



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.

Exacerbations de l'asthme et identification virale associée à celle du *Chlamydiae pneumoniae* et du *Mycoplasma pneumoniae* : épidémiologie comparative entre nourrissons et enfants âgés de plus de deux ans

J. Brouard^{1*}, F. Freymuth², F. Toutain¹, A. Vabret², J. Petitjean², S. Gouarin², B. Guillois¹, J.F. Duhamel¹

¹Services de pédiatrie, hôpital universitaire, avenue Georges-Clemenceau, 14033 Caen, France ; ²laboratoire de virologie humaine et moléculaire, hôpital universitaire, avenue Georges-Clemenceau, 14033 Caen, France

(Reçu le 7 novembre 2000 ; accepté le 19 janvier 2001)

Résumé

Objectifs. – L'utilisation des nouvelles techniques d'identification par les méthodes moléculaires apporte de nouvelles données épidémiologiques.

Patients et méthodes. – Cent dix-huit aspirations nasales pratiquées chez des enfants hospitalisés pour une exacerbation aiguë d'asthme ont été colligées. Les techniques conventionnelles ont associé la culture virale et l'immunofluorescence et les techniques moléculaires une *polymerase chain reaction* (PCR).

Résultats. – L'utilisation des techniques conventionnelles a mis en évidence un virus dans 34 % des prélèvements respiratoires (40 cas sur 118), tandis que l'étude par PCR permet une identification positive sur 68 % des prélèvements (80 cas sur 118) et l'association des deux méthodes amène la positivité à 77 % (91 cas sur 118). Les co-infections ont concerné 23 % des prélèvements positifs. L'identification virale par les outils traditionnels est significativement plus fréquente chez les jeunes asthmatiques, ainsi que lors de l'utilisation des outils de biologie moléculaire de façon non significative. L'épidémiologie comparative retrouve la prépondérance dans les deux groupes d'âge du rhinovirus (45 %), puis du virus respiratoire syncytial (28 %) et de l'entérovirus (8,5 %). Chez les enfants âgés de moins de deux ans, rhinovirus et virus respiratoire syncytial ont une prévalence proche (42 et 36 % respectivement) sensiblement différente de celle des enfants âgés de plus de deux ans (66 et 27 % respectivement). L'identification par PCR de *Chlamydia pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae* reste rare (six cas sur 118 prélèvements).

Conclusion. – La prééminence du rhinovirus et du virus respiratoire syncytial est retrouvée lors des exacerbations d'asthme chez le nourrisson tandis que *C. pneumoniae* et *M. pneumoniae* ne semblent pas particulièrement impliqués. L'identification est plus forte chez les jeunes asthmatiques avec probablement une charge virale plus importante, car la positivité de la culture virale est plus fréquente chez les enfants âgés de moins de deux ans. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

asthme / rhinovirus / virus respiratoire syncytial / entérovirus / *Mycoplasma pneumoniae* / *Chlamydia pneumoniae* / PCR

*Correspondance et tirés à part.

Summary – Viral identification, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* during asthma exacerbation: comparative epidemiology between infants and children.

Purpose. – Molecular processes can have a different impact on epidemiological data.

Patients and methods. – The study covers 118 nasal aspirate samples taken on children hospitalized for acute asthma exacerbation for 2 years. Conventional techniques associated viral culture and immunofluorescence while molecular techniques used polymerase chain reaction (PCR).

Results. – Virus presence was revealed with conventional techniques in 34% of the respiratory samples (40/118), while PCR study of viruses and genomes of *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* allowed positive identification in 68% of the samples (80/118). The combination of both techniques allowed identification of an infectious agent in 77% of cases (91/118). More than one pathogenic agent was isolated in 23% of positive samples. Epidemiological study shows prevalence of rhinovirus (45%), then respiratory syncytial virus (28%) and enterovirus (8.5%). In children under 2 years of age, rhinovirus and respiratory syncytial virus have a close prevalence (respectively 42 and 36%), which is not the same result as in older children (respectively 66 and 27%). Moreover, PCR techniques allowed the identification of just a few *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* (6/118).

Conclusion. – In this study, molecular techniques of identification demonstrate a clear advantage in sensitivity compared to performances of viral cultures or immunofluorescence. The importance of rhinovirus and respiratory syncytial virus is remarkable while *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* do not seem to be particularly involved. © 2001 Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS

asthma / rhinovirus / respiratory syncytial virus / enterovirus / *Chlamydia pneumoniae* / *Mycoplasma pneumoniae* / polymerase chain reaction

Les premières données sur l'épidémiologie de l'infection virale et l'asthme ont été obtenues dans les années 1970–1980 par l'isolement viral et la sérologie [1]. Par son pouvoir amplificateur, l'utilisation de l'outil moléculaire accroît la sensibilité de détection virale et semble approprié dans l'asthme où la charge virale peut être réduite [2]. L'épidémiologie virale, avec ces techniques virologiques modernes, lors des exacerbations d'asthme est disponible chez l'enfant d'une dizaine d'année [3] mais pas chez celui âgé de moins de deux ans.

PATIENTS ET MÉTHODES

Cette étude épidémiologique rétrospective a colligé les enquêtes virologiques à partir des sécrétions obtenues par aspiration nasale chez les enfants hospitalisés pour crise d'asthme aiguë dans un service de pédiatrie générale. Le diagnostic d'asthme a été fondé en fonction de l'âge selon les critères usuels [4, 5]. L'évaluation clinique a retenu outre l'âge, les paramètres vitaux (fréquences cardiaque et respiratoire, température, oxymétrie transcutanée), les mesures thérapeutiques (nutrition, oxygénothérapie, bronchodilatateur ou corticoïde systémique), la durée de

l'hospitalisation. La définition de la sévérité de la crise a retenu la nécessité d'une oxygénothérapie de plus de 24 heures pour maintenir une SaO₂ égale à 92 % ou une intolérance alimentaire imposant une hydratation par voie intraveineuse de plus de 24 heures ou le recours au bêta-2 mimétique et au corticoïde par la voie parentérale. Les examens paracliniques ont porté sur le dosage de la protéine C réactive, la numération des polynucléaires neutrophiles, l'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) à l'admission. Les prélèvements des sécrétions nasales ont été réalisés par le personnel infirmier ou par un kinésithérapeute. Ces prélèvements ont été transmis immédiatement dans un flacon stérile au laboratoire de virologie. Les techniques traditionnelles ont été pratiquées sur les prélèvements frais, elles ont inclus les cultures cellulaires (cellules MRC5, NCI-H292 et MDCK) et l'immunofluorescence (IF/CV) par anticorps monoclonaux (Imagen®, Dako Grande-Bretagne) pour les virus influenza A et B, les virus para-influenza 1, 2, 3, le virus respiratoire syncytial et le coronavirus 229E (Argene France). Les procédures mises en œuvre pour la réalisation des cultures virales ont permis l'isolement

viral, puis l'immunofluorescence a permis le diagnostic des virus respiratoire syncytial, virus para-influenza, virus influenza, adénovirus et entérovirus au sein des cellules en culture. Le rhinovirus a été identifié par le test de labilité acide ou par *reverse transcriptase-polymerase chain reaction* (RT-PCR). Les sous-types A et B du virus respiratoire syncytial ont été identifiés par des anticorps monoclonaux. Le typage des entérovirus a été effectué par neutralisation (Eurobio®). Les méthodes de virologie moléculaires ont utilisé les prélèvements congelés. Les procédures utilisées de PCR et de RT-PCR ont permis la détection des séquences du virus respiratoire syncytial, du rhinovirus, du virus para-influenza 3, de l'adénovirus, de l'entérovirus, des coronavirus 229E et OC43, de *Chlamydia pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae*. Chaque test de biologie moléculaire était accompagné d'échantillons contrôles, traités de la même façon que les échantillons contenant les virus. Les produits d'amplification étaient détectés en électrophorèse en gel d'agarose par hybridation par technique immunoenzymatique (GEN-ETI-K® DEIA Sorin).

Les données colligées ont été saisies à l'aide du logiciel Epi-Info®. Les comparaisons statistiques des données quantitatives ont été effectuées à l'aide du test non paramétrique de Mann-Whitney. L'analyse du χ^2 a été utilisée pour les données qualitatives avec correction de Yates pour les effectifs théoriques inférieurs à cinq. Pour les petits effectifs, les calculs statistiques ont été réalisés par la méthode exacte de Fischer. Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative pour l'interprétation du test.

RÉSULTATS

Entre le 1^{er} novembre 1996 et le 1^{er} septembre 1998, 118 enfants hospitalisés pour exacerbation aiguë d'asthme ont eu une aspiration nasale comportant une étude virologique exhaustive. Parmi eux, 59 sont âgés de moins de deux ans avec un âge moyen de 10,7 mois (écart-type : $\pm 5,8$ mois) et 59 de plus de deux ans avec un âge moyen de 65,6 mois (ET $\pm 41,1$ mois). L'étude des indicateurs cliniques en fonction de l'âge retrouve chez ceux âgés de moins de deux ans significativement plus de garçons (68 %), une désaturation initiale plus modérée (SaO₂ TC : $95,1 \pm 2,8$ %) et moins de crises sévères (17 % versus 40 %) (tableau I). Les examens paracliniques et l'évolution durant l'hospitalisation révèlent chez les

Tableau I. Présentation clinique de la cohorte.

	Âge < 2 ans (n = 59)	Âge ≥ 2 ans (n = 59)	p
Garçon	40	32	–
Filles	19	27	–
Sévérité	10	24	0,01
Oxymétrie transcutanée	95,1 % ($\pm 2,8$)	93,5 ($\pm 3,2$)	0,001
Fréquence respiratoire	50 (± 15)	40 (± 15)	NS
Fréquence cardiaque	140 (± 20)	130 (± 20)	NS
Température (°C)	37,6 ($\pm 0,8$)	37,6 ($\pm 0,8$)	NS
Moyenne \pm écart-type. NS : non significatif.			

enfants âgés de moins de deux ans une moindre valeur des polynucléaires neutrophiles (moyenne : $5\,470/\text{mm}^3 \pm 2\,890$ versus $7\,530/\text{mm}^3 \pm 4\,550$), moins d'isolement microbiologique lors de l'ECBC (5 % versus 22 %), moins d'utilisation de bêta-2 mimétique ou corticoïde par voie parentérale ainsi qu'une durée d'oxygénodépendance moins longue ($9,3$ heures $\pm 3,7$ versus 15 heures ± 20) (tableau II). La durée d'hospitalisation des nourrissons est plus importante, sans atteindre la significativité statistique ($7 \pm 3,8$ jours versus $6 \pm 2,4$ jours).

L'étude virologique révèle par l'utilisation de l'immunofluorescence et la culture virale une positivité de 40 prélèvements (34 %), les techniques de biologie moléculaire seule sont positives chez 80 enfants (68 %), l'association de celle-ci aux outils traditionnels permet une identification virale dans 85 prélèvements (72 %). Par l'identification moléculaire de *Chlamydia pneumoniae* (3) et *Mycoplasma pneumoniae* (3) cette positivité progresse à 91 enfants (77 %). Les co-infections virales sont retrouvées 15 fois, l'identification moléculaire de *Chlamydia pneumoniae* ou *Mycoplasma pneumoniae* a toujours été associée à un virus. Globalement, le rhinovirus est le plus fréquemment isolé (45 %), puis le virus respiratoire syncytial (28 %) et l'entérovirus (8,5 %) ensuite les virus influenza (5,5 %), l'adénovirus (5,5 %), les virus para-influenza (4,5 %) et rarement les coronavirus (3 %) (tableau III). L'identification virale par les outils traditionnels du diagnostic virologique est significativement plus fréquente chez les jeunes asthmatiques : la positivité de IF/CV correspond à un âge moyen de 28,4 mois, la négativité de cette recherche correspond à un âge moyen de 43 mois ($p < 0,01$). Ceci est également retrouvé lors de l'utilisation des outils de biologie moléculaire,

Tableau II. Présentation paraclinique et évolution de la cohorte.

	Âge < 2 ans (n = 59)	Âge ≥ 2 ans (n = 59)	p
Protéine C réactive (mg/L)	8,1 (± 7,6)	10,7 (± 12)	NS
Polynucléaires neutrophiles (mm ³)	5 470 (± 2 890)	7 530 (± 4 550)	0,01
ECBC (flore > 10 ⁵ /mL)	3	13	0,01
Bêta-2 mimétique parentéral	0	5	0,05
Corticoïde parentéral	2	15	0,001
Oxygénothérapie (h)	9,34	15	0,01
Durée hospitalisation (j)	7 (± 3,8)	6 (± 2,4)	NS

Moyenne ± écart-type. NS : non significatif.

mais la différence n'est pas statistiquement significative (positivité à 32 mois versus négativité à 50,5 mois) (*tableau IV*). Chez les enfants âgés de moins de deux ans, rhinovirus et virus respiratoire syncytial ont une prévalence proche (42 et 36 % respectivement), ceci est différent chez ceux âgés de plus de deux ans (66 et 27 % respectivement) mais pas de manière significative. La prévalence des autres virus respiratoires ne diffère pas selon l'âge. Cependant, les virus para-influenza n'ont jamais été isolés chez les enfants âgés de plus de deux ans (*tableau V*). La présence d'une neutropénie relative est retrouvée lors de l'analyse des résultats en fonction des données de l'IF/CV. Lorsque l'IF/CV est positive, le chiffre moyen des polynucléaires neutrophiles est de 5 230/mm³ (± 2 470) versus 7 150/mm³ (± 4 350). Il n'y a pas différence significative selon les résultats des techniques moléculaires (positivité à 6 800/mm³ ± 4 400 versus négativité à 5 800/mm³ ± 3 000).

DISCUSSION

La corrélation saisonnière entre la survenue des infections virales et les pics de crises d'asthme est tout à fait perceptible en clinique [6, 7]. Cette étude est en

accord avec les résultats d'autres équipes sur l'identification virale au décours des exacerbations d'asthme [8]. Notre particularité est d'avoir abordé cette recherche chez l'enfant asthmatique âgé de moins de deux ans en y associant de façon exhaustive les techniques de biologie moléculaire.

Le rhinovirus reste le facteur clé de ces exacerbations, puis le virus respiratoire syncytial. La prévalence de ces deux agents infectieux ne correspond pas à celle retrouvée lors des bronchiolites inaugurales [9]. Sans les techniques de biologie moléculaire, le rhinovirus a une prévalence sous-évaluée [10, 11]. Quelle est la signification d'un résultat positif isolément en biologie moléculaire ? Cette technique n'amplifie qu'une partie du génome et ne prouve pas que l'agent infectieux identifié soit en phase répllicative. L'IF/CV nécessite le maintien de l'intégrité cellulaire et de la viabilité virale. La technique PCR peut détecter des particules virales infectieuses et non infectieuses, l'isolement viral ne décèle pas les particules défectives, il est gêné par les inhibiteurs des virus présents dans les échantillons (mucine, interféron, bactéries...). C'est ce que semblent souligner nos résultats en objectivant une neutropénie relative lors d'une identification virale par IF/CV. Une hypothèse est que pour les enfants âgés de moins de deux

Tableau III. Identification virale incluant les co-infections virales (n = 106).

	Nbre	Pourcentage
Rhinovirus	48	45
Virus respiratoire syncytial	29	28
Entérovirus	9	8,5
Virus influenza	6	5,5
Adénovirus	6	5,5
Virus para-influenza	5	4,5
Coronavirus	3	3

Tableau IV. Identification virale associée à celle de *Chlamydia pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae* selon l'âge.

	Âge < 2 ans (n = 59)	Âge ≥ 2 ans (n = 59)	p
Culture virale et/ou immunofluorescence	28	12	0,01
PCR et RT-PCR	43	37	NS
Association des techniques	50	41	0,05
Aucune identification	9	18	0,05

Tableau V. Identification virale selon la technique et l'âge.

	Âge < 2 ans		Âge ≥ 2 ans	
	Culture virale et/ou immunofluorescence	Moléculaire (nbre de co-infections)	Culture virale et/ou immunofluorescence	Moléculaire (nbre de co-infections)
Rhinovirus	6	21 (5)	3	27 (5)
Virus respiratoire syncytial	12	18 (7)	3	11 (5)
Entérovirus	1	6 (2)	3	3 (1)
Virus influenza	3	NF	3	NF
Adénovirus	1	5 (3)	0	1 (1)
Virus para-nfluenza	5	0	0	0
Coronavirus	0	2 (1)	0	1
Sujets positifs	28	43	12	37
	-----		-----	
	NS		NS	

NF : non effectué ; NS : non significatif.

ans, une charge virale plus importante est nécessaire pour induire des sifflements, puis plus l'asthme vieillit, moins cette charge est nécessaire pour déclencher une exacerbation, les facteurs allergiques étant parallèlement prépondérants [12]. Nous n'avons pas pu étayer cette hypothèse car les techniques de biologie moléculaire employées ne permettaient pas de quantifier et de comparer cette charge virale. De même, la constitution d'une population témoin appariée pourrait, dans une étude prospective, clarifier le débat entre un lien de causalité par récurrence, rémanence ou latence, à différencier d'une présence non pathogène due à la circulation virale communautaire. Ceci est important, car l'amplification génique a permis de doubler les résultats positifs d'identification virale. L'infection latente est habituellement non permissive, sans réplication virale, mais elle s'accompagne souvent de l'expression de quelques protéines virales précoces, qui, si elles s'expriment à la surface, voire hors de la cellule, peuvent générer des phénomènes inflammatoires et immunitaires chroniques ou intermittents. Avec le virus respiratoire syncytial, l'infection latente ou persistante du poumon n'a pas été démontrée même si ses effets au long cours sont bien individualisés [13]. L'infection persistante adénovirale tant chez des enfants asthmatiques non répondeurs aux corticoïdes inhalés [14] qu'en période intercritique [15] est suggérée par une

même équipe par la détection de fragments adénoviraux. Leur épidémiologie virale est fort différente de la nôtre (adénovirus : 78,4 % ; rhinovirus : 32,4 %). Leur dernière étude a inclus une population témoin où un seul prélèvement présente du matériel génétique adénoviral. Lors des périodes intercritiques ou chez les non-asthmatiques, les taux d'identification par les méthodes traditionnelles sont inférieurs à 3 % [16] mais les méthodes moléculaires amènent une élévation de ce chiffre. Ces dernières vis-à-vis des picornavirus chez l'enfant le situent à 12 % de positivité [10], voire 35 % [17]... Nous avons exploré une population pédiatrique plus jeune que celle de Johnston et al. [3], les différences épidémiologiques peuvent en être la conséquence (tableau VI). Leur étude a montré un taux d'identification des coronavirus plus élevé que le nôtre (13 % versus 3 %), mais ils avaient utilisé concomitamment la PCR et la sérologie.

L'identification de *Chlamydia pneumoniae* et de *Mycoplasma pneumoniae* bénéficie beaucoup de l'apport des techniques moléculaires en raison des mauvais résultats documentés de leurs mises en évidence par les techniques traditionnelles [18]. Depuis plusieurs années, le rôle des infections à *Chlamydia pneumoniae* comme facteur d'exacerbation, voire d'apparition de l'asthme, fait l'objet de débats réguliers. Cunningham et al. [19] ont étudié 108 enfants

Tableau VI. Comparaison de l'épidémiologie virale, *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae* lors des exacerbations aiguës d'asthme chez l'enfant.

	Johnston et al. [10]	Étude de Caen
Aspirations nasales (nbre)	292	118
Identification positive (%)	77,3	77
Rhinovirus	84 (28,7)	48 (45)
Virus respiratoire syncytial	12 (4,1)	29 (28)
Entérovirus	63 (21,5)	9 (8,5)
Virus influenza	21 (7,1)	6 (5,5)
Adénovirus	?	6 (5,5)
Virus para-influenza	21 (7,1)	5 (4,5)
Coronavirus	38 (13)	3 (3)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	?	3
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	?	3

Les données entre parenthèses correspondent aux pourcentages.

asthmatiques âgés de neuf à 11 ans pendant 13 mois (PCR pour *Chlamydia pneumoniae* et *Mycoplasma pneumoniae*, recherche d'anticorps IgA spécifiques). La PCR pour *Chlamydia pneumoniae* était positive dans 23 % des cas, chiffre une dizaine de fois supérieur à notre taux d'identification (2,5 %) qui pourtant est proche de celui de Johnston et al. (1 %) [10]. Cuningham et al. [19] ont également pratiqué leurs investigations chez 65 enfants asymptomatiques, la détection en PCR s'est révélée similaire (28 %)... Toujours dans cette étude, *Mycoplasma pneumoniae* a été identifié à deux reprises dans les deux groupes de patients. La corrélation entre infection aiguë ou chronique à *Chlamydia pneumoniae* ou *Mycoplasma pneumoniae* et asthme aigu ou chronique n'est pas démontrée à l'évidence.

CONCLUSION

La grande sensibilité des outils moléculaires apporte une modification des résultats épidémiologiques lors du diagnostic des viroses respiratoires communes aux dépendants probablement de leur spécificité. Cependant, aucune comparaison entre les études n'est vraiment satisfaisante en l'absence de standardisation des procédures. Actuellement, le gain en efficacité du diagnostic moléculaire se heurte au coût, à la complexité et à la durée nécessaire pour leur réalisation. Le rhinovirus, le virus respiratoire syncytial, puis les entérovirus sont dans notre étude les principaux agents identifiés lors des exacerbations aiguës nettement

séparés des autres agents habituellement retrouvés dans les infections aiguës de l'arbre respiratoire. Les progrès de la recherche antivirale pourront peut être élargir les indications du diagnostic virologique en dehors du domaine épidémiologique ou de la recherche. Le pleconaril est, par exemple, efficace sur les infections à picornavirus (rhinovirus et entérovirus) réduisant la symptomatologie clinique.

Les hypothèses étiopathogéniques sont nombreuses, donc encore à définir pour relier l'identification virale et la symptomatologie clinique. L'atteinte des cellules épithéliales, l'intervention de cytokines (IL-6, IL-8, IL-11...) et de médiateurs (LTC4, histamine...), le recrutement cellulaire (polynucléaires éosinophiles et neutrophiles...), voire la diffusion systémique (lymphocytes, cellules mononucléées...) ne doivent pas être considérés isolément de même que les interactions entre virus, cellules mastocytaires, basophiles et IgE. Ces différents modèles suggèrent les divers objectifs potentiels d'une intervention thérapeutique.

RÉFÉRENCES

- McIntosh K, Ellis EF, Hoffman LS, Lybass TG, Eller JJ, Fulginiti VA. The association of viral and bacterial respiratory infections with exacerbations of wheezing in young asthmatic children. *J Pediatr* 1973 ; 82 : 578-90.
- Freythuth F, Vabret A, Brouard J, Duhamel JF, Guillois B, Petitjean J, et al. Épidémiologie de l'infection virale et asthme. *Rev Fr Allergol Immunol Clin* 1998 ; 38 : 319-25.
- Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Lampe F, Josephs L, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 years old children. *Br Med J* 1995 ; 310 : 1225-8.
- Tabachnik E, Levison H. Infantile bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1981 ; 67 : 339-47.
- The British guidelines on asthma management. *Asthma in adults and schoolchildren*. *Thorax* 1997 ; 52 (Suppl 1) : S2-S8.
- Clough JB, Holgate ST. Episodes of respiratory morbidity in children with cough and wheeze. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 ; 150 : 48-53.
- Dales RE, Schweitzer I, Toogood JH. Respiratory infections and the autumn increase in asthma morbidity. *Eur J Respir Dis* 1996 ; 9 : 72-7.
- Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, Smith S, Campbell MJ, Josephs LK, et al. The relationship between upper respiratory infections and hospital admissions for asthma : a time trend analysis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 654-60.
- Andréoletti L, Lesay M, Deschildre A, Lambert V, Dewilde A, Watré P. Differential detection of rhinoviruses and enteroviruses RNA sequences associated with classical immunofluorescence assay detection of respiratory virus antigens in nasopharyngeal swabs from infants with bronchiolitis. *J Med Virol* 2000 ; 61 : 341-6.
- Freythuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Ferrey J, Eugene G, Petitjean J, et al. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1997 ; 8 : 31-40.

- 11 Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F, Verdon R, Petitjean J, et al. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. *J Clin Virol* 1999 ; 13 : 131-9.
- 12 Freymuth F, Vabret A, Petitjean J, Gouarin S, Gueudin M, Campet M. Diagnostic des deux principales viroses respiratoires épidémiques : la grippe et les infections à virus respiratoire syncytial. Place de la virologie moléculaire. *Méd Mal Infect* 2000 ; 30 : 191-201.
- 13 Kneyber MCJ, Steyerberg EW, de Groot R, Moll HA. Long-term effects of respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis in infants and young children : a quantitative review. *Acta Paediatr* 2000 ; 89 : 654-60.
- 14 Macek V, Sorli J, Kopriva S, Marin J. Persistent adenoviral infection and chronic airway obstruction in children. *Am J Respir Crit Care Med* 1994 ; 150 : 7-10.
- 15 Marin J, Jeler-Kacar D, Levstek V, Macek V. Persistence of viruses in upper respiratory tract of children with asthma. *J Infect* 2000 ; 41 : 69-72.
- 16 Pattemore PK, Johnston SL, Bardin PG. Viruses as precipitants of asthma symptoms. I. *Epidemiology. Clin Exp Allergy* 1992 ; 22 : 325-36.
- 17 Rakes GP, Arruda E, Ingram JM, Hoover GE, Zambrano JC, Hayden FG, et al. Rhinovirus and respiratory syncytial virus in wheezing children requiring emergency care. IgE and eosinophil analyses. *Am J Respir Crit Care Med* 1999 ; 159 : 785-90.
- 18 Petitjean J, Vincent F, Fretigny M, Vabret A, Poveda JD, Brun J, et al. Comparison of two serological methods and a PCR-enzyme immunoassay for the diagnosis of acute respiratory infections with *Chlamydia pneumoniae* in adults. *J Med Microbiol* 1998 ; 47 : 615-21.
- 19 Cunningham AF, Johnston SL, Julious SA, Lampe FC, Ward ME. Chronic *Chlamydia pneumoniae* infection and asthma exacerbation in children. *Eur Respir J* 1998 ; 11 : 345-9.