



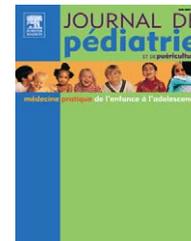
Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

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



Disponible en ligne sur
 ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
 EM|consulte
www.em-consulte.com



ARTICLE ORIGINAL

Marqueurs biologiques de gravité initiale des bronchiolites aiguës et d'évolution vers un asthme du nourrisson[☆]

Biological markers in acute bronchiolitis: Correlations with gravity and risk factors for asthma

E. Legru^a, O. Lees^{b,*}, M. Bubenheim^c, O. Boyer^b, C. Marguet^a

^a Service de pédiatrie médicale, CHU Charles-Nicolle, 1, rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France

^b Laboratoire d'immunopathologie clinique et expérimentale, CHU Charles-Nicolle, 1, rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France

^c Unité de biostatistiques, CHU Charles-Nicolle, 1, rue de Germont, 76031 Rouen cedex, France

MOTS CLÉS

Bronchiolite ;
VRS ;
Immunologie ;
Lymphocyte ;
Allergologie ;
Asthme

KEYWORDS

Bronchiolitis;

Résumé La bronchiolite aiguë est une infection virale respiratoire épidémique du nourrisson. Le virus respiratoire syncytial est l'agent infectieux le plus fréquent au cours des bronchiolites. D'autres virus sont retrouvés, seuls ou en co-infections virales. Ce travail est une étude dont le but est de rechercher un ou des marqueurs biologiques prédictifs de la gravité d'un épisode de bronchiolite aiguë et de l'évolution vers un asthme du nourrisson, dans le cadre du protocole Bronchiolite (PHRC 2000 n° 2000/020/HP), étude de cohorte, prospective, multicentrique, réalisée de novembre 2001 à janvier 2006. Sept centres ont participé : Rouen, Le Havre, Lille, Elbeuf, Evreux, Brest et Saint-Nazaire en association avec Nantes. Les données clinicobiologiques étaient recueillies au cours de l'hospitalisation initiale, puis lors des visites suivantes à un mois et à un an. Ainsi, 209 nourrissons âgés en moyenne de trois mois ont été suivis avec une évaluation de la gravité sur des critères cliniques. Les résultats de laboratoires ont été corrélés aux éléments de gravité pour les résultats suivants : identification virale, numération des leucocytes, lymphocytes et éosinophiles, étude en cytométrie en flux de populations lymphocytaires et allergologie incluant les IgE, l'*eosinophilic cationic protein* et test d'activation des basophiles. Les résultats de cette étude sont présentés et discutés.

© 2009 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Summary Acute bronchiolitis is an acute respiratory infection which commonly occurs in infancy. Respiratory syncytial virus is the major cause of lower respiratory tract infection. Some other virus may be found during co-infections. The aim of this study was to search for biological

[☆] Article paru précédemment dans la *Revue francophone des laboratoires* 2009;410:25–34..

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Olivier.Lees@chu-rouen.fr (O. Lees).

VRS;
Immunology;
Lymphocyte;
Allergology;
Asthma

markers correlated with gravity and risk factors for asthma and allergy. The follow-up was done during the multicenter and prospective study Bronchiolitis (PHRC 2000 No. 2000/020/HP), performed between November 2001 and January 2006, which included seven centers in France: Rouen, Le Havre, Lille, Elbeuf, Evreux, Brest and Saint-Nazaire associated with Nantes. Clinical and biological data were gathered during initial course, then at 1 month and 1 year. For the population of 209 infants, mean age was 3 months, the gravity was evaluated by scoring. The laboratory results correlated with clinical scoring were the following: viral evaluation, absolute numbers of leucocytes, lymphocytes and eosinophils, flow cytometry for sub-populations of lymphocytes, allergology including IgE, eosinophilic cationic protein, and basophil activation test. The results of the study are presented and discussed.

© 2009 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Abréviations

CD	cluster de différenciation
CMF	cytométrie en flux
ECP	<i>eosinophilic cationic protein</i>
Eo	polynucléaires éosinophiles
hMPV	<i>human metapneumovirus</i>
HLDA	<i>human leukocyte differentiation antigens</i>
Lc	lymphocytes
MFI	moyenne d'intensité de fluorescence
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PHRC	protocole hospitalier de recherche clinique
PMSI	programme de médicalisation des systèmes d'information
RT-PCR	<i>reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
RV	rhinovirus
TAB	tests d'activation des basophiles
VRS	virus respiratoire syncytial

Contexte scientifique et médical

La bronchiolite aiguë est une infection virale respiratoire épidémique du nourrisson. En France, on estime que 460 000 nourrissons (30 % de la population des nourrissons) sont touchés par cette infection, ce qui constitue un problème de santé publique. Il existe des pics hivernaux augmentant régulièrement d'une année à l'autre [1]. Cette augmentation est estimée à 9 % par an entre 1992 et 2000 [2]. Bien que la majorité des enfants soit prise en charge en ville, on observe un nombre grandissant de consultations à l'hôpital et d'hospitalisations. Ainsi, de novembre 2006 à avril 2007, 1221 enfants ont consulté aux urgences pédiatriques du CHU de Rouen en Haute-Normandie pour une bronchiolite aiguë, ce qui représente 13 % de l'ensemble des consultations médicales. Ce chiffre atteint 20 % lors du pic de fréquence de décembre et janvier (données PMSI). La conférence de consensus de 2000 [1] a établi des critères de gravité imposant une hospitalisation : âge inférieur à six semaines, prématurité inférieure à 34 semaines, cardiopathies sous-jacentes, pathologie pulmonaire chronique grave, aspect « toxique », survenue d'apnées, fréquence respiratoire supérieure à 60 minutes, saturation artérielle transcutanée en oxygène inférieure à 94 % sous air et au repos ou lors de la prise des biberons, troubles digestifs, difficultés psychosociales, présence d'un trouble de ventilation sur la radiographie thoracique [1]. On estime à environ 3 % la proportion de bronchiolites nécessitant une hospitalisation

[2]. Le taux de mortalité est moins bien connu. Il est estimé à deux pour 100 000 naissances vivantes aux États-Unis [3] et à 1,82 pour 100 000 en Grande-Bretagne [4].

Le VRS est l'agent infectieux le plus fréquent au cours des bronchiolites et retrouvé dans 60 à 90 % des cas [1]. D'autres virus sont retrouvés, seuls ou en co-infections virales. Un nombre limité de travaux a étudié des marqueurs biologiques associés à la gravité initiale de la bronchiolite ou de la survenue ultérieure d'un wheezing, épisodes sifflants respiratoires. Une dépression lymphocytaire est associée à la gravité [5]. D'autres publications plus récentes, présentées dans la discussion, concernent l'ECP et la survenue d'une hyperéosinophilie. Les rechutes des bronchiolites dans les deux premières années de vie concernent 23 à 60 % des enfants [1]. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude prospective de cohorte ayant recherché une corrélation entre l'étiologie virale d'une bronchiolite et l'évolution respiratoire chez le nourrisson.

Ce travail constitue la première étude ayant pour but de rechercher un ou des marqueurs biologiques prédictifs de la gravité d'un épisode de bronchiolite aiguë et de l'évolution vers un asthme du nourrisson, à partir de données cliniques et biologiques recueillies dans le cadre du protocole Bronchiolite (PHRC 2000 n° 2000/020/HP), étude de cohorte, prospective, multicentrique, réalisée de novembre 2001 à janvier 2006. Dans une cohorte de nourrissons présentant une bronchiolite, les objectifs sont de déterminer les marqueurs immunologiques et virologiques :

- de gravité initiale des bronchiolites aiguës du nourrisson et leur évolution au cours du temps ;
- d'évolution vers un asthme du nourrisson.

L'asthme du nourrisson est défini par une répétition de trois épisodes de bronchiolite ; 30 % de ces nourrissons ont un risque d'évolution vers un asthme de l'enfant.

Patients et méthodes

Protocole et éthique

Le protocole Bronchiolite PHRC 2000 n° 2000/020/HP a été soumis au Comité consultatif de protection des personnes dans la recherche biomédicale (CCPRB de Haute-Normandie). Un consentement écrit et éclairé a été signé par les parents. Ce travail s'appuie sur les données cliniques et biologiques recueillies de novembre 2001 à janvier 2006. Sept centres ont participé : Rouen, Le Havre, Lille, Elbeuf, Evreux, Brest et Saint-Nazaire.

Ce protocole comporte six visites cliniques (V1 à V6). Les données biologiques étaient recueillies lors des visites suivantes et ont été retenues dans notre étude :

- V1 : à l'inclusion pendant l'hospitalisation ;
- V3 : visite à un mois (plus ou moins huit jours) de l'épisode respiratoire ;
- V6 : visite à un an, entre neuf et 12 mois après l'hospitalisation.

Patients

Critères d'inclusion

- population homogène âgée de 15 jours à un an ;
- premier épisode de bronchiolite aiguë hospitalisée ;
- bronchiolite aiguë du nourrisson définie selon les critères suivants :
 - affection respiratoire aiguë avec polypnée,
 - distension radiologique,
 - présence à l'auscultation de sous-crépitations ou de sibilants,
 - survenue dans un contexte épidémique de bronchiolite.

Critères d'exclusion

- enfant participant à un autre protocole ;
- antécédent de bronchiolite ou de dysplasie bronchopulmonaire ;
- traitement de fond par corticoïdes inhalés ou corticoïdes par voie orale ;
- pathologie de co-morbidité sévère : cardiopathie congénitale, mucoviscidose, déficit immunitaire congénitale ou acquis...

Traitement reçu lors de l'hospitalisation

Les nourrissons ont bénéficié d'un traitement reposant sur les données actuelles disponibles pour le traitement de la bronchiolite aiguë du nourrisson : kinésithérapie respiratoire et traitements symptomatiques (bronchodilatateurs). Les corticoïdes oraux ou injectables (prednisone

ou prednisolone, 1 à 2 mg/kg par jour en deux fois) étaient prescrits dans les formes graves mettant en jeu le pronostic vital.

Méthodes

Déroulement de l'étude pendant l'hospitalisation (V1)

Données cliniques – éléments de gravité. Les données cliniques ont été recueillies par questionnaires et dossiers standardisés. Les critères de gravité retenus dans notre étude sont présentés dans le [Tableau 1](#).

Les scores I, II et III ont été déterminés de façon quotidienne et le nourrisson classifié à la fin de l'hospitalisation, afin de tenir compte des aggravations constatées en cours d'hospitalisation. Le score III correspond à la somme des scores I et II ; le score III maximum (valeur la plus élevée au cours du séjour) a été retenu pour les corrélations et études statistiques. D'autres éléments de gravité ont été pris en compte au cours de l'étude : la durée d'oxygénodépendance et d'hospitalisation.

Les critères de sortie pour la bronchiolite étaient : fréquence respiratoire normalisée, SaO₂ supérieure ou égale 95 %, mode d'alimentation normalisée supérieure ou égale à 24 heures et absence de complications directement liées à la bronchiolite aiguë ou à l'agent infectieux responsable de celle-ci. Si l'hospitalisation était prolongée pour des raisons indépendantes de l'évolution de la bronchiolite (survenue d'une gastroentérite, par exemple), cette durée n'était pas prise en compte.

Virologie. Les prélèvements, obtenus par aspirations pharyngées ont été rapidement transportés en flacon stérile à 4 °C dans les laboratoires de virologie de différents centres. Les virus suivants ont été recherchés par immunofluorescence (anticorps monoclonaux Imagen[®], Dako) : VRS, adénovirus, myxovirus influenzae de type A et B, para-influenzae de type 1, 2 et 3.

Pour les centres de Rouen, Caen, Elbeuf, Lille et Le Havre, un test de RT-PCR (multiplex) a été réalisé dans un second temps dans le service du Pr Freymuth à Caen. Il est maintenant bien démontré que la PCR est une technique très

Tableau 1 Scores de gravité clinique et radiologique.

Mettre une croix dans l'item retenu	0 : aucun	1 : visible	2 : marquée
Tirage intercostal			
Entonnoir xyphoïdien			
Balance thoraco-abdominale			
Battements des ailes du nez			
Score I : ___			
Entourer l'item retenu	0	1	2
Sibilants	Aucun	Expiratoire	Expiratoire et inspiratoire ou MV absent
Rapport I/E	I > E	I = E	I < E
Réactivité	Normale	Fatigue	Aréactif ou mauvaise impression clinique
Alimentation	Non perturbée ou fractionnée	Entérale (sonde)	Parentérale
Radiothorax (facultative)	Arcs costaux ≤ 8 et RCT ≥ 0,5	9–10 et RCT ≥ 0,5	10 ou RCT < 0,5
Score II : ___			
Scores I + II = score III = ___			

sensible (94,6 %) et très spécifique (100 %) pour la détection des virus respiratoires [6]. Le métapneumovirus (hMPV), l'entérovirus, le RV et le coronavirus ont été recherchés par cette technique.

Prélèvements sanguins. Ils ont été réalisés après pose d'un anesthésique local (Emla[®] patch) avec une épicroânienne.

Hématologie. La numération formule sanguine a été recueillie sur tube EDTA (volume de 1 ml). Les nombres absolus des Lc et des éosinophiles ont été calculés à partir du nombre de globules blancs de la numération formule sanguine.

Phénotypage lymphocytaire. L'immunophénotypage a été effectué en cytofluorométrie. Les prélèvements ont été réalisés sur tube EDTA pédiatrique (volume de 2 ml) et transportés rapidement à température ambiante au laboratoire d'immunologie. Des quadruples marquages ont été réalisés par immunophénotypage par cytométrie de flux (cytomètre Elite, Beckman Coulter). Cent microlitres de sang étaient mélangés aux anticorps monoclonaux et incubés pendant 20 minutes. Une lyse automatique était réalisée, ainsi qu'un lavage en PBS 1X pour les marquages CD3/4/DR/45 et CD19/23/86/45 avec une centrifugation de cinq minutes à 2000 tours par minute.

Les multimarquages du protocole ont été effectués sur les tubes suivants :

- CD45 isothiocyanate de fluorescéine (FITC), CD4 phycoérythrine (PE), CD8 tandem phycoérythrine/texas red (ECD), CD3 tandem phycoérythrine/cyanine 5 (PC5) ;
- CD23 FITC, CD86 PE, CD19 ECD, CD45 PC5 ;
- HLA-DR FITC, CD4 PE, CD3 ECD, CD45 PC5.

Les populations lymphocytaires identifiées par les CD correspondent aux antigènes de différenciation leucocytaires humains répertoriés dans les ateliers de nomenclature HLDA [7,8]. Au cours de ce protocole, les populations suivantes ont été étudiées :

- Lc T CD3+ : CD3 est un complexe multimoléculaire associé au récepteur T pour l'antigène (TcR) et joue un rôle majeur dans la transduction du signal. Il est strictement spécifique de la lignée T ;
- Lc T CD3+HLA-DR+ : HLA-DR est une molécule HLA de classe II exprimée par les cellules présentatrices de l'antigène mais aussi par les Lc T activés ;
- Lc T CD4+ : CD4 appartient à la superfamille des immunoglobulines. C'est un corécepteur de signalisation et d'adhésion dans l'activation par l'antigène des Lc T restreints par le CMH de classe II. CD4 est exprimé par les Lc T restreints par le CMH de classe II, les monocytes, les macrophages et une sous-population de thymocytes ;
- Lc T CD8+ : CD8 appartient à la superfamille des immunoglobulines. C'est un corécepteur de signalisation et d'adhésion dans l'activation par l'antigène des Lc T restreints par le CMH de classe I. CD8 est exprimé par les Lc T restreints par le CMH de classe I et une sous-population de thymocytes ;
- Lc B CD19+ : CD19 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines. CD19 est exprimé précocement sur les cellules progénitrices hématopoïétiques humaines et persiste à la surface des

Lc B tout au long de leur maturation et activation, jusqu'au stade plasmocytaire où il disparaît ;

- Lc B CD19+CD86+ : CD86 appartient à la superfamille des immunoglobulines. C'est une molécule de co-stimulation pour l'activation des Lc T (ligand de CD28). Elle est exprimée par les Lc B activés, les monocytes, les cellules dendritiques et certains Lc T ;
- Lc B CD19+CD23+ : CD23, aussi appelé FcεRIIb, est un récepteur de faible affinité pour les immunoglobulines de classe IgE. Il jouerait un rôle important dans la régulation de la synthèse des IgE et serait aussi capable d'activer la synthèse de cytokines par les monocytes ;
- le CD45 est le marqueur principal des cellules des lignées hématopoïétiques.

Allergologie. Chez l'enfant de moins de deux ans, les immunoglobulines de classe IgE sont intéressantes dans le diagnostic de maladie allergique. Le prélèvement des IgE totales a été réalisé sur tube neutre pédiatrique. Elles ont été dosées par la méthode UniCAP System[®] (Phadia). Il existe une variation physiologique de leur taux en fonction de l'âge.

L'ECP, protéine cytotoxique sécrétée par les éosinophiles activés, a été prélevée sur tube gélose et silicone (volume de 1 ml). La méthode UniCAP System[®] a été utilisée pour le dosage.

Le test d'activation des basophiles ou TAB est une méthode biologique en allergologie, effectuée en CMF, qui permet d'appréhender le mécanisme cellulaire de l'hypersensibilité immédiate IgE dépendante. Le TAB repose sur l'étude de marqueurs antigéniques membranaires, surexprimés sur les basophiles activés lors des réactions IgE dépendantes. Le TAB utilisé a été le « Kit Allergenicity » (Beckman Coulter). Il étudie la surexpression du marqueur CD203c présent sur les basophiles en CMF [9]. Les résultats peuvent être exprimés en pourcentage de basophiles positifs à partir d'un seuil, ou mieux en relevant le canal moyen d'intensité de fluorescence (MFI) sur l'ensemble des basophiles. Le résultat du TAB était significatif quand le rapport de MFI des échantillons avec anti-IgE ou allergène sur témoin négatif était supérieur à deux (index *i*) et/ou si le pourcentage de cellules CD203c positives atteignait plus de 20 % [10].

Déroulement de l'essai après la sortie de l'hospitalisation (V3–V6)

Recueil des données cliniques. Les données cliniques ont été recueillies de façon prospective, grâce à un carnet de surveillance remis à la fin de l'hospitalisation ou à la fin de l'épisode de bronchiolite aiguë si l'hospitalisation était prolongée pour des raisons indépendantes de l'évolution de la bronchiolite. Un examen clinique complet a été réalisé aux différentes visites. Le médecin devait, à la fin de chaque visite, classer l'enfant en « guéri », « peu symptomatique » ou « nécessitant un traitement de fond ». Les paramètres cliniques suivants ont été retenus dans notre étude : nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques, avis du médecin.

Définitions cliniques. Le diagnostic de « rechute » était posé devant l'apparition d'un wheezing, d'une toux irritative à prédominance nocturne ou d'une gêne respiratoire pendant plus de trois jours consécutifs associée à la nécessité de prendre des β₂ mimétiques de courte durée d'action. Le

diagnostic de « période symptomatique » était posé devant la survenue de symptômes (wheezing, toux, dyspnée), au repos ou à l'effort, pendant plus de sept jours consécutifs. Le diagnostic d'asthme du nourrisson était posé à la seconde rechute ou à la seconde période symptomatique après l'épisode respiratoire initial.

Prélèvements sanguins. Ils ont été réalisés de la même façon que précédemment (hospitalisation V1).

Tests statistiques

Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative pour l'interprétation des résultats. Le test de Mann-Whitney a été utilisé pour comparer l'âge des enfants et la gravité clinique des bronchiolites en fonction de l'étiologie virale. Le test de

Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer l'évolution respiratoire en fonction de l'étiologie virale. Le test de Wilcoxon a été utilisé pour comparer la biologie en fonction du temps. Le test de Spearman a été utilisé pour comparer la biologie en V1 en fonction de la gravité initiale des bronchiolites et la biologie en V1, V3 et V6 en fonction du nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques en V3 et V6. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour comparer la biologie en V1, V3 et V6 en fonction de l'avis du médecin en V3 et V6.

Résultats

Population

Deux cent neuf nourrissons ont été inclus en V1, âgés de 3,1 mois ($\pm 2,1$ mois). Le sex-ratio (H/F) était de 1,3. Cent

Tableau 2 Caractéristiques de la population.

Caractéristiques des patients		<i>n</i>	%	
Sexe masculin/sex féminin		118/91	56,5/43,5	
Antécédent d'atopie ^a familiale/atopie ^a personnelle		142/48	67,9/23,0	
Antécédent de prématurité ^b		12	5,7	
Tabagisme passif		128	61,2	
Virus seuls ou co-infectés	VRS	134	64,1	
	RV	56	26,8	
	hMPV	16	7,6	
	Autres virus ^c	16	7,6	
Virus seuls	VRS	95	45,4	
	RV	15	7,2	
	hMPV	8	3,8	
	Autres virus ^d	4	2,0	
Co-infections virales	VRS/RV	34	16,3	
	VRS/hMPV	3	1,4	
	hMPV/RV	5	2,4	
	Autres co-infections ^e	9	4,3	
Gravité clinique		Médianes	95 % CI	
V1 – Hospitalisation initiale	Score III maximum	5	4–7	
	SaO ₂ minimum (%)	95	92–97	
	Durée d'O ₂ (j)	1	0–3	
	Durée d'hospitalisation (j)	5	3,75–7	
Évolution respiratoire		<i>n</i>	%	
V3 – Visite à un mois	Avis médecin	Guéri	103	63,2
		Peu symptomatique	38	23,3
		Traitement de fond	22	13,5
	Rechutes et/ou périodes symptomatiques	Oui	30	27,0
		Non	81	73,0
V6 – Visite à un an	Avis médecin	Guéri	58	61,7
		Peu symptomatique	18	19,1
		Traitement de fond	18	19,1
	Rechutes et/ou périodes symptomatiques	Oui	16	26,3
		Non	45	73,8

^a Asthme, rhinite allergique ou dermatite atopique.

^b Moins de 37 SA.

^c Entérovirus, coronavirus, myxovirus influenzae de type A, myxovirus para-influenzae de type 1, myxovirus para-influenzae de type 3.

^d Myxovirus influenzae de type A, myxovirus para-influenzae de type 1, myxovirus para-influenzae de type 3.

^e VRS/coronavirus, VRS/entérovirus, VRS/RV/entérovirus, VRS/RV/myxovirus influenzae de type A.

Tableau 3 Évolution des paramètres hématologiques en fonction du temps.

	Valeurs normales	V1	V3	V6	V1/V3	V3/V6
N GB	9,0 (6,4–11,0)	12,010	12,514	11,287	NS	NS
% Eo		1,24	2,95	2,63	$p < 0,001$	NS
N Eo		0,153	0,365	0,311	$p < 0,001$	NS
% Lc		54,09	63,23	54,93	$p < 0,0001$	$p < 0,01$
N Lc	4,1 (2,7–5,4)	6,390	7,847	6,140	$p < 0,0001$	$p < 0,001$

soixante-quatre enfants (78,5 %) ont été suivis en V3 ($4,3 \pm 2,1$ mois) et 98 (46,9 %) en V6 ($14,3 \pm 2,4$ mois). Les caractéristiques des patients en V1 sont présentées dans le **Tableau 2**.

Une étiologie virale a été retrouvée dans 94,7 % des cas, 134 prélèvements (64,1 %) étaient positifs pour le VRS ; les autres virus et co-infections sont décrits dans le **Tableau 2**.

Les effectifs concernant les éléments de gravité figurent dans la deuxième partie du **Tableau 2** :

- 90 % des enfants ont présenté une bronchiolite de forme modérée, avec un score III maximum médian de 5 ; 10 % ont présenté une forme grave avec un score III maximum supérieur à 7 ;
- les deux tiers ont été hospitalisés moins de six jours ;
- la moitié a eu besoin d'oxygénothérapie ;
- un quart des enfants suivis ont rechuté à un mois et un an de l'épisode initial ;
- 13,5 % ont présenté un asthme du nourrisson à un mois et près de 20 % à un an.

Biologie

Hématologie

Hématologie en fonction du temps. Il existe une augmentation significative des éosinophiles et des Lc sanguins un mois après l'épisode respiratoire avec, pour les Lc sanguins, un retour aux valeurs retrouvées au moment de l'épisode respiratoire à un an. Les résultats significatifs sont présentés dans le **Tableau 3**.

Hématologie à V1 et gravité initiale. Les nombres d'éosinophiles et de Lc sanguins sont inversement corrélés aux scores cliniques maximums (II et III pour les éosinophiles, I, II et III pour les Lc) et à la durée de l'oxygénothérapie (**Tableau 4a**).

Hématologie et évolution respiratoire. Il existe à un mois de l'épisode initial, une corrélation entre le nombre absolu de globules blancs et de Lc et une évolution respiratoire défavorable (**Tableau 4b**).

Phénotypage lymphocytaire

Phénotypage lymphocytaire en fonction du temps. Il existe une augmentation significative des Lc T, des Lc T CD4+, des Lc T CD8+, des Lc T activés et des Lc T CD4+ à un mois puis une diminution, pour les Lc T et les Lc T CD4+ à un an (**Tableau 5**). Le rapport CD4+/CD8+ diminue à un mois et à un an. Il existe également une augmentation significative des Lc B et des Lc B CD23+ à un mois et un retour aux valeurs retrouvées au moment de l'épisode respiratoire pour les Lc B à un an.

Phénotypage lymphocytaire à V1 et gravité initiale. Les Lc T CD8+, T activés et T CD4+ activés sont inversement corrélés à la gravité clinique (scores I, II et III, durées d'oxygénothérapie et d'hospitalisation). Les nombres absolus de Lc T sont inversement corrélés aux scores cliniques (I, II et III), les nombres absolus de Lc T CD4+ et de Lc B activés sont inversement corrélés aux scores III maximum (**Tableau 6**).

Phénotypage comparé selon le groupe du score de gravité. Il a semblé intéressant de comparer les résultats d'immunologie en regroupant les enfants dans un groupe de gravité initiale faible ou élevée. La médiane du score de gravité III maximum observé lors de l'hospitalisation initiale (V1) est de 5, ce qui a été décrit dans les caractéristiques de la population. Les résultats présentés dans le **Tableau 7** mettent en évidence des diminutions significatives dans le groupe de gravité élevée, des sous-populations des Lc T en V1 (hospitalisation initiale). Certaines sous-populations B CD19+ sont alors augmentées. Il n'apparaît pas de différences significatives en V3, à un mois après l'épisode initial. Le suivi à un an (V6) montre qu'il existe moins de différences entre les deux groupes que ce qui est observé en hospitalisation initiale, mais portant sur les mêmes sous-populations. À cette date, le nombre d'éosinophiles sanguins a diminué.

Phénotypage lymphocytaire et évolution respiratoire. Les nombres absolus de Lc T activés, de Lc T CD4+ activés, de Lc B et de la sous-population CD19+CD23+ à V1 sont corrélés aux nombres de rechutes et/ou de périodes symptomatiques à

Tableau 4a Gravité clinique en fonction des données hématologiques.

	Score III	Oxygénothérapie (j)	Hospitalisation (j)
N GB V1 (G/l)	NS	NS	NS
N Eo V1 (G/l)	$p < 0,05$	$p < 0,01$	NS
N Lc V1 (G/l)	$p < 0,01$	$p < 0,05$	NS

Tableau 4b Évolution respiratoire à V3 en fonction des données hématologiques à V3.

	Avis du médecin V3	Nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques V3
N GB V3 (G/l)	$p < 0,01$	$p < 0,02$
N Eo V3 (G/l)	NS	NS
N Lc V3 (G/l)	$p < 0,02$	$p = 0,09$

Tableau 5 Évolution des paramètres du phénotypage lymphocytaire en fonction du temps.

% N (nb absolu G/L)	Valeurs normales		V1	V3	V6	V1/V3	V3/V6
	< 1 an	1–6 ans					
% CD3+			65,32	62,64	64,46	$p < 0,05$	NS
N CD3+	2,5(1,7–3,6)	2,5(1,8–3,0)	4,268	4,910	3,917	$p < 0,01$	$p < 0,01$
% CD3+CD4+			49,53	46,009	43,07	$p < 0,001$	$p < 0,01$
N CD3+CD4+	2,2(1,7–2,8)	1,6(1,0–1,8)	3,243	3,609	2,631	$p < 0,02$	$p < 0,0001$
% CD3+CD8+			13,44	13,96	16,25	$p < 0,002$	$p < 0,001$
N CD3+CD8+	0,9(0,8–1,2)	0,9(0,8–1,5)	0,874	1,084	0,986	$p < 0,001$	NS
Rapport CD4+/CD8+	1,9(1,5–2,9)	1,3(1,0–1,6)	4,402	3,836	3,172	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$
% CD3+DR+			1,49	1,42	2,04	NS	$p < 0,0001$
N CD3+DR+	7,5(4,0–9,0)	9,0(6,0–16,0)	0,085	0,116	0,122	$p < 0,01$	NS
% CD3+CD4+DR+			0,82	0,70	0,82	$p < 0,05$	NS
N CD3+CD4+DR+			0,044	0,056	0,048	$p < 0,01$	NS
% CD19+			22,98	25,80	26,08	$p < 0,01$	NS
N CD19+	0,9(0,5–1,5)	0,9(0,7–1,3)	1,470	2,037	1,602	$p < 0,0001$	$p < 0,001$
% CD19+CD86+			0,68	0,61	0,80	NS	NS
N CD19+CD86+			0,047	0,050	0,056	NS	NS
% CD19+CD23+			10,86	14,63	16,66	$p < 0,0001$	$p < 0,05$
N CD19+CD23+			0,710	1,153	1,020	$p < 0,0001$	NS

Tableau 6 Gravité clinique en fonction du phénotypage lymphocytaire.

	Scores III	Oxygénothérapie (j)	Hospitalisation (j)
N CD3+ V1 (G/l)	$p < 0,02$	NS	NS
N CD3+CD4+ V1 (G/l)	$p < 0,05$	NS	NS
N CD3+CD8+ V1 (G/l)	$p < 0,01$	$p < 0,05$	$p < 0,01$
Rapport CD4+/CD8+ V1	NS	NS	NS
N CD3+DR+ V1 (G/l)	$p < 0,001$	NS	NS
N CD3+CD4+DR+ V1 (G/l)	$p < 0,0001$	$p < 0,02$	$p < 0,05$
N CD19+ V1 (G/l)	NS	NS	NS
NCD19+CD86+ V1 (G/l)	$p < 0,05$	NS	NS
N CD19+CD23+ V1 (G/l)	NS	NS	NS

V3. Il existe également une corrélation entre l'avis du médecin à un mois et les nombres absolus de Lc B activés et la sous-population CD19 + CD23+. On ne retrouve pas de corrélation entre les données du phénotypage lymphocytaire et l'évolution respiratoire à un an. À un mois, il existe également une corrélation entre les nombres absolus de Lc T activés, de Lc B CD23+ et une évolution respiratoire défavorable. Les nombres absolus des Lc T et B sont corrélés à l'avis du médecin (Tableau 8).

Allergologie

Allergologie en fonction du temps. Il existe une augmentation significative de la médiane des IgE totales entre un mois et un an après l'épisode respiratoire. La valeur normale est inférieure à 0,1 UI/mL ; pour l'ensemble des nourrissons suivis, les valeurs initiales de 2 UI/ml observées passent à 2,5 UI/ml ($p < 0,001$). Nous ne retrouvons pas de différence significative pour le taux d'ECP. Il existe une augmentation significative de l'index de MFI des basophiles à un mois ($i = 2,11$) comparé à la valeur initiale ($i = 1,68$) ; les valeurs à un an ($i = 1,97$) correspondent à un retour vers la normale. Les pourcentages de basophiles CD203+ globaux ou activés montrent une tendance identique au cours du temps, mais de façon non significative.

Allergologie à V1 et gravité initiale. On ne retrouve pas de corrélation entre les taux d'IgE totales et d'ECP et la gravité clinique des bronchiolites. Il existe une corrélation inverse entre le nombre absolu de basophiles CD203+ et la durée de l'oxygénothérapie.

Allergologie et évolution respiratoire. On ne retrouve pas de corrélation entre le taux d'IgE totales et de l'ECP et l'évolution respiratoire à un mois et à un an. Il existe une corrélation entre le nombre absolu de basophiles CD203+ et le nombre absolu de rechutes et/ou de périodes symptomatiques à un an (Tableau 9). À un mois, il existe une corrélation inverse entre le pourcentage de basophiles CD203+ et l'avis du médecin.

Virologie

Virologie et gravité initiale

Gravité de la bronchiolite en fonction de la présence ou non des trois principaux virus : VRS, RV et hMPV. Les enfants porteurs d'un VRS présentent une bronchiolite plus grave par rapport aux non porteurs, avec un score clinique significativement augmenté et des durées d'oxygénothérapie et d'hospitalisation plus longues. Au contraire, le RV est associé

Tableau 7 Comparaison des résultats de l'immunologie entre groupes de gravité faible et de gravité élevée.

Groupe - Score III < ou > 5	Gravité faible		Gravité élevée		p
	Score III max < 5	N	Score III max > 5	N	
Observations en V1					
Phénotype	Moyennes	N	Moyennes	N	p
Immunologie des bronchiolites					
GB	12,863	84	11,151	80	< 0,01
% Lc	57,086	82	51,089	79	< 0,01
N Lc	7,127	87	5,692	89	< 0,001
N CD3+	4,765	82	3,777	83	< 0,01
N CD3+CD4+	3,634	82	2,858	83	< 0,01
N CD3+CD8+	0,972	82	0,777	83	< 0,02
N CD3+DR+	0,101	77	0,069	74	< 0,02
N CD3+CD4+DR+	0,053	81	0,034	82	< 0,001
N CD19+	1,609	82	1,333	83	< 0,05
% CD19+CD86+	0,866	88	0,476	84	< 0,05
N CD19+CD86+	0,066	82	0,027	81	< 0,02
Observations en V6					
Phénotype	Moyennes	N	Moyennes	N	p
N Eo	0,421	40	0,265	43	< 0,05
% Lc	59,348	40	52,302	43	< 0,02
N Lc	7,650	43	5,888	49	< 0,01
N CD3+	4,927	43	3,798	47	< 0,01
N CD3+CD4+	3,341	43	2,545	47	< 0,01
N CD3+CD8+	1,287	43	0,955	47	< 0,01
N CD3+CD4+DR+	0,068	43	0,045	46	< 0,01
N CD19+CD23+	1,175	43	0,949	47	< 0,05

à une gravité clinique moindre des bronchiolites avec un score de détresse respiratoire (score I maximum) plus faible et une durée d'hospitalisation plus courte. Nous n'avons pas non plus mis en évidence de différence significative concernant la gravité clinique en fonction de la présence ou non de l'hMPV (Tableau 10).

Co-infections virales VRS–RV et RV–hMPV. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative concernant

la gravité clinique entre les enfants présentant une bronchiolite à VRS seul et une bronchiolite co-infectée VRS–RV sauf pour la durée d'hospitalisation qui est significativement plus longue pour les bronchiolites à VRS seul (6,46 jours versus 5,24 jours). Compte tenu du faible nombre d'enfants co-infectés VRS–hMPV (trois enfants), nous ne pouvons pas réaliser d'études statistiques. Nous n'avons pas mis en évidence de différence significative concernant la gravité clinique entre les enfants présentant une bronchiolite à RV seul et une bronchiolite co-infectée RV–hPMV.

Tableau 8 Évolution respiratoire en fonction du phénotype lymphocytaire.

	Avis du médecin V3	Nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques V3
N CD3+DR+ V1 (G/l)	0,06	p < 0,05
N CD3+CD4+DR+ V1 (G/l)	NS	p < 0,01
N CD19+ V1 (G/l)	0,06	p < 0,05
NCD19+CD86+ V1 (G/l)	p < 0,01	0,09
N CD19+CD23+ V1 (G/l)	p < 0,05	p < 0,01
N CD3+ V3 (G/l)	p < 0,05	NS
N CD3+CD8+ V3 (G/l)	p = 0,05	p = 0,07
N CD3+DR+ V3 (G/l)	p < 0,01	p < 0,05
N CD3+CD4+DR+ V3(G/l)	NS	p = 0,07
N CD19+ V3 (G/l)	p < 0,02	NS
NCD19+CD86+ V3 (G/l)	p = 0,06	p = 0,08
N CD19+CD23+ V3 (G/l)	p < 0,02	p < 0,05

Virologie et biologie

Lors de l'épisode initial, on observe une augmentation importante des populations lymphocytaires T comparées aux valeurs normales ; cela concerne les nombres absolus des Lc, des Lc T CD3+, des Lc T CD4+ et CD8+. Cette augmentation est plus importante quand l'infection n'est pas due au VRS (Tableau 11).

Virologie et évolution respiratoire

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative concernant l'évolution respiratoire à un mois et à un an en fonction du virus responsable seul ou co-infecté.

Discussion

La particularité de notre travail est le jeune âge des nourrissons inclus (moyenne de 3,3 mois) à la différence des

Tableau 9 Évolution respiratoire en fonction du test d'activation des basophiles.

	Avis du médecin V6	Nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques V6
CD203 + Baso V1 (%)	NS	$p < 0,05$
CD203 + Baso activés V1 (%)	NS	$p = 0,07$
	Avis du médecin V3	Nombre de rechutes et/ou de périodes symptomatiques V3
CD203 + Baso V3 (%)	$p < 0,05$	NS
CD203 + Baso activés V3 (%)	$p = 0,09$	NS

Tableau 10 Gravité clinique en fonction du VRS, du RV et de l'hMPV seul ou co-infecté.

Critères cliniques	VRS = oui	VRS = non	p	RV = oui	RV = non	p	hMPV = oui	hMPV = non	p
	$n = 134$	$n = 47$		$n = 56$	$n = 125$		$n = 16$	$n = 165$	
Score III	6 (4–7)	5 (3–6)	$< 0,01$	5 (4–6,5)	5,5 (4–7)	NS	5 (3,5–7)	5 (4–7)	NS
O ₂ (j)	2 (0–3)	0 (0–2)	$< 0,01$	1 (0–3)	1 (0–3)	NS	0,5 (0–4)	1 (0–3)	NS
Hospit (j)	6 (4–8)	4 (3–5)	$< 0,0001$	4 (3–6)	6 (4–8)	$< 0,01$	4 (3–7,5)	5 (4–7)	NS

Score III : score III maximum ; O₂ : durée d'oxygénothérapie ; Hospit : durée d'hospitalisation.

Les données présentées sont les médianes, celles entre parenthèses sont les 25^e et 75^e percentiles.

autres cohortes déjà publiées. Nous observons la classique prédominance de garçons atteints de bronchiolite aiguë (sex-ratio : 1,3).

Les études ayant recherché des marqueurs biologiques prédictifs de la gravité initiale de la bronchiolite ou de la survenue ultérieure d'un wheezing sont anciennes. Bont et al. [5] ont observé qu'une dépression lymphocytaire était associée à la gravité de l'épisode infectieux. Nos observations multicentriques montrent que les pourcentages et nombres absolus de Lc et d'éosinophiles sont augmentés et inversement corrélés aux scores de gravité. Certaines sous-populations lymphocytaires sont plus impliquées : variations des Lc CD4+ et CD8+, augmentation des Lc B CD19+CD23+. Les augmentations sont plus fortes dans le groupe de gravité faible que de gravité élevée.

Les modifications allergologiques se traduisent par une augmentation du taux des IgE et des basophiles. Deux études publiées en 1997 ont montré qu'un taux élevé d'ECP pendant l'épisode de bronchiolite aiguë était associé à un risque ultérieur de wheezing à 16 semaines et à un an [11,12]. Deux études plus récentes ont montré qu'au cours d'une bronchiolite à VRS, une hyperéosinophilie [13] ou une augmenta-

tion du taux de l'ECP [14] était associée à un risque de wheezing aux âges respectifs de sept et cinq ans. Piippo-Savolainen et al. [15] ont montré que ce risque existait en présence d'une hyperéosinophilie non pas pendant, mais après l'épisode infectieux.

Les trois principaux virus retrouvés au cours de notre étude sont le VRS dans 64 % des cas, le RV dans 26,8 % des cas et l'hMPV dans 7,6 % des cas. Nous avons une excellente sensibilité de détection virale (94,7 %) grâce à l'apport de la PCR. Le VRS induit une forme plus grave de bronchiolite, se traduisant par un score III maximum plus élevé, une durée d'hospitalisation initiale plus longue et une nécessité d'oxygénothérapie. Le VRS est l'agent infectieux principal des bronchiolites hivernales, en cause dans 60 à 90 % des cas [1]. Dans une étude réalisée en Grande-Bretagne [16], le taux de mortalité des enfants âgés d'un à 12 mois attribuable au VRS en période hivernale était estimé à 2,9 pour 100 000 pour les causes respiratoires. Les autres virus responsables sont le virus para-influenzae en cause dans 5 à 20 % des cas [1], le virus influenzae et, plus récemment, grâce à l'amélioration des techniques de détection virale, le RV retrouvé dans 15 à 30 % des cas environ [17–19], le métapneumovirus (hMPV) retrouvé dans 6 à 16 % des cas [18–21], l'entérovirus et le coronavirus. Les co-infections virales sont fréquentes au cours des bronchiolites, 20 % à près de 30 % des cas, avec notamment la présence de co-infections VRS–RV ou VRS–hMPV [17,18]. La relation entre la gravité des bronchiolites aiguës et le virus responsable est discutée. Pour certains auteurs, la gravité clinique des bronchiolites à VRS et à RV [22] ou des bronchiolites à VRS et à hMPV [18,20] est identique. Cependant, dans l'étude de Korppi et al. [22], le VRS touche des enfants plus jeunes et cette préférence du VRS pour les petits nourrissons expliquerait l'augmentation de la gravité [23]. Van den Hoogen et al. [24] observent que les infections à hMPV sont moins graves que celles à VRS. Le RV est associé à une augmentation de la gravité de la maladie dans une étude [17] et à une diminution de la durée de la maladie dans une autre [19]. Le rôle des co-infections dans la gravité de l'épisode infectieux est tout aussi discuté. Pour

Tableau 11 Biologie en fonction de la positivité ou non du VRS.

Virus	Valeurs normales	VRS = oui	VRS = non	p
N Lc	4,1 (2,7–5,4)	6,088	8,007	$p < 0,05$
% CD3+		64,94	66,85	NS
N CD3+ (G/l)	2,5 (1,7–3,6)	4,041	5,404	$p < 0,01$
% CD3+CD4+		49,57	49,60	NS
N CD3+CD4+ (G/l)	2,2 (1,7–2,8)	3,092	4,046	$p < 0,02$
% CD3+CD8+		12,98	14,36	NS
N CD3+CD8+ (G/l)	0,9 (0,8–1,2)	0,808	1,138	$p < 0,01$

certain auteurs, la co-infection de l'hMPV avec le VRS n'aggrave pas les bronchiolites à hMPV [18]. À l'inverse, une co-infection VRS-hMPV est associée à une augmentation de la gravité [25,26] ou de la durée de la bronchiolite à VRS [27].

Les études concernant le risque ultérieur de wheezing aux âges préscolaires et scolaires, en fonction de l'étiologie virale de la bronchiolite aiguë, sont nombreuses. Ce risque a été bien démontré après la survenue d'une bronchiolite à VRS [28–34] et semble exister après la survenue d'une bronchiolite à RV [11,35,36]. Une étude l'a mis en évidence après une bronchiolite à hMPV [34]. La gravité de l'épisode initial serait également associée au risque ultérieur de wheezing [33,36].

Conclusion

Une importante cohorte de nourrissons, hospitalisés pour une bronchiolite aiguë, a été suivie dans le cadre d'un protocole multicentrique. À partir de l'hospitalisation initiale, les données cliniques ont pu être regroupées pour établir les éléments de gravité, regroupés en scores. Une étude virologique très complète concerne l'agent causal principal, le VRS, et les autres virus observés, isolés ou en co-infection. Cela a permis de mettre en évidence une gravité plus élevée en présence du VRS. Lors de l'hospitalisation initiale, puis au cours du suivi de visites à un mois et à un an, un bilan biologique très complet a été effectué. Les résultats montrent des modifications observées au niveau des cellules immunocompétentes, en hématologie, immunologie et allergologie. Au-delà des modifications habituellement observées lors de nombreuses infections virales comme l'augmentation des Lc T cytotoxiques circulants, au cours des bronchiolites, les différentes sous-populations lymphocytaires évoluent dans le temps, en fonction des virus observés et des éléments de gravité. Les informations clinicobiologiques comparées entre elles permettent de prédire le risque d'évolution vers un asthme du nourrisson.

Références

- [1] Conférence de consensus sur la prise en charge de la bronchiolite du nourrisson. Paris. France. 21 septembre 2000. Arch Pediatr 2001;8(Suppl. 1):S1-196.
- [2] Brouard J, Vabrec A, Freymuth F. Bien évaluer l'épidémie à VRS. Arch Pediatr 2006;20:S1–7.
- [3] Holman RC, Shay DK, Curns AT, Lingappa JR, Anderson LJ. Risk factors for bronchiolitis-associated deaths among infants in the United States. Pediatr Infect Dis J 2003;22:483–90.
- [4] Panickar JR, Dodd SR, Smyth RL, Couriel JM. Trends in deaths from respiratory illness in children in England and Wales from 1968 to 2000. Thorax 2005;60:1035–8.
- [5] Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Eur Respir J 1999;14:144–9.
- [6] Causse M, García-Mayorgas AD, Gutiérrez JB, Casal M. Preliminary evaluation of a multiplex reverse transcription-PCR assay combined with a new DNA chip hybridization assay for detecting respiratory syncytial virus. J Clin Microbiol 2007;45:3811–3.
- [7] Lees O, Béné MC, les membres du GEIL. Immunophénotypage des leucocytes. Clusters de différenciation humains. Application

à la caractérisation des hémopathies. Paris: Biotem Éditions; 1998.

- [8] Abbas AK. Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique. Paris: Elsevier; 2005.
- [9] Boumiza R, Monneret G, Forissier MF, Savoye J, Gutowski MC, Powell WS, et al. Marked improvement of the basophil test by detecting CD203c instead of CD63. Clin Exp Allergy 2003;33:259–65.
- [10] Tasset C. Test d'activation des basophiles dans les allergies alimentaires de l'enfant : lait de vache, œuf, arachide Paris; 2005. [Mémoire DESC allergologie et immunopathologie]
- [11] Reijonen TM, Kotaniemi-Syrjänen A, Korhonen K, Korppi M. Predictors of asthma 3 years after hospital admission for wheezing in infancy. Pediatrics 2000;106:1406–12.
- [12] Koller DY, Wojnarowski C, Herkner KR, Weinländer G, Raderer M, Eichler I, et al. High levels of eosinophil cationic protein in wheezing infants predict the development of asthma. J Allergy Clin Immunol 1997;99:752–6.
- [13] Ehlenfeld DR, Cameron K, Welliver RC. Eosinophilia at the time of respiratory syncytial virus bronchiolitis predicts childhood reactive airway disease. Pediatrics 2000;105:79–83.
- [14] Pifferi M, Ragazzo V, Caramella D, Baldini G. Eosinophil cationic protein in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis: predictive value for subsequent development of persistent wheezing. Pediatr Pulmonol 2001;31:419–24.
- [15] Piippo-Savolainen E, Remes S, Korppi M. Does blood eosinophilia in wheezing infants predict later asthma? A prospective 18–20 years follow-up. Allergy Asthma Proc 2007;28:163–9.
- [16] Fleming DM, Pannell RS, Cross KW. Mortality in children from influenzae and respiratory syncytial virus. J Epidemiol Community Health 2005;59:586–90.
- [17] Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsoia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med 2002;165:1285–9.
- [18] Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsoia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, et al. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. J Clin Virol 2004;30:267–70.
- [19] Mansbach JM, McAdam AJ, Clark S, Hain PD, Flood RG, Acholonu U, et al. Prospective multicenter study of the viral etiology of bronchiolitis in the emergency department. Acad Emerg Med 2008;15:111–8.
- [20] Bach N, Cuvillon D, Brouard J, Lafay F, Freymuth F, Legrand L, et al. Infections respiratoires aiguës à métapneumovirus humain chez l'enfant : études descriptive et comparative avec le virus respiratoire syncytial. Arch Pediatr 2004;11:212–5.
- [21] Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. Emerg Infect Dis 2003;9:372–5.
- [22] Korppi M, Kotaniemi-Syrjänen A, Waris M, Vainionpää R, Reijonen TM. Rhinovirus-associated wheezing in infancy. Comparison with respiratory syncytial virus bronchiolitis. Pediatr Infect Dis J 2004;23:995–9.
- [23] Weigl JA, Puppe W, Schmitt HJ. Variables explaining the duration of hospitalization in children under two years of age admitted with acute airway infections: does respiratory syncytial virus have a direct impact? Klin Padiatr 2004;216:7–15.
- [24] Van den Hoogen BG, Osterhaus A, Fouchier R. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. Pediatr Infect Dis J 2004;23(Suppl. 1):S25–32.
- [25] Semple MG, Cowell A, Dove W, Greensill J, McNamara PS, Halfhide C, et al. Dual infection of infants by human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus is strongly associated with severe bronchiolitis. J Infect Dis 2005;191:382–6.
- [26] König B, König W, Arnold R, Werchau H, Ihorst G, Forster J. Prospective study of human metapneumovirus infection in

- children less than 3 years of age. *J Clin Microbiol* 2004;42: 4632–5.
- [27] McNamara PS, Flanagan BF, Smyth RL, Hart CA. Impact of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus co-infection in severe bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2007;42: 740–3.
- [28] Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:1501–7.
- [29] Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:137–41.
- [30] Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet* 1999;354:541–5.
- [31] Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Köchling A, Hemmis S, Bongartz S, et al. RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitisation in the first year of life. *Eur Respir J* 2002;20:1277–83.
- [32] Henderson J, Hilliard TN, Sherriff A, Stalker D, Al Shammari N, Thomas HM. Hospitalization for RSV bronchiolitis before 12 months of age and subsequent asthma, atopy and wheeze: a longitudinal birth cohort study. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:386–92.
- [33] Eriksson M, Bennet R, Nilsson A. Wheezing following lower respiratory tract infections with respiratory syncytial virus and influenzae A in infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;11: 193–7.
- [34] García-García ML, Calvo C, Casas I, Bracamonte T, Rellán A, Gozalo F, et al. Human metapneumovirus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma at age 5. *Pediatr Pulmonol* 2007;42:458–64.
- [35] Kotaniemi-Syrjänen A, Vainionpää R, Reijonen TM, Waris M, Korhonen K, Korppi M. Rhinovirus-induced wheezing in infancy—the first sign of childhood asthma? *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:66–71.
- [36] Lemanske Jr RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, Shult PA, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116:571–7.