*. 2013;7:18–26.
26. Cantais A, Mory O, Pillet S, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol*. 2014;60:402–7.
27. Corless CE, Guiver M, Borrow R, Edwards-Jones V, Fox AJ, Kaczmarek EB. Simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and *Streptococcus pneumoniae* in suspected cases of meningitis and septicemia using real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:1553–8.
28. Gracie K, Correa E, Mabbott S, et al. Simultaneous detection and quantification of three bacterial meningitis pathogens by SERS. *Chem Sci*. 2014;5:1030–40.
29. McAvlin JC, Reilly PA, Roudabush RM, et al. Sensitive and specific method for rapid identification of *Streptococcus pneumoniae* using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3446–51.
30. Boving MK, Pedersen LN, Møller JK. Eight-plex PCR and liquid-array detection of bacterial and viral pathogens in cerebrospinal fluid from patients with suspected meningitis. *J Clin Microbiol*. 2009;47:908–13.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



3 Performance analytique d'un POCT

Durant nos travaux, il a été décidé de caractériser les performances analytiques d'un dispositif POCT réalisés en pratique courante. L'ensemble des échantillons utilisés en POCT aux urgences pédiatriques ont été secondairement retestés au laboratoire avec la technique de référence, l'immunofluorescence. En cas de discordance entre les deux résultats, une PCR était réalisée. Les résultats ont été analysés de façon séparée pour les différents virus (Grippe A/B et RSV) et des analyses de sensibilités spécificité ont été faites.



Analytical performances of the BD Veritor™ System for the detection of respiratory syncytial virus and influenzaviruses A and B when used at bedside in the pediatric emergency department

Aymeric Cantais^{a,b}, Olivier Mory^a, Aurélie Plat^a, Antoine Giraud^a, Bruno Pozzetto^{b,c}, Sylvie Pillet^{b,c,*}

^a Pediatric Emergency Department, University Hospital of Saint-Etienne, France

^b Laboratory Group on Mucosal Immunity and Pathogens (GIMAP EA3064), Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, France

^c Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France



ARTICLE INFO

Keywords:

RSV
Influenzaviruses
Immunochromatography
Point-of-care assay

ABSTRACT

This study aims to evaluate the analytical performance of the BD Veritor™ rapid diagnostic assays (RDTs) for respiratory syncytial virus (RSV) and influenzaviruses when performed 24/7 at bedside by nurses in the pediatric emergency department (PED). The study was performed between 14/10/2015 and 19/03/2016 on nasopharyngeal aspirates (NPAs) collected from children consulting at the PED of the University Hospital of Saint-Etienne for bronchiolitis (RSV detection) or flu-like syndrome (influenzaviruses A/B detection). NPAs were tested 24/7 at the PED with the RDT and then sent to the Infectious Agents Department for routine analyses, first by immunofluorescence assay (IFA), then by nucleic acid amplification test (NAAT) considered as the gold standard in case of discrepancy between RDT and IFA results. For RSV detection, 205 NPAs were analyzed; the overall concordance between RDT and routine assays was of 97.6% (200/205). The sensitivity (Se), specificity (Sp), negative predictive value (NPV) and positive predictive value (PPV) were of 97.6% (160/164), 97.6% (40/41), 90.9% (40/44) and 99.4% (160/161), respectively. A total of 419 NPA was tested for influenzaviruses. For influenza A, the overall concordance was of 98.8% (414/419); Se, Sp, NPV and PPV were of 100% (41/41), 98.7% (373/378), 100% (373/373) and 89.1% (41/46), respectively. For influenza B, the overall concordance was of 97.9% (410/419); Se, Sp, NPV and PPV were of 96.6% (172/178), 98.8% (238/241), 97.5% (238/244) and 98.3% (172/175), respectively. Due to their excellent performances and their easy handle by non-laboratory personnel, these RDTs can be warmly recommended as point of care assays at the PED.

Respiratory syncytial virus (RSV)-associated bronchiolitis and flu-like syndromes represent a huge burden at the pediatric emergency department (PED) each year during the winter season. Identification of the etiological agent helps the triage of sick children and helps to the limitation of prescriptions (Lacroix et al., 2015), inappropriate use of antibiotics (Messacar et al., 2017), and health costs (Messacar et al., 2017). Rapid diagnosis tests (RDTs) based on the detection of viral antigens are easy to perform by non-laboratory personnel at bedside but the weak performances of most of them restrict their wide use (Dunn and Ginocchio, 2015). “Second-generation” RDTs including an objective reading of the result on a small digital instrument, such as the Veritor™ System (Becton Dickinson Diagnostics) and the Sofia® Fluorescence Immunoassay (Quidel), have been shown to exhibit improved

sensitivity (Azar and Landry, 2018; Bruning et al., 2017; Koski and Klepser, 2017). The aim of this study was to assess the analytical performances and practicability of the BD Veritor™ System for the detection of RSV or influenzaviruses A/B when used 24/7 at the PED.

The commercial chromatographic immunoassays that were evaluated were the BD Veritor™ System for Rapid Detection of RSV that targets the RSV fusion protein nucleoprotein antigens, and the BD Veritor™ System for Rapid Detection of Flu A + B that targets the influenza A/B viral nucleoprotein antigens. The two devices are Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)-waived (Azar and Landry, 2018). They were used on nasopharyngeal aspirates (NPAs) collected between 14/10/2015 and 19/03/2016 from children admitted at the PED of the University Hospital of Saint-Etienne either for

Abbreviations: IFA, immunofluorescence assay; NAAT, nucleic acid amplification test; NPA, nasopharyngeal aspirate; PED, pediatric emergency department; RDT, rapid diagnosis test

* Corresponding author at: Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, 42055, Saint-Etienne Cedex 02, France.

E-mail address: sylvie.pillet@univ-st-etienne.fr (S. Pillet).

<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2019.04.022>

Received 5 February 2019; Received in revised form 25 April 2019; Accepted 26 April 2019

Available online 29 April 2019

0166-0934/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Table 1

BD Veritor™ rapid diagnosis tests (RDT) for respiratory syncytial virus (RSV) and influenzavirus (Flu) A/B detection compared to the routine assays used during the 2015–2016 winter season.

	RSV	Flu A	Flu B
Crude results (no.)			
-RDT+ / IFA+ / NAAT ND	150	24	154
-RDT- / IFA- / NAAT ND	12	329	201
-RDT- / IFA- / NAAT-	26	44	36
-RDT- / IFA+ / NAAT-	2	0	1
-RDT+ / IFA- / NAAT+	10	17	18
-RDT- / IFA- / NAAT+	3 ^a	0	0
-RDT- / IFA+ / NAAT+	1 ^b	0	6 ^c
-RDT+ / IFA- / NAAT-	1	5	3
Total	205	419	419
Analytical performances expressed as % ^d			
Overall concordance	97.6 (200/205)	98.8 (414/419)	97.9 (410/419)
-Cohen kappa coefficient	0.93	0.94	0.96
-Sensitivity	97.6 (160/164)	100 (41/41)	96.6 (172/178)
-Specificity	97.6 (40/41)	98.7 (373/378)	98.8 (238/241)
-Negative predictive value	90.9 (40/44)	100 (373/373)	97.5 (238/244)
-Positive predictive value	99.4 (160/161)	89.1 (41/46)	98.3 (172/175)

IFA: immunofluorescence assay; NAAT: nucleic acid amplification test; ND: not done.

^a Cycle threshold (Ct) values all > 34.

^b Ct value of 32.

^c Ct values comprised between 23.9 and 33.9.

^d Except for kappa coefficient.

bronchiolitis (infants aged from 0 to 24 months) or for fever or other flu-like symptoms. The appropriate RDT was performed 24/7 by nurses of the PED who all received a short training by one of us (SP), according to the International Standard NF EN ISO 22,870 international standard. Immediately after NPA sampling, the swab included in the kit was inserted and rolled 5 times in the sample before being introduced into the reagent tube. The test was then performed as recommended by the manufacturer and objectively interpreted by using the digital BD Veritor™ reader. The result was available in less than 15 min.

Then, NPAs were sent to the Infectious Agents Department and kept at 4 °C before being tested with routine assays during the opening hours of the laboratory. NPAs were first analyzed by immunofluorescence assay (IFA) for the detection of RSV or influenzavirus A/B antigens, using specific murine monoclonal antibodies (Argene®, bioMérieux) as specified by the manufacturer. These antibodies are directed against the F0 and F1 subunits of the fusion protein for RSV, a nucleoprotein for influenzaviruses A and a group-specific antigen for influenzaviruses B. If discrepant result between RDT and IFA was observed, the sample was tested by nucleic acid amplification test (NAAT) and the latter result was considered as the gold standard. Commercial one-step reverse-transcription and real-time PCR-based assays (RSV/metapneumovirus Multi Well System r-gene™ and Influenza A/B Multi Well System r-gene™, bioMérieux) were used as previously described (Pillet et al., 2013). The subtype of influenzavirus A was determined by RT-PCR assay using primers and probes designed by the French National Reference Centre for Influenza.

A total of 217 patients (sex ratio M/F: 1.13; mean of age: 134 days, range [7–684 days]) and 477 patients (sex ratio M/F: 1.10; mean of age 3.5 years, range [12 days–14.9 years]) were included for RDT detection of RSV and influenzaviruses, respectively. The RDT was found not interpretable in 4 samples for RSV (1.9%) and in 6 samples for influenzaviruses (1.4%) because of test failure. No result was available for IFA in 8 and 52 samples for RSV and flu, respectively, because of cell absence on the slide or insufficient amount of specimen. The remaining specimens (n = 205 for RSV and 419 for influenzaviruses) were used to evaluate the analytical performances of both RDTs by comparison to the combination of IFA and/or NAAT used routinely in the laboratory at the time of the study. The detailed results are shown in Table 1. The distribution of the RDTs performed during the 2015–2016 winter season is depicted in Fig. 1.

Among the 41 specimens found positive with influenzavirus A by RDT, the strain could be subtyped in 34 cases (82.9%), including 23 H1N1 pdm09 and 11 H3N2 subtypes. For flu B, the virus was not subtyped, but the Victoria lineage was shown to be predominant one during the 2015–2016 winter season (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

A special interest was given to discrepant results. Concerning RSV, in case of discordant result between IFA and RDT (n = 14), the RDT result was concordant with that of the NAAT in 12 samples (85.7%). Four samples gave a false negative result by RDT in comparison with NAAT; interestingly, the cycle threshold (Ct) value was 32 or more by NAAT, which corresponds to very low signals (Table 1). For flu A, from 22 discrepant results between RDT and IFA, 17 (77.3%) were arbitrated in favor of RDT by NAAT. For flu B, from 27 discrepant results between RDT and IFA, 18 (66.7%) were arbitrated in favor of RDT by NAAT; 6 samples gave a false negative result by RDT in comparison with NAAT, with Ct values comprised between 23.9 and 33.9, which could indicate a lower sensitivity of the RDT for this target than for RSV and influenzavirus A (Table 1).

The BD Veritor™ assays for the detection of RSV and influenzaviruses were compared to the routine techniques performed in our laboratory. At the time of the study, the first-line technique was IFA; this technique is cheap but lacks sensitivity and the result is dependent upon the reading of technicians. IFA was shown to be less sensitive than RDT in our study (a total of 48 false negative results for IFA against 10 for RDT, Table 1), the RDT giving closest results to NAAT for both RSV and influenzaviruses. The real-life design of the study did not allow the comparison between RDT and NAAT for all the specimens, the latter having been done mainly in case of discrepant result between RDT and IFA, which could have led to miss very low positive samples with high Ct values and found negative both by RDT and IFA. Despite these pitfalls, the analytical performances of the Veritor™ assays were shown to be very close to those described when these RDTs were compared to NAAT, for the detection of both RSV (Bell et al., 2014; Jonckheere et al., 2015; Jung et al., 2016; Kanwar et al., 2015; Schwartz et al., 2015) and influenzaviruses (Koski and Klepser, 2017; Mese et al., 2016; Ndegwa et al., 2017; Ryu et al., 2017). Of note, the sensitivity of RDT was slightly lower for influenzavirus B than for influenzavirus A, as already recorded (Bruning et al., 2017; Koski and Klepser, 2017; Mese et al., 2016; Ndegwa et al., 2017; Ryu et al., 2017). Importantly, the

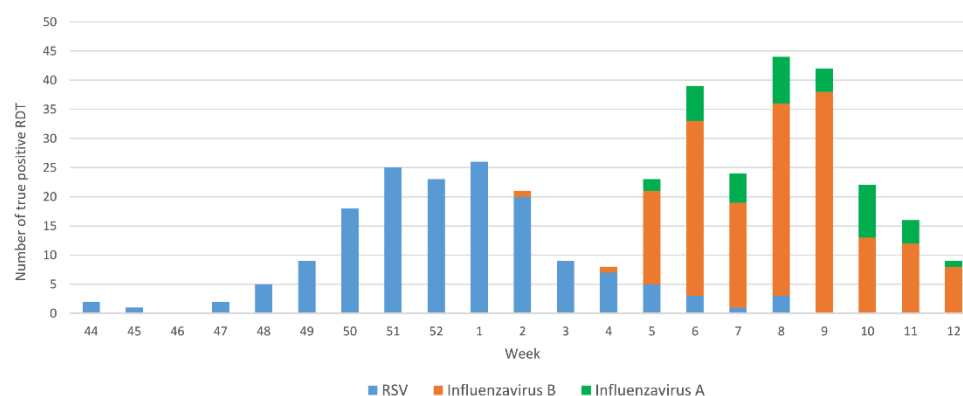


Fig. 1. Distribution of the BD Veritor™ rapid diagnosis tests (RDT) results during the 2015–2016 winter season. Only true positive results after comparison with routine assays are shown.

performances of RDTs are not affected when done at bedside by non-laboratory personnel (this study, (Mese et al., 2016; Ndegwa et al., 2017; Schwartz et al., 2015)). In our study, NPAs were preferred to swab specimens because of their common use for care of children exhibiting upper respiratory tract obstruction, thus limiting an additional invasive procedure; this practice has also been shown to increase the RDT sensitivity when compared to swabbing (Bell et al., 2014).

The Veritor™ assays for detection of respiratory viruses were shown to have excellent analytical performances in children, to be easy to perform by nurses at the PED with availability of the result 24/7 and to have limited cost. These qualities make them the choice as point-of-care assays in PED. The availability of the result within 15 min allows the rapid triage of children with cohorting of patients infected by the same virus in the same ward, prevention of nosocomial infections, limitation of unnecessary biological and radiological prescriptions, and rational use of antibiotic, meeting the criteria of diagnostic and antibiotic stewardship (Cantais et al., 2019; Messacar et al., 2017). After the study period, these assays were routinely implemented in the PED of our hospital during winter seasons and NAAT replaced IFA at the laboratory for respiratory specimens.

Funding

Becton Dickinson France supplied rapid tests used in this study but did not participate in the design or experimental work nor interpretation of the results.

Competing interests

Becton Dickinson funded the registration of SP for presenting a part of these results to the 19th Annual Meeting of the European Society for Clinical Virology in Lisbon in September 2016. The remaining authors have no financial disclosure in relation to the matter of this article.

Ethical approval

The study received the approval of the Ethics Committee of the University-Hospital of Saint-Etienne under the code IRBN322016/CHUSTE.

Author contributions

Aymeric Cantais and Olivier Mory conceptualized and designed the study, selected the patients according to clinical criteria, collected the clinical and virological data, analyzed the results, drafted the initial manuscript, and approved the final version.

Bruno Pozzetto and Sylvie Pillet conceptualized and designed the study, collected the clinical and virological data, analyzed the results,

and wrote the final version of the manuscript.

Aurélien Plat and Antoine Giraud participated to the clinical inclusion of patients, contributed to the collection of data and approved the final manuscript.

References

- Azar, M.M., Landry, M.L., 2018. Detection of influenza A and B viruses and respiratory syncytial virus by use of clinical laboratory improvement amendments of 1988 (CLIA)-waived point-of-care assays: a paradigm shift to molecular tests. *J. Clin. Microbiol.* 56. <https://doi.org/10.1128/JCM.00367-18>.
- Bell, J.J., Anderson, E.J., Greene, W.H., Romero, J.R., Merchant, M., Selvarangan, R., 2014. Multicenter clinical performance evaluation of BD Veritor™ System for rapid detection of respiratory syncytial virus. *J. Clin. Virol.* 61, 113–117. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.05.020>.
- Bruning, A., Leeflang, M., Vos, J., Spijker, R., de Jong, M.D., Wolthers, K.C., Pajkrt, D., 2017. Rapid tests for influenza, respiratory syncytial virus, and other respiratory viruses: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 65, 1026–1032. <https://doi.org/10.1093/cid/cix461>.
- Cantais, A., Mory, O., Plat, A., Bourmaud, A., Giraud, A., Costille, M., Pozzetto, B., Pillet, S., 2019. Impact of bedside diagnosis of influenza in the paediatric emergency ward. *Clin. Microbiol. Infect.* <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.019>. in press.
- Dunn, J.J., Ginocchio, C.C., 2015. Can newly developed, rapid immunochromatographic antigen detection tests be reliably used for the laboratory diagnosis of influenza virus infections? *J. Clin. Microbiol.* 53, 1790–1796. <https://doi.org/10.1128/JCM.02739-14>.
- European Centre for Disease Prevention and Control, 2017. Seasonal influenza - annual epidemiological report for 2015–16 season. European Centre for Disease Prevention and Control-Annual Epidemiological Report for 2015. Stockholm.
- Jonckheere, S., Verfaillie, C., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., Vanlaere, E., Vankeerberghen, A., De Beenhouwer, H., 2015. Multicenter evaluation of BD Veritor System and RSV K-SeT for rapid detection of respiratory syncytial virus in a diagnostic laboratory setting. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 83, 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.05.012>.
- Jung, B.K., Choi, S.H., Lee, J.H., Lee, J., Lim, C.S., 2016. Performance evaluation of four rapid antigen tests for the detection of respiratory syncytial virus. *J. Med. Virol.* 88, 1720–1724. <https://doi.org/10.1002/jmv.24522>.
- Kanwar, N., Hassan, F., Nguyen, A., Selvarangan, R., 2015. Head-to-head comparison of the diagnostic accuracies of BD Veritor™ System RSV and Quidel® Sofia® RSV FIA Systems for respiratory syncytial virus (RSV) diagnosis. *J. Clin. Virol.* 65, 83–86. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.02.008>.
- Koski, R.R., Klepser, M.E., 2017. A systematic review of rapid diagnostic tests for influenza: considerations for the community pharmacist. *J. Am. Pharm. Assoc.* 57, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.japh.2016.08.018>.
- Lacroix, S., Vignaud, B., Avril, E., Moreau-Klein, A., Coste, M., Launay, E., Gras-Le Guen, C., 2015. Impact of rapid influenza diagnostic test on physician estimation of viral infection probability in paediatric emergency department during epidemic period. *J. Clin. Virol.* 72, 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2015.08.002>.
- Mese, S., Akan, H., Badur, S., Uyanik, A., Istanbul Rapid Test Study Group, 2016. Analytical performance of the BD veritor™ System for rapid detection of influenza virus A and B in a primary healthcare setting. *BMC Infect. Dis.* 16, 481. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1811-9>.
- Messacar, K., Parker, S.K., Todd, J.K., Dominguez, S.R., 2017. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J. Clin. Microbiol.* 55, 715–723. <https://doi.org/10.1128/JCM.02264-16>.
- Ndegwa, L.K., Emukule, G., Uyeki, T.M., Mailu, E., Chaves, S.S., Widdowson, M.-A., Lewa, B.V., Muiruri, F.K., Omoth, P., Fields, B., Mott, J.A., 2017. Evaluation of the point-of-care Becton Dickinson Veritor™ rapid influenza diagnostic test in Kenya, 2013–2014. *BMC Infect. Dis.* 17, 60. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-2131-9>.
- Pillet, S., Lardeux, M., Dina, J., Grattard, F., Verhoeven, P., Le Goff, J., Vabret, A.,

- Pozzetto, B., 2013. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. PLoS One 8, e72174. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072174>.
- Ryu, S.W., Suh, I.B., Ryu, S.-M., Shin, K.S., Kim, H.-S., Kim, J., Uh, Y., Yoon, K.J., Lee, J.-H., 2017. Comparison of three rapid influenza diagnostic tests with digital readout systems and one conventional rapid influenza diagnostic test. J. Clin. Lab. Anal. <https://doi.org/10.1002/jcla.22234>.
- Schwartz, R.H., Selvarangan, R., Zissman, E.N., 2015. BD Veritor System respiratory syncytial virus rapid antigen detection test: point-of-care results in primary care pediatric offices compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction and viral culture methods. Pediatr. Emerg. Care 31, 830–834. <https://doi.org/10.1097/PEC.0000000000000371>.

4 Impact d'un TDR grippe sur la prise en charge aux urgences pédiatriques

Pendant la période de circulation grippale 2015-2016, un POCT grippe a été mis à disposition des médecins pour évaluer l'impact clinique que ce système pouvait avoir sur la prise en charge. Pour chaque patient inclus, le médecin devait décider quelle prise en charge il proposait en termes de prélèvements et de prise en charge. Une fois ces données enregistrées, le POCT était réalisé et le résultat rendu au médecin. Le critère principal était la différence entre les analyses annoncées et les analyses effectivement réalisés.

En parallèle, une analyse rétrospective a été réalisée sur la réalisation de ces examens les années précédentes, afin d'évaluer par deux modalités différentes l'impact qu'avait eu la mise à disposition d'un résultat de POCT grippe.

Les résultats sont très importants en termes d'impact sur la prise en charge (réduction des examens complémentaires invasifs inutiles, des ponctions lombaires, des imageries irradiantes, etc.). Nous mettons également en évidence un réservoir important d'économie financière avec cette attitude.



Original article

Impact of bedside diagnosis of influenza in the paediatric emergency ward

A. Cantais^{1,2,*}, O. Mory¹, A. Plat¹, A. Bourmaud^{3,4,5}, A. Giraud¹, M. Costille¹, B. Pozzetto^{2,6}, S. Pillet^{2,6}¹ Paediatric Emergency Department, University Hospital of Saint-Etienne, France² Groupe Immunité des Muqueuses et Agents Pathogènes (GIMAP), EA3064, Faculty of Medicine of Saint-Etienne, University of Lyon, France³ Public Health Department, Hyg e Centre, Lucien Neuwirth Cancer Institute, Saint Priest en Jarez, France⁴ Quality Safety Performance in Health (HESPER) EA7425, University of Lyon, France⁵ Inserm, Clinical Investigation Centre 1408, University-Hospital of Saint-Etienne, France⁶ Laboratory of Infectious Agents and Hygiene, University Hospital of Saint-Etienne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 June 2018

Received in revised form

12 November 2018

Accepted 18 November 2018

Available online 29 November 2018

Editor: A. Kalil

Keywords:

Medical costs

Cost-effectiveness impact

Rapid influenza diagnostic test

Immunoassay

Digital reader

24/7

BD Veritor

ABSTRACT

Objectives: This prospective study performed in the paediatric emergency department of the University Hospital of Saint-Etienne aimed to measure the impact of the 24/7 bedside use of the Veritor™ System (Becton Dickinson) on the reduction of supplementary investigations, hospital stay and antimicrobial use.

Methods: Influenza virus A and B antigens were detected with a rapid influenza digital immunoassay (DIA) on nasopharyngeal aspirates (NPAs) sampled from the children consulting at the paediatric emergency department between January and March 2016 for influenza-like illness. The same NPA was tested by immunofluorescence and/or molecular routine assays. Before performing the DIA, the clinician filled in a questionnaire listing the tests that he/she would have prescribed in the absence of the rapid testing. The prescription of complementary investigations, antimicrobial treatments and hospital stay were also compared to those of the 3 previous years.

Results: A total of 514 children with flu-like symptoms were included. The use of the DIA at bedside decreased the prescription of blood puncture by 47.9% (21.2% to 6.6%), of chest X-rays by 69.0% (33.3% to 10.3%), of lumbar puncture by 77.8% (7.0% to 1.6%), of urine culture by 79.2% (23.3% to 4.9%), of antibiotic treatments by 70.1% (16.9% to 5.1%), and of hospital stay by 25.0% (27.2% to 20.4%), resulting in a reduction of medical costs estimated to more than €69 000 in a season.

Conclusions: In addition to delivering a rapid aetiological diagnosis, this strategy saves medical costs and favours an antimicrobial stewardship strategy. However, further prospective studies are needed to confirm our findings. **A. Cantais, Clin Microbiol Infect 2019;25:898**

© 2018 European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

As the most common reason for consultation during epidemics, influenza-like illness represents a major burden at the paediatric emergency department. Up to 48% of the visits at this setting are related to acute respiratory infection or fever in children under than 5 years [1,2]. The attack rate during each annual outbreak is

estimated between 20% and 30% in children and could reach up to 50% in day care attendees [3,4]. However, the clinical diagnosis of flu is difficult to perform, especially in infants who cannot report evocative symptoms [5] and because of frequent unspecific presentation, such as isolated fever [6] or gastrointestinal symptoms [3,6]. Moreover, other respiratory agents can cause similar clinical presentations [7–10]. Identifying the aetiology of influenza-like illness is necessary for improving healthcare organization and efficiency, limiting unnecessary and painful investigations [11] and optimizing antiviral [12] and antimicrobial treatments [13].

The practicability of rapid influenza diagnostic tests (RIDTs) allows their use by non-trained healthcare professionals at bedside.

* Corresponding author. A. Cantais, Urgences Pédiatriques – CHU de Saint-Etienne, 42055, Saint-Etienne CEDEX 2, France.

E-mail address: aymeric.cantais@chu-st-etienne.fr (A. Cantais).

However, due to the low sensitivity of the first-generation RIDTs [14], their usefulness in clinical routine has been debated [15]. Newly designed assays with a digitally scan test strip, called digital immunoassays (DIAs), have better analytical performances when used in laboratories by trained personnel [16–20]. However, the cost-effectiveness impact of their implementation in clinical wards has been poorly evaluated. The aim of this study was to measure the impact of the bedside diagnosis of influenza by using a DIA on the reduction of supplementary investigations, hospital stay, and antimicrobial use.

Patients and methods

Study design and patients

Consecutive patients aged 0–16 years and consulting between 7 January and 19 March 2016, corresponding to the period of influenza virus circulation at the paediatric emergency department, were included prospectively. The study was started after three influenza cases were recorded within 3 consecutive days; it was stopped after 1 week without new influenza case. The inclusion criteria were fever $>38.5^{\circ}\text{C}$ without source and acute impaired general condition including tachypnoea, tachycardia, prolonged capillary refill time, and/or lethargy; the exclusion criteria were known immunosuppression and evident bacterial infection [11,21,22]. Prescription of virological testing was at the discretion of the emergency paediatrician, using the same criteria as for the previous winter seasons, without any specific recommendation for the study. An informative note was given to the parents, but no written consent was required by the Ethics Committee of the University Hospital of Saint-Etienne (approval ref. IRBN322016/CHUSTE).

Following oral acceptance of parents and older children, the clinician filled in a questionnaire listing the biological or radiological tests that he/she would prescribe together with the potential indication of hospitalization and anti-infectious treatment as a declared intent.

A nasopharyngeal aspirate (NPA) was taken immediately and the DIA was performed 24/7 at bedside. The result was communicated as soon as available to the clinician and the patient's relatives. Then the NPAs were sent to the microbiology laboratory as for the past seasons. Management of patients was not different from that given during past seasons.

At the end of the winter season, the content of the questionnaires was analysed by two of us (A.C. and O.M.); the prescriptions that were currently performed were compared with those proposed in the questionnaire before the DIA result was available.

Microbiological analyses

The BD Veritor™ System for Rapid Detection of Flu A+B (Becton Dickinson, Pont-de-Claix, France) detects influenza A and B nucleoprotein antigens. It was performed by paediatric emergency department nurses who had been specially trained. The swab included in the kit was rolled five times into the NPA before being introduced in the reagent tube. The test was then performed as recommended by the manufacturer. Interpretation using the Flu Veritor™ reader indicated three possible conditions: negative, positive, or not-interpretable. The result was obtained in less than 15 min. The NPA was kept at 4°C before being sent to the laboratory for routine assay.

At the microbiology laboratory, respiratory viruses were detected by an indirect immunofluorescence assay (IFA) already in use during the past years. Briefly, the NPA specimen was treated for removing mucus; the cells were dried on glass slides and fixed with

cold acetone before adding a set of monoclonal antibodies to influenza A and B antigens (bioMérieux) and, after washing, a fluorescein isothiocyanate-conjugated goat antibody directed against mouse IgG (bioMérieux). The reading was performed with an optical fluorescent microscope (Leitz, Stuttgart, Germany). In case of a discrepant result between DIA and IFA, 200 μL of the NPA sample were tested by the nucleic acid amplification test (NAAT) combining nucleic acid extraction on NUCLESENS® easyMAG® (bioMérieux), one-step reverse transcription and real-time PCR assay (Multi Well System FluA/B R-gene assay) as described [23]. The NAAT result was considered as the reference standard.

Data analysis

The number of provisional actions (prescription of biological and radiological investigations, hospital stay, consumption of antimicrobial drugs) declared through the questionnaire was compared to that of actions that were actually done. The latter variables were also compared to the data obtained from the past three winter seasons after reviewing electronic records of the medical database using the inclusion and exclusion criteria defined at the beginning of this section. The cost estimation of medical procedures and biological tests was based on the prices listed in the 2014 version of the respective official French classifications. For antimicrobial treatments, the mean cost for one prescription was evaluated by using doses and duration usually prescribed in such a situation; the cost of drugs was based on that of French generic antibiotics. For hospital stays, the cost of each case was based on its main final diagnosis and was estimated on the basis of its diagnosis-related group that corresponds to a price listed in a national database.

Statistical analysis

The chi-square test was used to compare qualitative data and the Student *t* test to compare means. Data recording, statistical tests and graphical drawing were performed using Microsoft Excel® 2016 and Addinsoft XLStat V19.03 software.

Results

Clinical characteristics of patients

From a total of 588 patients exhibiting influenza-like illness identified during the study period, 514 patients (87.4% (514/588), sex ratio M/F of 1.11; median age 2.7 years; 95% CI 2.2–3.2) were included; 42% (216/514) of the children were less than 2 years old. The clinical presentation corresponded to influenza-like syndrome, sometimes associated with gastro-enteric symptoms. Children exhibiting positive flu DIA presented a respiratory distress syndrome less frequently but a longer duration of fever (Table 1).

Virological results

From a total of 514 included patients, 245 tested negative, 262 positive (59 for influenza A and 203 for influenza B), and seven not-interpretable (1.4%) by the Flu Veritor assay. In addition to H3N2 and H1N1 pdm09 influenza A strains, the virus that predominated during the epidemic period belonged to type B, lineage Victoria [24], with a late flu peak at the end of February, which is common for B outbreaks [25].

A total of 477 specimens (92.8%) could be checked in the laboratory by using the IFA, completed by NAAT in case of discrepancy between DIA and IFA results: 450 results were concordant (94.3%, kappa coefficient of 0.911 (0.87–0.95)), including 217 negative and

Table 1

Clinical characteristics of the 507 children admitted at the Emergency Unit of the University Hospital of Saint-Etienne, France, for influenza-like symptoms, after exclusion of the seven patients exhibiting a not-interpretable result by influenza digital immunoassay (DIA)

Variable	Total, N = 507 (%)	Flu negative by DIA, N = 245 (%)	Flu positive by DIA, N = 262 (%)	p ^a
Demographical characteristics				
Female	242 (47.7)	123 (50.2)	119 (45.4)	NS
Male	265 (52.3)	122 (49.8)	143 (54.6)	
Age group				
0–2, years	215 (42.4)	131 (53.5)	84 (32.1)	<0.001
2–5 years	144 (28.4)	56 (22.9)	88 (33.6)	
5–12 years	131 (25.8)	49 (20)	82 (31.3)	
>12 years	17 (3.4)	9 (3.7)	8 (3)	
Medical comorbidities				
Pulmonary disease	38 (7.5)	20 (8.2)	18 (6.9)	NS
Other chronic disease	22 (4.3)	9 (3.7)	13 (5.0)	NS
Clinical presentation				
Myalgia	88 (17.4)	34 (13.9)	54 (20.6)	NS
Respiratory distress	63 (12.4)	41 (16.7)	22 (8.4)	<0.007
Digestive symptom (diarrhoea, nausea)	135 (26.6)	72 (29.4)	63 (24)	NS
Seizure	27 (5.3)	11 (4.5)	16 (6.1)	NS
Fever >38.5°C	477 (94.1)	227 (92.7)	250 (95.4)	NS
Mean duration of fever (h)	66.4	58.5	72.6	<0.002

^a NS = not statistically significant at the level of 0.05.

233 positive results (Table 2). The 27 discordant results included 11 false positive results, 10 false negative results, and six not-interpretable results by DIA that were all found positive by NAAT (one of the seven initial not-interpretable samples could not be tested). After exclusion of the not-interpretable samples, the sensitivity, specificity, and negative and positive predictive values of the DIA were respectively 95.9% (92.6–98.0), 95.2% (91.5–97.6), 95.6% (92.1–97.9), and 95.5% (92.1–97.7) by comparison to the routine tests.

Virtual cost saving

Table 3 summarizes the virtual cost saving between the actions that would have been done after the clinical examination of the patient as recorded in the paediatrician's questionnaire and those that were really done after obtaining the DIA result. Several variables were significantly reduced, including blood and urine cultures, chest X-rays, lumbar punctures, and use of antibiotics. Concerning direct costs, the reduction of the number of hospital stays was the most significant item (€59 255 over a total of €69 273).

With an individual cost of €5, the extra cost for the 514 DIA tests was estimated to be €3187. No personnel charge needs to be added since healthcare workers in the unit performed the test.

Table 2

Performance of the Veritor™ digital immunoassay (DIA) performed at bedside compared with the routine strategy used in the laboratory for the diagnosis of influenza on 477 clinical specimens from children admitted for influenza-like symptoms at the Emergency Unit of the University Hospital of Saint-Etienne, France

	Result of standard laboratory test ^a		Total
	Positive	Negative	
Result of the DIA test			
Positive	233^b	11	244
Negative	10	217	227
Not-interpretable	6 ^c	0	6
Total	249	228	477

Concordant results by both diagnostic approaches are shown in bold.

^a The standard laboratory test consisted in an immunofluorescence assay (IFA) completed by nucleic acid amplification test in case of discrepancy between the DIA and IFA results.

^b Forty-seven typed A and 186 typed B.

^c One typed A and five typed B.

Clinical evolution

Seventy-six patients (31.0%) were hospitalized in the DIA negative group versus 27 (10.3%) in the positive one ($p < 0.001$). The medical file analysis of these 27 children showed that hospitalization was justified by the occurrence of another infection in 10 cases (pyelonephritis, acute otitis media, pneumonia, gastroenteritis), a comorbidity in eight cases (age under 3 months, immunosuppression, diabetes), and/or a complicated flu in 13 cases (Table S1).

Regarding antimicrobials, 60 of 245 patients (24.5%) received antibiotics in the DIA negative group, versus 25 of 262 (9.5%) in the positive one ($p < 0.001$). Sixteen of these 25 patients presented with acute otitis media (which can be considered as a bacterial complication of flu) and four exhibited another presumed bacterial pathology, resulting in prescription or maintenance of an antibiotic therapy without documented infection in only five cases. According to the French guidelines [26], oseltamivir was prescribed to only 14 of the 262 patients who tested positive for flu with DIA (5.3%) after a mean duration of fever of 17 hours. No adverse effect was recorded.

No life-compromising complication was observed in our cohort.

Temporal comparison of medical prescriptions and hospitalization stay

As shown in Fig. 1 comparing the different actions performed during the winter season of the study versus the three past ones, a dramatic decrease was observed ($p < 0.001$) for each of them, notably for blood sampling, CRP measure, chest X-ray, and hospitalization stay. Blood culture prescriptions had decreased before the introduction of DIA, following the paediatricians' wish to reduce unnecessary blood culture and prevent blood waste.

Discussion

The objective of the study was to determine the impact of a bedside diagnosis of influenza in the context of paediatric emergencies on prescription of supplementary examinations, use of antimicrobial drugs, and hospitalization. Two strategies were chosen to reach this goal: (1) comparing the rates of prescriptions and hospitalizations between what the physician had really prescribed knowing the result of the bedside test and what he/she would have prescribed in the absence of DIA, and (2) comparing the

Table 3

Comparison between virtual prescriptions that were recorded through a questionnaire before the result of the rapid influenza digital immunoassay (DIA) was available and prescriptions that were finally performed in the 514 patients included into the study.

	No. of virtual prescriptions after physical examination of patients (%)	No. of current prescriptions after availability of the DIA result (%)	p between virtual and current prescriptions	Percentage of reduction between virtual and current prescriptions	Estimation of saved costs(€)
CRP dosage in capillary blood	294 (57.2)	142 (27.6)	<0.001	51.7	369
Blood sampling	192 (37.4)	100 (19.5)	<0.001	47.9	290
CRP dosage	185 (36.0)	94 (18.3)	<0.001	49.2	221
Procalcitonin dosage	169 (32.9)	72 (14.0)	<0.001	57.4	2095
Blood culture	109 (21.2)	34 (6.6)	<0.001	68.8	1.620
Urine test strip	238 (46.3)	139 (27.0)	<0.001	41.6	53
Urine culture	120 (23.3)	25 (4.9)	<0.001	79.2	1667
Chest X-rays	171 (33.3)	53 (10.3)	<0.001	69.0	2511
Lumbar puncture	36 (7.0)	8 (1.6)	<0.001	77.8	968
Hospitalization	140 (27.2)	105 (20.4)	0.013	25.0	59 255
Antibiotic treatment	87 (16.9)	26 (5.1)	<0.001	70.1	223
Total cost					69 273

CRP, C-reactive protein.

same criteria with what had been done during the 3 previous years in the same unit. Both approaches led to the conclusion that important benefits were generated using the rapid test at bedside.

To our knowledge, this study is the first one to propose a prospective evaluation of the medico-economic impact of the bedside diagnosis of influenza in the paediatric emergency ward. With regards to routine tests combining IFA and NAAT, the Flu Veritor™ assay exhibited excellent performances, in relation to the high viral load usually found in the respiratory secretions of young children with severe symptoms of flu-like illness [15,27,28]. Interestingly, the few not-interpretable Veritor™ tests were all found positive by

NAAT, which implies that alternative techniques must be tested in this situation. As previously shown [27,28], the Flu Veritor™ test was found to be easy to perform, even by non-specialist personnel; the availability of a mobile reader improved the objectivity and traceability of the result.

The strengths of this study are the excellent performances of the DIA in this population, a significant lesser number of invasive investigations, an important economy of antimicrobial treatments that were of no use, and a major impact in terms of cost benefits. Despite its prospective design, the study suffered some limitations. First, the routine strategy of flu diagnosis using IFA as first-line

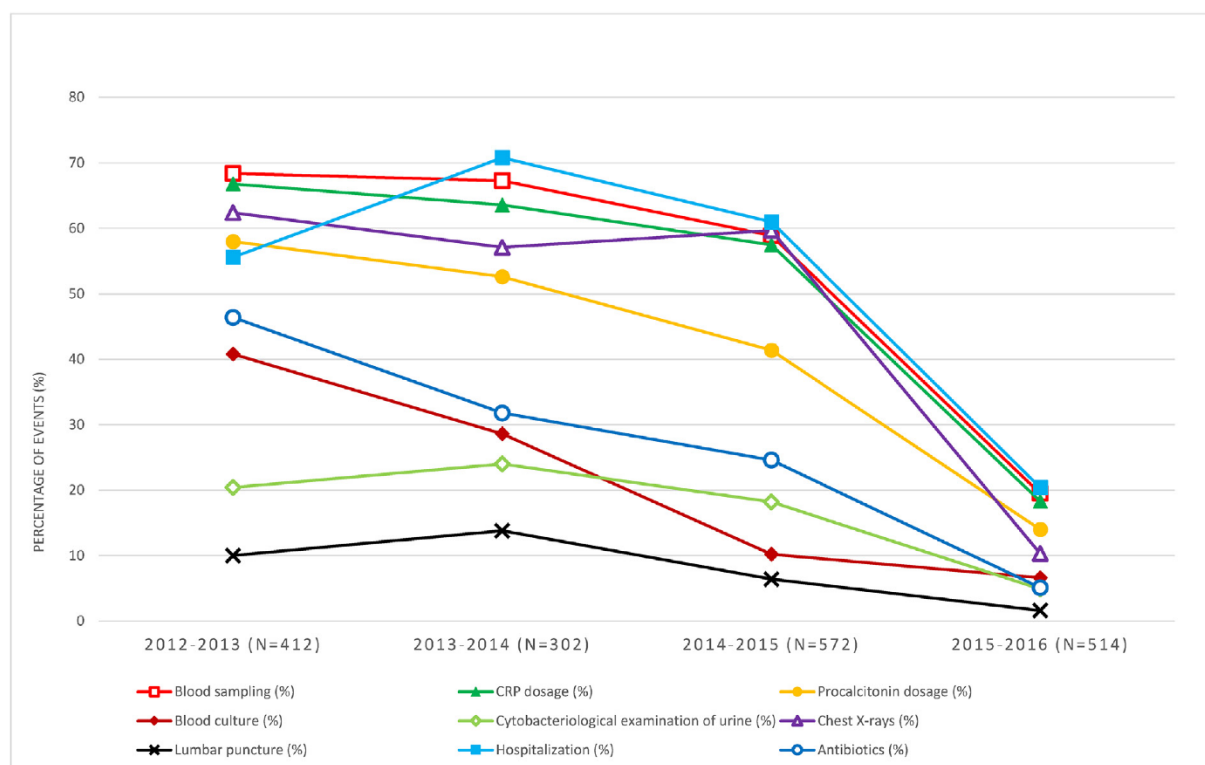


Fig. 1. Percentage of events performed during the study and the 3 years before in children confirmed positive for influenza at the paediatric emergency department of the University-Hospital of Saint-Etienne, France. CRP: C-reactive protein.

technique is no longer recommended and has been replaced by NAAT in most centres; however, the excellent performances of 'doctor tests' as used in this study were recently confirmed for the diagnosis of respiratory infections in paediatric wards when compared to NAAT [20,21,29,30]. Second, the comparison of the intents of the physician with the real prescription could have led to overestimating the real benefits of the bedside strategy. Third, even if the prescription of the flu tests was not subject to major changes during the 4 studied years, the comparison with historical records is an additional source of bias. Because conducting a randomized assay is difficult, the combination of the two former approaches leading to very similar results with clear-cut benefits of the bedside strategy is indicative of the robustness of the conclusions.

From a clinical point of view, the patients testing positive for flu by the DIA benefited from a significantly lesser number of invasive investigations, including blood puncture, lumbar puncture, and chest X-ray irradiation. The number of hospitalizations and the prescription of antibiotic drugs were also significantly reduced. All the patients who were hospitalized despite a positive DIA exhibited comorbidities, a severe presentation and/or a complicated flu. In the few patients ($n = 9$) exhibiting a false-positive result with the rapid test that deprived them of hospitalization, the clinical evolution was shown to be favourable (data not shown). Interestingly, the number of patients with respiratory distress was significantly lower in the flu group, which can be explained by the simultaneous occurrence of a bronchiolitis outbreak in the setting.

From an ecological point of view, an important economy of antimicrobial treatments that were of no use was observed. Although the consumption of antibiotics had already shown a trend to decrease during the two previous seasons, the number of patients with flu treated by antibiotics passed under the bar of 10% during the last season. Consequently, the bedside diagnosis of flu contributes to improving the antimicrobial stewardship strategy aimed at fighting the growing resistance of bacteria, as previously shown for other rapid virological tools [13].

The impact of diagnosing flu at the bedside was major in terms of economic benefits. A significant reduction was observed for procalcitonin dosage, blood culture, urine culture, and chest radiography, because these examinations are essential for investigating a fever of unknown origin in infants. The main economic impact was the theoretical saving of 35 hospitalizations, which represented a saving of more than €69 000. Although these cost savings are virtual, they are indicative of the optimization of medical costs induced by this strategy. They were confirmed by a dramatic decrease in the actual rate of hospitalization compared with the three previous years.

As a whole, the excellent analytical performances of the Flu Veritor™ system allow its use as a point-of-care test to performing an accurate and rapid diagnosis of influenza at the paediatric emergency department. In addition to delivering a rapid aetiological diagnosis, this strategy is able to save the prescription of a considerable number of unnecessary tests, antimicrobial treatments, and hospital stay. However, a randomized prospective trial would be useful to confirm these very encouraging results. It is also important to keep in mind that the rapid test must be considered as a support to the medical decision and that the clinical appreciation of the severity of the symptoms must be the major factor for deciding of complementary investigations, antimicrobial treatment, and hospitalization.

Transparency declaration

Dr Bourmaud reports support from Abbvie biopharmaceutical company for one medical congress transportation and accommodation. All others authors declare no support was received from the

industry in the last 3 years. Becton Dickinson France provided freely the BD Flu Veritor tests and readers used in this study, but did not participate in any way in the design of the study, the data analysis nor the writing of the manuscript.

Acknowledgments

The nurses, the medical personnel and the laboratory staff who participated to the study are sincerely acknowledged. We are also indebted to all the children and their family for accepting to take part to this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.11.019>.

References

- [1] Jules A, Grijalva CG, Zhu Y, Talbot HK, Williams JV, Poehling KA, et al. Influenza-related hospitalization and ED visits in children less than 5 years: 2000–2011. *Pediatrics* 2015;135:e66–74.
- [2] Gorelick MH, Alpern ER, Alessandrini EA. A system for grouping presenting complaints: the pediatric emergency reason for visit clusters. *Acad Emerg Med* 2005;12:723–31.
- [3] Fraaij PLA, Heikkinen T. Seasonal influenza: the burden of disease in children. *Vaccine* 2011;29:7524–8.
- [4] O'Brien MA, Uyeki TM, Shay DK, Thompson WW, Kleinman K, McAdam A, et al. Incidence of outpatient visits and hospitalizations related to influenza in infants and young children. *Pediatrics* 2004;113:585–93.
- [5] Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, Szilagyi P, Staat MA, Iwane MK, et al. The under-recognized burden of influenza in young children. *N Engl J Med* 2006;355:31–40.
- [6] Heinonen S, Peltola V, Silvennoinen H, Vahlberg T, Heikkinen T. Signs and symptoms predicting influenza in children: a matched case–control analysis of prospectively collected clinical data. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:1569–74.
- [7] Schnepf N, Resche-Rigon M, Chaillon A, Scemla A, Gras G, Semoun O, et al. High burden of non-influenza viruses in influenza-like illness in the early weeks of H1N1v epidemic in France. *PLoS One* 2011;6:e23514.
- [8] Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, et al. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. *J Clin Virol* 2014;60:402–7.
- [9] Jain S, Williams DJ, Arnold SR, Ampofo K, Bramley AM, Reed C, et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. children. *N Engl J Med* 2015;372:835–45.
- [10] Taylor S, Lopez P, Weckx L, Borja-Tabora C, Ulloa-Gutierrez R, Lazcano-Ponce E, et al. Respiratory viruses and influenza-like illness: epidemiology and outcomes in children aged 6 months to 10 years in a multi-country population sample. *J Infect* 2017;74:29–41.
- [11] Lacroix S, Vignaud B, Avril E, Moreau-Klein A, Coste M, Launay E, et al. Impact of rapid influenza diagnostic test on physician estimation of viral infection probability in paediatric emergency department during epidemic period. *J Clin Virol* 2015;72:141–5.
- [12] Abraham MK, Perkins J, Vilke GM, Coyne CJ. Influenza in the emergency department: vaccination, diagnosis, and treatment: clinical practice paper approved by American Academy of Emergency Medicine Clinical Guidelines Committee. *J Emerg Med* 2016;50:536–42.
- [13] Messacar K, Parker SK, Todd JK, Dominguez SR. Implementation of rapid molecular infectious disease diagnostics: the role of diagnostic and antimicrobial stewardship. *J Clin Microbiol* 2017;55:715–23.
- [14] Bouscambert M, Valette M, Lina B. Rapid bedside tests for diagnosis, management, and prevention of nosocomial influenza. *J Hosp Infect* 2015;89:314–8.
- [15] Dunn JJ, Ginocchio CC. Point-counterpoint: can newly developed, rapid immunochromatographic antigen detection tests be reliably used for the laboratory diagnosis of influenza virus infections? *J Clin Microbiol* 2015;53:1790–6.
- [16] Hassan F, Nguyen A, Formanek A, Bell JJ, Selvarangan R. Comparison of the BD Veritor system for flu A+B with the Alere BinaxNOW influenza A&B card for detection of influenza A and B viruses in respiratory specimens from pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2014;52:906–10.
- [17] Leonardi GP, Wilson AM, Mitrache I, Zuretti AR. Comparison of the SOFIA and Veritor direct antigen detection assay systems for identification of influenza viruses from patient nasopharyngeal specimens. *J Clin Microbiol* 2015;53:1345–7.
- [18] Dunn J, Obuekwe J, Baun T, Rogers J, Patel T, Snow L. Prompt detection of influenza A and B viruses using the BD Veritor™ system flu A+B, Quidel®

- Sofia® influenza A+B FIA, and Alere BinaxNOW® influenza A&B compared to real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;79:10–3.
- [19] Peters TR, Blakeney E, Vannoy L, Poehling KA. Evaluation of the limit of detection of the BD Veritor™ system flu A+B test and two rapid influenza detection tests for influenza virus. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013;75:200–2.
 - [20] Merckx J, Wali R, Schiller I, Caya C, Gore GC, Chartrand C, et al. Diagnostic accuracy of novel and traditional rapid tests for influenza infection compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2017;167:394.
 - [21] Lau LLH, Cowling BJ, Fang VJ, Chan K-H, Lau EHY, Lipsitch M, et al. Viral shedding and clinical illness in naturally acquired influenza virus infections. *J Infect Dis* 2010;201:1509–16.
 - [22] McCullers JA. Influenza virus. In: Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases. 8th ed. Elsevier; 2018. p. 1729–45 (Elsevier).
 - [23] Pillet S, Lardeux M, Dina J, Grattard F, Verhoeven P, Le Goff J, et al. Comparative evaluation of six commercialized multiplex PCR kits for the diagnosis of respiratory infections. *PLoS One* 2013;8:e72174.
 - [24] European Centre for Disease Prevention and Control. Seasonal influenza - annual epidemiological report for 2016–17 season. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/seasonal-influenza-annual-epidemiological-report-2016-17-season>.
 - [25] Mosnier A, Caini S, Daviaud I, Bensoussan J-L, Stoll-Keller F, Bui TT, et al. Ten influenza seasons in France: distribution and timing of influenza A and B circulation, 2003–2013. *BMC Infect Dis* 2015;15:357.
 - [26] Haut Conseil de Santé Publique. Avis relatif à l'utilisation des antiviraux chez les patients en extra-hospitalier pour le traitement en curatif et le traitement en post-exposition en période de circulation des virus de la grippe saisonnière. 2012. Available from: https://www.hcsp.fr/Explore.cgi/Telecharger?NomFichier=hcspa20121109_antivirauxextrahospgrippe.pdf.
 - [27] Mese S, Akan H, Badur S, Uyanik A, Istanbul Rapid Test Study Group. Analytical performance of the BD Veritor™ system for rapid detection of influenza virus A and B in a primary healthcare setting. *BMC Infect Dis* 2016;16:481.
 - [28] Ndegwa LK, Emukule G, Uyeki TM, Mailu E, Chaves SS, Widdowson M-A, et al. Evaluation of the point-of-care Becton Dickinson Veritor™ rapid influenza diagnostic test in Kenya, 2013–2014. *BMC Infect Dis* 2017;17:60.
 - [29] Schwartz RH, Selvarangan R, Zissman EN. BD Veritor System respiratory syncytial virus rapid antigen detection test: point-of-care results in primary care pediatric offices compared with reverse transcriptase polymerase chain reaction and viral culture methods. *Pediatr Emerg Care* 2015;31:830–4.
 - [30] Tran LC, Tournus C, Dina J, Morello R, Brouard J, Vabret A. SOFIA®RSV: prospective laboratory evaluation and implementation of a rapid diagnostic test in a pediatric emergency ward. *BMC Infect Dis* 2017;17:452.

5 Test antigénique SARS-CoV-2

La pandémie de SARS-CoV-2 et son impact majeur sur les systèmes de santé a imposé l'utilisation de tests antigéniques dans les stratégies de prise en charge dans tous les pays du monde. Cependant, la majorité des articles relatant leurs performances sont des analyses de laboratoire loin du malade, ou des recherches concernant l'adulte. Comme nous l'avons montré dans d'autres articles, la performance sur l'enfant est très différente.

Nous avons analysé l'usage fait de plus de mille tests antigéniques SARS-CoV-2 aux urgences pédiatriques, et évalué leurs performances analytiques, d'une part. D'autre part, nous avons voulu analyser les déterminants de cette performance afin de mieux comprendre les freins à l'utilisation de ces dispositifs, que ce soit en termes de caractéristiques cliniques du patient (âge, sexe, comorbidités) ou de la maladie (Ct principalement, et probablement délai depuis l'apparition des symptômes)



Prospective evaluation of the point-of-care use of a rapid antigenic SARS-CoV-2 immunochromatographic test in a pediatric emergency department

Journal:	<i>Clinical Microbiology and Infection</i>
Manuscript ID	CLM-21-22156
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	10-Sep-2021
Complete List of Authors:	Ollier, Quentin; Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Pediatric Emergency Pillet, Sylvie; University Hospital of Saint-Etienne, Microbiology Mory, Olivier; CHU Nord, Urgences Pédiatrie Gagnaire, Julie; Université Claude Bernard Lyon 1, INSERM U1111 - Centre International de Recherche en infectiologie; Hospices Civils de Lyon, Laboratoire de bactériologie Thuiller, Charlotte; Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Pediatric Emergency Annino, Nadine; Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Pediatric Emergency Gagneux-Brunon, Amandine; University hospital of Saint-Etienne, Infectious diseases department Botelho-Nevers, Elisabeth; CHU de Saint-Etienne, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales Bourlet, Thomas; University of Saint-Etienne, GIMAP, Microbiology Pozzetto, Bruno; University hospital of Saint-Etienne, Laboratory of Bacteriology-Virology-Hygiene Cantais, Aymeric; Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Etienne, Pediatric Emergency
Key Words:	POCT, Pediatric, Covid-19, Diagnosis test, Sensitivity
Abstract:	Objectives This study aimed at evaluating the immunochromatographic COVID19Speed-Antigen Test (BioSpeedia, France) as antigen point-of-care test (AgPOCT) to detect SARS-CoV-2 infection in the paediatric emergency department of the University Hospital of Saint-Etienne, France. Methods Between January 15th and May 28th 2021, every child presenting a respiratory symptomatology compatible with Covid-19 (symptomatic group) or requiring hospitalization for any reason (asymptomatic group) was included prospectively and received a nasopharyngeal aspiration (NPA) to carry out both AgPOCT and RT-qPCR test, the latter being used as gold standard, for the diagnosis of SARS-CoV-2 infection. Results Among the 1009 enrolled children, we obtained a result by both

	techniques for 990 of them: 33 (3.3%) were positive by AgPOCT and 46 (4.6%) by RT-qPCR. The overall sensitivity and specificity of the AgPOCT were 69.6% (CI95% 54.3-82.3) and 99.9% (CI95% 99.4-100), respectively, by comparison to RT-qPCR. Its sensitivity was increased to 82.9% [CI 95% 66.4-93.4] in symptomatic children. The mean cycle threshold (Ct) value was significantly lower in positive samples for AgPOCT than in negative ones, in the overall population and in both symptomatic and asymptomatic groups. After logistic regression, male sex (OR 9.0 [95%CI 1.6-90.2]; $p<0.05$) and presence of cough (OR 5.1 [95%CI 1.0-31.9]; $p=0.05$) were positively correlated to AgPOCT positivity. Conclusions The use of the COVID19Speed-Antigen Test at bedside in the emergency room provides satisfying performances for diagnosing SARS-CoV-2 infection, especially in symptomatic children.

Original Article :

Prospective evaluation of the point-of-care use of a rapid antigenic SARS-CoV-2 immunochromatographic test in a pediatric emergency department

Ollier Quentin¹, Pillet Sylvie, PharmD-PhD^{2,3}, Mory Olivier, MD¹, Gagnaire Julie, PharmD-PHD^{3,4}, Thuiller Charlotte, MD¹, Annino Nadine, MD¹, Gagneux-Brunon Amandine, MD-PhD^{3,4}, Botelho-Nevers Elisabeth, MD-PhD^{3,4}, Bourlet Thomas, PharmD-PhD^{2,3}, Pozzetto Bruno, MD-PhD^{2,3}, Cantais Aymeric, MD^{1,3}

1 : Pediatric Emergency Department – University-Hospital of Saint Etienne, Saint-Etienne, France

2 : Department of Infectious Agents and Hygiene, University-Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

3 : CIRI - Centre International de Recherche en Infectiologie, Team GIMAP, Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Inserm, U1111, CNRS, UMR5308, ENS Lyon, 46 allée d'Italie, F-69007, Lyon, France

4 : Department of Infectious Diseases, University-Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, France

Corresponding author :

CANTAIS Aymeric, MD.

Postal adress :

CANTAIS Aymeric

Urgences Pédiatriques, CHU de Saint Etienne,

42000 Saint-Etienne, FRANCE

Tel : +33 4 77 82 81 90

Mail : aymeric.cantais@chu-st-etienne.fr

1
2
3 25 **Abstract (225 words)**
4
5

6
7 26 *Objectives*
8

9 27 This study aimed at evaluating the immunochromatographic COVID19Speed-Antigen Test
10
11 28 (BioSpeedia, France) as antigen point-of-care test (AgPOCT) to detect SARS-CoV-2 infection in the
12
13 29 paediatric emergency department of the University Hospital of Saint-Etienne, France.
14
15

16 30 *Methods*
17

18 31 Between January 15th and May 28th 2021, every child presenting a respiratory symptomatology
19
20 32 compatible with Covid-19 (symptomatic group) or requiring hospitalization for any reason
21
22 33 (asymptomatic group) was included prospectively and received a nasopharyngeal aspiration (NPA) to
23
24 34 carry out both AgPOCT and RT-qPCR test, the latter being used as gold standard, for the diagnosis of
25
26 35 SARS-CoV-2 infection.
27
28

29 36 *Results*
30

31 37 Among the 1009 enrolled children, we obtained a result by both techniques for 990 of them: 33
32
33 38 (3.3%) were positive by AgPOCT and 46 (4.6%) by RT-qPCR. The overall sensitivity and specificity of
34
35 39 the AgPOCT were 69.6% (CI95% 54.3-82.3) and 99.9% (CI95% 99.4-100), respectively, by comparison
36
37 40 to RT-qPCR. Its sensitivity was increased to 82.9% [CI 95% 66.4-93.4] in symptomatic children. The
38
39 41 mean cycle threshold (Ct) value was significantly lower in positive samples for AgPOCT than in
40
41 42 negative ones, in the overall population and in both symptomatic and asymptomatic groups. After
42
43 43 logistic regression, male sex (OR 9.0 [95%CI 1.6-90.2]; p<0.05) and presence of cough (OR 5.1 [95%CI
44
45 44 1.0-31.9]; p=0.05) were positively correlated to AgPOCT positivity.
46
47
48
49

50 45 *Conclusions*
51

52 46 The use of the COVID19Speed-Antigen Test at bedside in the emergency room provides satisfying
53
54 47 performances for diagnosing SARS-CoV-2 infection, especially in symptomatic children.
55
56
57
58
59
60

Introduction

Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 virus (SARS-CoV-2) emerged in December 2019 in Wuhan, China, causing the coronavirus disease 2019 (Covid-19) ongoing pandemic. Virus detection has been widely recommended to undertake interventions based on case finding and contact tracing. In symptomatic subjects, the spreading of infectious virus primarily occurs before the time of symptom onset. RT-qPCR testing performed on a nasopharyngeal sample is the gold standard for SARS-CoV-2 detection (1); it allows a semi-quantitative estimation of viral load by the cycle threshold (Ct) value. Nevertheless, this kind of molecular assay requires trained personnel, sophisticated laboratory equipment, and logistical planning. They are not fully adapted to the rapid screening of SARS-CoV-2 infected patients consulting at the emergency department (2). Consequently, delays in obtaining RT-qPCR results can rarely be shortened and can even be slowed down by the increasing demand for tests (3), whereas quickness of results is a crucial factor to control the viral transmission .

By the mid of 2020, antigen point-of-care tests (AgPOCT) appeared as an exciting alternative to rapid SARS-CoV-2 diagnosis. Although their analytical performances are inferior to those of RT-qPCR (4), they allow bedside testing, giving a piece of essential information within a few minutes. Despite the availability of a myriad of commercial SARS-CoV-2 AgPOCT, each has to be carefully evaluated in field conditions. Several evaluations of antigen tests have been published, but most of these studies were conducted either in only adults (4–8) or in both adults and children (9,10). This could be explained by the fact that children are considered far less important drivers of Covid-19 than adults (11–13). Nevertheless, they can be part of the transmission chain (14), as seen by the increasing number of positive tests in the pupil population since the schools' reopening around the world. Thus, there is a lack of evidence about the accuracy of AgPOCT in the pediatric population since, to the best of our knowledge, only two commercial AgPOCT kits have been evaluated in this context (15–17).

The objective of the present study was to evaluate the performances of the COVID19Speed-Antigen Test (BioSpeedia, France) prospectively as an AgPOCT for diagnosis of SARS-CoV-2 infection in

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

74 nasopharyngeal samples by comparison to an RT-qPCR assay in children with rapid tests performed
75 directly in the pediatric emergency department.

For Peer Review

Methods

This is a single-centre prospective study performed at the University Hospital of Saint-Etienne, Saint-Etienne, Loire Department, France, from January 15th to May 28th 2021. The COVID19Speed-Antigen Test (BioSpeedia, France) was chosen for its excellent performances in the adult population of our hospital (unpublished data).

Inclusion and exclusion criteria

Patients between 0 and 15 years old and those older who had still regular pediatric follow-ups were considered. Each child for whom an AgPOCT test was realized was included prospectively. The indication to perform a test in our centre was the presence of symptoms compatible with Covid-19, the notion of contact with an infected person, and hospitalization. Institutionally, each hospitalized child was indeed systematically tested for SARS-CoV-2 infection before entering the hospital ward, whatever the reason for hospitalization.

Two categories of patients were defined retrospectively. The “symptomatic group” included all patients presenting symptoms compatible with Covid-19, as described for children by Mansourian et al. (18) (fever, cough, vomiting, diarrhoea, sore throat, and dyspnea). The “asymptomatic group” gathered all the other patients who presented none of the above symptoms.

Procedures

Nasopharyngeal aspirate (NPA) was performed by the nurses of the pediatric emergency department using an atraumatic flexible hose. Following NPA sampling, the swab included in the AgPOCT kit was immersed in the sample and rolled three times before being introduced into the reagent tube. The AgPOCT was then performed at bedside in the emergency service, as recommended by the manufacturer. In parallel, the NPA was sent to the hospital laboratory for RT-qPCR analysis (r-gene, bioMérieux, France) on an ABI7500 fast thermocycler (Thermofisher, France) after extraction of total nucleic acids using the NUCLISSENS eMAG platform (bioMérieux).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

During the outbreak of respiratory syncytial virus (RSV), which started on 19 March 2021 (19) and was still ongoing in August 2021, an AgPOCT (Veritor) was used 24/7 at the pediatric emergency room as previously described (20). As no influenza virus circulated during the study period, the AgPOCT for flu diagnosis was not used.

Data collection and analysis

The following data collected at enrolment were managed using Microsoft Excel®: date of inclusion, age, gender, gravity rank from 1 (*i.e.* immediate emergency) to 5 (*i.e.* not urgent) at entrance, temperature at entrance, SpO2 at entrance, number of days after onset of symptoms, known exposure with an infected person, number of days since exposure, clinical symptoms (*i.e.* fever, nasal discharge, cough, and diarrhoea) (18) and comorbidities (*i.e.* chronic respiratory disease, cardiopathy, and immunosuppression). Each child admitted to the emergency department was triaged according to the severity of the clinical picture.

According to the judgment of the physician in charge at inclusion, some patients were also tested on the same NPA with a Luminex®-based multiplex PCR assay (NxTAG® Respiratory Pathogen Panel, Theradiag, France) able to detect 18 viruses [influenza virus A, influenza virus A H1N1pdm09, influenza virus A H3N2, influenza virus B, RSV-A, RSV-B, human parainfluenza virus (HPIV)-1, HPIV-2, HPIV-3, HPIV-4, human coronavirus (HCoV)-229E, HCoV-NL63, HCoV-OC43, HCoV-HKU1, metapneumovirus, rhinovirus-enterovirus, adenovirus, and bocavirus) and three atypical bacteria (*Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila*)].

AgPOCT results together with those of the RT-qPCR assay, including the Ct value for each gene target, were subsequently recorded. The Ct values were categorized according to the recommendations of the French Society of Microbiology for the r-gene assay, as strongly positive (Ct value < 23), positive (23 ≤ Ct value < 33), or low positive (Ct value ≥ 33) (21).

The study was approved by the local Ethics Committee under the number IRBN332021/CHUSTE.

Statistical analysis

Continuous variables were expressed by their mean (standard deviation [SD]) and median (interquartile range [IQR]) upon variable distribution. Categorical variables were presented by their frequencies and relative proportions. For comparisons of continuous variables, parametric Student T-test and non-parametric Mann-Whitney test upon variable distribution were used. For categorical variables, either Chi² or Fischer's exact tests were performed depending on applicability. Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated with 95% confidence interval (95%CI). The overall concordance was appreciated by the unadjusted Cohen's kappa test and the prevalence-adjusted and bias-adjusted kappa (PABAK) test. Statistical significance was defined as $p < 0.05$.

A logistic regression analysis was performed on the population infected by SARS-CoV-2 to evaluate clinical and anamnestic parameters which could influence the AgPOCT performance, defined as the ability of AgPOCT to give a result similar to PCR. The model was adjusted on age, sex, gravity rank at entrance, temperature at entrance, number of days after symptoms onset, presence of contact with a confirmed case, and each type of symptom. Selection of variables and management of multicollinearity were performed with a stepwise algorithm by Akaike information criterion (AIC) using the stepAIC function of the package MASS (V7.3-54). Associations between these parameters and the AgPOCT performance were expressed using odds ratios (OR) with 95%CI. Residual deviance and Chi² test of the variables were carried out by analysis of variance of the model. The goodness of Fit was analyzed by the deviance of the model using McFadden's R².

All statistical analyses were performed with the R V4.0.2 software (GNU General Public License, <https://www.r-project.org>).

Results

Characteristics of the study population

The main demographic, anamnestic, clinical, and microbiologic characteristics of the 1011 included children are depicted in Table 1. The median age was 1.7 [IQR 0.4 – 5.2] year old. The first reason for testing was the presence of Covid-19 compatible symptoms, with almost half of the study population presenting fever. As data was missing for 2 patients, 493 (48.9%) and 516 (51.1%) children were classified in the symptomatic and asymptomatic groups, respectively (Table 1). After exclusion of 21 missing data (2 NPA failures and 19 omitted SARS-CoV-2 RT-qPCR prescriptions), the virological results were analyzed on a total of 990 children. The SARS-CoV-2 was tested positive in 33 (3.3%) children by AgPOCT and in 46 (4.6%) of them by RT-qPCR, with mostly low Ct values (Table 2 and Figure 1). During the study period, the incidence of new cases as defined by the French Health authorities was 105-215 cases per 100.000 inhabitants in the pediatric population of the Loire department (data available at data.gouv.fr). At this time, the alpha variant of SARS-CoV-2 predominated.

Performances of the AgPOCT by comparison to RT-qPCR in the overall population

The AgPOCT sensitivity was 69.6% (CI95% 54.3-82.3) and its specificity was 99.9% (CI95% 99.4-100), with a NPV of 98.5% (CI95% 97.6-99.2) and a PPV of 97.0% (CI95% 84.2-99.9) (Table 3). The percent agreement was of 98.5% (CI95% 97.5-99.2). Given an overall concordance of 32 cases +/+ and 943 cases -/-, the unadjusted Cohen's kappa was of 0.80 (CI95% 0.74-0.86), and the prevalence-adjusted and bias-adjusted kappa (PABAK) of 0.97 (CI95% 0.95-0.98). Sensitivity varied according to the Ct value of RT-qPCR assay (Figure 1A). It was 100% (CI95% 86.8-100) in strongly positive specimens and then decreased while the Ct value increased (Table 2 and Figure 2A). Taking 30 as a limit of Ct value (N = 34 cases), the sensitivity of the AgPOCT was 94.12% (CI95% 80.32-99.28) (Table 2).

Specificity was close to 100% (Figure 2B), with a single AgPOCT false-positive result in a symptomatic 3-month-old child found infected by RSV-A; of note, the sample was not positive after retesting with AgPOCT.

The logistic regression model unveiled that male sex (OR 9.0 [95%CI 1.6-90.2]; $p=0.03$) and presence of cough (OR 5.1 [95%CI 1.0-31.9]; $p=0.06$) were predictive of a higher performance of the AgPOCT. A growing number of days after symptom onset (OR 0.8 [95%CI 0.6-1.0]; $p=0.09$) was predictive of lower AgPOCT performance (Supplementary Table 1). Age, gravity rank at entrance, temperature at entrance, presence of contact with a confirmed case, and other clinical symptoms than cough were not predictive of a better performance of the AgPOCT.

SARS-CoV-2 infected symptomatic children

Among the 493 (48.9%) symptomatic participants, the mean duration of symptoms at the time of testing was 2.89 days (Table 1). The most frequently registered symptoms were fever ($n=343$, 69.7%), rhinorrhea ($n=320$, 65.2%) and cough ($n=314$, 64.0%). Of note, no child presented a severe form of Covid-19. Thirty-five (7.3%) symptomatic patients were positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR (Table 2). The analysis disclosed a sensitivity of 82.9% (95%CI 66.4-93.4) and a specificity of 99.8% (95%CI 98.7-100) in this group (Table 3). As shown in Figure 1B, the sensitivity of the AgPOCT was closely related to the Ct value of the RT-qPCR assay.

SARS-CoV-2 infected asymptomatic children

Among the 516 (51.1%) asymptomatic participants at the time of sampling, 3 (0.6%) were positive by AgPOCT and 11 (2.1%) by RT-qPCR (Figure 1B), with significantly higher Ct value than that found in symptomatic participants (Table 2). False-negative AgPOCT mainly happened in the asymptomatic group.

Infections by other pathogens

1
2
3 202 Due to compatible respiratory symptoms or evocative epidemiological context, 379 (37.5%) patients
4
5 203 of the study population were tested by a multiplex PCR assay detecting 21 respiratory pathogens,
6
7 204 including 18 viruses and 3 atypical bacteria; one or several respiratory viruses were detected in 353
8
9 205 children (93.1%) . Neither influenza virus nor atypical bacterium was recorded in any tested NPA.
10
11 206 Twenty-seven of these 379 patients (7.12%) were found to be positive for SARS-CoV-2 by RT-qPCR.
12
13 207 As previously recorded, one patient exhibiting an RSV-A infection gave a false-positive non-
14
15 208 reproducible result by AgPOCT (Supplementary Table 2).
16
17 209 Moreover, 290 (76.5%) of the 379 patients tested for other pathogens had symptoms considered as
18
19 210 suggestive of Covid-19. Of these 290 children, 265 (91.4%) were Covid-19 negative, and all of them
20
21 211 were positive for at least another respiratory virus. Of the 25 patients who were found Covid-19
22
23 212 positive by RT-qPCR, 12 were positive for at least another respiratory virus. Interestingly, of these 25
24
25 213 patients, all of the three patients who were negative by AgPOCT exhibited a coinfection with at least
26
27 214 a clinically relevant virus, versus only 12 of the 22 AgPOCT positive subjects (Supplementary Table 2).
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Discussion

The strengths of this study include its prospective design, the large size of the effective (more than 1000 children included sequentially), the execution of rapid tests at bedside by healthcare personnel of the pediatric emergency room, and the use of a simple NPA that was tested in parallel by RT-qPCR. By comparison to RT-qPCR, the overall sensitivity and specificity of the AgPOCT were of 69.6% (CI95% 54.3-82.3) and 99.9% (CI95% 99.4-100), respectively. Concerning children exhibiting symptoms compatible with Covid-19, the sensitivity raised to 82.9% (CI95% 66.4-93.4), better than that recorded in previous studies ranging from 45% to 78% (15–17). This high sensitivity meets the criteria recommended by the World Health Organization for using an antigen test as a SARS-CoV-2 diagnostic technique (22).

As previously shown in adults the Ct values were much lower in patients with positive AgPOCT (true positives) than in those with negative one (false negatives) (Figure 1). The correlation between low Ct values and high infectivity has been reported earlier many times (23–26), as also exemplified by the link between Ct value and in vitro culturability of the viral strain (27). Infectivity is strongly reduced, together with the culturability of the viral strain for a Ct value over 30 (28). These considerations explain why the claimed sensitivity of a SARS-CoV-2 antigen test greatly depends on the Ct values of the tested samples when RT-qPCR is used as a gold standard (8). In addition, it is now well known that, following the resolution of Covid-19 symptoms, people can have prolonged positive SARS-CoV-2 RT-qPCR results for several weeks and that, at the end of the course of the disease, Ct value is often very high (29). Although these data have been mostly documented in adults, it is probable that a similar long-lasting duration of low viral load (and thus high Ct value) may occur in children.

Considering Ct value in association with the clinical context of patients might be helpful in individual management decisions. The performances of the present AgPOCT, with a specificity of 100% and a sensitivity of 85% for Ct values below 30 by RT-qPCR, are consistent with its use in this approach.

1
2
3 239 The analysis of clinical and anamnestic parameters identified three variables that were predictive of
4
5 240 an improved test accuracy of antigen testing (Supplementary Table 1). The presence of respiratory
6
7 241 symptoms such as cough and a short delay after the beginning of the disease is consistent with the
8
9 242 known pathophysiology of the disease, with higher viral load in the airways when they are inflamed
10
11 243 at the early phase of the disease. The gender-related effect is less intuitive to explain. However, this
12
13 244 finding has already been reported in adults and could be related to gender differences in adaptive
14
15 245 immune responses or in the balance between inflammation and tissue repair in the resolution of
16
17 246 infection (30).
18
19
20
21 247 By analysis of the 25 patients positive for both SARS-CoV-2 and other respiratory viruses, it appears
22
23 248 that the 3 children with negative AgPOCT results were those with the highest Ct value; all of them
24
25 249 exhibited other clinically relevant virus(es) (Supplementary Table 2). These data suggest that the
26
27 250 negativity of AgPOCT is indicative that SARS-CoV-2 may not play a significant role in the respiratory
28
29 251 syndrome of these patients despite the positivity of the molecular test.
30
31
32
33 252 Our study has also some limitations. The number of positive samples was limited by the low
34
35 253 prevalence of SARS-CoV-2 infection during the study period, which reduces the statistical power of
36
37 254 the analysis. Second, we analyzed a single commercial rapid test; despite the excellent performances
38
39 255 of the COVID19Speed-Antigen Test, our conclusions cannot be extended to other commercial brands,
40
41 256 which implies that the performances of an antigenic test must be assessed very carefully before
42
43 257 being used as POC test at bedside. Finally, our study is monocentric by construction, which raises
44
45 258 methodological weaknesses.
46
47
48
49
50 259 In conclusion, our results assess the excellent sensitivity and specificity of the COVID19Speed-Antigen
51
52 260 Test in symptomatic children. This study highlights the putative impact of male sex, presence of
53
54 261 cough, and number of days after symptoms onset on the assay sensitivity. Consequently, this
55
56 262 AgPOCT could be used in efforts to limit the viral spread in pediatric emergency settings. Although
57
58 263 additional studies are necessary to confirm our results, this study pleads for incorporating AgPOCT at
59
60

264 bedside in the emergency room into pediatric clinical guidelines to mitigate the SARS-CoV-2
265 pandemic.

For Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Contributors. AC and QO designed and supervised the study. QO, AC, OM, CT and NA supervised the inclusion of patients. QO, SP and AC collected the data. AC performed data analyses. AC, SP and BP wrote the manuscript. All the authors had full access to the data and reviewed the final version of the manuscript.

Declaration of interest. The authors have no competing interests.

Funding. The study was supported by the University Hospital of Saint-Étienne, France. BioSpeedia supplied the COVID19Speed-Antigen Test equipment. The funders had no role in study design, data collection and analysis, writing of the manuscript, and decision to submit the work for publication.

Acknowledgements. The authors are grateful to Yves Germani and Evelyne Begaud from BioSpeedia for supplying the AgPOCT kits free of charge. They are indebted to the paediatricians and medical students of the Pediatric Emergency Department of the University Hospital of Saint-Etienne for their involvement in patients' recruitment and completion of medical files. The nurses of this Department are thoroughly acknowledged for having performed the rapid tests at bedside.

Data sharing. Full data can be obtained from the corresponding author on request.

References

1. Centers for Disease Control and Prevention. National Center for Immunization and Respiratory Diseases (NCIRD), Division of Viral Diseases. Overview of Testing for SARS-CoV-2 (COVID-19). 2021 Mar 17. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/testing-overview.html>
2. Dinnes J, Deeks JJ, Berhane S, Taylor M, Adriano A, Davenport C, et al. Rapid, point-of-care antigen and molecular-based tests for diagnosis of SARS-CoV-2 infection. *Cochrane Database Syst Rev*. 2021;3:CD013705.
3. Guglielmi G. The explosion of new coronavirus tests that could help to end the pandemic. *Nature*. 2020 ;583:506–9.
4. Corman VM, Haage VC, Bleicker T, Schmidt ML, Mühlemann B, Zuchowski M, et al. Comparison of seven commercial SARS-CoV-2 rapid point-of-care antigen tests: a single-centre laboratory evaluation study. *Lancet Microbe*. 2021; 2:e311-9.
5. Gili A, Paggi R, Russo C, Cenci E, Pietrella D, Graziani A, et al. Evaluation of Lumipulse® G SARS-CoV-2 antigen assay automated test for detecting SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (NP) in nasopharyngeal swabs for community and population screening. *Int J Infect Dis*. 2021;105:391–6.
6. Albert E, Torres I, Bueno F, Huntley D, Molla E, Fernández-Fuentes MÁ, et al. Field evaluation of a rapid antigen test (Panbio™ COVID-19 Ag Rapid Test Device) for COVID-19 diagnosis in primary healthcare centres. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27:472.e7-10.
7. Alemany A, Baró B, Ouchi D, Rodó P, Ubals M, Corbacho-Monné M, et al. Analytical and clinical performance of the panbio COVID-19 antigen-detecting rapid diagnostic test. *J Infect*. 2021 May;82:186–230.
8. Gremmels H, Winkel BMF, Schuurman R, Rosingh A, Rieger NAM, Rodriguez O, et al. Real-life validation of the Panbio™ COVID-19 antigen rapid test (Abbott) in community-dwelling subjects with symptoms of potential SARS-CoV-2 infection. *EClinicalMedicine*. 2021;31:100677.
9. Pollock NR, Savage TJ, Wardell H, Lee RA, Mathew A, Stengelin M, et al. Correlation of SARS-CoV-2 nucleocapsid antigen and RNA concentrations in nasopharyngeal samples from children and adults using an ultrasensitive and quantitative antigen assay. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e03077-20.
10. Frnda J, Durica M. On pilot massive COVID-19 testing by antigen tests in Europe. Case study: Slovakia. *Infect Dis Rep*. 2021;13:45–57.
11. Gilliam WS, Malik AA, Shafiq M, Klotz M, Reyes C, Humphries JE, et al. COVID-19 transmission in US child care programs. *Pediatrics*. 2021;147: e2020031971 .
12. Rajmil L. Role of children in the transmission of the COVID-19 pandemic: a rapid scoping review. *BMJ Paediatr Open*. 2020;4:e000722.
13. Ludvigsson JF. Children are unlikely to be the main drivers of the COVID-19 pandemic – A systematic review. *Acta Paediatr*. 2020;109:1525–30.

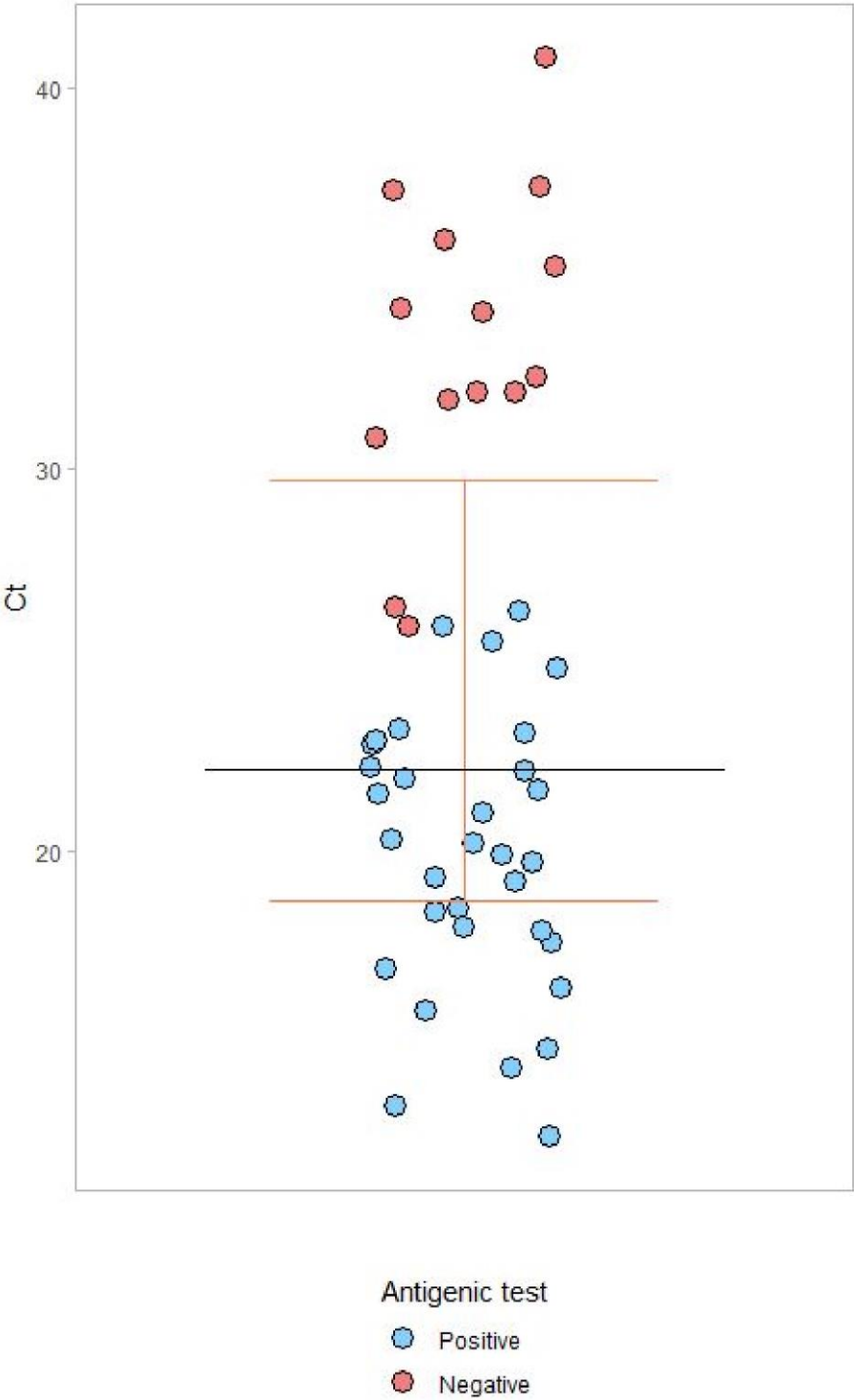
- 1
2
3 319 14. Kim J, Choe YJ, Lee J, Park YJ, Park O, Han MS, et al. Role of children in household transmission
4 320 of COVID-19. *Arch Dis Child*. 2021;106:709-11..
- 5
6 321 15. Villaverde S, Domínguez-Rodríguez S, Sabrido G, Pérez-Jorge C, Plata M, Romero MP, et al.
7 322 Diagnostic accuracy of the Panbio severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 antigen
8 323 rapid test compared with reverse-transcriptase polymerase chain reaction testing of
9 324 nasopharyngeal samples in the pediatric population. *J Pediatr*. 2021;232:287-9.e4.
- 10
11 325 16. González-Donapetry P, García-Clemente P, Bloise I, García-Sánchez C, Sánchez Castellano MÁ,
12 326 Romero MP, et al. Think of the children: evaluation of SARS-CoV-2 rapid antigen test in
13 327 pediatric population. *Pediatr Infect Dis J*. 2021;40:385–8.
- 14
15 328 17. Sood N, Shetgiri R, Rodriguez A, Jimenez D, Treminino S, Daflos A, et al. Evaluation of the
16 329 Abbott BinaxNOW rapid antigen test for SARS-CoV-2 infection in children: implications for
17 330 screening in a school setting. *PloS One*. 2021;16:e0249710.
- 18
19 331 18. Mansourian M, Ghandi Y, Habibi D, Mehrabi S. COVID-19 infection in children: a systematic
20 332 review and meta-analysis of clinical features and laboratory findings. *Arch Pediatr*.
21 333 2021r;28:242–8.
- 22
23 334 19. Casalegno J-S, Ploin D, Cantais A, Masson E, Bard E, Valette M, et al. Characteristics of the
24 335 delayed respiratory syncytial virus epidemic, 2020/2021, Rhône Loire, France. *Euro Surveill Bull*
25 336 *E*. 2021;26:2100630 .
- 26
27 337 20. Cantais A, Mory O, Plat A, Giraud A, Pozzetto B, Pillet S. Analytical performances of the BD
28 338 Veritor™ System for the detection of respiratory syncytial virus and influenzaviruses A and B
29 339 when used at bedside in the pediatric emergency department. *J Virol Methods*. 2019;270:66–9.
- 30
31 340 21. Société Française de Microbiologie. Réalisation des prélèvements salivaires pour la détection
32 341 du SARS-CoV-2 par RT-PCR dans le cadre du diagnostic/dépistage de la COVID-19 [Internet].
33 342 2021. Available from: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/03/Avis-](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/03/Avis-SFM-salive-SARS-CoV-2-V3-_-MAJ-29032021.pdf)
34 343 [SFM-salive-SARS-CoV-2-V3-_-MAJ-29032021.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2021/03/Avis-SFM-salive-SARS-CoV-2-V3-_-MAJ-29032021.pdf)
- 35
36 344 22. World Health Organization. Antigen-detection in the diagnosis of SARS-CoV-2 infection using
37 345 rapid immunoassays: interim guidance. 2020 Sep 11; Available from:
38 346 <https://apps.who.int/iris/handle/10665/334253>
- 39
40 347 23. Rao SN, Manissero D, Steele VR, Pareja J. A systematic review of the clinical utility of cycle
41 348 threshold values in the context of COVID-19. *Infect Dis Ther*. 2020 ;9:573–86.
- 42
43 349 24. Korenkov M, Poopalasingam N, Madler M, Vanshylla K, Eggeling R, Wirtz M, et al. Evaluation of
44 350 a rapid antigen test to detect SARS-CoV-2 infection and identify potentially infectious
45 351 individuals. *J Clin Microbiol*. 2021;59:e0089621.
- 46
47 352 25. Strömer A, Rose R, Schäfer M, Schön F, Vollersen A, Lorentz T, et al. Performance of a point-of-
48 353 care test for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen. *Microorganisms*. 2020;9:58.
- 49
50 354 26. La Scola B, Le Bideau M, Andreani J, Hoang VT, Grimaldier C, Colson P, et al. Viral RNA load as
51 355 determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from
52 356 infectious disease wards. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2020;39:1059–61.
- 53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 357 27. Bullard J, Dust K, Funk D, Strong JE, Alexander D, Garnett L, et al. Predicting infectious severe
4 358 acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. Clin Infect Dis.
5 359 2020;71:2663–6.
6
7 360 28. Young BE, Ong SWX, Ng LFP, Anderson DE, Chia WN, Chia PY, et al. Viral dynamics and immune
8 361 correlates of COVID-19 disease severity. Clin Infect Dis. 2020; ciaa1280.
9
10 362 29. Wölfel R, Corman VM, Guggemos W, Seilmaier M, Zange S, Müller MA, et al. Virological
11 363 assessment of hospitalized patients with COVID-2019. Nature. 2020;581:465–9.
12
13 364 30. Scully EP, Haverfield J, Ursin RL, Tannenbaum C, Klein SL. Considering how biological sex
14 365 impacts immune responses and COVID-19 outcomes. Nat Rev Immunol. 2020;20 :442–7.
15
16
17 366
18
19 367
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

Figure 1: Distribution of SARS-CoV-2 RT-qPCR Ct values after AgPOCT testing, globally (A) and according to the presence of symptoms (B).

A.



B.

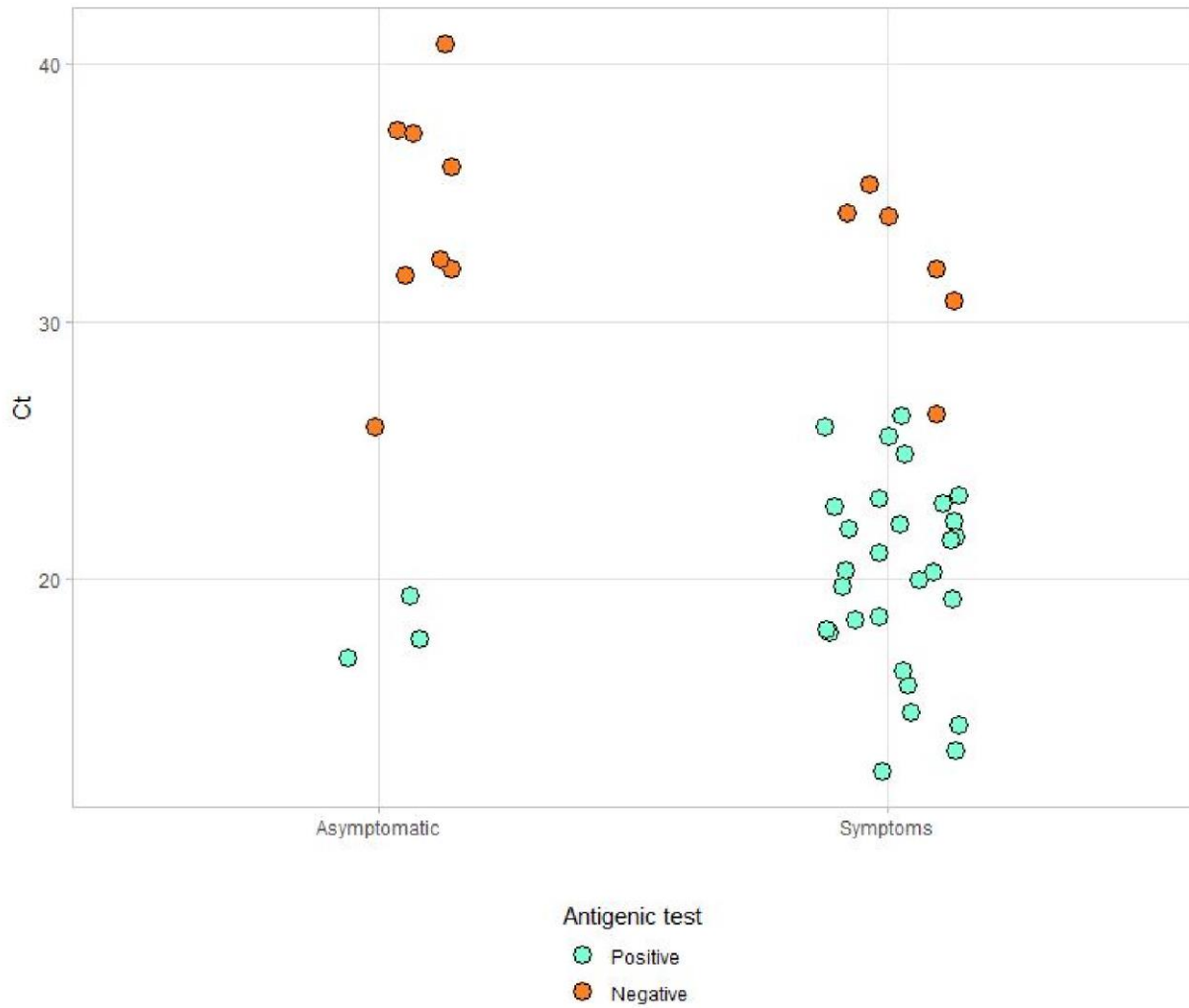


Figure 2: AgPOCT analytical performances (sensitivity in A and specificity in B) according to RT-qPCR Ct value.

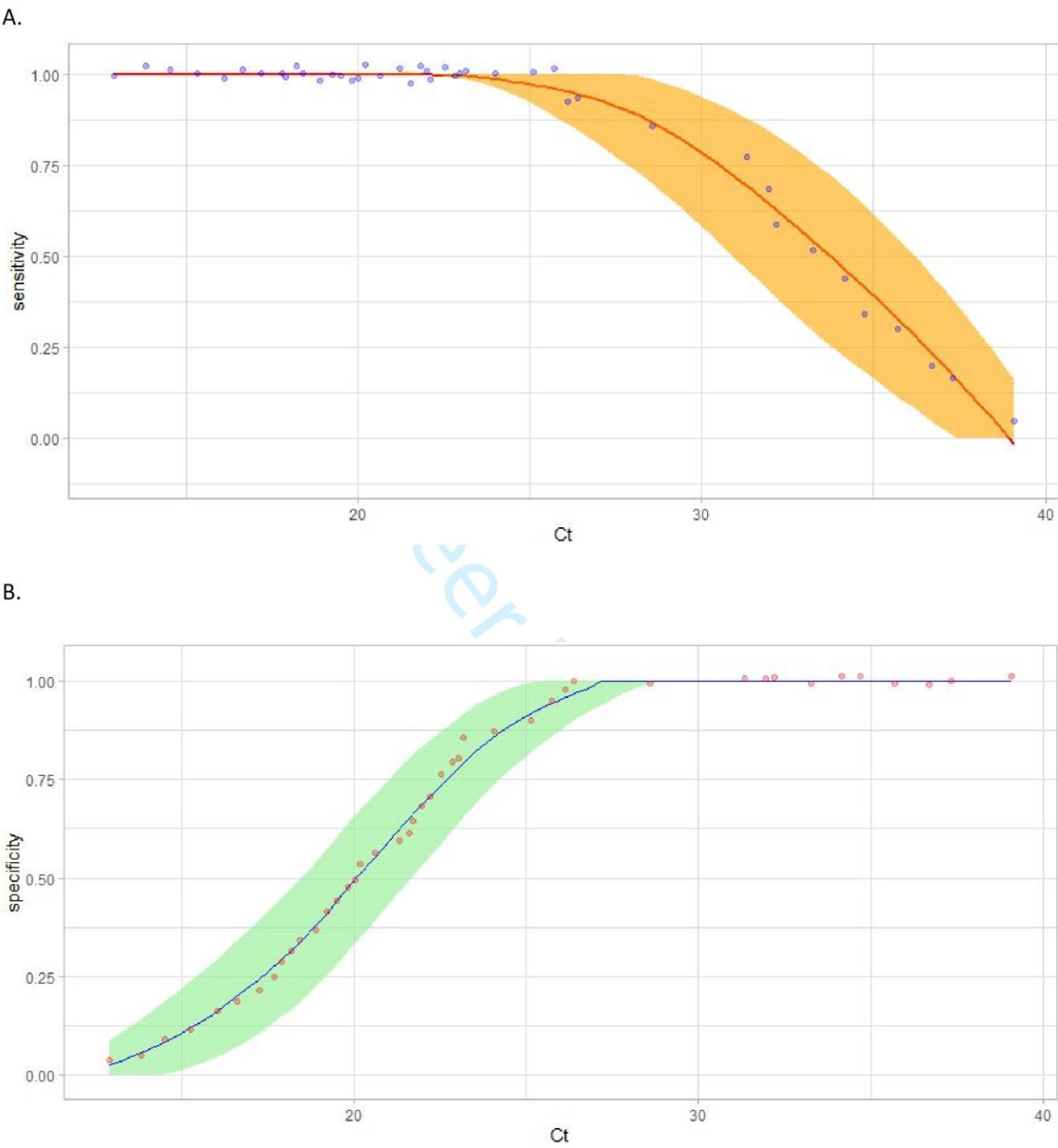


Table 1: Demographics and main clinical characteristics of study's participants. "Symptomatic" means "presence of symptoms compatible with SARS-CoV-2 infection" as described in the text.

Characteristics	Overall n=1009	Symptomatic n=493	Asymptomatic n=516	p-value
Age in days, mean (SD)	1347.1 (1619.2)	823.6 (1144.3)	1841.8 (1834.9)	<0.001
Age category, n (%)				<0.001
<2 years	551 (54.5)	328 (66.5)	223 (43.2)	
2-10 years	324 (32.0)	142 (28.8)	181 (35.1)	
>10 years	136 (13.5)	23 (4.7)	112 (21.7)	
Male sex, n (%)	549 (54.3)	269 (54.6)	278 (53.9)	0.88
Gravity rank at admission (%)				0.40
1 (the most serious health condition)	19 (1.9)	9 (1.8)	10 (1.9)	
2	72 (7.1)	35 (7.1)	37 (7.2)	
3	492 (48.8)	252 (51.1)	240 (46.5)	
4	392 (38.9)	185 (37.5)	207 (40.1)	
5 (the least serious health condition)	34 (3.4)	12 (2.4)	22 (4.3)	
SpO₂ at entrance, mean (SD)	98.3 (3.2)	97.9 (3.7)	98.7 (2.4)	<0.001
Temperature at entrance, mean (SD)	38.1 (15.2)	37.7 (1.0)	38.4 (21.3)	0.41
Hospitalization, n (%)	764 (75.7)	279 (56.6)	485 (94.0)	<0.001
Days since symptom onset, mean (SD)	2.3 (3.1)	2.9 (3.5)	1.52 (2.2)	<0.001
Contact with a confirmed case, n (%)	72 (7.1)	58 (11.8)	14 (2.7)	<0.001
Days since exposure, mean (SD)	6.0 (4.1)	6.0 (4.1)	5.9 (4.4)	0.92
Symptoms, n (%)				
Fever	502 (49.8)	343 (69.7)	159 (30.8)	<0.001
Nasal discharge	382 (37.9)	320 (65.2)	62 (12)	<0.001
Cough	355 (35.5)	314 (64.0)	41 (7.9)	<0.001
Diarrhoea	153 (15.2)	60 (12.2)	93 (18.0)	0.01
Comorbidities, n (%)				
Chronic respiratory disease	72 (7.2)	55 (11.2)	17 (3.3)	<0.001
Cardiopathy	30 (3.0)	19 (3.9)	11 (2.1)	0.15
Immunodepression	24 (2.4)	7 (1.4)	17 (3.3)	0.08

SpO₂: peripheral oxygen saturation.

Table 2: Virological results of SARS-CoV-2 infection in the children included in the study.

	Overall n=1009	Symptomatic n=493	Asymptomatic n=516	p-value
Positive RT-qPCR, n (%)	46 (4.6)	35 (7.3)	11 (2.1)	<0.001
Ct value of the nucleocapsid target, mean (SD)	24.0 (7.3)	22.2 (5.8)	29.8 (8.5)	0.002
Ct value of the polymerase target, mean (SD)	24.2 (6.6)	22.7 (5.5)	29.2 (8.0)	0.005
Ct-value category, n (%)				0.034
Strong positive (Ct < 23)	26 (56.5)	23 (65.7)	3 (27.3)	
Positive (23 ≤ Ct < 33)	13 (28.3)	9 (25.7)	4 (36.4)	
Low positive (Ct ≥ 33)	7 (15.2)	3 (8.6)	4 (36.4)	
Ct value < 30	34 (73.9)	30 (85.7)	4 (36.4)	
Positive AgPOCT, n (%)	33 (3.3)	30 (6.1)	3 (0.6)	<0.001
Ct value of the nucleocapsid target, mean (SD)	19.9 (3.6)	20.1 (3.7)	17.9 (4.3)	
Ct value of the polymerase target, mean (SD)	20.6 (3.3)	20.7 (3.3)	18.9 (1.7)	
Negative AgPOCT, n (%)	14 (1.4)	6 (42.9)	8 (57.1)	
Ct value of the nucleocapsid target, mean (SD)	33.3 (4.1)	32.1 (4.6)	34.2 (4.6)	
Ct value of the polymerase target, mean (SD)	33.0 (3.6)	32.3 (3.2)	33.6 (1.2)	
Concordance between RT-qPCR and AgPOCT, n (%)				<0.001
False negative	14 (1.4)	6 (1.3)	8 (1.6)	
False positive	1 (0.1)	1 (0.2)	0 (0)	
True negative	943 (95.3)	440 (92.4)	501 (97.9)	
True positive	32 (3.2)	29 (6.1)	3 (0.6)	

CT: cycle threshold; AgPOCT: antigen point-of-care test.

Table 3: Diagnostic accuracy of the COVID19Speed-Antigen Test (BioSpeedia, France) by Comparison to RT-qPCR.

	Sensitivity, % [95%CI]	Specificity, % [95%CI]	NPV, % [95%CI]	PPV, % [95%CI]
Overall population	69.57 [54.25-82.26]	99.89 [99.41-100]	98.54 [97.56-99.20]	96.97 [84.24-99.92]
Strongly positive (Ct value < 23)	100 [86.77-100]	-	-	100 [86.77-100]
Positive (23 ≤ Ct value < 33)	46.15 [19.22-74.87]	-	-	100 [54.07-100]
Low positive (Ct value ≥ 33)	0 [0-40.96]	-	-	0 [0-40.96]
Ct value <30	94.12 [80.32-99.28]	-	-	100 [89.11-100]
Symptomatic	82.86 [66.35-93.44]	99.77 [98.74-99.99]	98.65 [97.09-99.50]	96.67 [82.78-99.92]
Asymptomatic	27.27 [6.02-60.97]	100 [99.27-100]	98.43 [96.93-99.32]	100 [29.24-100]

NPV: negative predictive value. PPV: positive predictive value. CI: confidence interval.

Supplementary Table 1: Tested characteristics for association between false negative and true positive AgPOCT among SARS-CoV-2 infected children (n=46).

Explanatory variable	Estimate	Standard error	Odds Ratio [95% CI]	Residual deviance	p-value
Male sex	2.20	0.98	9.02 [1.59 - 90.22]	4.95	0.03
Cough	1.62	0.85	5.06 [1.04 - 31.92]	3.66	0.06
Days after symptom onset	-0.23	0.15	0.79 [0.55 - 1.03]	2.89	0.09

Pseudo R² of McFadden = 0.235

Supplementary Table 2: Synthetic microbiological results of the 379 patients from the study population who were tested by multiplex PCR assay for the detection of respiratory pathogens, including 18 viruses and 3 atypical bacteria (no bacterium was identified in this panel).

Symptoms evocative of Covid-19 ¹	Detection of SARS-CoV-2 RNA by RT-qPCR	Antigen test	Detection of respiratory virus(es) by multiplex PCR	
			Absence of virus	Presence of at least 1 virus
Presence (n=290)	Positive (n=25)	Positive (n=22)	12	10 ²
		Negative (n=3)	0	3 ³
	Negative (n=265)	Positive (n=1)	0	1 ⁴
		Negative (n=264)	0	264
Absence (n=89)	Positive (n=2)	Positive (n=1)	1	0
		Negative (n=1)	0	1 ⁵
	Negative (n=87)	Negative (n=87)	15	72

¹See text and Table 1 for the description of these two groups termed “symptomatic” and “asymptomatic”.
²Details of these 10 coinfections: bocavirus: n=4; human metapneumovirus: n=1; adenovirus: n=1; rhinoenterovirus: n=1; double infection with parainfluenza virus (PIV) 3 and human metapneumovirus: n=1; triple infection with respiratory syncytial virus (RSV) A, adenovirus and bocavirus: n=1.
³Details of these 3 coinfections: RSV-A n=1; double infection with rhino-enterovirus and coronavirus NL-63: n = 1; double infection with PIV-2 and bocavirus: n= 1.
⁴This case corresponds to an RSV-A infection. It is the sole false positive result of the study for the SARS-CoV-2 antigen test. Of interest, the antigen test was repeated negative after control.
⁵This case corresponds to a Coronavirus NL65 infection

C. Discussion générale et perspectives

1 Principaux messages de ces travaux

Les travaux présentés dans le cadre de ce travail de thèse vont tous dans le même sens : un diagnostic étiologique de qualité est nécessaire, utile et pertinent dans le cadre d'une pratique aux urgences pédiatriques.

Cela est nécessaire car c'est un prérequis pour une épargne antibiotique et de façon plus générale une gestion raisonnée des antimicrobiens, comme le montrent l'étude OPTIPAC et avant elle Epi-PAUPS. C'est utile en ce sens également, mais l'analyse des travaux concernant l'usage des TDR aux urgences pédiatriques montre la pertinence sur la prise en charge, tout autant que la fiabilité de ces dispositifs.

Nous soulignons ici les grands axes de réflexions tirés de ces travaux. Chaque travail a lui-même fait l'objet de discussions et de critiques poussées, rapportées dans le corps de chaque article.

1.1 Concernant l'usage des PCR multiplex dans les PAC

L'étude Epi-PAUPS, puis l'étude OPTIPAC qui lui fait suite se concentrent sur l'effet sur la prescription d'antibiotiques. Ce qui est essentiel à retenir de ces travaux, c'est qu'il est possible, en utilisant un dispositif approprié comme la PCR multiplex lors de la consultation aux urgences pédiatriques, de diminuer drastiquement la prescription d'antibiotique dits « inutiles ». En effet, nous montrons dans l'analyse détaillée que ce sont les cas de pneumopathies virales, et d'ailleurs plutôt en bon état général, qui bénéficient le plus d'une abstention thérapeutique, ceci sans nuire à la qualité des soins. En effet, l'attitude consistant à ne pas traiter ces pneumopathies reconnues comme virale n'a pas conduit à une augmentation du nombre de cas de pneumopathies bactériennes. Ce risque avait été souligné lors de la mise en place de l'étude.

1.2 Concernant la performance des TDR aux urgences pédiatriques

Les messages principaux qui ressortent de nos travaux sont d'une part la grande fiabilité microbiologique de ces tests. L'article analytique tout autant que celui sur le TDR SARS-CoV-2 montrent des caractéristiques de sensibilité et spécificité compatibles avec un usage quotidien de ces dispositifs, y compris dans des conditions de pratique clinique réelle en biologie délocalisée aux urgences, dans des conditions qui ne sont donc pas celle – idéales – des laboratoires. En creux, nous soulignons cependant leurs limites : sensibilité qui baisse lorsque la charge virale diminue, nécessité d'être en situation épidémique pour que la probabilité pré-test soit suffisante pour en autoriser l'usage.

1.3 Concernant l'usage des TDR aux urgences pédiatriques

Les articles sur l'impact des TDR Grippe et celui sur la démarche diagnostique des infections à pneumocoque s'attachent à relier la pratique clinique réelle du praticien avec l'utilisation concrète des tests rapides. Nous montrons l'impact sur le nombre d'examens complémentaires, qui diminue drastiquement sur tous les types d'examens, y compris les plus invasifs comme la ponction lombaire, lorsque les TDR sont utilisés. La réflexion sur le pneumocoque propose un algorithme de diagnostic qui permet de contourner les limites inhérentes aux particularités de ce germe en pédiatrie (le portage important, en contexte de vaccination contre les sérogroupes les plus dangereux)

2 Forces et faiblesses des travaux présentés

2.1 Concernant l'usage des PCR multiplex dans les PAC

L'étude OPTIPAC est celle qui a plus de force dans nos travaux. Sur l'aspect méthodologie et la force des conclusions qu'elle met en évidence, elle permet de tirer des conclusions. Il s'agit d'une étude multicentrique, randomisée, contrôlée effectuée avec rigueur et avec des sites multiples qui se sont véritablement sentis impliqués dans le projet, soutenu financièrement par les pouvoirs publics (PHRC National). Cependant, elle n'est pas exempte de limites. Ainsi nous avons un effet centre, le centre de Saint-Etienne ayant inclus presque la moitié des malades. Le critère de jugement utilisé est complexe, composite, et soumis à une interprétation sur lecture du dossier.

Mais cette complexité a une cause. Il ne s'agit pas d'une situation simple, standardisée. Par nature, le tableau de « pneumopathie aigue communautaire » recouvre des réalités complexes, différentes et non toujours superposables. Le spectre de sévérité, par exemple, était prévu dans cette étude pour aller de la réanimation à la prise en charge ambulatoire. Les âges explorés ont été ceux de toute la pédiatrie, hors néonatalogie. Les germes possiblement rencontrés sont très divers, allant des bactéries atypiques aux virus dont la pathogénie sur le parenchyme pulmonaire est encore mal comprise en passant par le pneumocoque, très étudié. Cela conduit à des dossiers cliniques extrêmement lourds et peu superposables pour une analyse statistique simple, rendant nécessaire la constitution d'un comité d'experts afin de formaliser le critère de jugement principal. Il aurait été possible de structurer l'étude autour d'un simple type de pneumopathie (les pneumopathies franches lobaires aigues, ou les tableaux de syndrome interstitiel, etc ...) mais de l'information aurait été perdue, et la masse de patient à atteindre pour une analyse de qualité aurait été plus difficile à constituer. Ce choix a été fait, et les conclusions que nous en tirons sont – malgré ces difficultés – plutôt satisfaisantes.

2.1 Concernant la performance des TDR aux urgences pédiatriques

La force principale de nos travaux sur ce point réside dans le nombre de patients inclus, dans une situation de pratique clinique réelle, ce qui n'est que très rarement le cas dans la littérature. La majorité des articles publiés sur ces thématiques font état de contrôles de tests sur des sécrétions congelées au laboratoire, ou sur des prélèvements sélectionnés (par exemple selon les valeurs de Ct). Il en ressort des chiffres de sensibilité/spécificité non applicables pour l'usage au lit du malade (très haut ou très bas). La force de notre travail est de s'être affranchi de cette problématique grâce à une coordination forte entre le service d'urgence et le laboratoire.

La faiblesse la plus marquante qui impacte nos travaux est la technique utilisée en comparatif de nos TDR. Ce n'est que récemment avec le développement aisé de la PCR que cette technique a pu être utilisée en routine, et donc le résultat disponible pour le contrôle des prélèvements. L'usage de l'immunofluorescence avant cela, technique plus complexe et plus longue, ne permettait pas forcément l'analyse de l'exhaustivité des prélèvements, et la performance de la méthode n'est pas la même que celle de la technique PCR. Dans l'article des TDR Grippe/RSV, il est même rapporté des discordants TDR/IF/PCR ce qui conduit à des situations complexes à analyser.

2.2 Concernant l'usage des TDR aux urgences pédiatriques

Ces études, bien que très informatives, sont entachées de limites qui rendent leur interprétation parfois difficile. Ainsi, l'étude sur l'impact des TDR grippe est limitée par construction : nous comparons la pratique réelle à un questionnaire déclaratif sur les intentions du praticien, avec toutes les limites que cela comporte (changement d'avis, nouveaux éléments, sur ou sous-déclaration selon les « recommandations »). Nous avons cependant mis des barrières méthodologiques pour limiter l'impact de ces biais, ainsi le questionnaire devait-il être impérativement rendu après examen clinique et avant de réaliser le test, ce dernier point étant contrôlé par l'infirmière qui ne réalisait le test qu'après avoir récupéré le questionnaire.

Enfin, la principale faiblesse du travail sur le pneumocoque est sa nature rétrospective, sur dossier et analyse sur des prélèvements déjà faits, au laboratoire, comme nous avons pu le décrire plus haut.

3 Implications pour la pratique clinique

OPTIPAC est l'étude la plus rigoureuse sur le plan méthodologique que nous proposons. En tant qu'étude multicentrique randomisée contrôlée, elle permet de réellement prendre en compte ses conclusions, qui sont plus qu'un simple faisceau d'arguments en faveur de la PCR multiplex pour réduire l'antibiothérapie dans les PAC de l'enfant, aux urgences pédiatriques. D'autres travaux et

l'évolution de la pratique médicale vont également dans ce sens. Ce travail a vocation à être pris en compte pour la réflexion autour de la nécessaire mise à jour des recommandations sur cette pathologie.

Les conclusions qu'on pourrait en tirer en termes de pratique clinique sont en rapport avec l'initiation d'une antibiothérapie probabiliste devant un enfant présentant une pneumopathie aigüe aux urgences pédiatriques, avec un bon état général. Dans ce genre de situation, il est probablement légitime de se passer d'antibiotique et d'attendre le résultat des prélèvements pour prendre la décision d'un traitement. Il est fort probable dans cette situation qu'une stratégie de prélèvement exhaustive et de suivi rapproché mettrait en évidence une étiologie virale à guérison spontanée sans évolution péjorative ni séquelle comme cela a été le cas dans l'étude.

De même, une attitude de prélèvement rapide avec PCR dont le résultat serait rendu aux urgences permettrait probablement d'orienter l'antibiothérapie, particulièrement vis-à-vis des infections à germe atypique justifiant d'un macrolide, dont on sait que la présentation clinique est loin d'être systématiquement celle historiquement décrite.

Les autres travaux, autour des tests rapides, rejoignent ces attitudes. Ainsi le TDR grippe a une implication majeure pour la pratique clinique. En période grippale, avec une forte probabilité pré-test de grippe chez un enfant présentant une fièvre élevée, la réalisation d'un TDR grippe permet probablement une épargne d'examen complémentaires, ainsi qu'une prescription plus précoce de Tamiflu, bien que ce point ne soit pas spécifiquement abordé dans nos travaux.

Les TDR de façon générale – et plus globalement la possibilité de faire un diagnostic étiologique très précoce – ont également un impact sur le flux des malades, permettant un tri, un isolement, une orientation en secteur approprié sur le plan infectieux. Il en est ainsi des secteurs RSV où l'on isole les enfants potentiellement contagieux dès la sortie des urgences – ce qui permet de protéger les 20% de patients présentant une bronchiolite négative en RSV qui risqueraient l'infection nosocomiale par un RSV en l'absence de tels tests. L'orientation des patients Covid positif peut également être envisagée vers des secteurs dédiés comme cela a pu être le cas lors de cette pandémie.

L'usage de TDR dans les services d'urgences pédiatriques n'est pas neutre. Cela a également des implications logistiques, organisationnelles, réglementaires ... En effet, l'usage de biologie délocalisée est encadré par la loi, ne peut se faire que sous la responsabilité d'un biologiste et justifie d'une accréditation nécessitant des formations régulières et exhaustives. Cela implique une organisation solide dans le service, une bonne coordination des pratiques IDE/médecins et des liens très resserrés avec le laboratoire référent. Nos travaux de recherche ont souvent été l'occasion de structurer ces procédures dans notre service.

4 Implications pour de futures recherches

Ce travail ouvre des perspectives multiples de recherche clinique pour les années à venir.

4.1 Prolongation de ces travaux

Tout d'abord, certains de ces travaux méritent une confirmation méthodologiquement plus importante. A l'instar d'OPTIPAC qui a suivi Epi-PAUPS, il faudrait faire des études plus rigoureuses méthodologiquement concernant nos thématiques.

Il faudrait une étude d'impact sur l'usage des TDR grippe en particulier. Ce sont à ce jour les plus répandus sur les différents services d'urgences pédiatriques de France, et ceux pour lesquels le recul est le plus important. On peut imaginer une étude prospective multicentrique, randomisée entre l'usage ou non d'un TDR grippe devant des fièvres de l'enfant en période épidémique. D'autres designs sont possibles. On peut proposer l'évaluation d'un algorithme de prescription du Tamiflu aux urgences pédiatriques incluant le test rapide. Les récentes recommandations de l'IDSA sur la grippe (Uyeki et al. 2019) font la part belle à cette thérapeutique en pédiatrie. Nous avons-nous-même publié un article de recherche clinique à ce sujet (Cizeron et al. 2021). Ce travail, eu égard à son coût notamment en personnel de recherche pour le suivi, justifierait d'un budget type PHRC. Il faudrait surtout que la situation épidémiologique redevienne prévisible car la pandémie de SARS-CoV-2 a mis un arrêt brutal à la diffusion du virus grippal dans le monde, rendant ce type d'étude impossible à mettre en œuvre ...

Le SARS-CoV-2, justement, est devenu un sujet de recherche majeur. Notre article sur les TDR ne concerne que le variant alpha. La place du variant delta dans les infections pédiatrique est encore soumise à débat à date de rédaction de ces lignes. Poursuivre nos travaux en contexte de variant delta permettrait peut-être d'identifier des caractères différents entre les variants, des performances différentes entre les tests. Et chose qui a son importance : suivre en recherche clinique des cas d'infection permettrait de disposer d'une base de données exploitable pour la recherche. Ce genre de travail gagnerait également à se développer en multicentrique afin de gagner de la force.

4.2 Travaux originaux

L'analyse de l'impact et de la performance des méthodes de diagnostic gagnerait probablement à être étendue dans le futur. L'hypothèse d'un TDR rotavirus a rapidement émergé. Ce pathogène, très contagieux, justifierait tout à fait d'un isolement sectoriel en cas d'épidémie, autant que de mesures renforcées sur l'isolement contact. Par ailleurs, il s'agit d'un germe au profil évolutif péjoratif par rapport aux autres virus de gastro-entérite, notamment sur les enfants les plus faibles – un peu à l'instar du RSV. Savoir qu'une gastro-entérite est due à rotavirus permettrait d'anticiper l'évolution

potentielle du patient. Reste à convaincre les IDE de réaliser le test en pratique ... Un TDR sur le LCR – pneumocoque ou méningocoque, mais aussi entérovirus – pourrait trouver une certaine logique dans la prise en charge.

Enfin, il reste à exploiter le potentiel d'une véritable PCR POCT en biologie délocalisée. Les automates ont tellement progressé de nos jours que cette idée devient envisageable. Les impacts pourraient être extrêmement important, permettant de faire en PCR tout ce que l'on fait en TDR, au prix de délai légèrement rallongé (1h au lieu de 10 mn) et d'un coût un peu supérieur. Mais, si l'on trouve les bonnes indications ... cela pourrait faire sens.

Tout cela ouvre des perspectives passionnantes pour l'avenir et je souhaite que les travaux présentés ici permettent de poursuivre sur cette voie.

Bibliographie

- Abdullah, Abu S. M., Brian Tomlinson, Clive S. Cockram, and G. Neil Thomas. 2003. 'Lessons from the severe acute respiratory syndrome outbreak in hong kong', *Emerging infectious diseases*, 9: 1042-45.
- Alchikh, M., T. Conrad, C. Hoppe, X. Ma, E. Broberg, P. Penttinen, J. Reiche, B. Biere, B. Schweiger, and B. Rath. 2019. 'Are we missing respiratory viral infections in infants and children? Comparison of a hospital-based quality management system with standard of care', *Clin Microbiol Infect*, 25: 380.e9-80.e16.
- Alexopoulou, L., A. C. Holt, R. Medzhitov, and R. A. Flavell. 2001. 'Recognition of double-stranded rna and activation of nf-kappab by toll-like receptor 3', *Nature*, 413: 732-8.
- Allander, T., M. T. Tammi, M. Eriksson, A. Bjerkner, A. Tiveljung-Lindell, and B. Andersson. 2005. 'Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 12891-6.
- Almeida, J. D., and D. A. Tyrrell. 1967. 'The morphology of three previously uncharacterized human respiratory viruses that grow in organ culture', *J Gen Virol*, 1: 175-8.
- Ambroggio, L., C. Mangeot, E. Murtagh Kurowski, C. Graham, P. Korn, M. Strasser, C. Cavallo, et al. 2018. 'Guideline adoption for community-acquired pneumonia in the outpatient setting', *PEDIATRICS*, 142.
- Ammann, A. J., J. Addiego, D. W. Wara, B. Lubin, W. B. Smith, and W. C. Mentzer. 1977. 'Polyvalent pneumococcal-polysaccharide immunization of patients with sickle-cell anemia and patients with splenectomy', *N Engl J Med*, 297: 897-900.
- Anadol, D., Y. Z. Aydin, and A. Gocmen. 2001. 'Overdiagnosis of pneumonia in children', *Turk J Pediatr*, 43: 205-9.
- Anderson, Larry J., R. Michael Hendry, Lauren T. Pierik, Cecilia Tsou, and Kenneth McIntosh. 1991. 'Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus', *The Journal of Infectious Diseases*, 163: 687-92.
- Andrewes, C. H., P. P. Laidlaw, and Wilson Smith. 1935. 'Influenza: Observations on the recovery of virus from man and on the antibody content of human sera', *British Journal of Experimental Pathology*, 16: 566-82.
- Aniansson, G., B. Alm, B. Andersson, P. Larsson, O. Nylén, H. Peterson, P. Rignér, M. Svanborg, and C. Svanborg. 1992. 'Nasopharyngeal colonization during the first year of life', *J Infect Dis*, 165 Suppl 1: S38-42.
- Asner, S. A., M. E. Science, D. Tran, M. Smieja, A. Merglen, and D. Mertz. 2014. 'Clinical disease severity of respiratory viral co-infection versus single viral infection: A systematic review and meta-analysis', *PLoS One*, 9: e99392.
- Austrian, R. 1981. 'Some observations on the pneumococcus and on the current status of pneumococcal disease and its prevention', *Rev Infect Dis*, 3 Suppl: S1-17.
- Avery, O. T., and R. Dubos. 1931. 'The protective action of a specific enzyme against type iii pneumococcus infection in mice', *The Journal of experimental medicine*, 54: 73-89.
- Aw, W., and S. Fukuda. 2018. 'Understanding the role of the gut ecosystem in diabetes mellitus', *J Diabetes Investig*, 9: 5-12.
- Bartlett, John MS, and David Stirling. 2003. 'A short history of the polymerase chain reaction.' in, *Pcr protocols* (Springer).
- Beck, J. M. 2014. 'Abcs of the lung microbiome', *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 1: S3-6.
- Beckmann, C., and H. H. Hirsch. 2016. 'Comparing luminex ntag-respiratory pathogen panel and respifinder-22 for multiplex detection of respiratory pathogens', *J Med Virol*, 88: 1319-24.

- Bennett, B. L., R. P. Garofalo, S. G. Cron, Y. M. Hosakote, R. L. Atmar, C. G. Macias, and P. A. Piedra. 2007. 'Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis', *J Infect Dis*, 195: 1532-40.
- Bowden, Thomas A., Max Crispin, E. Yvonne Jones, and David I. Stuart. 2010. 'Shared paramyxoviral glycoprotein architecture is adapted for diverse attachment strategies', *Biochemical Society transactions*, 38: 1349-55.
- Boyer, G. S., F. W. Denny, I. Miller, and H. S. Ginsberg. 1960. 'Correlation of production of infectious virus with sequential stages of cytologic alteration in hela cells infected with adenoviruses types 5 and 7', *The Journal of experimental medicine*, 112: 865-82.
- Braciale, T. J., J. Sun, and T. S. Kim. 2012. 'Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection', *Nat Rev Immunol*, 12: 295-305.
- Bradley, J. S., C. L. Byington, S. S. Shah, B. Alverson, E. R. Carter, C. Harrison, S. L. Kaplan, et al. 2011. 'The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of america', *Clin Infect Dis*, 53: e25-76.
- Bradley, John S., Carrie L. Byington, Samir S. Shah, Brian Alverson, Edward R. Carter, Christopher Harrison, Sheldon L. Kaplan, et al. 2011. 'The management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: Clinical practice guidelines by the pediatric infectious diseases society and the infectious diseases society of america', *Clinical Infectious Diseases*, 53: e25-e76.
- Brolin, I., and L. Wernstedt. 1978. 'Radiographic appearance of mycoplasmal pneumonai', *Scandinavian journal of respiratory diseases*, 59: 179-89.
- Brooks, L. J., M. M. Cloutier, and E. Afshani. 1982. 'Significance of roentgenographic abnormalities in children hospitalized for asthma', *Chest*, 82: 315-8.
- Brouwer, M. C., J. de Gans, S. G. Heckenberg, A. H. Zwinderman, T. van der Poll, and D. van de Beek. 2009. 'Host genetic susceptibility to pneumococcal and meningococcal disease: A systematic review and meta-analysis', *Lancet Infect Dis*, 9: 31-44.
- Brown, E. J., S. W. Hosea, and M. M. Frank. 1981. 'The role of the spleen in experimental pneumococcal bacteremia', *The Journal of clinical investigation*, 67: 975-82.
- Cao, A. M., J. P. Choy, L. N. Mohanakrishnan, R. F. Bain, and M. L. van Driel. 2013. 'Chest radiographs for acute lower respiratory tract infections', *Cochrane Database Syst Rev*, 2013: Cd009119.
- CDC. 2020. 'Types of influenza viruses'. <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>.
- Cebey-López, M., J. Herberg, J. Pardo-Seco, A. Gómez-Carballea, N. Martín-Torres, A. Salas, J. M. Martín-Sánchez, et al. 2016. 'Does viral co-infection influence the severity of acute respiratory infection in children?', *PLoS One*, 11: e0152481.
- Chanock, R. M. 1956. 'Association of a new type of cytopathogenic myxovirus with infantile croup', *The Journal of experimental medicine*, 104: 555-76.
- Chanock, R. M., and R. H. Parrott. 1965. 'Acute respiratory disease in infancy and childhood: Present understanding and prospects for prevention', *PEDIATRICS*, 36: 21-39.
- Chanock, R. M., R. H. Parrott, K. M. Johnson, A. Z. Kapikian, and J. A. Bell. 1963. 'Myxoviruses: Parainfluenza', *Am Rev Respir Dis*, 88: Suppl 152-66.
- Chanock, R., B. Roizman, and R. Myers. 1957. 'Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (cca). I. Isolation, properties and characterization', *Am J Hyg*, 66: 281-90.
- Chastel, C. 2004. '[when the egyptian mummies are speaking about the infections that have made them ill]', *Hist Sci Med*, 38: 147-55.
- Chaudhuri, N., and I. Sabroe. 2008. 'Basic science of the innate immune system and the lung', *Paediatr Respir Rev*, 9: 236-42.
- Chelly, J., J. C. Kaplan, P. Maire, S. Gautron, and A. Kahn. 1988. 'Transcription of the dystrophin gene in human muscle and non-muscle tissue', *Nature*, 333: 858-60.
- Chen, Austen, Beth Mann, Geli Gao, Richard Heath, Janice King, Jeff Maissoneuve, Mark Alderson, et al. 2015. 'Multivalent pneumococcal protein vaccines comprising pneumolysoid with

- epitopes/fragments of cbpa and/or pspa elicit strong and broad protection', *Clinical and Vaccine Immunology*, 22: 1079.
- Chen, Ying-Han, WenLi Du, Marne C Hagemeijer, Peter M Takvorian, Cyrilla Pau, Ann Cali, Christine A Brantner, et al. 2015. 'Phosphatidylserine vesicles enable efficient en bloc transmission of enteroviruses', *Cell*, 160: 619-30.
- Choudhry, A., J. Mathena, J. D. Albano, M. Yacovone, and L. Collins. 2016. 'Safety evaluation of adenovirus type 4 and type 7 vaccine live, oral in military recruits', *Vaccine*, 34: 4558-64.
- Christensen, Andreas, Svein Arne Nordbø, Sidsel Krokstad, Anne Gro Wesenberg Rognlien, and Henrik Døllner. 2010. 'Human bocavirus in children: Mono-detection, high viral load and viraemia are associated with respiratory tract infection', *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 49: 158-62.
- Cizeron, A., F. Saunier, A. Gagneux-Brunon, S. Pillet, A. Cantais, and E. Botelho-Nevers. 2021. 'Low rate of oseltamivir prescription among adults and children with confirmed influenza illness in france during the 2018-19 influenza season', *J Antimicrob Chemother*, 76: 1057-62.
- Clark, J. E., D. Hammal, D. Spencer, and F. Hampton. 2007. 'Children with pneumonia: How do they present and how are they managed?', *Arch Dis Child*, 92: 394-8.
- Clarke, C. W. 1979. 'Relationship of bacterial and viral infections to exacerbations of asthma', *Thorax*, 34: 344-7.
- Cohen, Robert, François Angoulvant, Sandra Biscardi, Fouad Madhi, Francois Dubos, and Yves Gillet. 2017. 'Antibiotic treatment of lower respiratory tract infections', *Archives de Pédiatrie*, 24: S17-S21.
- Collins, P. L., and B. S. Graham. 2008. 'Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis', *J Virol*, 82: 2040-55.
- Cosgrove, S. E. 2006. 'The relationship between antimicrobial resistance and patient outcomes: Mortality, length of hospital stay, and health care costs', *Clin Infect Dis*, 42 Suppl 2: S82-9.
- Counihan, M. E., D. K. Shay, R. C. Holman, S. A. Lowther, and L. J. Anderson. 2001. 'Human parainfluenza virus-associated hospitalizations among children less than five years of age in the united states', *Pediatr Infect Dis J*, 20: 646-53.
- Crosby, L. M., and C. M. Waters. 2010. 'Epithelial repair mechanisms in the lung', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 298: L715-31.
- Crowe, James E., and John V. Williams. 2003. 'Immunology of viral respiratory tract infection in infancy', *Paediatric Respiratory Reviews*, 4: 112-19.
- Cruveilhier, Louis. 1919. "Action du sérum antipneumococcique au cours de la pneumonie et dans les complications de la grippe." In *Annales de l'Institut Pasteur*, 448-61.
- Cui, Jie, Fang Li, and Zheng-Li Shi. 2019. 'Origin and evolution of pathogenic coronaviruses', *Nature Reviews Microbiology*, 17: 181-92.
- da Fonseca Lima, E. J., D. E. Lima, G. H. Serra, E. Lima M. A. Abreu, and M. J. de Mello. 2016. 'Prescription of antibiotics in community-acquired pneumonia in children: Are we following the recommendations?', *Ther Clin Risk Manag*, 12: 983-8.
- Das, Sujata, Charu Khanna, Shalini Singh, Shilpa Nandi, and Reema Verma. 2020. 'Impact of human microbiome on health', *Microbial Diversity, Interventions and Scope*: 349-73.
- Dascomb, H. E., and M. R. Hilleman. 1956. 'Clinical and laboratory studies in patients with respiratory disease caused by adenoviruses (ri-apc-ard agents)', *The American Journal of Medicine*, 21: 161-74.
- Davies, H. A., and M. R. Macnaughton. 1979. 'Comparison of the morphology of three coronaviruses', *Archives of virology*, 59: 25-33.
- Dawood, F. S., A. M. Fry, D. Goswami, A. Sharmeen, K. Nahar, B. A. Anjali, M. Rahman, and W. A. Brooks. 2016. 'Incidence and characteristics of early childhood wheezing, dhaka, bangladesh, 2004-2010', *Pediatr Pulmonol*, 51: 588-95.
- de Graaf, M., Adme Osterhaus, R. A. M. Fouchier, and E. C. Holmes. 2008. 'Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses', *J Gen Virol*, 89: 2933-42.

- Di Pietro, P., O. Della Casa Alberighi, M. Silvestri, M. A. Tosca, A. Ruocco, G. Conforti, G. A. Rossi, et al. 2017. 'Monitoring adherence to guidelines of antibiotic use in pediatric pneumonia: The marea study', *Ital J Pediatr*, 43: 113.
- do Carmo Debur, M., S. M. Raboni, F. B. Flizikowski, D. C. Chong, A. P. Persicote, M. B. Nogueira, L. V. Rosele, S. M. de Almeida, and L. de Noronha. 2010. 'Immunohistochemical assessment of respiratory viruses in necropsy samples from lethal non-pandemic seasonal respiratory infections', *J Clin Pathol*, 63: 930-4.
- Doerschuk, C. M., S. Tasaka, and Q. Wang. 2000. 'Cd11/cd18-dependent and -independent neutrophil emigration in the lungs: How do neutrophils know which route to take?', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 23: 133-6.
- Dopazo, J., A. Mendoza, J. Herrero, F. Caldara, Y. Humbert, L. Friedli, M. Guerrier, et al. 2001. 'Annotated draft genomic sequence from a streptococcus pneumoniae type 19f clinical isolate', *Microb Drug Resist*, 7: 99-125.
- Dowell, S. F., B. A. Kupronis, E. R. Zell, and D. K. Shay. 2000a. 'Mortality from pneumonia in children in the united states, 1939 through 1996', *N Engl J Med*, 342: 1399-407.
- Dowell, Scott F., Benjamin A. Kupronis, Elizabeth R. Zell, and David K. Shay. 2000b. 'Mortality from pneumonia in children in the united states, 1939 through 1996', *New England Journal of Medicine*, 342: 1399-407.
- Dudding, B. A., F. H. Top, Jr., P. E. Winter, E. L. Buescher, T. H. Lamson, and A. Leibovitz. 1973. 'Acute respiratory disease in military trainees: The adenovirus surveillance program, 1966-1971', *Am J Epidemiol*, 97: 187-98.
- Eaton, M. D., G. Meiklejohn, and W. van Herick. 1944. 'Studies on the etiology of primary atypical pneumonia : A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos', *The Journal of experimental medicine*, 79: 649-68.
- Ekiert, D. C., G. Bhabha, M. A. Elsliger, R. H. Friesen, M. Jongeneelen, M. Throsby, J. Goudsmit, and I. A. Wilson. 2009. 'Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope', *Science*, 324: 246-51.
- Enders, J. F., T. H. Weller, and F. C. Robbins. 1949. 'Cultivation of the lansing strain of poliomyelitis virus in cultures of various human embryonic tissues', *Science*, 109: 85-7.
- Esper, Frank, Carla Weibel, David Ferguson, Marie L. Landry, and Jeffrey S. Kahn. 2005. 'Evidence of a novel human coronavirus that is associated with respiratory tract disease in infants and young children', *The Journal of Infectious Diseases*, 191: 492-98.
- Esposito, S., S. Bianchini, A. Argentiero, C. Neglia, and N. Principi. 2020. 'How does one choose the appropriate pharmacotherapy for children with lower respiratory tract infections?', *Expert Opin Pharmacother*: 1-9.
- Fahy, J. V., and P. M. O'Byrne. 2001. "'Reactive airways disease". A lazy term of uncertain meaning that should be abandoned', *Am J Respir Crit Care Med*, 163: 822-3.
- Federici, Carlo, Marianna Cavazza, Francesco Costa, and Claudio Jommi. 2018. 'Health care costs of influenza-related episodes in high income countries: A systematic review', *PLoS One*, 13: e0202787-e87.
- Felton, Lloyd D. 1924. 'A study of the isolation and concentration of the specific antibodies of antipneumococcus sera', *The Boston Medical and Surgical Journal*, 190: 819-25.
- Fields, Bernard N., David Mahan Knipe, Peter M Howley, Keith D Everiss, and Hsing-Jien Kung. 2013. 'Diagnostic virology.' in, *Fundamental virology* (Lippincott-Raven Philadelphia).
- Fields, Bernard N., David M. Knipe, and Peter M. Howley. 2013. 'Adenovirus.' in, *Fields virology* (Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia).
- Forni, Diego, Rachele Cagliani, Mario Clerici, and Manuela Sironi. 2017. 'Molecular evolution of human coronavirus genomes', *Trends in Microbiology*, 25: 35-48.
- Forster, Johannes, Gabriele Ihorst, Christian H. L. Rieger, Volker Stephan, Hans-Dieter Frank, Heidrun Gurth, Reinhard Berner, et al. 2004. 'Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the pri.De study)', *European Journal of Pediatrics*, 163: 709-16.

- Fry, Alicia M., Xiaoyan Lu, Malinee Chittaganpitch, Teresa Peret, Julie Fischer, Scott F. Dowell, Larry J. Anderson, Dean Erdman, and Sonja J. Olsen. 2007. 'Human bocavirus: A novel parvovirus epidemiologically associated with pneumonia requiring hospitalization in thailand', *The Journal of Infectious Diseases*, 195: 1038-45.
- Fung, To Sing, and Ding Xiang Liu. 2019. 'Human coronavirus: Host-pathogen interaction', *Annual Review of Microbiology*, 73: 529-57.
- Ganime, A. C., J. P. Leite, C. E. Figueiredo, F. A. Carvalho-Costa, F. G. Melgaço, F. C. Malta, T. M. Fumian, and M. P. Miagostovich. 2016. 'Dissemination of human adenoviruses and rotavirus species a on fomites of hospital pediatric units', *Am J Infect Control*, 44: 1411-13.
- Gao, Rongbao, Bin Cao, Yunwen Hu, Zijian Feng, Dayan Wang, Wanfu Hu, Jian Chen, et al. 2013. 'Human infection with a novel avian-origin influenza a (h7n9) virus', *New England Journal of Medicine*, 368: 1888-97.
- Gaydos, C. A., and J. C. Gaydos. 1995. 'Adenovirus vaccines in the u.S. Military', *Mil Med*, 160: 300-4.
- Gerhard, W. 2001. 'The role of the antibody response in influenza virus infection', *Curr Top Microbiol Immunol*, 260: 171-90.
- Gibson, D. G., J. I. Glass, C. Lartigue, V. N. Noskov, R. Y. Chuang, M. A. Algire, G. A. Benders, et al. 2010. 'Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome', *Science*, 329: 52-6.
- Gill, P. J., S. E. Richardson, O. Ostrow, and J. N. Friedman. 2017. 'Testing for respiratory viruses in children: To swab or not to swab', *JAMA Pediatr*, 171: 798-804.
- Giuffrida, M. J., N. Valero, J. Mosquera, M. Alvarez de Mon, B. Chacín, L. M. Espina, J. Gotera, J. Bermudez, and A. Mavarez. 2014. 'Increased cytokine/chemokines in serum from asthmatic and non-asthmatic patients with viral respiratory infection', *Influenza Other Respir Viruses*, 8: 116-22.
- Glezen, W. P., A. L. Frank, L. H. Taber, and J. A. Kasel. 1984. 'Parainfluenza virus type 3: Seasonality and risk of infection and reinfection in young children', *J Infect Dis*, 150: 851-7.
- Glezen, W. Paul, Larry H. Taber, Arthur L. Frank, and Julius A. Kasel. 1986. 'Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus', *American Journal of Diseases of Children*, 140: 543-46.
- Goh, K. J., C. T. Tan, N. K. Chew, P. S. Tan, A. Kamarulzaman, S. A. Sarji, K. T. Wong, B. J. Abdullah, K. B. Chua, and S. K. Lam. 2000. 'Clinical features of nipah virus encephalitis among pig farmers in malaysia', *N Engl J Med*, 342: 1229-35.
- Gotoh, B., T. Komatsu, K. Takeuchi, and J. Yokoo. 2002. 'Paramyxovirus strategies for evading the interferon response', *Rev Med Virol*, 12: 337-57.
- Gray, Gregory C., and Dean D. Erdman. 2018. 'Adenovirus vaccines', *Plotkin's Vaccines*: 121-33.e8.
- Griffin, Marie R., Yuwei Zhu, Matthew R. Moore, Cynthia G. Whitney, and Carlos G. Grijalva. 2013. 'U.S. Hospitalizations for pneumonia after a decade of pneumococcal vaccination', *New England Journal of Medicine*, 369: 155-63.
- Grijalva, C. G., J. P. Nuorti, P. G. Arbogast, S. W. Martin, K. M. Edwards, and M. R. Griffin. 2007. 'Decline in pneumonia admissions after routine childhood immunisation with pneumococcal conjugate vaccine in the USA: A time-series analysis', *Lancet*, 369: 1179-86.
- Grubor, Branka, Jack M. Gallup, David K. Meyerholz, Erika C. Crouch, Richard B. Evans, Kim A. Brogden, Howard D. Lehmkuhl, and Mark R. Ackermann. 2004. 'Enhanced surfactant protein and defensin mrna levels and reduced viral replication during parainfluenza virus type 3 pneumonia in neonatal lambs', *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 11: 599-607.
- Guan, Y., L. L. M. Poon, C. Y. Cheung, T. M. Ellis, W. Lim, A. S. Lipatov, K. H. Chan, et al. 2004. 'H5n1 influenza: A protean pandemic threat', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 8156.
- Guarnieri, G. 1892. 'Ricerche sulla patogenesi ed etiologia dell'infezione vaccinica e vaiolosa', *Arch. Sci. Med*, 16: 243-47.

- Gurda, B. L., K. N. Parent, H. Bladek, R. S. Sinkovits, M. A. DiMattia, C. Rence, A. Castro, et al. 2010. 'Human bocavirus capsid structure: Insights into the structural repertoire of the parvoviridae', *J Virol*, 84: 5880-9.
- Håkansson, A., A. Kidd, G. Wadell, H. Sabharwal, and C. Svanborg. 1994. 'Adenovirus infection enhances in vitro adherence of streptococcus pneumoniae', *Infection and immunity*, 62: 2707-14.
- Hall, C. B. 2001. 'Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus', *N Engl J Med*, 344: 1917-28.
- Hall, C. B., W. J. Hall, and D. M. Speers. 1979. 'Clinical and physiological manifestations of bronchiolitis and pneumonia. Outcome of respiratory syncytial virus', *Am J Dis Child*, 133: 798-802.
- Haller, O., and G. Kochs. 2002. 'Interferon-induced mx proteins: Dynamin-like gtpases with antiviral activity', *Traffic*, 3: 710-7.
- Halpin, Thomas J., Francis J. Holtzhauer, Robert J. Campbell, Lois J. Hall, Adolfo Correa-Villaseñor, Richard Lanese, Janet Rice, and Eugene S. Hurwitz. 1982. 'Reye's syndrome and medication use', *JAMA*, 248: 687-91.
- Halsey, N. A., K. R. Talaat, A. Greenbaum, E. Mensah, M. Z. Dudley, T. Proveaux, and D. A. Salmon. 2015. 'The safety of influenza vaccines in children: An institute for vaccine safety white paper', *Vaccine*, 33 Suppl 5: F1-f67.
- Hamre, D., and M. Beem. 1972. 'Virologic studies of acute respiratory disease in young adults. V. Coronavirus 229e infections during six years of surveillance', *Am J Epidemiol*, 96: 94-106.
- Harris, Michael, Julia Clark, Nicky Coote, Penny Fletcher, Anthony Harnden, Michael McKean, and Anne Thomson. 2011. 'British thoracic society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: Update 2011', *Thorax*, 66: ii1.
- Harris, Patrick, Ian Winney, Chris Ashhurst-Smith, Mark O'Brien, and Stephen Graves. 2012. 'Comparison of vitek ms (maldi-tof) to standard routine identification methods: An advance but no panacea', *Pathology*, 44: 583-85.
- Hazir, T., Y. B. Nisar, S. Abbasi, Y. P. Ashraf, J. Khurshid, P. Tariq, R. Asghar, A. Murtaza, T. Masood, and S. Maqbool. 2011. 'Comparison of oral amoxicillin with placebo for the treatment of world health organization-defined nonsevere pneumonia in children aged 2-59 months: A multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial in pakistan', *Clin Infect Dis*, 52: 293-300.
- Heier, I., K. Malmstrom, A. S. Pelkonen, L. P. Malmberg, M. Kajosaari, M. Turpeinen, H. Lindahl, P. Brandtzaeg, F. L. Jahnsen, and M. J. Makela. 2008. 'Bronchial response pattern of antigen presenting cells and regulatory t cells in children less than 2 years of age', *Thorax*, 63: 703-9.
- Henrickson, K. J., S. M. Kuhn, and L. L. Savatski. 1994. 'Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children', *Clin Infect Dis*, 18: 770-9.
- Herold, S., N. M. Gabrielli, and I. Vadasz. 2013. 'Novel concepts of acute lung injury and alveolar-capillary barrier dysfunction', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 305: L665-81.
- Higuchi, R., C. Fockler, G. Dollinger, and R. Watson. 1993. 'Kinetic pcr analysis: Real-time monitoring of DNA amplification reactions', *Biotechnology (N Y)*, 11: 1026-30.
- Holm-Hansen, C. C., S. E. Midgley, and T. K. Fischer. 2016. 'Global emergence of enterovirus d68: A systematic review', *Lancet Infect Dis*, 16: e64-e75.
- Holt, P. G., D. H. Strickland, M. E. Wikstrom, and F. L. Jahnsen. 2008. 'Regulation of immunological homeostasis in the respiratory tract', *Nat Rev Immunol*, 8: 142-52.
- Holzel, A., L. Parker, W. H. Patterson, D. Cartmel, L. L. White, R. Purdy, K. M. Thompson, and J. O. Tobin. 1965. 'Virus isolations from throats of children admitted to hospital with respiratory and other diseases, manchester 1962-4', *British medical journal*, 1: 614-19.
- Hopkirk, A.F. 1914. *Influenza: Its history, nature, cause, and treatment* (Walter Scott Publishing Company).
- Hrincius, E. R., S. Liedmann, D. Finkelstein, P. Vogel, S. Gansebom, C. Ehrhardt, S. Ludwig, D. S. Hains, R. Webby, and J. A. McCullers. 2015. 'Nonstructural protein 1 (ns1)-mediated inhibition of c-

- abl results in acute lung injury and priming for bacterial co-infections: Insights into 1918 h1n1 pandemic?', *J Infect Dis*, 211: 1418-28.
- Huang, H. S., C. L. Tsai, J. Chang, T. C. Hsu, S. Lin, and C. C. Lee. 2018. 'Multiplex pcr system for the rapid diagnosis of respiratory virus infection: Systematic review and meta-analysis', *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 24: 1055-63.
- Huang, I. Chueh, Charles C. Bailey, Jessica L. Weyer, Sheli R. Radoshitzky, Michelle M. Becker, Jessica J. Chiang, Abraham L. Brass, et al. 2011. 'Distinct patterns of ifitm-mediated restriction of filoviruses, sars coronavirus, and influenza a virus', *PLOS Pathogens*, 7: e1001258.
- Huang, Q., X. Deng, Z. Yan, F. Cheng, Y. Luo, W. Shen, D. C. Lei-Butters, et al. 2012. 'Establishment of a reverse genetics system for studying human bocavirus in human airway epithelia', *PLoS Pathog*, 8: e1002899.
- Huber, Victor C. 2014. 'Influenza vaccines: From whole virus preparations to recombinant protein technology', *Expert review of vaccines*, 13: 31-42.
- Huebner, R. J., W. P. Rowe, T. G. Ward, R. H. Parrott, and J. A. Bell. 1954. 'Adenoidal-pharyngeal-conjunctival agents: A newly recognized group of common viruses of the respiratory system', *The New England Journal of Medicine*, 251: 1077-86.
- Hyams, C., E. Camberlein, J. M. Cohen, K. Bax, and J. S. Brown. 2010. 'The streptococcus pneumoniae capsule inhibits complement activity and neutrophil phagocytosis by multiple mechanisms', *Infection and immunity*, 78: 704-15.
- Ichinohe, T., I. K. Pang, and A. Iwasaki. 2010. 'Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular m2 ion channel', *Nat Immunol*, 11: 404-10.
- Ichiyama, T., S. Endo, M. Kaneko, H. Isumi, T. Matsubara, and S. Furukawa. 2003. 'Serum cytokine concentrations of influenza-associated acute necrotizing encephalopathy', *Pediatr Int*, 45: 734-6.
- Ip, D. K., L. L. Lau, N. H. Leung, V. J. Fang, K. H. Chan, D. K. Chu, G. M. Leung, J. S. Peiris, T. M. Uyeki, and B. J. Cowling. 2017. 'Viral shedding and transmission potential of asymptomatic and paucisymptomatic influenza virus infections in the community', *Clin Infect Dis*, 64: 736-42.
- Jain, Seema, Finelli, Lyn, CDC EPIC Study Team. 2015. 'Community-acquired pneumonia among u.S. Children', *New England Journal of Medicine*, 372: 2166-68.
- Jansen, R. R., J. Wieringa, S. M. Koekkoek, C. E. Visser, D. Pajkrt, R. Molenkamp, M. D. de Jong, and J. Schinkel. 2011. 'Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: Toward defining clinically relevant cutoff values', *J Clin Microbiol*, 49: 2631-6.
- Jartti, T., K. Hedman, L. Jartti, O. Ruuskanen, T. Allander, and M. Söderlund-Venermo. 2012. 'Human bocavirus-the first 5 years', *Rev Med Virol*, 22: 46-64.
- Jedrzejewski, M. J. 2001. 'Pneumococcal virulence factors: Structure and function', *Microbiol Mol Biol Rev*, 65: 187-207 ; first page, table of contents.
- Jernberg, C., S. Löfmark, C. Edlund, and J. K. Jansson. 2010. 'Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota', *Microbiology (Reading)*, 156: 3216-23.
- Ji, W., Y. Wang, Z. Chen, X. Shao, Z. Ji, and J. Xu. 2009. 'Human metapneumovirus in children with acute respiratory tract infections in suzhou, china 2005-2006', *Scand J Infect Dis*, 41: 735-44.
- Johnson, J. E., R. A. Gonzales, S. J. Olson, P. F. Wright, and B. S. Graham. 2007. 'The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection', *Mod Pathol*, 20: 108-19.
- Kacki, Sacha. 2012. 'Les zoonoses en archéologie. L'interaction homme-animal et la santé des populations anciennes', *Archeopages*: 68-75.
- Kailasan, Shweta, Jamie Garrison, Maria Ilyas, Paul Chipman, Robert McKenna, Kalle Kantola, Maria Söderlund-Venermo, Indrè Kučinskaitė-Kodžė, Aurelija Žvirblienė, and Mavis Agbandje-McKenna. 2016. 'Mapping antigenic epitopes on the human bocavirus capsid', *Journal of virology*, 90: 4670-80.
- Kapikian, A. Z., R. H. Mitchell, R. M. Chanock, R. A. Shvedoff, and C. E. Stewart. 1969. 'An epidemiologic study of altered clinical reactivity to respiratory syncytial (rs) virus infection in

- children previously vaccinated with an inactivated rs virus vaccine', *Am J Epidemiol*, 89: 405-21.
- Karas, M., D. Bachmann, U. Bahr, and F. Hillenkamp. 1987. 'Matrix-assisted ultraviolet laser desorption of non-volatile compounds', *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*, 78: 53-68.
- Karron, R. A., K. L. O'Brien, J. L. Froehlich, and V. A. Brown. 1993. 'Molecular epidemiology of a parainfluenza type 3 virus outbreak on a pediatric ward', *J Infect Dis*, 167: 1441-5.
- Keswick, B. H., C. P. Gerba, and S. M. Goyal. 1981. 'Occurrence of enteroviruses in community swimming pools', *American Journal of Public Health*, 71: 1026-30.
- Kim, E. Y., J. T. Battaile, A. C. Patel, Y. You, E. Agapov, M. H. Grayson, L. A. Benoit, et al. 2008. 'Persistent activation of an innate immune response translates respiratory viral infection into chronic lung disease', *Nat Med*, 14: 633-40.
- Kim, H. W., J. G. Canchola, C. D. Brandt, G. Pyles, R. M. Chanock, K. Jensen, and R. H. Parrott. 1969. 'Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine', *Am J Epidemiol*, 89: 422-34.
- Kochanek, K. D., S. L. Murphy, J. Xu, and E. Arias. 2014. 'Mortality in the united states, 2013', *NCHS Data Brief*: 1-8.
- Kocielek, L. K., S. J. Patel, X. Zheng, K. M. Todd, S. T. Shulman, and D. N. Gerding. 2016. 'Clinical and microbiologic assessment of cases of pediatric community-associated clostridium difficile infection reveals opportunities for improved testing decisions', *Pediatr Infect Dis J*, 35: 157-61.
- Kolaczowska, E., and P. Kubes. 2013. 'Neutrophil recruitment and function in health and inflammation', *Nat Rev Immunol*, 13: 159-75.
- Kolli, Deepthi, Meera R. Gupta, Elena Sbrana, Thangam S. Velayutham, Hong Chao, Antonella Casola, and Roberto P. Garofalo. 2014. 'Alveolar macrophages contribute to the pathogenesis of human metapneumovirus infection while protecting against respiratory syncytial virus infection', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 51: 502-15.
- Krammer, Florian, Gavin J. D. Smith, Ron A. M. Fouchier, Malik Peiris, Katherine Kedzierska, Peter C. Doherty, Peter Palese, et al. 2018. 'Influenza', *Nature Reviews Disease Primers*, 4: 3.
- Kreijtz, J. H. C. M., R. A. M. Fouchier, and G. F. Rimmelzwaan. 2011. 'Immune responses to influenza virus infection', *Virus Research*, 162: 19-30.
- Kronman, M. P., A. L. Hersh, R. Feng, Y. S. Huang, G. E. Lee, and S. S. Shah. 2011. 'Ambulatory visit rates and antibiotic prescribing for children with pneumonia, 1994-2007', *PEDIATRICS*, 127: 411-8.
- Laennec, R.T.H. 1819. *De l'auscultation médiate, ou, traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur: Fondé principalement sur ce nouveau moyen d'exploration* (J.-A. Brosson, et J.-S. Chaudé).
- Laham, F. R., V. Israele, J. M. Casellas, A. M. Garcia, C. M. Lac Prugent, S. J. Hoffman, D. Hauer, et al. 2004. 'Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy', *J Infect Dis*, 189: 2047-56.
- Launay, E., K. Levieux, C. Levy, F. Dubos, A. Martinot, B. Vrignaud, F. Lepage, et al. 2016. 'Compliance with the current recommendations for prescribing antibiotics for paediatric community-acquired pneumonia is improving: Data from a prospective study in a french network', *BMC Pediatr*, 16: 126.
- Lee, G. E., S. A. Lorch, S. Sheffler-Collins, M. P. Kronman, and S. S. Shah. 2010. 'National hospitalization trends for pediatric pneumonia and associated complications', *PEDIATRICS*, 126: 204-13.
- Lee, S. G., and P. P. Hung. 1993. 'Vaccines for control of respiratory disease caused by adenoviruses', *Reviews in Medical Virology*, 3: 209-16.
- Lee, Y. T., E. J. Ko, H. S. Hwang, J. S. Lee, K. H. Kim, Y. M. Kwon, and S. M. Kang. 2015. 'Respiratory syncytial virus-like nanoparticle vaccination induces long-term protection without pulmonary

- disease by modulating cytokines and t-cells partially through alveolar macrophages', *Int J Nanomedicine*, 10: 4491-505.
- Lessler, J., N. G. Reich, R. Brookmeyer, T. M. Perl, K. E. Nelson, and D. A. Cummings. 2009. 'Incubation periods of acute respiratory viral infections: A systematic review', *Lancet Infect Dis*, 9: 291-300.
- Leung, C. W., Y. W. Kwan, P. W. Ko, S. S. Chiu, P. Y. Loung, N. C. Fong, L. P. Lee, et al. 2004. 'Severe acute respiratory syndrome among children', *PEDIATRICS*, 113: e535-43.
- Leung, Chiang-Hsiang, Hsiang-Kuang Tseng, Wei-Sheng Wang, Hsiu-Tzy Chiang, Alice Ying-Jung Wu, and Chang-Pan Liu. 2014. 'Clinical characteristics of children and adults hospitalized for influenza virus infection', *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 47: 518-25.
- Li, X., S. Sambhara, C. X. Li, M. Ewasyshyn, M. Parrington, J. Caterini, O. James, G. Cates, R. P. Du, and M. Klein. 1998. 'Protection against respiratory syncytial virus infection by DNA immunization', *The Journal of experimental medicine*, 188: 681-88.
- Li, Xuyong, Jiayun Yang, Bin Liu, Yane Jia, Jing Guo, Xue Gao, Shaoting Weng, et al. 2016. 'Co-circulation of h5n6, h3n2, h3n8, and emergence of novel reassortant h3n6 in a local community in hunan province in china', *Scientific reports*, 6: 25549-49.
- Lim, Y. X., Y. L. Ng, J. P. Tam, and D. X. Liu. 2016. 'Human coronaviruses: A review of virus-host interactions', *Diseases*, 4.
- Lindner, Juha, Sandra Zehentmeier, Rauli Franssila, Sascha Barabas, Josef Schroeder, Ludwig Deml, and Susanne Modrow. 2008. 'Cd4+ t helper cell responses against human bocavirus viral protein 2 viruslike particles in healthy adults', *The Journal of Infectious Diseases*, 198: 1677-84.
- Lion, T. 2014. 'Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients', *Clin Microbiol Rev*, 27: 441-62.
- Longtin, Jean, Martine Bastien, Rodica Gilca, Eric Leblanc, Gaston de Serres, Michel G. Bergeron, and Guy Boivin. 2008. 'Human bocavirus infections in hospitalized children and adults', *Emerging infectious diseases*, 14: 217-21.
- López, Carolina B., Bruno Moltedo, Lena Alexopoulou, Laura Bonifaz, Richard A. Flavell, and Thomas M. Moran. 2004. 'Tlr-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand rna viruses', *The Journal of Immunology*, 173: 6882.
- Lu, Xiaoyan, Eileen Schneider, Seema Jain, Anna M. Bramley, Weston Hymas, Chris Stockmann, Krow Ampofo, et al. 2017. 'Rhinovirus viremia in patients hospitalized with community-acquired pneumonia', *The Journal of Infectious Diseases*, 216: 1104-11.
- Luh, D. L., Z. S. You, and S. C. Chen. 2016. 'Comparison of the social contact patterns among school-age children in specific seasons, locations, and times', *Epidemics*, 14: 36-44.
- Lukacs, N. W., M. L. Moore, B. D. Rudd, A. A. Berlin, R. D. Collins, S. J. Olson, S. B. Ho, and R. S. Peebles, Jr. 2006. 'Differential immune responses and pulmonary pathophysiology are induced by two different strains of respiratory syncytial virus', *Am J Pathol*, 169: 977-86.
- Lynch, Joseph P., and Adriana E. Kajon. 2016. 'Adenovirus: Epidemiology, global spread of novel serotypes, and advances in treatment and prevention', *Seminars in respiratory and critical care medicine*, 37: 586-602.
- Macpherson, R. I., G. R. Cumming, and V. Chernick. 1969. 'Unilateral hyperlucent lung: A complication of viral pneumonia', *Journal of the Canadian Association of Radiologists*, 20: 225-31.
- Maël, Bessaud, Blondel Bruno, Joffret Marie-Line, Kain Alice Mac, and Delpeyroux Francis. 2018. 'Nomenclature et classification des entérovirus : Quelle histoire !', *Virologie*, 22: 289-303.
- Mahy, Brian WJ. 2005. 'Introduction and history of foot-and-mouth disease virus.' in, *Foot-and-mouth disease virus* (Springer).
- Mäkelä, M. J., T. Puhakka, O. Ruuskanen, M. Leinonen, P. Saikku, M. Kimpimäki, S. Blomqvist, T. Hyypiä, and P. Arstila. 1998. 'Viruses and bacteria in the etiology of the common cold', *J Clin Microbiol*, 36: 539-42.

- Mandell, Lionel A, Richard G Wunderink, Antonio Anzueto, John G Bartlett, G Douglas Campbell, Nathan C Dean, Scott F Dowell, Thomas M File Jr, Daniel M Musher, and Michael S Niederman. 2007. 'Infectious diseases society of america/american thoracic society consensus guidelines on the management of community-acquired pneumonia in adults', *Clinical Infectious Diseases*, 44: S27-S72.
- Mani, Chitra S. 2018. 'Acute pneumonia and its complications.' in Sarah S. Long, Charles G. Prober and Marc Fischer (eds.), *Principles and practice of pediatric infectious diseases* (Elsevier).
- Mansbach, J. M., P. A. Piedra, S. J. Teach, A. F. Sullivan, T. Forgey, S. Clark, J. A. Espinola, and C. A. Camargo, Jr. 2012. 'Prospective multicenter study of viral etiology and hospital length of stay in children with severe bronchiolitis', *Arch Pediatr Adolesc Med*, 166: 700-6.
- Maragakis, L. L., E. N. Perencevich, and S. E. Cosgrove. 2008. 'Clinical and economic burden of antimicrobial resistance', *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6: 751-63.
- Marks, Matthew, Tamika Burns, Maria Abadi, Beza Seyoum, Justin Thornton, Elaine Tuomanen, and Liise-anne Pirofski. 2007. 'Influence of neutropenia on the course of serotype 8 pneumococcal pneumonia in mice', *Infection and immunity*, 75: 1586-97.
- Martin, E. T., J. Kuypers, J. P. McRoberts, J. A. Englund, and D. M. Zerr. 2015. 'Human bocavirus 1 primary infection and shedding in infants', *J Infect Dis*, 212: 516-24.
- Mather, C. A., S. F. Rivera, and S. M. Butler-Wu. 2014. 'Comparison of the bruker biotyper and vitek ms matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry systems for identification of mycobacteria using simplified protein extraction protocols', *J Clin Microbiol*, 52: 130-8.
- Mathews, B., S. Shah, R. H. Cleveland, E. Y. Lee, R. G. Bachur, and M. I. Neuman. 2009. 'Clinical predictors of pneumonia among children with wheezing', *PEDIATRICS*, 124: e29-36.
- Mbawuike, I. N., J. Wells, R. Byrd, S. G. Cron, W. P. Glezen, and P. A. Piedra. 2001. 'Hla-restricted cd8+ cytotoxic t lymphocyte, interferon-gamma, and interleukin-4 responses to respiratory syncytial virus infection in infants and children', *J Infect Dis*, 183: 687-96.
- McCaig, L. F., R. E. Besser, and J. M. Hughes. 2003. 'Antimicrobial drug prescription in ambulatory care settings, united states, 1992-2000', *Emerg Infect Dis*, 9: 432-7.
- McCollum, Eric D., Daniel E. Park, Nora L. Watson, Nicholas S. S. Fancourt, Christopher Focht, Henry C. Baggett, W. Abdullah Brooks, et al. 2020. 'Digital auscultation in perch: Associations with chest radiography and pneumonia mortality in children', *Pediatric Pulmonology*, 55: 3197-208.
- McCormick, D. P., R. P. Wenzel, J. A. Davies, and W. E. Beam. 1972. 'Nasal secretion protein responses in patients with wild-type adenovirus disease', *Infection and immunity*, 6: 282-88.
- McCullers, J. A. 2014. 'The co-pathogenesis of influenza viruses with bacteria in the lung', *Nat Rev Microbiol*, 12: 252-62.
- McCullers, J. A., and J. E. Rehg. 2002. 'Lethal synergism between influenza virus and streptococcus pneumoniae: Characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor', *J Infect Dis*, 186: 341-50.
- McCullers, J. A., T. Saito, and A. R. Iverson. 2004. 'Multiple genotypes of influenza b virus circulated between 1979 and 2003', *J Virol*, 78: 12817-28.
- McCullers, Jonathan A., and Victor C. Huber. 2012. 'Correlates of vaccine protection from influenza and its complications', *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 8: 34-44.
- McIntosh, K., E. F. Ellis, L. S. Hoffman, T. G. Lybass, J. J. Eller, and V. A. Fulginiti. 1973. 'The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children', *J Pediatr*, 82: 578-90.
- Medina, Jorge L., Jacqueline J. Coalson, Edward G. Brooks, Vicki T. Winter, Adriana Chaparro, Molly F. R. Principe, Thirumalai R. Kannan, Joel B. Baseman, and Peter H. Dube. 2012. 'Mycoplasma pneumoniae cards toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46: 815-22.

- Midgley, C. M., M. A. Jackson, R. Selvarangan, G. Turabelidze, E. Obringer, D. Johnson, B. L. Giles, et al. 2014. 'Severe respiratory illness associated with enterovirus d68 - missouri and illinois, 2014', *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 63: 798-9.
- Miragliotta, G, M Colucci, N Semeraro, and D Fumarola. 1981. 'Platelet injury and stimulation of leukocyte procoagulant activity invitro by a lipopolysaccharide from hemophilus-influenzae type-b', *Microbiologica*, 4: 173-80.
- Mistchenko, A. S., R. A. Diez, A. L. Mariani, J. Robaldo, A. F. Maffey, G. Bayley-Bustamante, and S. Grinstein. 1994. 'Cytokines in adenoviral disease in children: Association of interleukin-6, interleukin-8, and tumor necrosis factor alpha levels with clinical outcome', *J Pediatr*, 124: 714-20.
- Mitchell, L. S., B. Taylor, W. Reimels, F. F. Barrett, and J. P. Devincenzo. 2000. 'Adenovirus 7a: A community-acquired outbreak in a children's hospital', *Pediatr Infect Dis J*, 19: 996-1000.
- Moffatt, M. F., and W. O. Cookson. 2017. 'The lung microbiome in health and disease', *Clinical medicine (London, England)*, 17: 525-29.
- Moffet, H. L., A. C. Siegel, and H. K. Doyle. 1968. 'Nonstreptococcal pharyngitis', *J Pediatr*, 73: 51-60.
- Monsalvo, A. C., J. P. Batalle, M. F. Lopez, J. C. Krause, J. Klemenc, J. Z. Hernandez, B. Maskin, et al. 2011. 'Severe pandemic 2009 h1n1 influenza disease due to pathogenic immune complexes', *Nat Med*, 17: 195-9.
- Morens, D. M., J. K. Taubenberger, and A. S. Fauci. 2008. 'Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: Implications for pandemic influenza preparedness', *J Infect Dis*, 198: 962-70.
- Morris, J. A., R. E. Blount, and R. E. Savage. 1956. 'Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with goryza', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 92: 544-49.
- Munir, S., P. Hillyer, C. Le Nouën, U. J. Buchholz, R. L. Rabin, P. L. Collins, and A. Bukreyev. 2011. 'Respiratory syncytial virus interferon antagonist ns1 protein suppresses and skews the human t lymphocyte response', *PLoS Pathog*, 7: e1001336.
- Nahid, A. A., N. Sikder, A. K. Bairagi, M. A. Razzaque, M. Masud, Z. Kouzani A, and M. A. P. Mahmud. 2020. 'A novel method to identify pneumonia through analyzing chest radiographs employing a multichannel convolutional neural network', *Sensors (Basel)*, 20.
- Nair, H., W. A. Brooks, M. Katz, A. Roca, J. A. Berkley, S. A. Madhi, J. M. Simmerman, et al. 2011. 'Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: A systematic review and meta-analysis', *Lancet*, 378: 1917-30.
- Nair, H., D. J. Nokes, B. D. Gessner, M. Dherani, S. A. Madhi, R. J. Singleton, K. L. O'Brien, et al. 2010. 'Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: A systematic review and meta-analysis', *Lancet*, 375: 1545-55.
- Neish, A. S. 2014. 'Mucosal immunity and the microbiome', *Ann Am Thorac Soc*, 11 Suppl 1: S28-32.
- Neuman, Mark I., and Marvin B. Harper. 2003. 'Evaluation of a rapid urine antigen assay for the detection of invasive pneumococcal disease in children', *PEDIATRICS*, 112: 1279-82.
- Ning, G., X. Wang, D. Wu, Z. Yin, Y. Li, H. Wang, and W. Yang. 2017. 'The etiology of community-acquired pneumonia among children under 5 years of age in mainland china, 2001-2015: A systematic review', *Hum Vaccin Immunother*, 13: 2742-50.
- Nowak-Wegrzyn, A., J. A. Winkelstein, A. J. Swift, and H. M. Lederman. 2000. 'Serum opsonic activity in infants with sickle-cell disease immunized with pneumococcal polysaccharide protein conjugate vaccine. The pneumococcal conjugate vaccine study group', *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 7: 788-93.
- Oberste, M. S., K. Maher, D. R. Kilpatrick, and M. A. Pallansch. 1999. 'Molecular evolution of the human enteroviruses: Correlation of serotype with vp1 sequence and application to picornavirus classification', *J Virol*, 73: 1941-8.
- Orvedahl, Anthony, Amruta Padhye, Kevin Barton, Kevin O'Bryan, Jack Baty, Nancy Gruchala, Angela Niesen, Angeliki Margoni, and Mythili Srinivasan. 2016. 'Clinical characterization of children

- presenting to the hospital with enterovirus d68 infection during the 2014 outbreak in st. Louis', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35: 481-87.
- Paradiso, P. R., S. W. Hildreth, D. A. Hogerman, D. J. Speelman, E. B. Lewin, J. Oren, and D. H. Smith. 1994. 'Safety and immunogenicity of a subunit respiratory syncytial virus vaccine in children 24 to 48 months old', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 13: 792-98.
- Paterson, D. L., P. K. Murray, and J. G. McCormack. 1998. 'Zoonotic disease in australia caused by a novel member of the paramyxoviridae', *Clin Infect Dis*, 27: 112-8.
- Patrozou, Eleni, and Leonard A. Mermel. 2009. 'Does influenza transmission occur from asymptomatic infection or prior to symptom onset?', *Public health reports (Washington, D.C. : 1974)*, 124: 193-96.
- Peiris, J. S., K. P. Hui, and H. L. Yen. 2010. 'Host response to influenza virus: Protection versus immunopathology', *Curr Opin Immunol*, 22: 475-81.
- Peiris, J. S., L. L. Poon, and Y. Guan. 2009. 'Emergence of a novel swine-origin influenza a virus (s-oiv) h1n1 virus in humans', *J Clin Virol*, 45: 169-73.
- Peltola, H. 2000. 'Worldwide haemophilus influenzae type b disease at the beginning of the 21st century: Global analysis of the disease burden 25 years after the use of the polysaccharide vaccine and a decade after the advent of conjugates', *Clinical Microbiology Reviews*, 13: 302-17.
- Peltola, V., T. Heikkinen, O. Ruuskanen, T. Jartti, T. Hovi, T. Kilpi, and R. Vainionpää. 2011. 'Temporal association between rhinovirus circulation in the community and invasive pneumococcal disease in children', *Pediatr Infect Dis J*, 30: 456-61.
- Pfeiffer, R. 1892. "Vorläufige mitteilungen über die erregere der influenza, deutsche med." In.: Wchnschr.
- Pfuntner, Anne Wier, Lauren M. Steiner, Claudia. 2011a. *Costs for hospital stays in the united states, 2011: Statistical brief #168* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD)).
- Pfuntner, Anne Wier, Lauren M. Stocks, Carol. 2011b. *Most frequent conditions in u.S. Hospitals, 2011: Statistical brief #162* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD)).
- Pinkerton, H., and S. Carroll. 1971. 'Fatal adenovirus pneumonia in infants. Correlation of histologic and electron microscopic observations', *The American journal of pathology*, 65: 543-48.
- Pittman, M. 1933. 'The action of type-specific hemophilus influenzae antiserum', *The Journal of experimental medicine*, 58: 683-706.
- Pneumonia Etiology Research for Child Health Study, Group. 2019. 'Causes of severe pneumonia requiring hospital admission in children without hiv infection from africa and asia: The perch multi-country case-control study', *Lancet*, 394: 757-79.
- Prage, L., U. Pettersson, and L. Philipson. 1968. 'Internal basic proteins in adenovirus', *Virology*, 36: 508-11.
- Principi, N., and S. Esposito. 2011. 'Management of severe community-acquired pneumonia of children in developing and developed countries', *Thorax*, 66: 815-22.
- . 2016. 'Antimicrobial stewardship in paediatrics', *BMC Infect Dis*, 16: 424.
- . 2017. 'Biomarkers in pediatric community-acquired pneumonia', *Int J Mol Sci*, 18.
- Rabinow, Paul. 2011. *Making pcr: A story of biotechnology* (University of Chicago Press).
- Ralston, S., and V. Hill. 2009. 'Incidence of apnea in infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis: A systematic review', *J Pediatr*, 155: 728-33.
- Randall, R. E., and S. Goodbourn. 2008. 'Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures', *J Gen Virol*, 89: 1-47.
- Rapola, Satu, Virva Jäntti, Mervi Eerola, P. Helena Mäkelä, Helena Käyhty, and Terhi Kilpi. 2003. 'Anti-psaa and the risk of pneumococcal aom and carriage', *Vaccine*, 21: 3608-13.
- Ray, C GEORGE, and LINDA L Minnich. 1987. 'Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses', *Journal of Clinical Microbiology*, 25: 355-57.

- Ren, L., R. Gonzalez, Z. Xie, Z. Xiong, C. Liu, Z. Xiang, Y. Xiao, et al. 2011. 'Human parainfluenza virus type 4 infection in chinese children with lower respiratory tract infections: A comparison study', *J Clin Virol*, 51: 209-12.
- Rewers, M., H. Hyöty, Å Lernmark, W. Hagopian, J. X. She, D. Schatz, A. G. Ziegler, J. Toppari, B. Akolkar, and J. Krischer. 2018. 'The environmental determinants of diabetes in the young (teddy) study: 2018 update', *Curr Diab Rep*, 18: 136.
- Riegelman, Richard K. 2005. *Studying a study and testing a test: How to read the medical evidence* (Lippincott Williams & Wilkins).
- Rima, B., P. Collins, A. Easton, R. Fouchier, G. Kurath, R. A. Lamb, B. Lee, et al. 2017. 'Ictv virus taxonomy profile: Pneumoviridae', *J Gen Virol*, 98: 2912-13.
- Risku, Minna, Suvi Lappalainen, Sirpa Räsänen, and Timo Vesikari. 2010. 'Detection of human coronaviruses in children with acute gastroenteritis', *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 48: 27-30.
- Rose, M. A., M. Barker, J. Liese, O. Adams, T. Ankermann, U. Baumann, F. Brinkmann, et al. 2020. '[guidelines for the management of community acquired pneumonia in children and adolescents (pediatric community acquired pneumonia, pcap) - issued under the responsibility of the german society for pediatric infectious diseases (dgpi) and the german society for pediatric pulmonology (gpp)]', *Pneumologie*, 74: 515-44.
- Russell, K. L., M. P. Broderick, S. E. Franklin, L. B. Blyn, N. E. Freed, E. Moradi, D. J. Ecker, et al. 2006. 'Transmission dynamics and prospective environmental sampling of adenovirus in a military recruit setting', *J Infect Dis*, 194: 877-85.
- Ryan, M. A., R. S. Christian, and J. Wohlrabe. 2001. 'Handwashing and respiratory illness among young adults in military training', *Am J Prev Med*, 21: 79-83.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. 'Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase', *Science*, 239: 487-91.
- Saiki, RK, S Scharf, F Faloona, KB Mullis, GT Horn, HA Erlich, and N Arnheim. 1985. 'Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia', *Science*, 230: 1350-54.
- Saraya, T. 2016. 'The history of mycoplasma pneumoniae pneumonia', *Frontiers in microbiology*, 7: 364.
- Schiffman, M. H., H. M. Bauer, A. T. Lorincz, M. M. Manos, J. C. Byrne, A. G. Glass, D. M. Cadell, and P. M. Howley. 1991. 'Comparison of southern blot hybridization and polymerase chain reaction methods for the detection of human papillomavirus DNA', *J Clin Microbiol*, 29: 573-7.
- Schildgen, O., A. Müller, T. Allander, I. M. Mackay, S. Völz, B. Kupfer, and A. Simon. 2008. 'Human bocavirus: Passenger or pathogen in acute respiratory tract infections?', *Clin Microbiol Rev*, 21: 291-304, table of contents.
- Schot, M. J. C., A. R. J. Dekker, W. G. Giorgi, R. M. Hopstaken, N. J. de Wit, T. J. M. Verheij, and J. W. L. Cals. 2018. 'Diagnostic value of signs, symptoms and diagnostic tests for diagnosing pneumonia in ambulant children in developed countries: A systematic review', *NPJ Prim Care Respir Med*, 28: 40.
- Schuffenecker, Isabelle, Audrey Mirand, Laurence Josset, Cécile Henquell, Denise Hecquet, Léa Pilorgé, Joëlle Petitjean-Lecherbonnier, et al. 2016. 'Epidemiological and clinical characteristics of patients infected with enterovirus d68, france, july to december 2014', *Eurosurveillance*, 21: 30226.
- Scott, J. A., C. Wonodi, J. C. Moisi, M. Deloria-Knoll, A. N. DeLuca, R. A. Karron, N. Bhat, et al. 2012. 'The definition of pneumonia, the assessment of severity, and clinical standardization in the pneumonia etiology research for child health study', *Clin Infect Dis*, 54 Suppl 2: S109-16.
- Seltzer, E. G., and E. D. Shapiro. 1996. 'Misdiagnosis of lyme disease: When not to order serologic tests', *Pediatr Infect Dis J*, 15: 762-3.
- Shah, S. N., R. G. Bachur, D. L. Simel, and M. I. Neuman. 2017. 'Does this child have pneumonia?: The rational clinical examination systematic review', *JAMA*, 318: 462-71.

- Shaper, Mirza, Susan K. Hollingshead, William H. Benjamin, Jr., and David E. Briles. 2004. 'PspA protects streptococcus pneumoniae from killing by apolactoferrin, and antibody to PspA enhances killing of pneumococci by apolactoferrin [corrected]', *Infection and immunity*, 72: 5031-40.
- Sheng, Z. M., D. S. Chertow, X. Ambroggio, S. McCall, R. M. Przygodzki, R. E. Cunningham, O. A. Maximova, J. C. Kash, D. M. Morens, and J. K. Taubenberger. 2011. 'Autopsy series of 68 cases dying before and during the 1918 influenza pandemic peak', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108: 16416-21.
- Sherk, Bill. 2004. *500 years of new words: The fascinating story of how, when, and why these words first entered the English language* (Dundurn).
- Shi, Ting, David A. McAllister, Katherine L. O'Brien, Eric A. F. Simoes, Shabir A. Madhi, Bradford D. Gessner, Fernando P. Polack, et al. 2017. 'Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: A systematic review and modelling study', *The Lancet*, 390: 946-58.
- Shope, R. E., and T. Francis. 1936. 'The susceptibility of swine to the virus of human influenza', *The Journal of experimental medicine*, 64: 791-801.
- Sieg, S., C. King, Y. Huang, and D. Kaplan. 1996. 'The role of interleukin-10 in the inhibition of t-cell proliferation and apoptosis mediated by parainfluenza virus type 3', *J Virol*, 70: 4845-8.
- Similä, S., O. Linna, P. Lanning, E. Heikkinen, and M. Ala-Houhala. 1981. 'Chronic lung damage caused by adenovirus type 7: A ten-year follow-up study', *Chest*, 80: 127-31.
- Sizun, J., D. Soupre, M. C. Legrand, J. D. Giroux, S. Rubio, J. M. Cauvin, C. Chastel, D. Alix, and L. de Parscau. 1995. 'Neonatal nosocomial respiratory infection with coronavirus: A prospective study in a neonatal intensive care unit', *Acta paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*, 84: 617-20.
- Sobeslavsky, O., B. Prescott, and R. M. Chanock. 1968. 'Adsorption of mycoplasma pneumoniae to neuraminic acid receptors of various cells and possible role in virulence', *Journal of bacteriology*, 96: 695-705.
- Srugo, I., A. Klein, M. Stein, O. Golan-Shany, N. Kerem, I. Chistyakov, J. Genizi, et al. 2017. 'Validation of a novel assay to distinguish bacterial and viral infections', *PEDIATRICS*, 140.
- Stabell, Erik C, and Paul D Olivo. 1992. 'Isolation of a cell line for rapid and sensitive histochemical assay for the detection of herpes simplex virus', *Journal of virological methods*, 38: 195-204.
- Stephens, D. S., and M. M. Farley. 1991. 'Pathogenic events during infection of the human nasopharynx with neisseria meningitidis and haemophilus influenzae', *Rev Infect Dis*, 13: 22-33.
- Strickland, D. H., T. Thepen, U. R. Kees, G. Kraal, and P. G. Holt. 1993. 'Regulation of t-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages', *Immunology*, 80: 266-72.
- Stuckey-Schrock, K., B. L. Hayes, and C. M. George. 2012. 'Community-acquired pneumonia in children', *Am Fam Physician*, 86: 661-7.
- Suzuki, T., C. W. Chow, and G. P. Downey. 2008. 'Role of innate immune cells and their products in lung immunopathology', *Int J Biochem Cell Biol*, 40: 1348-61.
- Swartz, Morton N, and Philip R Dodge. 1965. 'Bacterial meningitis—a review of selected aspects: General clinical features, special problems and unusual meningeal reactions mimicking bacterial meningitis', *New England Journal of Medicine*, 272: 725-31.
- Tagliabue, C., N. Principi, C. Giavoli, and S. Esposito. 2016. 'Obesity: Impact of infections and response to vaccines', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 35: 325-31.
- Takala, A. K., O. Meurman, M. Kleemola, E. Kela, P. R. Rönnerberg, J. Eskola, and P. H. Mäkelä. 1993. 'Preceding respiratory infection predisposing for primary and secondary invasive haemophilus influenzae type b disease', *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 12: 189-95.
- Tanaka, Koichi, Hiroaki Waki, Yutaka Ido, Satoshi Akita, Yoshikazu Yoshida, Tamio Yoshida, and T. Matsuo. 1988. 'Protein and polymer analyses up to m/z 100 000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry', *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2: 151-53.
- Tannous, R., R. N. Haddad, and P. H. Torbey. 2020. 'Management of community-acquired pneumonia in pediatrics: Adherence to clinical guidelines', *Front Pediatr*, 8: 302.

- Techasaensiri, B., C. Techasaensiri, A. Mejías, G. H. McCracken, Jr., and O. Ramilo. 2010. 'Viral coinfections in children with invasive pneumococcal disease', *Pediatr Infect Dis J*, 29: 519-23.
- The IMpact-RSV Study Group. 1998. 'Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants', *PEDIATRICS*, 102: 531-37.
- Tsai, C. M., C. R. Lin, H. Zhang, I. M. Chiu, C. Y. Cheng, H. R. Yu, and Y. H. Huang. 2020. 'Using machine learning to predict bacteremia in febrile children presented to the emergency department', *Diagnostics (Basel)*, 10.
- Turner, Paul, Claudia Turner, Auscharee Jankhot, Naw Helen, Sue J. Lee, Nicholas P. Day, Nicholas J. White, Francois Nosten, and David Goldblatt. 2012. 'A longitudinal study of streptococcus pneumoniae carriage in a cohort of infants and their mothers on the thailand-myanmar border', *PLoS One*, 7: e38271-e71.
- Tyrrell, D. A., and M. L. Bynoe. 1965. 'Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures', *British medical journal*, 1: 1467-70.
- Ukimura, Akira, Tohru Izumi, Akira Matsumori, and A. Pandemic in Japan organized by the Japanese Circulation Society Clinical Research Committee on Myocarditis Associated with the Influenza. 2010. 'A national survey on myocarditis associated with the 2009 influenza a (h1n1) pandemic in japan', *Circulation Journal*, 74: 2193-99.
- Uscher-Pines, Lori, Daniel J. Barnett, Jason W. Sapsin, David M. Bishai, and Ran D. Balicer. 2008. 'A systematic analysis of influenza vaccine shortage policies', *Public health*, 122: 183-91.
- Uyeki, T. M., H. H. Bernstein, J. S. Bradley, J. A. Englund, T. M. File, A. M. Fry, S. Gravenstein, et al. 2019. 'Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america: 2018 update on diagnosis, treatment, chemoprophylaxis, and institutional outbreak management of seasonal influenza', *Clin Infect Dis*, 68: e1-e47.
- Vabret, N., G. J. Britton, C. Gruber, S. Hegde, J. Kim, M. Kuksin, R. Levantovsky, et al. 2020. 'Immunology of covid-19: Current state of the science', *Immunity*, 52: 910-41.
- Valentine, R. C., and H. G. Pereira. 1965. 'Antigens and structure of the adenovirus', *J Mol Biol*, 13: 13-20.
- Van den Bruel, A., T. Haj-Hassan, M. Thompson, F. Buntinx, and D. Mant. 2010. 'Diagnostic value of clinical features at presentation to identify serious infection in children in developed countries: A systematic review', *Lancet*, 375: 834-45.
- van den Hoogen, B. G., J. C. de Jong, J. Groen, T. Kuiken, R. de Groot, R. A. Fouchier, and A. D. Osterhaus. 2001. 'A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease', *Nat Med*, 7: 719-24.
- van der Linden, Lonneke, Katja C. Wolthers, and Frank J. M. van Kuppeveld. 2015. 'Replication and inhibitors of enteroviruses and parechoviruses', *Viruses*, 7: 4529-62.
- van Hemert, Martijn J., Sjoerd H. E. van den Worm, Kèvin Knoops, A. Mieke Mommaas, Alexander E. Gorbalenya, and Eric J. Snijder. 2008. 'Sars-coronavirus replication/transcription complexes are membrane-protected and need a host factor for activity in vitro', *PLOS Pathogens*, 4: e1000054-e54.
- van Houten, C. B., J. A. H. de Groot, A. Klein, I. Srugo, I. Chistyakov, W. de Waal, C. B. Meijssen, et al. 2017. 'A host-protein based assay to differentiate between bacterial and viral infections in preschool children (opportunity): A double-blind, multicentre, validation study', *Lancet Infect Dis*, 17: 431-40.
- van Riel, D., V. J. Munster, E. de Wit, G. F. Rimmelzwaan, R. A. Fouchier, A. D. Osterhaus, and T. Kuiken. 2006. 'H5n1 virus attachment to lower respiratory tract', *Science*, 312: 399.
- Vangay, P., T. Ward, J. S. Gerber, and D. Knights. 2015. 'Antibiotics, pediatric dysbiosis, and disease', *Cell Host Microbe*, 17: 553-64.
- Visscher, D. W., and J. L. Myers. 2006. 'Bronchiolitis: The pathologist's perspective', *Proc Am Thorac Soc*, 3: 41-7.
- Vogelstein, B., and K. W. Kinzler. 1999. 'Digital pcr', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96: 9236-41.

- Wagner, D. K., P. Muelenaer, F. W. Henderson, M. H. Snyder, C. B. Reimer, E. E. Walsh, L. J. Anderson, D. L. Nelson, and B. R. Murphy. 1989. 'Serum immunoglobulin g antibody subclass response to respiratory syncytial virus f and g glycoproteins after first, second, and third infections', *J Clin Microbiol*, 27: 589-92.
- Wang, Keqiang, Wen Xi, Donghong Yang, Yali Zheng, Yaqiong Zhang, Yusheng Chen, Chunliang Yan, et al. 2017. 'Rhinovirus is associated with severe adult community-acquired pneumonia in china', *Journal of thoracic disease*, 9: 4502-11.
- Watson, D. A., D. M. Musher, J. W. Jacobson, and J. Verhoef. 1993. 'A brief history of the pneumococcus in biomedical research: A panoply of scientific discovery', *Clin Infect Dis*, 17: 913-24.
- Webster, R. G., W. J. Bean, O. T. Gorman, T. M. Chambers, and Y. Kawaoka. 1992. 'Evolution and ecology of influenza a viruses', *Microbiol Rev*, 56: 152-79.
- Webster, R. G., M. Peiris, H. Chen, and Y. Guan. 2006. 'H5n1 outbreaks and enzootic influenza', *Emerg Infect Dis*, 12: 3-8.
- Weller, Thomas H, and John F Enders. 1948. 'Production of hemagglutinin by mumps and influenza a viruses in suspended cell tissue cultures', *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 69: 124-28.
- Welliver, R. 2009. 'The relationship of meteorological conditions to the epidemic activity of respiratory syncytial virus', *Paediatr Respir Rev*, 10 Suppl 1: 6-8.
- Welliver, R. C., T. N. Kaul, T. I. Putnam, M. Sun, K. Riddlesberger, and P. L. Ogra. 1980. 'The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: Kinetics of class-specific responses', *J Pediatr*, 96: 808-13.
- Welliver, R. C., Sr. 2008. 'The immune response to respiratory syncytial virus infection: Friend or foe?', *Clin Rev Allergy Immunol*, 34: 163-73.
- Welliver, R. C., D. T. Wong, M. Sun, E. Middleton, Jr., R. S. Vaughan, and P. L. Ogra. 1981. 'The development of respiratory syncytial virus-specific ige and the release of histamine in nasopharyngeal secretions after infection', *N Engl J Med*, 305: 841-6.
- Welliver, R., D. T. Wong, T. S. Choi, and P. L. Ogra. 1982. 'Natural history of parainfluenza virus infection in childhood', *J Pediatr*, 101: 180-7.
- Welliver, T. P., R. P. Garofalo, Y. Hosakote, K. H. Hintz, L. Avendano, K. Sanchez, L. Velozo, et al. 2007. 'Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses', *J Infect Dis*, 195: 1126-36.
- Westbury, C. F. 2010. 'Bayes' rule for clinicians: An introduction', *Front Psychol*, 1: 192.
- WHO. 1980. 'A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: A who memorandum*', *Bulletin of the World Health Organization*, 58: 585-91.
- Wilking, A. N., E. Elliott, M. N. Garcia, K. O. Murray, and F. M. Munoz. 2014. 'Central nervous system manifestations in pediatric patients with influenza a h1n1 infection during the 2009 pandemic', *Pediatr Neurol*, 51: 370-6.
- Wilson, I. A., J. J. Skehel, and D. C. Wiley. 1981. 'Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution', *Nature*, 289: 366-73.
- Woodland, D.L., and T.D. Randall. 2004. 'Anatomical features of antiviral immunity in the respiratory tract', *Semin Immunol*, 16.
- World Health Organization. 2014. 'Revised who classification and treatment of pneumonia in children at health facilities: Evidence summaries'.
- . 2019. 'Pneumonia in children - fact sheet'. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/pneumonia>.
- Wright, R. E. 1930. 'Superficial punctate keratitis: A record of an epidemic of superficial punctate keratitis which appeared in madras about may, 1928, and continued during the year that followed, embodying observations relating to the clinical appearances, biomicroscopy, epidemiology, aetiology and histopathology, of the disease, based on the investigation of over 900 cases', *The British journal of ophthalmology*, 14: 257-91.

- Xu, J., S. L. Murphy, K. D. Kockanek, and E. Arias. 2020. 'Mortality in the united states, 2018', *NCHS Data Brief*: 1-8.
- Yamayoshi, Seiya, Satoshi Fukuyama, Shinya Yamada, Dongming Zhao, Shin Murakami, Ryuta Uraki, Tokiko Watanabe, Yuriko Tomita, Gabriele Neumann, and Yoshihiro Kawaoka. 2015. 'Amino acids substitutions in the pb2 protein of h7n9 influenza a viruses are important for virulence in mammalian hosts', *Scientific reports*, 5: 8039.
- Yang, Lin, Kwok Hung Chan, Lorna K. P. Suen, King Pan Chan, Xiling Wang, Peihua Cao, Daihai He, J. S. Malik Peiris, and Chit Ming Wong. 2015. 'Impact of the 2009 h1n1 pandemic on age-specific epidemic curves of other respiratory viruses: A comparison of pre-pandemic, pandemic and post-pandemic periods in a subtropical city', *PLoS One*, 10: e0125447-e47.
- Yeh, E. A., A. Collins, M. E. Cohen, P. K. Duffner, and H. Faden. 2004. 'Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis', *PEDIATRICS*, 113: e73-6.
- Yoon, S. W., R. J. Webby, and R. G. Webster. 2014. 'Evolution and ecology of influenza a viruses', *Curr Top Microbiol Immunol*, 385: 359-75.
- Youssef, A. S., M. Fanous, F. J. Siddiqui, J. Estrada, V. Chorny, M. Braiman, and E. F. Mayer. 2020. 'Value of blood cultures in the management of children hospitalized with community-acquired pneumonia', *Cureus*, 12: e8222.
- Yu, Hao, Lauren M. Wier, and Anne Elixhauser. 2006. *Hospital stays for children, 2009: Statistical brief #118* (Agency for Healthcare Research and Quality (US), Rockville (MD)).
- Zaki, A. M., S. van Boheemen, T. M. Bestebroer, A. D. Osterhaus, and R. A. Fouchier. 2012. 'Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in saudi arabia', *N Engl J Med*, 367: 1814-20.
- Zhang, S., P. M. Sammon, I. King, A. L. Andrade, C. M. Toscano, S. N. Araujo, A. Sinha, et al. 2016. 'Cost of management of severe pneumonia in young children: Systematic analysis', *J Glob Health*, 6: 010408.
- Zhang, Ying, Jingyan Li, and Qihan Li. 2018. 'Immune evasion of enteroviruses under innate immune monitoring', *Frontiers in microbiology*, 9: 1866-66.
- Zhou, L., M. M. Chong, and D. R. Littman. 2009. 'Plasticity of cd4+ t cell lineage differentiation', *Immunity*, 30: 646-55.
- Zhou, Y., J. X. Li, P. F. Jin, Y. X. Wang, and F. C. Zhu. 2016. 'Enterovirus 71: A whole virion inactivated enterovirus 71 vaccine', *Expert review of vaccines*, 15: 803-13.
- Zhu, Qing, Nita K. Patel, Josephine M. McAuliffe, Wei Zhu, Leslie Wachter, Michael P. McCarthy, and JoAnn A. Suzich. 2011. 'Natural polymorphisms and resistance-associated mutations in the fusion protein of respiratory syncytial virus (rsv): Effects on rsv susceptibility to palivizumab', *The Journal of Infectious Diseases*, 205: 635-38.

ANNEXES

A. Plan complet

INTRODUCTION GENERALE	5
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
A. POSITION GENERALE DE LA PROBLEMATIQUE.....	8
1 Les infections des voies respiratoires basses – vue globale	8
1.1 Recommandations de prise en charge et pratiques actuelles.....	9
1.2 Les enjeux.....	10
2 Les méthodes de diagnostic étiologiques	11
2.1 Les méthodes diagnostiques classiques	11
2.1.1 Diagnostic non microbiologique	11
2.1.2 Diagnostic bactériologique	12
2.1.3 Diagnostic moléculaire	13
2.1.4 Tests antigéniques	14
2.2 Controverses actuelles : POCT et Multiplexing.....	14
2.2.1 POCT	15
2.2.2 Multiplexing.....	15
B. DIAGNOSTIC ETIOLOGIQUE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES	17
1 Tests biologiques, aspects statistiques	17
1.1 Qu'est-ce que la normalité d'un test ?	17
1.2 Précision	19
1.3 Rapport de vraisemblance.....	20
1.4 Valeur prédictive	20
1.5 Théorème de Bayes et l'erreur en diagnostic médical	21
2 Evolution historique des techniques de détection des infections respiratoires	22
2.1 Détection bactériologique.....	22
2.1.1 Première révolution : la culture.....	22
2.1.2 Deuxième révolution : Les tests moléculaires et la spectrométrie de masse.....	23
2.2 Diagnostic virologique.....	23
2.2.1 Cultures cellulaires	23
2.2.2 Techniques antigéniques	24
2.3 PCR	25
3 Perspectives pour demain.....	26
C. PATHOGENIE GENERALE DES INFECTIONS DES VOIES RESPIRATOIRES BASSES	26
1 Mécanismes de défense pulmonaire	28
1.1 Voies respiratoires supérieures.....	28
1.1.1 Filtration de l'air	28
1.1.2 Immunité locale.....	28
1.2 Voies respiratoires inférieures	28
1.3 Immunité innée	29
1.4 Immunité adaptative	30
1.5 Microbiome.....	31
2 Pathogénie générale des infections virales.....	31
3 Pathogénie générale des infections bactériennes	33
4 Place de la vaccination	34
D. AGENTS ETIOLOGIQUES : VIRUS	34

1	Place des agents infectieux viraux dans les PAC	34
2	Virus de la Grippe.....	34
2.1	Historique	35
2.2	Microbiologie	36
2.2.1	Convention de nommage	36
2.2.2	Structure.....	36
2.2.3	Facteurs de virulence	37
2.1	Pathophysiologie	37
2.1.1	Immunité innée	37
2.1.2	Immunité humorale.....	38
2.1.3	Immunité cellulaire.....	38
2.2	Épidémiologie.....	39
2.3	Écologie	40
2.4	Manifestations cliniques	41
2.5	Vaccins et prévention	42
2.5.1	Historique	42
2.5.2	Sélection des souches.....	42
2.5.3	Immunogénicité	43
2.5.4	Vaccination pédiatrique	43
3	RSV.....	43
3.1	Historique	44
3.2	Microbiologie	44
3.3	Épidémiologie.....	45
3.4	Manifestations cliniques	46
3.5	Pathophysiologie des infections à RSV	47
3.5.1	Vue globale	47
3.5.2	Immunité innée	47
3.5.3	Réponse lymphocytaire B.....	48
3.5.4	Réponse lymphocytaire T	48
3.6	Vaccin et prévention	49
3.6.1	Immunoprophylaxie	49
3.6.2	Vaccination	49
4	Entérovirus & Rhinovirus	50
4.1	Introduction	50
4.2	Classification, historique et taxonomie.	50
4.3	Microbiologie	52
4.4	Pathophysiologie.....	53
4.5	Epidémiologie.....	53
4.6	Manifestations cliniques	54
4.7	Entérovirus D68.....	54
4.8	Vaccin et prévention	55
5	Coronavirus.....	55
5.1	Historique	55
5.2	Microbiologie	56
5.3	Pathophysiologie.....	56
5.3.1	Réplication virale	56
5.3.2	Réponse immunitaire	57
5.4	Epidémiologie.....	57
5.5	Manifestations cliniques	57
5.6	Coronavirus épidémiques.....	58
5.6.1	SARS-CoV	58
5.6.2	MERS-CoV.....	58
5.6.3	SARS CoV-2	58
6	Adénovirus.....	59
6.1	Historique	59
6.2	Microbiologie	60
6.3	Pathophysiologie	60
6.3.1	Infection des cellules	60

6.3.2	Réponse immunitaire	61
6.4	Epidémiologie	61
6.5	Manifestations cliniques	62
6.6	Vaccination	62
7	<i>Virus parainfluenza</i>	63
7.1	Historique	63
7.2	Microbiologie	64
7.3	Physiopathologie	64
7.4	Epidémiologie	65
7.5	Manifestations cliniques	66
8	<i>Human Métapneumovirus</i>	67
8.1	Histoire	67
8.2	Microbiologie	67
8.3	Pathophysiologie	68
8.4	Epidémiologie	68
8.5	Manifestations cliniques	68
9	<i>Bocavirus</i>	69
9.1	Histoire	69
9.2	Microbiologie	69
9.3	Physiopathologie	69
9.4	Epidémiologie	70
9.5	Manifestations cliniques	70
E.	AGENTS ETIOLOGIQUES BACTERIENS	71
1	<i>Pneumocoque</i>	71
1.1	Histoire	71
1.2	Microbiologie	72
1.2.1	Facteurs de virulence	72
1.3	Pathophysiologie	73
1.4	Epidémiologie	74
1.5	Manifestations cliniques	74
1.6	Vaccins	75
2	<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	76
2.1	Histoire	76
2.2	Microbiologie	77
2.3	Pathophysiologie	77
2.4	Epidémiologie	77
2.5	Manifestations cliniques	78
2.6	Vaccins et traitements	78
3	<i>Haemophilus Influenzae de type B</i>	78
3.1	Histoire	79
3.2	Microbiologie	79
3.3	Physiopathologie	80
3.4	Epidémiologie	80
3.5	Manifestations cliniques	81
3.6	Vaccin	81
	TRAVAUX PERSONNELS	82
A.	DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES PNEUMOPATHIES AUX URGENCES PEDIATRIQUES	82
1	<i>Etude Epi-Paups</i>	83
2	<i>Etude OPTIPAC</i>	90
B.	UTILISATION DES TESTS ANTIGENIQUES RAPIDES POUR LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS RESPIRATOIRES AUX URGENCES PEDIATRIQUES	115
1	<i>Introduction</i>	115
1.1	Evaluation d'une stratégie utilisant un TDR pneumocoque	115
1.2	Performances analytiques des TDR <i>BD-Veritor</i> en Grippe et RSV	115
1.3	Impact d'un TDR Grippe sur la prise en charge aux urgences pédiatriques	116
1.4	Test antigénique SARS-CoV-2	116

2	<i>Evaluation d'une stratégie utilisant un TDR pneumocoque.....</i>	117
3	<i>Performance analytique d'un POCT.....</i>	127
4	<i>Impact d'un TDR grippe sur la prise en charge aux urgences pédiatriques</i>	132
5	<i>Test antigénique SARS-CoV-2</i>	140
C.	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	168
1	<i>Principaux messages de ces travaux.....</i>	168
1.1	Concernant l'usage des PCR multiplex dans les PAC	168
1.2	Concernant la performance des TDR aux urgences pédiatriques.....	168
1.3	Concernant l'usage des TDR aux urgences pédiatriques.....	169
2	<i>Forces et faiblesses des travaux présentés</i>	169
2.1	Concernant l'usage des PCR multiplex dans les PAC	169
2.1	Concernant la performance des TDR aux urgences pédiatriques.....	170
2.2	Concernant l'usage des TDR aux urgences pédiatriques.....	170
3	<i>Implications pour la pratique clinique</i>	170
4	<i>Implications pour de futures recherches.....</i>	172
4.1	Prolongation de ces travaux	172
4.2	Travaux originaux	172
	BIBLIOGRAPHIE	174
	ANNEXES.....	191
A.	PLAN COMPLET.....	191
B.	CV COMPLET.....	195

B. CV complet



CANTAIS Aymeric

73 les coteaux de Lapra – 42330 St Bonnet Les Oules

Téléphone : 06 76 14 78 67

Adresse de messagerie : aymeric.cantais@chu-st-etienne.fr

Inscrit à l'ordre des médecins depuis 2014

N° RPPS : 10100537082

Praticien Hospitalier aux Urgences Pédiatriques du CHU de Saint Etienne depuis 2016

Faculté de Médecine de Saint Etienne, Université Jean Monnet

Laboratoire de rattachement : GIMAP EA 3064 (Groupe Immunité des Muqueuses et Agents pathogènes) – WP1 : WP1 : Modélisation des interactions muqueuses-agents pathogènes / étude des réservoirs

Activité clinique

► Coursus Médical :

2019-2020 : Médecin Clinicien/chercheur aux Urgences Pédiatriques des HUG – Genève - Suisse

2017-Ce jour : **Praticien hospitalier titulaire** aux Urgences Pédiatriques CHU de St-Etienne

2016-2019 : Praticien Hospitalier contractuel aux Urgences Pédiatriques CHU de St-Etienne

2014 – 2016 : Assistant spécialiste aux Urgences Pédiatriques CHU de St-Etienne

2010 – 2014 : Internat au CHU de St Etienne :

DES de médecine générale à Saint Etienne

DESC de médecine d'urgence : 2012-2015

(Mémoire : Etude de l'usage et de l'intérêt de la procalcitonine aux urgences pédiatriques)

Lauréat du concours médaille d'or du CHU de Saint-Etienne (2013)

2003 – 2010 : Externat de médecine à la faculté de médecine Lyon-Sud

► Diplômes complémentaires :

2020 : **CESAM** : Diplôme de Biostatistiques, Paris Sorbonne

2019 : **EUSIM** : Formation Européenne à la Simulation en Santé

2016-2017 : **DIU** Echographie générale, option pédiatrie (Pr GUIBAUD)

2013-2015 : **DIU** Médecine Intensive (Pr ZENI)

2013-2015 : **DIU** Urgences et Réanimation Pédiatrique (Pr JAVOUHEY et GFRUP)

2013 : **DU** Infectiologie, vaccinologie et chimiothérapie anti-infectieuses – Pr CHIDIAC – Lyon

2012 : **DIU** Accueil des urgences médico-chirurgicales en service de pédiatrie - Rhône Alpes

2011 : **DU** traumatologie à l'usage de l'urgentiste – Pr SARAGAGLIA – Grenoble

▶ **Activité de gardes et d'astreintes**

2014-en cours : Participation actuelle aux tours de gardes suivants :
Réanimation Pédiatrique et néonatale (2-3 gardes / mois)
Urgences pédiatriques (3-4 gardes par mois)

2014-2016 : Participation aux tours de gardes du SAMU polyvalent (46 gardes sur la période)

Activité de recherche

▶ **Cursus universitaire**

2016-en cours : Thèse de science : Diagnostic des pneumopathies virales et mécanismes d'interactions bactériens et virales (soutenance Novembre 2021)

Directeur de Thèse : Pr Bruno POZZETTO – GIMAP / CIRI - CHU de Saint Etienne

2015-2016 : Master 2 Sciences Biologiques et Technologiques pour la Santé

(Mémoire : Contamination microbiologiques des téléphones personnels médicaux (DECT) au cours des épidémies hivernales en pédiatrie)

2008 : Master 1 Recherche Biomédicale (Lyon)

▶ **Membre de sociétés savantes**

2017-2020 : GFRUP

2018- ce jour : Membre de la commission recherche du GFRUP

2012-2017 : SFMU

2014-2017 : SRLF

2013-2015 : SFP

2015 : ESCIM

2015-2020 : GPIP

▶ **Autres activités en rapport avec la recherche clinique**

2018-ce jour : Membre de la commission recherche du GFRUP. Organisateur depuis session 2019.

2017-ce jour : Membre de la **commission recherche du comité d'éthique** du CHU de St Etienne

2017-ce jour : Membre de la DRCI (Direction Recherche Clinique et Innovation) du CHU de St-Etienne

2016 : Membre du comité éditorial de rédaction du **livre blanc** « Les tests rapides, outils essentiels de la lutte contre l'antibiorésistance : 10 propositions en faveur du déploiement et du développement des tests rapides en France »

▶ **Communications Scientifiques en congrès**

Orales :

Incidence of contrast-induced acute kidney injury in a pediatric setting : a cohort study
SRLF, Janvier 2015

Etude de l'effet hémodynamique du propracétamol en réanimation :
SRLF, Janvier 2015

OPTIPAC, étude sur l'intérêt d'une PCR multiplexe aux urgences pédiatriques pour les pneumopathies de l'enfant, présentation d'étude
RICA I 2017

Affichées :

Effet de la dose-col en anesthésie obstétricale au cours du travail
SFAR, Septembre 2015

Impact de l'utilisation d'un TDR RSV pendant les épidémies hivernales aux urgences pédiatriques
RICA I, Décembre 2017

► **Travaux publiés actuellement :**

1: Woudenberg T, Pelleau S, Anna F, Attia M, Donnadieu F, Gravet A, Lohmann C, Seraphin H, Guiheneuf R, Delamare C, Stefic K, Marlet J, Brochot E, Castelain S, Augereau O, Sibilia J, Dubos F, Meddour D, Guen CG, Coste-Burel M, Imbert-Marcille BM, Chauvire-Drouard A, Schweitzer C, Gatin A, Lomazzi S, Joulié A, Haas H, Cantais A, Bertholon F, Chinazzo-Vigouroux MF, Abdallah MS, Arowas L, Charneau P, Hoen B, Demeret C, Werf SV, Fontanet A, White M. Humoral immunity to SARS-CoV-2 and seasonal coronaviruses in children and adults in north-eastern France. *EBioMedicine*. 2021 Jul 22;70:103495. doi: 10.1016/j.ebiom.2021.103495. Epub ahead of print. PMID: 34304047; PMCID: PMC8299153.

2: Casalegno JS, Ploin D, Cantais A, Masson E, Bard E, Valette M, Fanget R, Targe SC, Myar-Dury AF, Doret-Dion M, Massoud M, Queromes G, Vanhems P, Claris O, Butin M, Pillet S, Ader F, Bin S, Gaymard A, Lina B, Morfin F; RSV study group in Lyon, Javouhey E, Gillet Y. Characteristics of the delayed respiratory syncytial virus epidemic, 2020/2021, Rhône Loire, France. *Euro Surveill*. 2021 Jul;26(29):2100630. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2021.26.29.2100630. PMID: 34296674; PMCID: PMC8299747.

3: Glangetas A, Hartley MA, Cantais A, Courvoisier DS, Rivollet D, Shama DM, Perez A, Spechbach H, Trombert V, Bourquin S, Jaggi M, Barazzzone-Argiroffo C, Gervais A, Siebert JN. Deep learning diagnostic and risk-stratification pattern detection for COVID-19 in digital lung auscultations: clinical protocol for a case-control and prospective cohort study. *BMC Pulm Med*. 2021 Mar 24;21(1):103. doi: 10.1186/s12890-021-01467-w. PMID: 33761909; PMCID: PMC7988633.

4: Sahyoun C, Cantais A, Gervais A, Bressan S, Löllgen R, Krauss B; Pediatric Emergency Medicine Comfort and Analgesia Research in Europe (PemCARE) group of the Research in European Pediatric Emergency Medicine (REPEM) network. Correction to: Pediatric procedural sedation and analgesia in the emergency department: surveying the current European practice. *Eur J Pediatr*. 2021 Jun;180(6):1815-1816. doi: 10.1007/s00431-021-03980-w. Erratum for: *Eur J Pediatr*. 2021 Jun;180(6):1799-1813. PMID: 33582863.

5: Sahyoun C, Cantais A, Gervais A, Bressan S, Löllgen R, Krauss B; Pediatric Emergency Medicine Comfort and Analgesia Research in Europe (PemCARE) group of the Research in European Pediatric Emergency Medicine. Pediatric procedural sedation and analgesia in the emergency department: surveying the current European practice. *Eur J Pediatr*. 2021 Jun;180(6):1799-1813. doi: 10.1007/s00431-021-03930-6. Epub 2021 Jan 28. Erratum in: *Eur J Pediatr*. 2021 Feb 13; PMID: 33511466; PMCID: PMC8105204.

- 6: Cizeron A, Saunier F, Gagneux-Brunon A, Pillet S, Cantais A, Botelho-Nevers E. Low rate of oseltamivir prescription among adults and children with confirmed influenza illness in France during the 2018-19 influenza season. *J Antimicrob Chemother.* 2021 Mar 12;76(4):1057-1062. doi: 10.1093/jac/dkaa539. PMID: 33406225.
- 7: Cantais A, Grattard F, Gagnaire J, Mory O, Plat A, Lleres-Vadeboin M, Berthelot P, Bourlet T, Botelho-Nevers E, Pozzetto B, Pillet S. Longitudinal Study of Viral and Bacterial Contamination of Hospital Pediatricians' Mobile Phones. *Microorganisms.* 2020 Dec 16;8(12):2011. doi: 10.3390/microorganisms8122011. PMID: 33339327; PMCID: PMC7766489.
- 8: Siebert JN, Lacroix L, Cantais A, Manzano S, Ehrler F. The Impact of a Tablet App on Adherence to American Heart Association Guidelines During Simulated Pediatric Cardiopulmonary Resuscitation: Randomized Controlled Trial. *J Med Internet Res.* 2020 May 27;22(5):e17792. doi: 10.2196/17792. PMID: 32292179; PMCID: PMC7287744.
- 9: Haddar CH, Joly J, Carricajo A, Verhoeven PO, Grattard F, Mory O, Begaud E, Germani Y, Cantais A, Pozzetto B. Strategy using a new antigenic test for rapid diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infection in respiratory samples from children consulting at hospital. *BMC Microbiol.* 2020 Apr 7;20(1):79. doi: 10.1186/s12866-020-01764-0. PMID: 32264834; PMCID: PMC7137283.
- 10: Excoffier J, Pichot V, Cantais A, Mory O, Roche F, Patural H, Chouchou F. Autonomic Cardiac Reactivity to Painful Procedures Under Hypnosis in Pediatric Emergencies: A Feasibility Study. *Am J Clin Hypn.* 2020 Jan;62(3):267-281. doi: 10.1080/00029157.2018.1564013. PMID: 31928519.
- 11: Cantais A, Mory O, Plat A, Giraud A, Pozzetto B, Pillet S. Analytical performances of the BD Veritor™ System for the detection of respiratory syncytial virus and influenzaviruses A and B when used at bedside in the pediatric emergency department. *J Virol Methods.* 2019 Aug;270:66-69. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.022. Epub 2019 Apr 29. PMID: 31047969.
- 12: Cantais A, Mory O, Plat A, Bourmaud A, Giraud A, Costille M, Pozzetto B, Pillet S. Impact of bedside diagnosis of influenza in the paediatric emergency ward. *Clin Microbiol Infect.* 2019 Jul;25(7):898-903. doi: 10.1016/j.cmi.2018.11.019. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30502486.
- 13: Cantais A, Schnell D, Vincent F, Hammouda Z, Perinel S, Balichard S, Abroug F, Zeni F, Meziani F, Bornstain C, Darmon M. Acetaminophen-Induced Changes in Systemic Blood Pressure in Critically Ill Patients: Results of a Multicenter Cohort Study. *Crit Care Med.* 2016 Dec;44(12):2192-2198. doi: 10.1097/CCM.0000000000001954. PMID: 27414476.
- 14: Cantais A, Hammouda Z, Mory O, Patural H, Stephan JL, Gulyaeva L, Darmon M. Incidence of contrast-induced acute kidney injury in a pediatric setting: a cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2016 Aug;31(8):1355-62. doi: 10.1007/s00467-016-3313-9. Epub 2016 Mar 21. PMID: 27001054.
- 15: Botelho-Nevers E, Gagneux-Brunon A, Cantais A, Daoud F, Fouilloux P, Fresard A, Cazorla C, Witz M, Monnier G, Guerson N, Ragozin N, Parize P, Bourhy H, Dacheux L, Pihier N, Septfonds A, Guichard M, Lucht F. The potential lethal consequences of rabies vaccine avoidance and dog smuggling in Europe. *J Infect.* 2016 May;72(5):626-8. doi: 10.1016/j.jinf.2016.02.013. Epub 2016 Mar 3. PMID:

26940506.

16: Cantais A, Mory O, Pillet S, Verhoeven PO, Bonneau J, Patural H, Pozzetto B. Epidemiology and microbiological investigations of community-acquired pneumonia in children admitted at the emergency department of a university hospital. J Clin Virol. 2014 Aug;60(4):402-7. doi: 10.1016/j.jcv.2014.05.006. Epub 2014 May 22. PMID: 24915939; PMCID: PMC7106426.

► Encadrement : Direction de travaux de thèses d'internes

Etude de pratiques : Utilité de la PCT aux urgences pédiatriques.

- Travail de thèse de Mr Halim Dalla Gharbi
- Soutenance réalisée le 7 mai 2015

Intérêt et efficacité de la monothérapie par amikacine dans les pyélonéphrites aiguës de l'enfant aux urgences pédiatriques

- Travail de thèse de Mr Maxime Chasson
- Soutenance réalisée le 15 octobre 2015

Facteurs prédictifs d'hospitalisation dans les gastroentérites du nourrisson du moins de deux ans

- Travail de thèse de Mr Romain Constant
- Soutenance réalisée le 21/06/2016

Diagnostic des atteintes organiques intra-abdominales post-traumatiques de l'enfant

- Travail de thèse de Mr Yannis Khennouf
- Soutenance réalisée le 26/10/2016

Détermination de facteurs prédictifs d'infection bactérienne chez le nourrisson de moins de 3 mois consultant aux urgences pour de la fièvre

- Travail de thèse de Mlle Marion PHILLIT
- Soutenance réalisée le 14/09/2017

Intoxication accidentelles pédiatriques au cannabis en région Auvergne Rhône Alpes

- Travail de thèse de Mlle Louise MEUGNIER
- Soutenance réalisée le 03/10/2017

Etude du risque réel d'infection bactérienne chez les nourrissons de moins de 3 mois fébriles considérés comme sévères aux urgences pédiatriques

- Travail de thèse de Mr Joan NOUET
- Soutenance réalisée le 23/10/2017

Typage des entérovirus détectés dans un service d'urgence pédiatrique : quelle corrélation clinico-biologique ?

- Travail de thèse de Mlle Marion BERNARD
- Soutenance réalisée le 25/10/2017

Etude rétrospective de la prise en charge des traumatisés crâniens légers aux urgences pédiatriques, impact de la mise en place du protocole PECARN

- Travail de thèse de Mlle Lydie FAVRE
- Soutenance réalisée le 31/10/2017

Analyse descriptive des cas de suspicion d'appendicite aiguë adressées aux urgences pédiatriques

- Travail de thèse de Mr Thibault ROBESAT
- Soutenance réalisée le 02/11/2017

Adaptation des pratiques thérapeutiques dans la prise en charge de la douleur aiguë de l'enfant depuis la suppression de la codéine en 2013

- Travail de thèse de Mlle Florence VALEZY
- Soutenance réalisée le 07/11/2017

Etude d'un nouveau protocole de prise en charge des enfants suspects de présenter un accident vasculaire cérébral aux urgences pédiatriques de l'hôpital Nord à Saint Etienne.

- Travail de thèse de Mme Gaelle GOUSSE
- Soutenance réalisée le 09/03/2018

► Encadrement : Direction de mémoires du DIU d'urgences pédiatriques

Evaluation des représentations de la fièvre et des antipyrétiques chez les enfants par les parents consultants aux urgences pédiatriques du Chu de St Etienne en 2015 – Mme Florence VALEZY – 9 octobre 2016

Pratiques et intérêt du dosage de la procalcitonine chez le nourrisson de moins de 3 mois aux urgences pédiatriques – Mme Marion PHILLIT – 9 octobre 2016

Intoxications pédiatriques accidentelles au cannabis : série de cas dans les hôpitaux de St Etienne, Roanne et Annonay – Mme Louise MEUGNIER – 18 octobre 2016

Questions sur la présence des parents pendant les prises de sang ou pose de VVP au service des Urgences Pédiatriques : Le vécu des patients – Mlle Pauline BAILLY – 18 octobre 2016

Questions sur la présence des parents pendant les prises de sang ou pose de VVP au service des Urgences Pédiatriques : Vécu de l'équipe infirmière – Mlle Justine BONVENTRE – 5 mai 2017

Evaluation de la douleur chez les enfants ayant reçu un antalgique de palier 3 aux urgences pédiatriques – Mr Jean-Charles SULTANA – 5 mai 2017

Prise en charge des acidocétoses aigue révélant un diabète aux urgences pédiatriques du CHU de Saint Etienne – Mr Loïc GUINET – 5 octobre 2017

Prise en charge du syndrome d'entérocolite induite par les protéines alimentaires aux urgences pédiatriques du CHU de Saint Etienne – Mlle Vanessa BRUYERE – 5 octobre 2017

► Encadrement : Supervision d'autres travaux de mémoires

Impact de la mise en place de tests de diagnostic rapide des virus de la grippe A et B et du RSV aux urgences pédiatriques sur la prise en charge des patients – Mlle Marion COSTILLE – Mémoire de Master 1 – 09/2016

Evaluation de l'impact de l'utilisation de sufentanyl intranasal dans l'analgésie procédurale aux urgences pédiatriques – Mme Elona MALUKA – Mémoire de DIU de douleur et antalgie – 06/2017

Evaluation de l'impact d'un protocole court de prise en charge des pyélonéphrite aigues en ambulatoire après une dose unique d'aminoside. – Mme Louise TRIPODI – Mémoire de DIU de Néphrologie Pédiatrique – 06/2017

Hypnoanalgésie aux urgences pédiatriques : Quelle limites et intérêts lors de la consultation d'urgence ? – Mme Valérie RIEU – Mémoire de DIU d'hypnoanalgésie – 06/2016

Activité d'enseignement

► Diplômes

- 2015-2016 :** **Full Instructor** pour l'EPALS (ERC : *European Resuscitation Council*)
2014-2015 : « *Generic Instructor Course* » : Instructeur EPALS (RANP) pour l'ERC
2013 : RANP (Réanimation Avancée Néonatale et Pédiatrique, Formation EPALS - ERC)

► Formations extérieures

2016-en cours : Participation en tant qu'instructeur aux formations ERC EPALS à Lyon
 Deux à trois formations de deux jours pleins chaque année

2016-en cours : **Directeur des formations ARPS** (Atelier de réanimation pédiatrique de St Etienne)

6 à 12 journées de formations organisées par le service des urgences pédiatriques

- Formations sur la prise en charge de l'enfant gravement malade
- Formations aux IDE, aux internes, aux médecins de pédiatrie et du SAMU
- Ouverture 2019 aux hôpitaux de la région Loire
- Validant DPC sous le N° CHU de St Etienne

► **Formations universitaires**

2016-en cours : Enseignement au certificat optionnel de stratégie des examens complémentaires
8h de cours chaque année aux étudiants en médecine

2016-en cours : Co-Organisateur avec le Pr Patural des « Ateliers Arrêt Cardiaque Pédiatrique »
4x4h sur deux jours par an d'atelier sur l'ACR de l'enfant aux externes en médecine

2017-en cours : Cours au DIU national d'Accueil Médico-Chirurgical des Urgences Pédiatriques (10h par an)

2017-en cours : Membre de la commission pédagogique du DIU de Réanimation et urgences Pédiatriques

Le 30/11/2021

