



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.

Article original

# L'analyse virologique des aspirations nasopharyngées reflète-t-elle l'infection respiratoire basse chez l'enfant ? Étude en PCR multiplex

## *Does the nasopharyngeal samples virological analysis reflect the lower respiratory tract infection in children population? A PCR multiplex study*

C. Koenig-Zores<sup>a,\*</sup>, F. Stoll-Keller<sup>b</sup>, C. Ammouche<sup>c</sup>, L. Donato<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Service de réanimation néonatale et pédiatrie 2, pôle médicochirurgical de pédiatrie, hôpital de Hautepierre, hôpitaux universitaires de Strasbourg, avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

<sup>b</sup> Service de virologie, pôle de biologie, hôpitaux universitaires de Strasbourg, 67000 Strasbourg, France

<sup>c</sup> Service de réanimation médicochirurgicale pédiatrique, pôle médicochirurgical de pédiatrie, hôpital de Hautepierre, hôpitaux universitaires de Strasbourg, avenue Molière, 67098 Strasbourg, France

Reçu le 22 octobre 2012 ; accepté le 21 novembre 2012

Disponible sur Internet le 20 décembre 2012

### Résumé

Les infections respiratoires sont un problème de santé publique. Leur cause en est majoritairement virale chez le jeune enfant. La mise au point de techniques de détection par biologie moléculaire a permis d'en élargir le spectre virologique. L'objectif de notre travail est d'évaluer la corrélation entre les résultats des prélèvements effectués par aspiration rhinopharyngée et par lavage bronchoalvéolaire. Trente enfants présentant une symptomatologie d'infection respiratoire basse ont ainsi été prélevés aux deux sites au cours d'une même séance. Les échantillons ont été analysés par Polymerase chain reaction (PCR) virale multiplex (xTAG<sup>TM</sup> RVP). Une corrélation forte est retrouvée entre la positivité de la PCR virale dans les voies respiratoires hautes et basses ( $p = 0,0002$ ). Le virus le plus fréquemment isolé est l'entéro-rhinovirus. Ces résultats confirment que l'infection virale touche l'appareil respiratoire de façon diffuse, et suggèrent que le prélèvement par aspiration rhinopharyngée suffit au diagnostic virologique d'une infection respiratoire virale basse chez l'enfant immunocompétent.

© 2012 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Lavage bronchoalvéolaire ; PCR ; Virus ; Aspiration rhinopharyngée ; Infection respiratoire ; Pédiatrie

### Abstract

Respiratory tract infections are frequent in young children and are related to viruses in most cases. Multiplex Polymerase chain reaction (PCR) based techniques are valuable tools for describing the spectrum of such viruses. The goal of this study was to assess the correlation of virus detection in samples obtained by nasopharyngeal aspiration and by bronchoalveolar lavage. Both samples were taken at the same time in 30 children with lower respiratory tract infection, and were analyzed by multiplex virus PCR (xTAG<sup>TM</sup> RVP). A strong correlation has been found ( $P = 0.0002$ ) and the most frequently isolated virus was the enterovirus spp. These results strengthen the opinion that viruses colonize both the upper and lower respiratory tract. Nasopharyngeal samples should be sufficient to the diagnosis of lower respiratory tract viral infection in immuno-competent children.

© 2012 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Bronchoalveolar lavage; PCR; Viruses; Nasopharyngeal aspiration; Respiratory tract infection; Paediatrics

## 1. Introduction

Les virus sont responsables d'environ 80 % des infections respiratoires de l'enfant : infections hautes (rhinite, laryngotrachéite) et basses (bronchite, bronchiolite, pneumopathie). L'incidence annuelle des pneumopathies communautaires de

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : [claire.koenig@chru-strasbourg.fr](mailto:claire.koenig@chru-strasbourg.fr) (C. Koenig-Zores).

l'enfant de moins de cinq ans est de 34 à 40 pour mille [1]. Les virus en sont principalement responsables chez les nourrissons [2].

Les nouveaux outils du diagnostic virologique permettent d'affiner les données épidémiologiques. Comparées à l'immuno-histochimie et aux cultures, les techniques de Polymerase chain reaction (PCR) mettent en évidence un spectre viral beaucoup plus large, incluant des organismes déjà connus, mais aussi des virus dits « émergents » issus le plus souvent d'une recombinaison génétique. Chez l'enfant, la méthode de prélèvement la plus largement employée est l'aspiration rhinopharyngée (ARP) à l'aide d'un dispositif stérile. L'écouvillonnage nasal a une moins bonne sensibilité pour certains virus [3]. Les virus peuvent également être recherchés par prélèvement pulmonaire notamment dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA), par brossage endoscopique ou même par biopsie.

À notre connaissance, aucune étude n'a comparé à ce jour les résultats de l'analyse virologique de l'ARP et du LBA en PCR multiplex. Notre étude a comme objectif principal d'évaluer la corrélation chez des enfants immunocompétents, présentant une infection respiratoire basse, et chez lesquels une indication d'endoscopie bronchique a été posée. L'objectif secondaire est d'explorer l'existence ou non d'un portage viral chez les patients présentant une symptomatologie d'asthme.

## 2. Patients et méthodes

Cette étude a été menée de janvier 2008 à avril 2010 dans les hôpitaux universitaires de Strasbourg principalement en hospitalisation de jour, mais également en réanimation pédiatrique.

### 2.1. Critères d'inclusion

Les enfants inclus dans l'étude devaient présenter une symptomatologie respiratoire chronique pour laquelle une bronchofibroscope était requise : bronchopneumopathie traînante, asthme mal contrôlé, et où le diagnostic d'infection bronchique était optiquement porté au cours de l'examen. Parmi les 30 patients inclus, sept avaient un asthme déjà diagnostiqué au moment de l'examen et au moins trois d'entre eux ont eu des symptômes d'hyperréactivité bronchique dans les mois qui ont suivi.

### 2.2. Critères d'exclusion

Aucun enfant porteur ou suspect de l'une des affections suivantes n'a été inclus dans l'étude :

- déficit immunitaire, constitutionnel ou acquis ;
- maladie génétique de l'arbre respiratoire (mucoviscidose, dyskinésie ciliaire primitive) ;
- syndrome polymalformatif ;
- infection nosocomiale ;
- d'un corps étranger inhalé.

### 2.3. Déroulement de l'examen

La fibroscopie bronchique a été réalisée en ambulatoire ou en hospitalisation si nécessaire, après obtention de l'accord des parents. Vingt minutes avant l'examen, l'enfant a reçu une prémédication par voie intrarectale (sulfate d'atropine et benzodiazépine à courte durée d'action). Chez l'enfant de plus d'un an, une sédation complémentaire par protoxyde d'azote inhalé a été délivrée au masque pendant toute la durée de l'examen. Le geste a été complété par une anesthésie locale à la lidocaïne.

### 2.4. Modalités de prélèvement

L'endoscopie, réalisée par voie naso-trachéale, est précédée d'une pulvérisation nasale de lidocaïne. Dans notre protocole habituel cette pulvérisation est suivie d'une aspiration nasopharyngée visant à éliminer l'excédent de lidocaïne. Dans le présent travail, le produit de cette aspiration a été collecté pour étude virologique. Après exploration de l'arbre bronchique, le LBA a été effectué dans le territoire le plus suspect ou dans la bronche lobaire moyenne en cas d'infection diffuse. Trois à cinq seringues de 1 mL/kg de sérum physiologique stérile ont été injectées successivement par le canal opérateur, puis ré-aspirées et homogénéisées sur flacon piège. Des échantillons ont été envoyés aux laboratoires pour analyses virologique, cytologique et bactériologique.

### 2.5. Analyse virologique

Les deux prélèvements ont été acheminés dans un milieu de transport spécifique (*universal transport medium* [UTM-RT, milieu de transport universel]) au laboratoire de virologie où a été réalisée une PCR multiplex pour la détection d'un panel de virus respiratoires<sup>1</sup>. Il s'agit d'un test qualitatif de recherche d'acide nucléique viral permettant la détection simultanée et l'identification de plusieurs virus à tropisme respiratoire à partir d'aspirations ou de sécrétions rhinopharyngées ou de LBA. Les virus recherchés par cette technique sont l'influenza A, H1, H3 et H5, l'influenza B, le virus respiratoire syncytial (VRS) de type A et B ; la para-influenza 1, 2, 3,4, le Coronavirus (CoV) NL63, OC43, HKU1, 229E, SARS, le métapneumovirus humain (MPV), l'adénovirus et l'entéro-rhinovirus (cette technique ne pouvant différencier ces deux Picornavirus).

### 2.6. Analyse statistique

Les données sont traitées à l'aide du logiciel Statistica 8.0<sup>2</sup>. Les résultats sont exprimés en variables qualitatives et leur association est mesurée en analyse de corrélation (Spearman R) ainsi qu'en régression logistique. Les comparaisons sont faites en  $X_2$  ou en probabilité unilatérale de Fisher en cas d'effectifs

<sup>1</sup> La technique utilisée dans notre centre est commercialisée sous le nom de « xTAG™ RVP ».

<sup>2</sup> Statsoft Inc.

théoriques insuffisants. Le seuil de significativité est fixé pour un risque  $\alpha$  inférieur à 5 %.

### 3. Résultats

#### 3.1. Population étudiée

Trente enfants âgés de 11 [1–122] mois et pesant 8,8 [3,4–36] kg ont été inclus (médianes et extrêmes). Le sex-ratio est de 1. Pour plus de la moitié d'entre eux, l'indication de fibroscopie a été posée devant un tableau d'infection bronchopulmonaire traînante ; un tiers des cas présentait un asthme mal contrôlé ; les autres étaient majoritairement explorés dans le cadre d'une pathologie œsophagienne ou laryngée avec symptômes respiratoires.

Les fibroscopes utilisés étaient : Olympus® BFXP40/XP60/XP160 (diamètre : 2,8 mm) chez 21 sur 30 enfants, Olympus® 3C30/3C160 (diamètre : 3,6 mm) chez neuf sur 30 patients<sup>3</sup>.

#### 3.2. Microbiologie

##### 3.2.1. Positivité des prélèvements

Vingt-cinq sur 30 (83 %) prélèvements ont permis d'identifier un ou plusieurs virus et/ou bactéries pouvant être associés à la symptomatologie. Une identification mixte, virale et bactérienne, est trouvée dans 16 sur 30 (53 %) cas (bactéries par ordre de fréquence : *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae* et *Staphylococcus aureus*).

##### 3.2.2. Analyse virologique des aspirations rhinopharyngées (ARP)

La PCR multiplex est positive dans 15 sur 30 (50 %) des cas, et a permis de mettre en évidence 16 virus (Fig. 1). Le virus le plus largement mis en évidence est l'entéro-rhinovirus chez 11 sur 30 (37 %) des enfants soit 11 sur 15 (73 %) des PCR virales multiplex positives. On ne note qu'un seul cas de co-infection virale (entéro-rhinovirus et CoV).

##### 3.2.3. Analyse virologique du liquide de lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Seize sur 30 (53 %) des prélèvements étaient positifs à au moins un virus, et ont mis en évidence 18 virus (Fig. 1). Le virus le plus souvent identifié est l'entéro-rhinovirus chez 13 sur 30 (43 %) des enfants soit 13 sur 16 (81 %) des PCR multiplex virales positives. Les autres virus sont retrouvés en égales proportions mais bien inférieures à celle de l'entéro-rhinovirus un sur 16 (6 %). On note deux co-infections virales : entéro-rhinovirus/CoV et entéro-rhinovirus/métapneumovirus.

##### 3.2.4. Association entre positivité de la Polymerase chain reaction (PCR) au niveau de l'aspiration rhinopharyngée (ARP) et du lavage bronchoalvéolaire (LBA)

Tous virus confondus, la positivité de la PCR multiplex effectuée au niveau des ARP est significativement corrélée à sa

positivité sur le LBA (Spearman  $R = 0,63$  ;  $p = 0,00017$ ) (Fig. 2). En régression logistique, l'ARP positive fournit un bon modèle prédictif pour un LBA positif (OR 26 ; Wald- $\text{Chi}^2 = 10,7$  ;  $p = 0,001$ ).

##### 3.2.5. Corrélation spécifique par virus

La positivité de la PCR pour l'entéro-rhinovirus au niveau des ARP est statistiquement corrélée à celle du LBA (Spearman  $R = 0,73$  ;  $p = 0,00001$ ) (Fig. 3). La signature moléculaire des virus influenza B, virus respiratoire syncytial A et B et du CoV a été identifiée de manière concordante dans quatre paires de prélèvements. Cinq prélèvements discordants entre les deux sites ont été mis en évidence. Trois PCR virales multiplex ne sont positives qu'au niveau du LBA. L'entéro-rhinovirus est impliqué dans tous les cas, dont une fois en association avec un métapneumovirus (Fig. 1).

#### 3.3. Profil virologique des asthmatiques

Le diagnostic d'asthme a été retenu dans sept cas sur 30 (23 %). Afin de confronter la validité de nos données à celle de la littérature, nous avons comparé les résultats virologiques des échantillons selon le statut d'asthme [4,5]. On retrouve bien une différence de portage de Rhinovirus entre les asthmatiques et les autres (respectivement : 85 % vs 25 % sur les ARP ; 71 % vs 40 % sur les LBA) (Fig. 4).

### 4. Discussion

Notre choix s'est porté vers l'étude de l'épidémiologie virale de nos patients par le biais d'une analyse moléculaire (PCR) virale multiplex. Le diagnostic virologique est dépendant de la qualité du prélèvement (caractère intracellulaire obligatoire), de sa rapidité de prise en charge et de la technique d'analyse utilisée. La PCR, très sensible, a supplanté les deux autres techniques utilisées auparavant pour le diagnostic viral : la culture et la recherche d'antigènes [6]. Elle est plus sensible notamment pour certains virus pneumotropes (Rhinovirus, Bocavirus, et certains CoV) qui peuvent mettre en défaut les autres techniques de diagnostic [7]. La PCR multiplex permet de rechercher dans le même temps un panel de virus. Son utilisation a permis d'accroître nos connaissances sur les causes des infections des voies respiratoires. La principale limite de cette technique est qu'elle ne peut témoigner du caractère actif de l'infection. La présence d'acides nucléiques appartenant au Rhinovirus peut se retrouver de façon prolongée, pouvant positiver la PCR plusieurs semaines après une infection [8]. Le développement de techniques quantitatives, malheureusement non encore disponibles en PCR multiplex, pourrait remédier à cet écueil. En cas de forte suspicion clinique et de négativité de cet examen, il reste donc préconisé d'effectuer une culture cellulaire qui reste la référence pour détecter un virus infectieux.

Cette technique est particulièrement adaptée aux jeunes enfants, dont le taux d'infections virales est extrêmement élevé, non seulement à des fins épidémiologiques, mais également thérapeutiques, pronostiques et pour la mise en place de

<sup>3</sup> Olympus Medical Systems Corp, Tokyo ; Japon.

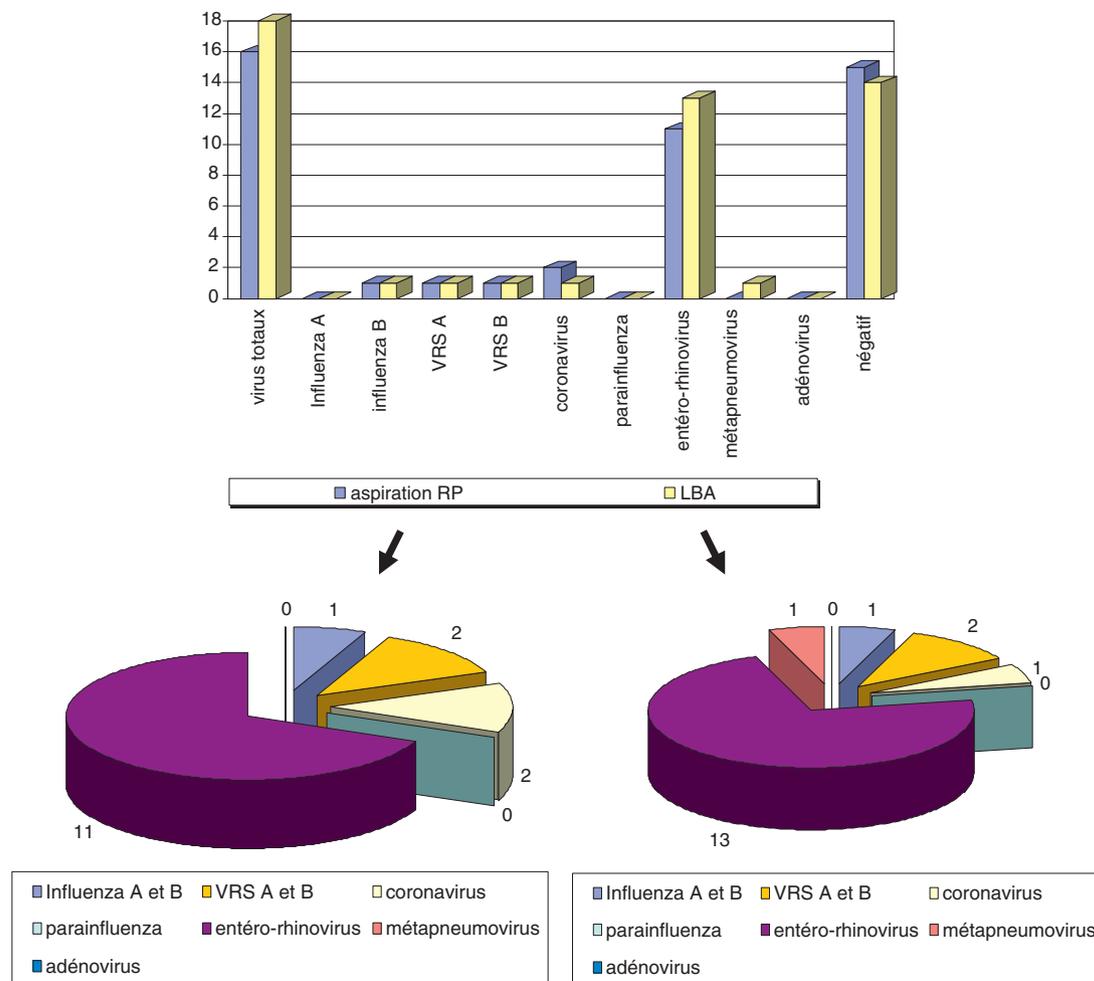


Fig. 1. Résultats des Polymerase chain reaction (PCR) virales au niveau des deux sites de prélèvement. Le diagramme à barres représente le nombre de fois (en ordonnée) où les différents virus (en abscisse) ont été identifiés par PCR selon le site de prélèvement : en bleu, aspirations rhinopharyngées (ARP) ; en jaune, lavage bronchoalvéolaire (LBA). Les camemberts indiquent la proportion de chaque virus dans les produits d'ARP (à gauche) et dans le liquide de LBA (à droite).

procédures d'isolement adéquates [2,9–12]. Un taux important de co-infection virale et bactérienne est retrouvé dans notre étude dévoilant le lien étroit, probablement potentialisateur, existant entre les deux types de pathogènes [13,14].

Le recours à cette technique nous a permis de retrouver l'association classique entre asthme et présence d'entéro-rhinovirus dans les prélèvements rhinopharyngés ( $p = 0,009$ ). Dans notre étude, le lien est moins fort au niveau du LBA ( $p = 0,16$ ) dans cette population particulière, probablement lié à l'effectif réduit. Néanmoins, la même tendance se dessine.

La technique de biologie moléculaire utilisée dans notre centre ne nous permet pas de distinguer les Rhinovirus des entérovirus. En cas de positivité de celle-ci, nous avons considéré qu'il s'agissait d'une infection à Rhinovirus compte-tenu du terrain, de la saisonnalité des examens et de l'épidémiologie des Rhinovirus.

Dans de nombreux centres, la technique de choix concernant le site de prélèvement à visée virologique dans le cadre d'une infection respiratoire basse est la réalisation d'une ARP, l'indication d'endoscopie n'étant pas posée chez le tout venant. À l'instar de ce qui a été montré dans les dyskinesies ciliaires primitives [15], nous cherchons à déterminer si l'infection

bronchopulmonaire virale peut être mise en évidence par un prélèvement peu invasif effectué dans un site facilement accessible en pratique courante.

Notre étude montre une corrélation forte entre la positivité de la PCR virale multiplex au niveau des ARP et sa positivité au niveau du LBA ( $p = 0,00017$ ). Ainsi, le risque d'avoir un LBA positif est 26 fois plus important si l'ARP est positive. L'association est clairement établie pour le Rhinovirus, microorganisme largement majoritaire sur notre set de prélèvements ( $p = 0,00001$ ). Ces résultats confortent l'idée que l'infection virale touche l'appareil respiratoire haut et bas de façon diffuse.

Néanmoins, ils ne montrent pas une concordance totale entre les deux sites de prélèvement, principalement liée à la faible représentativité de certains virus, ne permettant pas de conclure hormis pour l'entéro-rhinovirus. Nous continuons à ce jour les inclusions afin de pouvoir affiner les corrélations virus par virus.

À la vue de ces résultats, la PCR virale multiplex sur l'ARP est un bon reflet du prélèvement dans le bas appareil. Elle devrait suffire au diagnostic de bronchopneumopathie virale chez l'enfant immunocompétent.

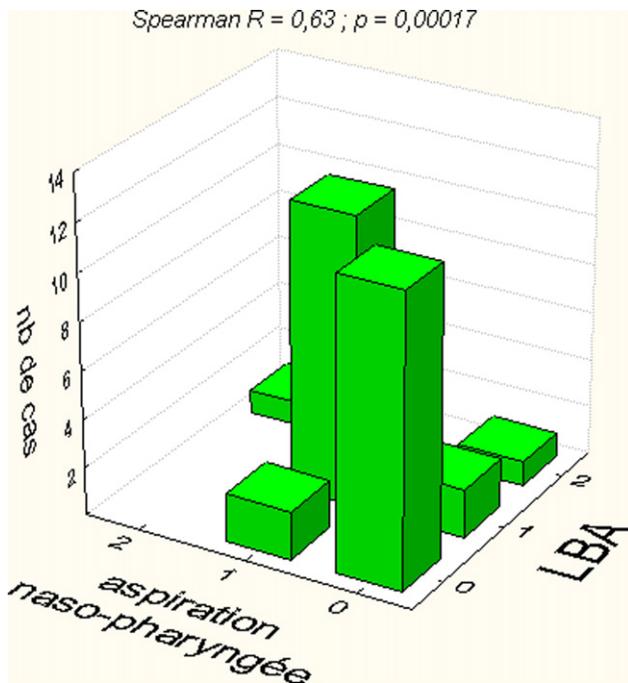


Fig. 2. Concordance entre la positivité de la Polymerase chain reaction (PCR) virale haute et basse. Abscisse : nombre de virus révélés par la PCR multiplex : 0 (aucun), un et deux. Prélèvements concordants (diagonale) : 12 cas avec aspirations rhinopharyngées (ARP) et lavage bronchoalvéolaire (LBA) négatifs ; 12 cas où l'ARP et le LBA montrent un virus ; un cas avec deux virus. Prélèvements discordants (marges) : deux ARP sont isolément positives ; trois LBA sont isolément positifs.

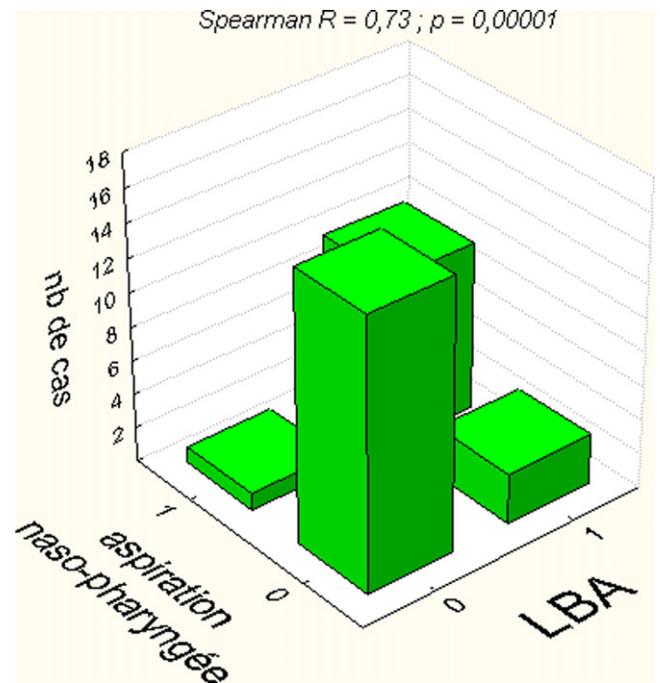


Fig. 3. Concordance entre la positivité de la Polymerase chain reaction (PCR) entéro-rhinovirus haute et basse. Abscisse : PCR négative (0) ou positive (1) pour la recherche d'entéro-rhinovirus en PCR. Prélèvements concordants (diagonale) : 16 cas avec aspirations rhinopharyngées (ARP) et lavage bronchoalvéolaire (LBA) négatifs ; dix cas où l'ARP et le LBA montrent un entéro-rhinovirus. Prélèvements discordants : une ARP est isolément positive ; trois LBA sont isolément positifs.

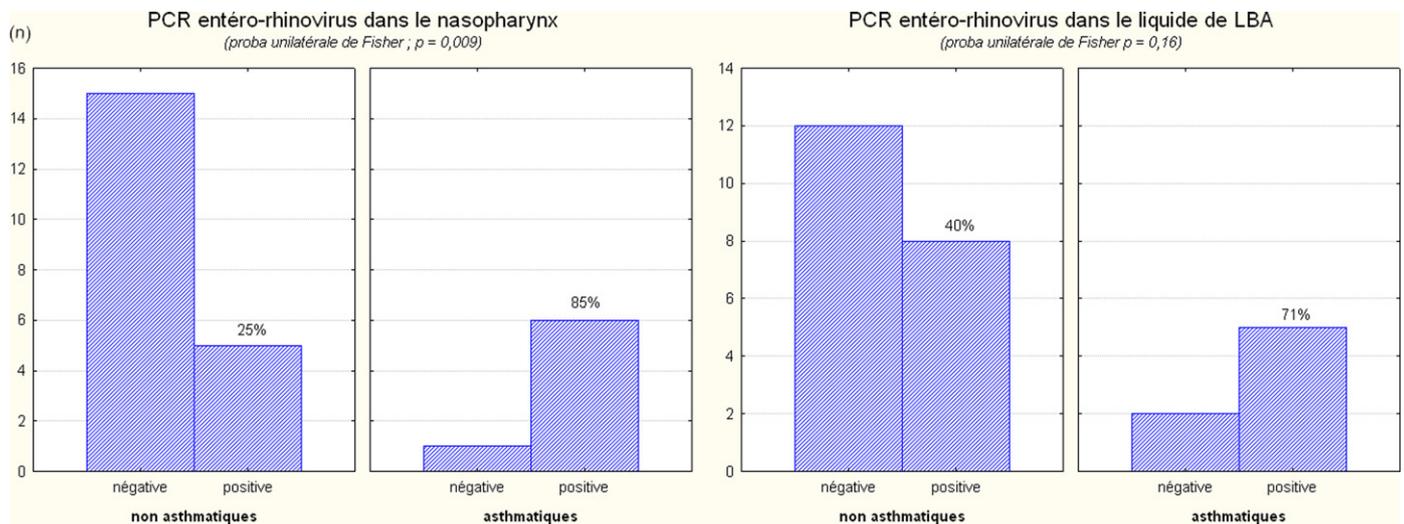


Fig. 4. Comparaison de la positivité de la Polymerase chain reaction (PCR) à entéro-rhinovirus dans la population asthmatique vs non asthmatique.

L'accès au poumon profond par le LBA est un examen invasif, toutefois difficilement contournable chez l'enfant immunodéprimé ou en cas de pneumopathie grave sans germe identifié par d'autres techniques.

### 5. Conclusion

La biologie moléculaire permet de préciser le spectre épidémiologique des infections respiratoires. La PCR virale multiplex, peu invasive au niveau rhinopharyngé, paraît bien

corrélée aux résultats du LBA et plaide pour un continuum de l'infection virale tout au long de l'arbre respiratoire. L'ARP devrait suffire au diagnostic virologique d'une bronchopneumopathie chez l'enfant immunocompétent. Néanmoins, sa réalisation ne doit pas faire retarder la pratique du LBA en cas d'infection respiratoire basse traînante ou d'une pathologie sous-jacente associée (autre type de microorganisme, bactérie ou parasite).

Prédominant dans notre étude, le Rhinovirus est connu pour produire de petites lésions tissulaires avec production de

médiateurs pro-inflammatoires induisant un afflux de polynucléaires neutrophiles. Cette réponse immune, qui pourrait augmenter la réactivité bronchique chez l'asthmatique, est un facteur supposé d'exacerbation. Le sens de l'association Rhinovirus et asthme, bien démontrée par de larges échantillons de population [16], n'est toutefois pas clair. On sait que la fonction des cellules T régulatrices est perturbée chez l'atopique, et pas seulement au niveau de la réponse Th2. Le suivi de la cohorte COAST montre que le nombre d'épisodes de viroses sifflantes dans la première année de vie et le portage ultérieur de Rhinovirus dépendent de la qualité de la réponse Th1 mesurée dès la naissance [17]. Ces travaux semblent indiquer que l'asthme du jeune enfant prédispose au portage de microorganismes dans les voies aériennes et remettent en question le rôle déclenchant des virus, qui seraient plutôt des marqueurs : viroses asthmo-induites ?

### Déclaration d'intérêts

Les auteurs déclarent ne pas avoir de conflits d'intérêts en relation avec cet article.

### Références

- [1] McIntosh K. Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 2002;346(6):429–37.
- [2] Juven T, Mertsola J, Waris M, Leinonen M, Meurman O, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19(4):293–8.
- [3] Heikkinen T, Marttila J, Salmi AA, Ruuskanen O. Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2002;40(11):4337–9.
- [4] Lemanske Jr RF, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005;116(3):571–7.
- [5] Gern JE. Rhinovirus and the initiation of asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009;9(1):73–8.
- [6] Leruez-Ville M. Diagnosis of viral respiratory infections. *Arch Pédiatr* 2007;14(4):404–9.
- [7] Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J* 2004;23(11):1003–7.
- [8] Jartti T, Lehtinen P, Vuorinen T, Koskenvuo M, Ruuskanen O. Persistence of rhinovirus and enterovirus RNA after acute respiratory illness in children. *J Med Virol* 2004;72(4):695–9.
- [9] Doan QH, Kisson N, Dobson S, Whitehouse S, Cochrane D, et al. A randomized, controlled trial of the impact of early and rapid diagnosis of viral infections in children brought to an emergency department with febrile respiratory tract illnesses. *J Pediatr* 2009;154(1):91–5.
- [10] Woo PC, Chiu SS, Seto WH, Peiris M. Cost-effectiveness of rapid diagnosis of viral respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1997;35(6):1579–81.
- [11] Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, Le Roux P, Deschildre A, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One* 2009;4(2):e4596.
- [12] McIntosh K, Halonen P, Ruuskanen O. Report of a workshop on respiratory viral infections: epidemiology, diagnosis, treatment, and prevention. *Clin Infect Dis* 1993;16(1):151–64.
- [13] Brouard J, Vabret A, Freymuth F, Duhamel JF. Virus bacteria interactions in acute viral pneumonia in infancy: clinical and therapeutic consequences. *Arch Pediatr* 1998;5(Suppl. 1):22s–5s.
- [14] Hament JM, Kimpen JL, Fleer A, Wolfs TF. Respiratory viral infection predisposing for bacterial disease: a concise review. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999;26(3-4):189–95.
- [15] Verra F, Fleury-Feith J, Boucherat M, Pinchon MC, Bignon J. Do nasal ciliary changes reflect bronchial changes? An ultrastructural study. *Am Rev Respir Dis* 1993;147(4):908–13.
- [16] Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Roberg KA, Anderson EL, et al. Wheezing rhinovirus diseases in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:667–72.
- [17] Friedlander SL, Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, Li Z, et al. Viral infection, cytokine dysregulation and the origins of childhood asthma and allergic diseases. *Pediatr Infect Dis J* 2005;24:S170–6.