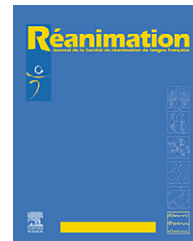


available at www.sciencedirect.comjournal homepage: <http://france.elsevier.com/direct/REURG/>

MISE AU POINT

Techniques actuelles de diagnostic des infections virales respiratoires en réanimation

Current techniques used for the diagnosis of respiratory virus infectious in intensive care units

F. Freymuth^{a,*}, A. Vabret^a, J. Dina^a, C. Daubin^b, S. Gouarin^a, J. Petitjean^a, P. Charbonneau^b

^a *Laboratoire de virologie humaine et moléculaire, centre hospitalier universitaire de Caen, avenue Georges-Clémenceau, 14033 Caen cedex, France*

^b *Service de réanimation médicale, centre hospitalier universitaire de Caen, avenue de la Côte-de-Nacre, 14033 Caen cedex, France*

Disponible sur internet le 15 mars 2007

MOTS CLÉS

Diagnostic ;
Virus respiratoires ;
Réanimation

Résumé Plusieurs centaines de virus respiratoires différents peuvent être détectés chez les patients atteints d'une infection virale respiratoire et hospitalisés dans un service de réanimation : virus influenza, virus respiratoire syncytial, virus para-influenza, adénovirus, coronavirus, rhinovirus, entérovirus, métagneumovirus humain, bocavirus... La recherche de ces virus doit être effectuée sur un prélèvement nasal ou trachéobronchique, riche en cellules épithéliales. Chez les patients immunodéprimés, il faut ajouter un lavage bronchoalvéolaire pour rechercher le cytomégalovirus et les adénovirus. La mise en évidence d'antigènes viraux par immunofluorescence (IF) ou technique immunoenzymatique dans les cellules infectées est en théorie la méthode la plus simple et rapide à utiliser. Comme pour toutes les techniques de diagnostic, la qualité du prélèvement est un déterminant majeur de son efficacité. Cette méthode est malheureusement peu sensible dans les infections respiratoires chez l'adulte. La recherche virale en culture, compliquée et de réponse tardive, peut être utile dans ce cas en raison de son efficacité. Les méthodes PCR sont plus efficaces : elles peuvent identifier les virus non détectés par les techniques conventionnelles et elles augmentent l'isolement des virus classiques. Elles permettent aussi d'identifier les sous-types viraux, d'étudier par séquençage la variabilité génétique des souches et de quantifier la charge virale respiratoire. Les techniques multiplex recherchant plusieurs virus directement dans les prélèvements sont les plus adaptées au diagnostic en raison du nombre de virus à rechercher. Des méthodes PCR en temps réel, fournissant un résultat rapide, ont été récemment développées. La richesse en cellules et le transport du prélèvement sont moins critiques pour les recherches virales en PCR que pour les techniques conventionnelles d'IF et de culture. De plus, les acides nucléiques persistent plus longtemps que les virus infectieux, permettant ainsi un diagnostic plus tardif. Néanmoins, dans un laboratoire de virologie clinique où la rapidité, le coût modéré et la simplicité des techniques sont des exigences prioritaires, le meilleur choix est d'utiliser séquen-

* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : Freymuth-f@chu-caen.fr (F. Freymuth).

tiellement l'IF et les PCR multiplex. Le développement des outils de PCR multiplex en temps réel est la priorité majeure du futur.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

KEYWORDS

Diagnosis;
Viral respiratory
viruses;
ICU

Abstract Hundred viruses can be isolated in patients suffering from respiratory virus infections and hospitalised in intensive care unit (ICU): influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, adenovirus, coronavirus, rhinovirus, enterovirus, human metapneumovirus, bocavirus... Nasal or tracheobronchial specimens, which contain many epithelial cells will be used to isolate these common viruses. In immunocompromised patients a bronchoalveolar lavage has to be added to these specimens in order to detect cytomegalovirus and some adenovirus. The immunofluorescence or immunoenzymatic assays, which detect viral antigens in the infected cells are the easiest and fastest diagnostic methods, theoretically. As with other techniques, specimen quality is a major determinant of their performance. Unfortunately, the sensitivity of the antigen detection assays is low in respiratory infections in adults. Then the virus recovery by cell culture, which is usually more sensitive than the antigen detection assays, can be helpful. Many studies have reported more respiratory virus detections using nucleic acid testing such as PCR. They detect viruses, which are missed by conventional methods and increase the detection of common respiratory virus. Multiplex PCR assays have been developed, and these can simultaneously detect several viruses directly in clinical specimens. Nucleic acid testing can subtype viruses using subtype-specific primers, and analyse strain variation through genetic. It can be used also to quantify the viral load in clinical specimens. More recently real-time RT-PCR assays have been developed to get more rapidly the results of the nucleic acids assays. Specimen quality, timing and transportation conditions may be less critical for nucleic acid testing than for culture or antigen detection, as viable virus and intact infected cells need not to be preserved. Moreover, viral nucleic acids are detectable for several days longer into the clinical course than is cultivable virus, potentially allowing a diagnosis to be made in late-presenting patients. However, in a clinical virology laboratory, where the speed, low cost, and high sensitivity of the methods are required, the sequential use of antigen detection tests and multiplex PCR could be the best choice, particularly in the clinical setting of respiratory virus infections in adults hospitalised in ICU. In the future, the development of real-time multiplex PCR is likely to be top-priority.

© 2007 Société de réanimation de langue française. Publié par Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Introduction

Les moyens diagnostiques utilisés pour identifier les infections virales respiratoires en réanimation chez l'adulte ont évolué parallèlement aux progrès accomplis pour reconnaître les infections virales respiratoires de l'enfant, les premières à être investiguées du fait de leur fréquence. L'étape marquante du diagnostic des infections virales respiratoires a été l'arrivée, dans les années 1970, des techniques de diagnostic rapide, suite aux travaux de Gardner sur la détection en immunofluorescence (IF) des antigènes du virus respiratoire syncytial (VRS) dans les sécrétions respiratoires des enfants atteints de bronchiolite [1]. L'application de la biologie moléculaire à la détection des acides nucléiques viraux a constitué, dans les années 1990, une nouvelle étape de l'évolution du diagnostic virologique. À cette époque plusieurs groupes décrivent des techniques de PCR pour la recherche des virus influenza ou du VRS [2, 3], mais ces essais de techniques complexes, nécessitant des locaux adaptés et un personnel qualifié, restent sans suite.

Depuis quelques années, l'utilisation large de la virologie moléculaire dans l'infection VIH, les méningites et hépati-

tes virales, la possibilité de standardiser ou d'automatiser l'outil, ont réactivé l'intérêt du diagnostic moléculaire dans le domaine des viroses respiratoires. De plus, l'émergence de virus dangereux à isoler au laboratoire tels que le coronavirus du SRAS ou le virus influenza aviaire A/H5N1 a focalisé l'attention des développeurs sur des outils de détection sécurisés, tels que les méthodes d'amplification génique. On se trouve donc aujourd'hui à une période charnière où les méthodes utilisées pour identifier une infection virale respiratoire, notamment chez les patients hospitalisés, se partagent entre les méthodes virologiques traditionnelles et les techniques moléculaires. Après un rappel sur les virus trouvés chez les patients hospitalisés dans un service de réanimation, et leur épidémiologie, cet article présente les différents outils disponibles selon qu'il s'agit de sujets immunocompétents ou immunodéprimés.

Virus des infections respiratoires en réanimation

La recherche de virus chez un patient atteint d'une pneumopathie et hospitalisé en réanimation nécessite de

connaître les virus qui peuvent être en cause et leur épidémiologie.

Virus responsables

Plusieurs centaines de virus respiratoires différents peuvent être détectés chez les patients atteints d'une infection virale respiratoire et hospitalisés dans un service de réanimation. Aux virus respiratoires classiques que sont les virus influenza A, B, C, virus respiratoire syncytial (VRS) A et B, virus para-influenza 1, 2, 3, 4, adénovirus (51 sérotypes), coronavirus (CoV) 229E et OC43, rhinovirus (environ une centaine), entérovirus (quelques dizaines), s'ajoutent les virus récemment détectés en France : le métapneumovirus humain (hMPV) [4], les CoV NL63 [5] et CoV HKU1 [6], le bocavirus [7], enfin le CoV du SRAS et les virus influenza A aviaires potentiellement adaptables à l'homme...

En réanimation, on peut trouver tous ces virus dans les formes graves de pneumonies communautaires survenant chez des sujets en bonne santé : grippe maligne, SRAS, infections à virus influenza aviaire H5N1.... Mais, ils seront le plus souvent isolés chez des sujets fragilisés : insuffisants respiratoires, asthmatiques, personnes âgées ou atteintes de BPCO ou de cardiopathies..., chez lesquels une infection virale respiratoire, même minime, peut constituer un facteur aggravant de leur pathologie.

Sur le terrain particulier de l'immunodépression, qui favorise la réactivation et l'expression clinique des virus latents, des virus « opportunistes » peuvent provoquer des pneumonies : le cytomégalovirus (CMV), certains adénovirus. Enfin, il faut mentionner les complications pulmonaires de certaines viroses systémiques, rougeole ou varicelle notamment, et les trachéobronchites postchirurgicales à virus herpès simplex (HSV), qui ne seront pas abordées ici.

Épidémiologie des infections virales respiratoires communautaires

Une « virose respiratoire » comporte en général l'atteinte concomitante de plusieurs segments respiratoires, une rhinopharyngite et de la toux, et des signes généraux modérés (en dehors de la grippe). De nombreux virus peuvent en être la cause et les caractéristiques épidémiologiques de l'infection constituent un élément d'orientation important pour les recherches virales. Les pneumonies infectieuses virales sont beaucoup plus rares chez l'adulte que chez l'enfant. L'enfant est le réservoir essentiel des virus respiratoires et les infections par ces virus sont particulièrement fréquentes les premières années de la vie [8]. Comme cela a été montré il y a presque 50 ans pour la grippe, les épidémies virales respiratoires débutent dans les collectivités d'enfants et ceux-ci seront donc les premiers à être hospitalisés [9]. La contamination des adultes ou des personnes âgées se fait au contact des jeunes enfants, surtout s'ils vivent en crèche ou sont scolarisés. La recherche de virus chez l'adulte hospitalisé en réanimation doit tenir compte de la fréquence des différents virus dans la population générale. La distribution des virus respiratoires dans celle-ci peut être extrapolée des données obtenues chez l'enfant hospitalisé. Dans une étude réalisée au CHU de Caen, sur 5258 aspirations nasales d'enfants hospitalisés au cours

des hivers 1999-2000, 2000-2001 et 2001-2002, on obtient 2150 (40,8 %) échantillons positifs, et parmi ceux-ci 825 (38,4 %) positifs à VRS, 328 (15,2 %) à virus influenza A et B, 189 (8,8 %) à adénovirus, 164 (7,6 %) à virus para-influenza, 482 (22,4 %) à rhinovirus, et 35 (1,6 %) à CoV [10]. Ainsi, les virus circulant le plus dans la population sont par ordre de fréquence les rhinovirus, le VRS et les virus influenza (la recherche d'hMPV et des nouveaux CoV n'était pas incluse dans ce travail).

Les infections virales respiratoires virales ont un caractère épidémique et surviennent entre octobre et avril. Elles sont très fréquentes en période hivernale, de novembre à février, époque de diffusion majeure des deux principaux virus épidémiques, le VRS et les virus influenza A et B. La cinétique des épidémies de grippe et à VRS est assez bien conservée d'une année sur l'autre (Fig. 1). Depuis les sept derniers hivers, et à l'exception de l'hiver 2003-2004, l'épidémie de grippe commence toujours fin décembre et culmine quatre à six semaines plus tard, en janvier, février ou mars selon la date d'apparition des premiers cas. Les premiers cas d'infection à VRS s'observent en octobre et l'épidémie culmine toujours en décembre et janvier. Les autres virus respiratoires ont une épidémiologie moins stéréotypée, en dehors du hMPV dont l'épidémie coïncide avec celle due au VRS. Les rhinovirus et virus para-influenza circulent plus volontiers en automne et au début du printemps, les CoV à la fin de l'hiver et au printemps (Fig. 2). Les infections à adénovirus s'observent tout au long de la saison. La recherche d'un virus chez un patient hospitalisé en réanimation doit tenir compte de ces données épidémiologiques.

Techniques de diagnostic des infections virales respiratoires chez les sujets immunocompétents

Ces techniques concernent les infections virales survenant chez des sujets immunocompétents et les virus respiratoires communautaires.

Diagnostic virologique conventionnel

Les techniques conventionnelles utilisées pour le diagnostic d'une infection virale respiratoire chez un patient en réanimation ne sont pas différentes quel que soit l'âge des patients (nourrissons, adultes, sujets âgés) ou le type d'atteinte respiratoire (rhinopharyngite, trachéobronchite, bronchiolite, pneumonie, crise d'asthme, exacerbation de BPCO...).

La recherche d'anticorps sériques (ou diagnostic sérologique)

Elle a peu d'intérêt pour le diagnostic. La gamme des réactifs disponibles couvre seulement les infections à virus influenza A et B, VRS, virus para-influenza 1, 2, 3 et adénovirus. Il n'existe pas de sérologie possible pour les infections à rhinovirus, coronavirus, bocavirus ou entérovirus. Le résultat est obtenu tardivement vers le 15^e jour, car il exige l'étude de deux sérums successifs. Les méthodes sérologiques sont insuffisamment sensibles. En effet, les adultes sont porteurs d'anticorps contre ces virus, depuis

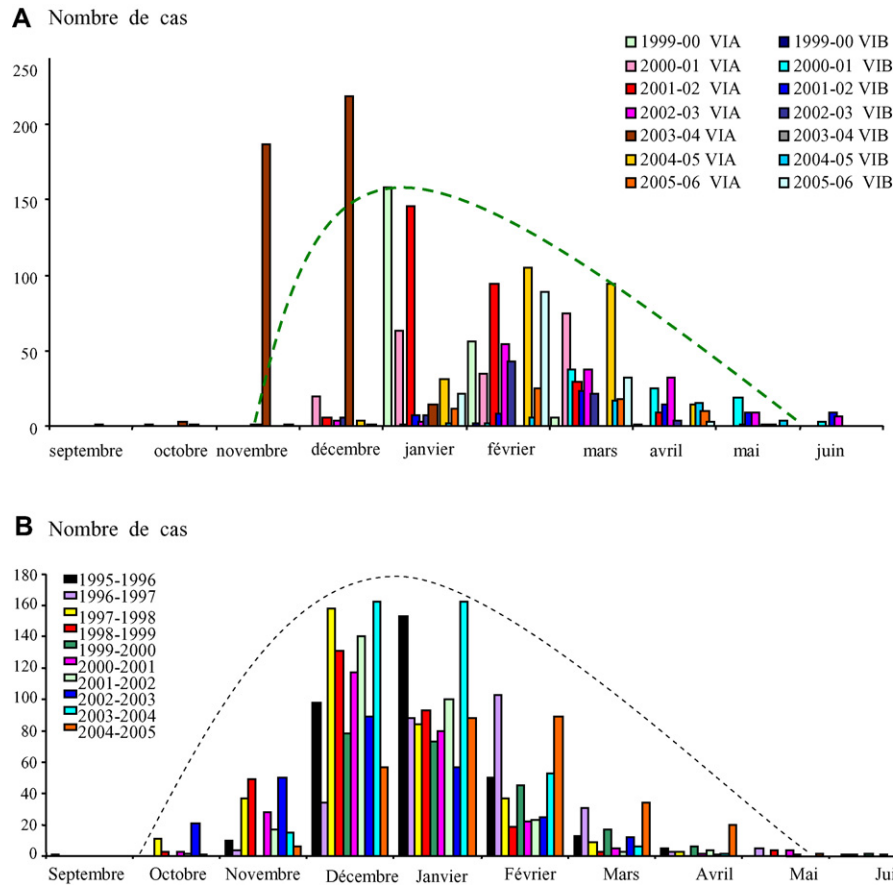


Figure 1 Cinétique des épidémies de grippe (A) et à virus respiratoire syncytial (B) chez les patients hospitalisés au CHU de Caen.

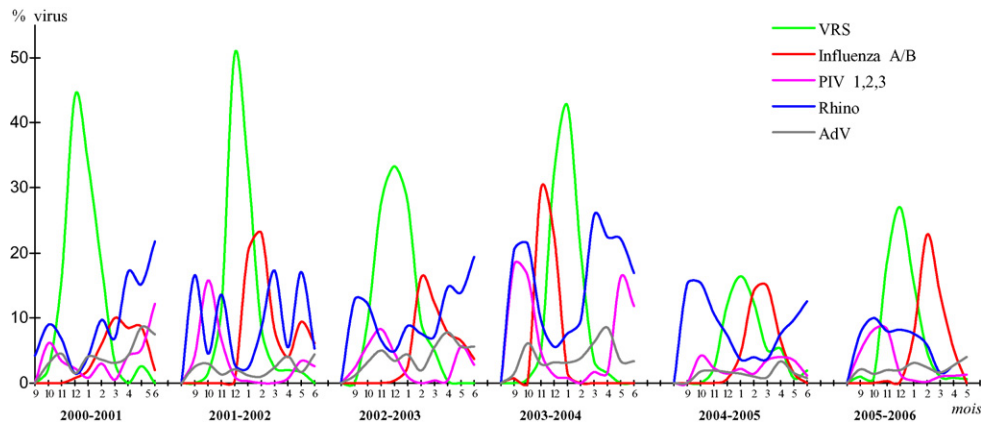


Figure 2 Répartition saisonnière des infections virales respiratoires chez les patients hospitalisés au CHU de Caen (en ordonnée : pourcentage des virus par mois).

l'enfance, et la montée des anticorps ou la présence d'IgM spécifiques est difficile à démontrer dans les infections ultérieures. Ainsi, bien qu'utilisant des techniques « maisons » ultrasensibles pour la sérologie des infections à VRS de l'adulte, Ann Falsey observe six sérologies faussement négatives parmi 110 infections à VRS de l'adulte prouvées par culture et PCR [11]. Au total, la sérologie ne fournit pas d'aide au diagnostic des infections virales

respiratoires chez les adultes hospitalisés en réanimation. Elle conserve toute sa valeur au plan épidémiologique.

Recherche directe du virus ou ses constituants

Le diagnostic d'infection virale repose avant tout sur la recherche directe du virus ou de ses constituants dans les sécrétions respiratoires. Quel que soit l'âge du patient ou la pathologie, elle se fait à partir d'un prélèvement de sécré-

tions nasales (et non pharyngées) parce que les cellules cylindriques ciliées sont le siège électif de la réplication virale. Il y a, par exemple, 4,34 log₁₀ TCID₅₀/ml (doses infectieuses 50 en culture de tissus) dans le nez d'un enfant atteint de bronchiolite à VRS contre 1,63 log₁₀ TCID₅₀/ml dans la gorge [12]. Par rapport à l'enfant, les sécrétions nasales sont plus difficiles à recueillir chez l'adulte : l'infection virale y est peu exsudative, et le mucus souvent épais. Dès lors, il est parfois plus facile de recueillir les sécrétions par lavage nasal à l'aide de quelques millilitres de sérum physiologique ou de milieu de transport virologique. L'écouvillonnage nasal est possible chez l'adulte, mais à condition :

- d'humidifier le coton de l'écouvillon par immersion dans le milieu de transport ;
- d'appuyer suffisamment le coton sur les parois des fosses nasales pour détacher des cellules épithéliales ;
- de bien essorer les sécrétions dans le milieu de transport.

Enfin le recueil, s'il est possible, de sécrétions trachéales ou bronchiques est d'un grand intérêt chez l'adulte, car ce type d'échantillon est très riche en cellules respiratoires. Les conditions dans lesquelles s'effectue le recueil des sécrétions nasales conditionnent l'efficacité diagnostique. La précocité du prélèvement par rapport au début clinique est essentielle, quel que soit le virus. Dans la grippe expérimentale de l'adulte par exemple, la réplication virale est maximale 48 heures après l'inoculation ; elle chute ensuite progressivement avec très peu de virus résiduels après six à huit jours [13]. Dans l'infection à VRS, l'élimination nasale du virus est plus courte et moins forte chez l'adulte que chez l'enfant (respectivement trois à quatre jours vs cinq à dix jours, et < 10³ vs < 10⁶ TCID₅₀/ml) [14]. Plus les signes cliniques sont accentués, plus le prélèvement sera riche en virus, et la recherche virale facilitée. Chez des volontaires infectés par un virus influenza, le titre viral est de 10³ à 10⁷ TCID₅₀/ml dans le lavage nasal s'ils sont symptomatiques, et inférieur à 10³ TCID₅₀/ml chez les sujets asymptomatiques, ou ceux présentant une infection minime des voies aériennes supérieures [15]. Enfin, la cellularité de l'échantillon doit être suffisante, car la majorité des virus contenus dans le prélèvement restent dans les cellules ou sont adsorbés à leur membrane. En raison de la fragilité des virus enveloppés et des cellules infectées dans le milieu extérieur, les prélèvements peuvent être transmis tels quels si leur acheminement est rapide (< 2 heures). Sinon, ils doivent être placés dans un milieu de transport virologique, et conservés au froid, à 4 °C, pour un transport n'excédant pas 24 à 48 heures, au moins pour les recherches virales en IF ou culture. Si l'échantillon doit être congelé, la technique d'IF ne sera plus praticable. La température de congélation doit être inférieure à -70 °C pour maintenir les virus viables, mais une conservation à -20° suffit pour une recherche des acides nucléiques viraux. Au total, le prélèvement nasal ou trachéobronchique doit rapporter une quantité suffisante de sécrétions (au moins 200 µl) ; sa richesse en cellules épithéliales doit être vérifiée par la turbidité du liquide dans lequel les sécrétions ont été exprimées, et le transport doit être protégé.

Antigènes viraux par immunofluorescence (IF)

La mise en évidence d'antigènes viraux par IF dans les cellules infectées est en théorie la méthode la plus intéressante à utiliser pour la recherche des virus. Simple à mettre en œuvre et économique, elle fournit en moins d'une heure un résultat qui peut être exprimé sous forme semi-quantitative. Des anticorps monoclonaux sont disponibles pour rechercher et identifier les virus influenza A et B, les quatre virus para-influenza, le VRS, les adénovirus, et très récemment le hMPV. En revanche, il n'y a pas de recherche possible pour les rhinovirus et les entérovirus, en raison du nombre élevé de sérotypes et de l'absence d'antigène de groupe ou d'anticorps disponibles à ce jour pour détecter les cinq CoV, le virus influenza type C et le bocavirus. Chez l'enfant, l'IF s'avère au moins aussi performante que l'isolement en culture, classiquement pris comme système de référence. La fausse négativité d'un test d'IF résulte le plus souvent d'un prélèvement de mauvaise qualité. Chez l'adulte, la recherche virale par IF est souvent décevante. Le VRS, par exemple, est détecté par culture ou recherche d'antigène dans moins de 50 % des cas chez les personnes âgées infectées [16]. Dans une étude réalisée à Caen sur 51 pneumopathies infectieuses en réanimation, la culture ou les tests de détection antigénique directe détectent moins d'échantillons positifs que la culture ou les tests moléculaires : 11 positifs vs 17 [17].

La mise en évidence d'antigènes viraux par marquage immunoenzymatique (IE) repose sur le même principe que l'IF. Les tests d'IF et d'IE se pratiquent sur les mêmes types de prélèvements et leurs niveaux de sensibilité et de spécificité sont comparables. Il existe moins de réactifs disponibles en technique IE qu'en IF : ils sont limités à la détection des virus influenza, du VRS, et récemment du hMPV. Des tests IE unitaires, reposant sur un principe d'immunochromatographie, sont disponibles pour identifier une infection à VRS ou à virus influenza. Leur avantage est qu'ils sont utilisables « au lit du malade », permettant au clinicien d'identifier un de ces deux virus en environ 15 minutes. Chez l'enfant admis dans un service d'urgence pédiatrique, ils peuvent participer à la décision d'hospitalisation [18]. Dans un service de réanimation adulte on peut se poser la question de leur emploi pour identifier une pneumopathie infectieuse virale, notamment grippale. Le problème majeur posé avec ce type de tests de diagnostic rapide est celui de leur sensibilité. Tous les kits actuels sont capables de détecter tous les types de virus influenza, y compris les souches aviaires A/H5N1, mais leur sensibilité est nettement inférieure à celle de l'isolement en culture [19]. La sensibilité dépend aussi du type et de la qualité du prélèvement, de l'âge des patients, du type de maladie. L'utilisation de ces tests par les praticiens sur le terrain peut être acceptable pour la surveillance des épidémies grippales [20]. Elle est beaucoup plus problématique pour un diagnostic de pneumonie chez un patient en réanimation. On peut éventuellement les utiliser en première intention, mais, que le résultat soit positif ou négatif, il devra de toutes façons être contrôlé par une technique de référence : culture ou PCR...

Isolement en culture de cellules

La recherche virale par isolement en culture de cellules a des indications limitées. L'isolement en culture de cellules

représente un système d'amplification virale, une seule particule infectieuse pouvant, en théorie, aboutir à une culture positive. Ayant dans l'absolu la sensibilité la meilleure, la culture a été longtemps considérée comme la technique de référence. L'isolement des virus respiratoires sur des cultures cellulaires est de moins en moins utilisé aujourd'hui par les laboratoires de virologie non spécialisés pour plusieurs raisons. La technique de cultures cellulaires, déjà délicate et exigeante, nécessite ici l'emploi de plusieurs lignées cellulaires cultivées en parallèle, certaines cellules étant plus adaptées que d'autres à l'isolement viral. Par exemple, les cellules MRC5 permettent l'isolement du VRS, mais non celui des virus influenza, et inversement, les cellules MDCK sont adaptées à l'isolement des virus influenza mais non à celui du VRS, etc. De plus, des techniques d'identification spécifiques (IF, séroneutralisation, méthodes PCR) s'ajoutent à l'isolement viral, compliquant la procédure et retardant le résultat. Ainsi, le délai de réponse de la culture est toujours long, allant de 5 à 21 jours, ce qui est peu compatible avec une exploitation rapide des données virales. Par ailleurs, il existe des facteurs liés au prélèvement, qui exposent à des résultats faussement négatifs : facteurs chimiques inactivant les virus, inhibiteurs de la croissance virale (anticorps, interférons, contamination bactérienne...). En dépit de ces facteurs, l'isolement des virus respiratoires en culture est plus performant que la détection antigénique directe, et cela quel que soit l'âge ou l'état clinique du patient. À titre d'exemple, nous avons comparé la détection antigénique directe par IF à l'isolement en culture sur 2150 aspirations nasales d'enfants hospitalisés et infectés par un virus respiratoire au cours de trois hivers successifs [10]. L'IF a détecté seulement 57 % des aspirations nasales positives. L'apport de la culture a permis la détection supplémentaire de 30,5 % de virus influenza, 21,1 % d'adénovirus, 19 % de virus para-influenza, et la mise en évidence de 272 infections à rhinovirus, et 35 à CoV. Au total, la recherche virale en culture reste intéressante pour le diagnostic des infections virales respiratoires en réanimation en raison de sa grande efficacité. Cependant, en raison de ses complexités et délais de réponse, il paraît plus judicieux de l'utiliser en deuxième intention, sur des échantillons qui auraient été trouvés négatifs par les techniques rapides d'IF.

Diagnostic virologique moléculaire

La recherche du génome viral par hybridation simple sur des sécrétions respiratoires, ou par hybridation in situ sur des coupes histologiques est une méthode trop peu sensible pour le diagnostic. Elle est intéressante pour localiser le virus dans les pathologies pulmonaires complexes ou les études physiopathologiques. Les méthodes d'amplification génique (PCR) ont beaucoup d'avantages pour le diagnostic des infections virales respiratoires, qu'il s'agisse d'enfants ou d'adultes, et qu'ils soient hospitalisés en réanimation, ou non. En effet, elles sont capables de détecter quelques virus ou équivalent-génomés (EG), par unité de volume testée. Cette grande sensibilité est particulièrement utile chez l'adulte où la charge virale dans les sécrétions respiratoires est naturellement plus faible que chez l'enfant. Les acides nucléiques viraux sont présents plus

longtemps dans les voies respiratoires des sujets infectés que ne le sont les virus cultivables. Cette caractéristique est intéressante chez les adultes, dont l'hospitalisation dans les pneumopathies infectieuses est en général plus tardive que celle des nourrissons. Enfin, les exigences concernant le recueil et le transport des prélèvements sont moins fortes pour la recherche des acides nucléiques viraux puisque les cellules (dans le cas de l'IF) ou les virus (dans le cas de la culture) n'ont pas à être préservés. Les techniques PCR détectent également des particules virales incomplètes, non infectieuses. La charge virale mesurée en EG/ml n'est donc pas superposable à celle mesurée en TCID50/ml. Mais cette particularité n'est pas un inconvénient pour le diagnostic, du moins à la phase aiguë de la maladie. Les méthodes PCR ont encore d'autres avantages. Grâce au choix de la localisation de la région amplifiée sur le génome viral, on peut obtenir des outils PCR plus ou moins spécifiques de l'espèce, du type ou de la souche virale. On dispose ainsi de PCR identifiant, soit le virus ou le genre viral (exemple : VRS, rhinovirus, adénovirus, entérovirus), soit le type ou le sous-groupe viral (exemple : virus influenza A ou B, VRS A ou B, virus para-influenza 3), soit le sous-type (exemple : virus influenza A/H3 ou H1 ou H5, adénovirus spB...). Il est possible également d'étudier la variation génétique des souches par le séquençage des produits d'amplification et de mesurer la charge virale dans les échantillons respiratoires. Enfin, les techniques de détection des acides nucléiques sont les seules autorisées pour rechercher les virus hautement pathogènes que sont le SARS-CoV ou les virus influenza A/H5N1, puisque l'on travaille dans ces cas sur des acides nucléiques, lesquels ne sont pas directement infectants.

La supériorité des méthodes PCR sur les techniques conventionnelles pour la recherche de chaque virus respiratoire est établie depuis longtemps [21-23]. Mais compte tenu du nombre de virus à rechercher, les méthodes PCR dites « multiplex », capables de détecter simultanément plusieurs virus respiratoires, sont très intéressantes. Leur supériorité a été bien montrée dans les infections respiratoires de l'enfant hospitalisé, où elles augmentent à la fois la détection des virus respiratoires classiques et la recherche de virus respiratoires non ou très difficilement cultivables : CoV, hMPV, rhinovirus, virus influenza C, bocavirus... [10,24-26]. Dans une étude réalisée chez 263 enfants consultant aux urgences pédiatriques du CHU de Caen pour une infection respiratoire aiguë, nous avons comparé l'efficacité des méthodes conventionnelles d'IF, permettant la détection de sept virus différents, d'IF et de culture, permettant la détection de 13 virus, à des PCR multiplex pouvant détecter jusqu'à 15 virus [18]. Cent cinquante-cinq (57,6 %) aspirations nasales ont été trouvées positives en IF, 188 (72,3 %) positives en IF et culture, et 242 (92 %) positives en PCR multiplex. Les techniques multiplex PCR détectent 124 virus qui n'avaient pas été détectés par les méthodes conventionnelles : 68 rhinovirus, 17 hMPV, 15 VRS, huit virus para-influenza, cinq CoV et deux virus influenza. L'utilisation des multiplex PCR en routine est difficile en raison de leur complexité (plusieurs multiplex sont nécessaires), de la longueur de la réalisation de la technique (qui comprend les phases d'extraction, de *reverse transcription*, de PCR et de révélation par électrophorèse

ou hybridation), et de l'absence de standardisation, puisqu'il s'agit uniquement de techniques « maison ». L'apparition récente des méthodes de PCR multiplex en temps réel permet de gagner du temps sur les phases de PCR et de révélation. Templeton et al. ont décrit deux PCR multiplex en temps réel pour la détection de sept virus respiratoires : virus influenza A et B, VRS, virus para-influenza 1, 2, 3, 4. Ces méthodes ont détecté 20 virus supplémentaires aux 67 souches virales isolées en culture : cinq virus influenza, huit VRS, sept virus para-influenza [27]. Kuypres et al. ont comparé des méthodes multiplex en temps réel à la détection antigénique en IF sur 1138 échantillons respiratoires d'enfants. Au moins un virus a été détecté dans 436 (38,3 %) échantillons par IF, et dans 606 (53,4 %) échantillons par PCR ($p < 0,001$) [28].

Chez les adultes hospitalisés en réanimation, quelques études récentes confirment la supériorité des méthodes PCR sur les techniques conventionnelles pour le diagnostic des pneumopathies infectieuses. La première, menée en 2004, a identifié un virus chez un tiers des patients (17/51) non immunodéprimés et hospitalisés en réanimation pour une pneumopathie grave : six virus influenza, trois VRS, trois rhinovirus, deux adénovirus, un virus para-influenza, un CMV et un virus herpès simplex [17]. La recherche virale a été faite sur des aspirations nasales ou trachéales, et les PCR étaient des techniques « maison », unitaires, recherchant huit virus. Neuf (17,6 %) virus respiratoires classiques ont été détectés par les méthodes conventionnelles, et 15 (29,4 %) par les outils moléculaires. En 2005, Legoff et al. ont utilisé une technique multiplex PCR commerciale et des méthodes PCR « maison » pour rechercher dix virus respiratoires dans 41 LBA de patients atteints de pneumonie, hospitalisés en réanimation [29]. Ils ont identifié seulement un seul virus par ces méthodes conventionnelles (virus influenza A), et 14 (29,8 %) virus par les PCR : huit virus influenza, deux virus para-influenza, deux VRS, deux adénovirus. L'étude de Carrat et al. a concerné 122 patients hospitalisés dans un service de réanimation pour défaillance cardiorespiratoire au cours de deux hivers successifs [30]. La recherche virale a été faite sur des sécrétions nasales par des techniques « maison » de PCR en temps réel pour détecter les virus influenza, VRS et hMPV, et par des PCR unitaires pour les rhinovirus et CoV 229E et OC43. Vingt-deux prélèvements (17 %) ont été trouvés positifs pour un virus respiratoire : huit avec un virus influenza, six un VRS, quatre un rhinovirus, deux un hMPV et un avec un CoV OC43. L'étude prospective de Daubin et al. a comparé des techniques moléculaires et des conventionnelles [31]. Elle concernait 187 patients, intubés et ventilés, admis dans un service de réanimation entre septembre 2003 et septembre 2004. La recherche virale était faite sur des aspirations trachéobronchiques par des méthodes conventionnelles d'IF et de culture et par des PCR multiplex « maisons » détectant 13 virus respiratoires. Quarante-cinq virus ont été détectés chez 41 (22 %) : 24 rhinovirus, sept virus influenza, deux VRS, deux entérovirus, un virus para-influenza 3, un adénovirus, un CoV 229E. Par ailleurs, sept virus herpès simplex ont été isolés en culture, le plus souvent en association avec un virus respiratoire. Dans cette étude 65,7 % des virus respiratoires étaient détectés par les PCR multiplex, et 34,3 % par les méthodes conventionnelles.

Bien qu'il y ait de grandes différences dans les méthodologies conventionnelles ou moléculaires utilisées dans ces études, elles montrent toutes que les méthodes PCR sont plus efficaces que les méthodes conventionnelles pour le diagnostic des infections virales respiratoires chez les adultes en réanimation. Elles identifient des virus qui ne peuvent pas être trouvés par ces dernières. Elles augmentent la détection des virus respiratoires classiques lorsque la charge virale de l'échantillon est faible. Ainsi, il a été montré que la plupart des échantillons trouvés négatifs en IF et positifs en PCR contenaient un titre viral inférieur d'au moins trois log. par rapport aux échantillons positifs en IF et PCR [28]. Cette caractéristique de sensibilité est un élément important justifiant la place, certainement prioritaire, des techniques moléculaires pour la recherche des virus dans les infections respiratoires de l'adulte, notamment en réanimation. Néanmoins, dans un laboratoire de virologie clinique où la rapidité, le coût modéré et la simplicité des techniques sont des exigences prioritaires, le meilleur choix est peut-être d'utiliser séquentiellement les techniques, en débutant par l'IF, et en poursuivant la recherche par les PCR multiplex en cas de négativité de l'IF.

Les techniques de diagnostic des infections virales respiratoires en cas d'immunodépression

Chez les sujets immunodéprimés, la fréquence des pneumonies dues aux virus respiratoires classiques (virus influenza, VRS, etc.) ne paraît pas plus élevée que dans la population normale. En revanche, dans des situations de forte immunodépression (greffe médullaire, traitement des rejets...), et avec certains virus (VRS, virus para-influenza, adénovirus), l'affection est plus grave et la localisation respiratoire souvent à l'origine d'une dissémination hématogène de l'infection. Les pneumonies virales des sujets immunodéprimés sont plus souvent dues à des virus latents, l'immunodépression favorisant à la fois la réactivation virale et son expression clinique. Le CMV est considéré comme un agent majeur de morbidité et de mortalité par pneumonie interstitielle chez les sujets transplantés et ceux atteints de sida [32]. L'atteinte pulmonaire est fréquente (28 p. 100) dans les varicelles graves des sujets immunodéprimés [33]. L'infection latente du tissu ganglionnaire par certains adénovirus (types 1,2,5,6...) est fréquemment réactivée en cas d'immunodépression, et peut entraîner des infections disséminées avec atteinte pulmonaire grave [34].

Le diagnostic virologique de ces pneumonies virales ne fait pas appel à des techniques différentes de celles utilisées chez l'immunocompétent. La recherche virale s'effectuera à la fois sur les sécrétions bronchiques recueillies au début de la manœuvre conduisant au lavage bronchoalvéolaire (LBA), et sur ce LBA. Par ailleurs, comme dans ces atteintes l'élimination des virus par les voies aériennes est plus prolongée que chez le sujet immunocompétent (15 jours en moyenne au lieu de six dans la grippe A, de 40 à 112 jours au lieu de cinq à sept dans l'infection à VRS) et que la charge virale est souvent élevée, les recherches virales directes, même retardées peuvent être positives.

Pneumonies à CMV

Il est particulièrement difficile de porter le diagnostic de pneumonie à CMV chez le sujet immunodéprimé [35]. Le critère biologique traditionnel basé sur la détection d'inclusions spécifiques dans les cellules est souvent pris en défaut, car de telles inclusions sont très rarement décelées dans le LBA par rapport à celles trouvées dans le tissu pulmonaire [36], et la biopsie pulmonaire est rarement disponible. Enfin, le nombre et la distribution des cellules répliquant le virus (porteuses d'inclusions) ne reflètent pas l'importance de l'altération fonctionnelle du poumon, puisque des cellules infectées de façon abortive peuvent contribuer à la lyse cellulaire [37]. En l'absence d'inclusions, la pneumonie à CMV est probable lorsque le CMV est le seul pathogène décelé dans le LBA et que la maladie répond favorablement au traitement antiviral. Par ailleurs, on sait que l'isolement du CMV dans le LBA de certains patients n'ayant pas de pneumonie a une valeur pronostique importante, puisque, par exemple, les patients greffés de moelle ont 70 % de risques de présenter une pneumonie interstitielle à CMV si le traitement antiviral n'est pas débuté à ce stade [38]. Ainsi, la mise en évidence du CMV dans le LBA par isolement en culture ou détection de séquences virales est utile au clinicien dans sa démarche diagnostique et thérapeutique. La culture dite rapide, associant centrifugation de l'inoculum sur les fibroblastes et détection par immunocytochimie des antigènes très précoces donne un résultat en 24 à 48 heures qui peut être quantitatif si on rapporte le nombre de cellules marquées à l'inoculum. Il existe aujourd'hui des techniques standardisées et commercialisées pour la détection par PCR et la quantification du CMV dans les produits pathologiques. Plus simples à réaliser et plus rapides, elles ont tendance à remplacer l'isolement en culture dans les laboratoires. Des études récentes sur la quantification, l'expression génomique et la distribution du CMV dans les deux fractions cellulaires et acellulaires du LBA fournissent des résultats intéressants. La quantification de l'ADN CMV dans le LBA a une grande valeur diagnostique, car elle est corrélée au nombre d'inclusions présentes dans le tissu pulmonaire [39]. D'autres auteurs ont montré que la quantité d'ADN CMV présent dans le LBA est significativement plus grande chez les patients atteints de pneumonie à CMV que chez les excréteurs asymptomatiques [40]. De plus, la charge virale déterminée dans le LBA est supérieure à celle du compartiment sanguin chez les patients présentant une pneumopathie à CMV [39]. En culture, le CMV est fréquemment isolé des fractions cellulaires et acellulaires du LBA, mais la présence du virus dans les cellules est plus étroitement associée à la pneumonie à CMV que sa présence dans la phase acellulaire [41]. Des ARNm spécifiques de gènes précoces (IE1 ARNm) ou tardifs (gH ARNm) sont constamment trouvés dans les pneumonies à CMV certaines ou probables, et jamais décelés chez les excréteurs asymptomatiques, ou les sujets séropositifs seulement. Enfin, il faut souligner que si la recherche des marqueurs d'infection active à CMV apporte la preuve d'une répllication virale (augmentation significative des anticorps IgG anti-CMV, ou présence d'IgM, existence de fortes virémie, antigénémie ou charges

virales sanguines), elle n'en indique pas la localisation, et ne permet pas de porter le diagnostic de pneumonie à CMV.

Pneumonies à adénovirus

Chez les sujets immunodéprimés, l'infection à adénovirus est caractérisée par trois éléments. Les atteintes cliniques sont nombreuses et variées : poumon, rein, foie, intestin. Les localisations hépatiques et pulmonaires sont fréquentes. Cette dernière aggrave le pronostic avec un taux de mortalité de 60 % [34]. Les sérotypes rencontrés sont avant tout ceux induisant une infection latente du tissu lymphoïde : sérotypes 1,2,5,6 de l'espèce C ; mais des sérotypes rares, atypiques ou nouveaux, sont parfois en cause. Enfin, le processus lésionnel pulmonaire, peut, comme dans l'infection à CMV, ne pas être directement lié à l'intensité de la répllication virale, mais à des cycles infectieux incomplets [42]. Les pneumonies à adénovirus sont rares chez les sujets immunodéprimés ou en réanimation [43].

Le diagnostic des pneumonies à adénovirus comporte une recherche virale dans les sécrétions trachéobronchiques et alvéolaires. La recherche directe en IF est une méthode peu sensible dans le diagnostic de la pathologie respiratoire commune à adénovirus de l'enfant, et il y a toute raison de penser, que chez l'immunodéprimé, et si l'infection est non permissive, elle l'est encore moins. Les sérotypes responsables des infections respiratoires communes à adénovirus sont au nombre d'une dizaine, et en général, isolables sur les systèmes de culture traditionnels. En revanche, pour les sérotypes rares, et a fortiori atypiques (recombinants?) ou nouveaux, la culture peut être négative. Pour ces raisons, la recherche d'adénovirus par PCR dans les sécrétions bronchiques et alvéolaires est nécessaire pour le diagnostic des pneumonies à adénovirus chez l'immunodéprimé. Il existe de nombreuses techniques, permettant, soit la détection d'un adénovirus, soit l'identification de l'espèce [44]. La recherche et la quantification d'une virémie peuvent apporter des informations complémentaires utiles au diagnostic [45].

Conclusion

L'identification d'un virus dans une atteinte respiratoire de l'adulte, qu'il soit ou non hospitalisé en réanimation, est encore dominée en routine, par les méthodes immunologiques de diagnostic direct et rapide. L'apparition de nouveaux anticorps monoclonaux pourra permettre d'élargir le champ des investigations virologiques, mais il restera toujours de nombreux virus non détectables par cette méthode. De plus, la faible charge virale présente dans les sécrétions respiratoires des atteintes de l'adulte limitera toujours l'intérêt de la détection antigénique directe. Dans ce contexte, il y a donc une grande place pour les méthodes ultrasensibles, telles que l'isolement en culture ou les méthodes PCR. Il est clair que la culture sera de moins en moins utilisée et remplacée par des PCR multiples, compte tenu du nombre et de la diversité génétique des virus à rechercher. Mais, à ce jour, ces techniques PCR multiplex restent encore d'une utilisation très difficile en routine. Il s'agit avant tout de techniques « maison », compliquées à mettre en œuvre, nécessitant de nombreux

contrôles dus à l'absence de standardisation et d'automatisation, et enfin d'un coût relativement élevé. Les méthodes de PCR multiplex en temps réel représentent vraiment le développement prioritaire des prochaines années. Le problème de la validation clinique des résultats de PCR semble aujourd'hui résolu, mais la persistance post aiguë du VRS, du hMPV ou des rhinovirus est intrigante [46-48].

Références

- [1] Gardner PS, McQuillin J. Application of immunofluorescent antibody technique in the rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *BMJ* 1968;3:340-3.
- [2] Zhang W, Evans DH. Detection and identification of human influenza by the polymerase chain reaction. *J Virol Methods* 1991;33:165-89.
- [3] Cubie HA, Ingis JM, Leslie EE, Edmunds AT, Totapally B. Detection of respiratory syncytial virus in acute bronchiolitis in infants. *J Med Virol* 1992;38:283-7.
- [4] Freymuth F, Vabret A, Legrand L, Eterradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:92-4.
- [5] Vabret A, Mourez T, Dina J, Van der Hoek L, Gouarin S, Petitjean J, et al. Human coronavirus NL63, France. *Emerg Infect Dis* 2005;11:1225-9.
- [6] Vabret A, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, Corbet S, Freymuth F. Detection of the new human coronavirus HKU1: a report of 6 cases. *Clin Infect Dis* 2006;42:634-9.
- [7] Foulongne V, Rodière M, Segondy M. Human bocavirus in children. *Emerg Infect Dis* 2006;12:862-3.
- [8] Freymuth F, Quibrac M, Petitjean J, Daon F, Amiel ML. Les virus responsables d'infections respiratoires en pédiatrie. Bilan de 3480 aspirations nasales réalisées chez l'enfant en une période de six ans. *Ann Pediatr (Paris)* 1987;34:493-501.
- [9] A combined study group. Some aspects of the recent epidemic of influenza in Dundee. *BMJ* 1958;1:908-13.
- [10] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean-Lecherbonnier J, et al. Development of three multiplex RT-PCR assays for the detection of 12 respiratory RNA viruses. *J Virol Methods* 2005;126:53-63.
- [11] Falsey AR, Formica MA, Walsh EE. Diagnosis of respiratory syncytial virus infection, comparison of reverse transcription-PCR to viral culture and serology in adults with respiratory illness. *J Clin Microbiol* 2002;40:817-20.
- [12] Hall CB, Douglas Jr. RG. Clinically useful method for the isolation to respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1975;131:1-5.
- [13] Richman DD, Murphy BR, Baron S, Uhlendorf C. Three strains of influenza A virus (H3N2): interferon sensitivity in vitro and interferon production in volunteers. *J Clin Microbiol* 1976;3:223-6.
- [14] Falsey AR, Walsh EE. Respiratory syncytial virus infection in adults. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:371-84.
- [15] Murphy BR, Clements ML. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. *Curr Top Microbiol Immunol* 1989;146:107-16.
- [16] Falsey AR, Treanor JJ, Betts RF, Walsh EE. Viral respiratory infections in the institutionalised elderly: clinical and epidemiological findings. *J Am Geriatr Soc* 1992;40:115-9.
- [17] Freymuth F, Vabret A, Gouarin S, Petitjean J, Charbonneau P, Lehoux P, et al. Épidémiologie et diagnostic des infections à virus respiratoire syncytial de l'adulte. *Rev Mal Respir* 2004;2:35-42.
- [18] Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78:1498-504.
- [19] Chan KH, Lam SY, Puthavathana P, Nguyen TD, Long HT, Pang CM, et al. Comparative analytical sensitivities of six rapid influenza A antigen detection test kits for detection of influenza A subtypes H1N1, H3N2 and H5N1. *J Clin Virol* 2007;38:169-71.
- [20] Wunderli W, Thomas Y, Müller DA, Dick M, Kaiser L. Rapid antigen testing for the surveillance of influenza epidemics. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:295-300.
- [21] Freymuth F, Vabret A, Galateau-Salle F, Eugène G, Petitjean J, Gennetay E, et al. Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus 3, adenovirus and rhinovirus sequences in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridization. *Clin Diagn Virol* 1997;8:31-40.
- [22] Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, et al., The New Vaccine Surveillance Network Study Group. Superiority of reverse-transcription polymerase chain reaction to conventional viral culture in the diagnosis of acute respiratory tract infections in children. *J Infect Dis* 2004;189:706-10.
- [23] Rovida F, Percivalle E, Zavattoni M, Torsellini M, Sarasini A, Campanini G, et al. Monoclonal antibodies versus reverse transcription-PCR for detection of respiratory viruses in a patient population with respiratory tract infections admitted to hospital. *J Med Virol* 2005;75:336-47.
- [24] Coiras MT, Aguilar JC, Garcia ML, Casas I, Perez-Brena P. Simultaneous detection of fourteen respiratory viruses in clinical specimens by two multiplex reverse transcription nested-PCR assays. *J Med Virol* 2004;72:484-95.
- [25] Fan J, Henrickson KJ, Savatski L. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridisation assay (Hexaplex). *Clin Infect Dis* 1998;25:1397-402.
- [26] Grondahl B, Puppe W, Hoppe A, Kuhne I, Weigl JA, Schmitt HJ. Rapid identification of nine microorganisms causing acute respiratory tract infections by single-tube multiplex reverse transcription-PCR: feasibility study. *J Clin Microbiol* 1999;37:1-7.
- [27] Templeton KE, Scheltinga SA, Beersma MF, Kroes AC, Claas EC. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4. *J Clin Microbiol* 2004;42:1564-9.
- [28] Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, Huang ML, Cent A, Corey L, et al. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children. *J Clin Microbiol* 2006;44:2382-8.
- [29] Legoff J, Guérot E, Ndjoyi-Mbiguino A, Matta M, Si-Mohamed A, Gutmann L, et al. High prevalence of respiratory viral infections in patients hospitalized in an intensive care unit for acute respiratory infections as detected by nucleic acid-based assays. *J Clin Microbiol* 2005;43:455-7.
- [30] Carrat F, Leruez-Ville M, Tonnellier M, Baudel JL, Deshayes J, Meyer P, et al. A virologic survey of patients admitted to a critical care unit for acute cardiorespiratory failure. *Intensive Care Med* 2006;32:156-9.
- [31] Daubin C, Parienti JJ, Vincent S, Vabret A, Du Cheyron D, Ramakers M, et al. Epidemiology and clinical outcome of virus-positive respiratory samples in ventilated patients: a prospective cohort study. *Crit Care* 2006;10:R142.
- [32] Smith CB. Cytomegalovirus pneumonia. State-of-the-art. *Chest* 1989;95:1825-1875.
- [33] Balfour HH. Varicella zoster infections in immunocompromised hosts. *Am J Med* 1988;85:68-73.

- [34] Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992;5:262-74.
- [35] Mayaud C, Parrot A, Cadranet J. Pneumopathies virales de l'immunodéprimé. In: Freymuth F, editor. *Bronchopneumopathies virales*. Guides MédiBio. Paris: Éditions scientifiques et médicales Elsevier; 2001. p. 99-106.
- [36] Rodriguez-Barradas MC, Stool E, Musher DM, Gathe J, Golstein J, Genta RM, et al. Diagnosing and treating cytomegalovirus pneumonia in patients with AIDS. *Clin Infect Dis* 1996;23:76-81.
- [37] Fillet AM. Les pneumonies à cytomégalovirus. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1995;6:9-17.
- [38] Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, Zaia JA. A randomised, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogenic bone marrow transplants. *N Engl J Med* 1991;324:1005-11.
- [39] Chemaly RF, Yen-Lieberman B, Castilla EA, Reilly A, Arrigain S, Farver C, et al. Correlation between viral loads of cytomegalovirus in blood and bronchoalveolar lavage specimens from lung transplant recipients determined by histology and immunohistochemistry. *J Clin Microbiol* 2004;42:2168-72.
- [40] Boivin G, Olson CA, Quirk MR, Kringstad B, Hertz MI, Jordan MC. Quantitation of cytomegalovirus DNA and characterization of viral gene expression in bronchoalveolar cells of infected patients with and without pneumonitis. *J Infect Dis* 1996;173:1304-12.
- [41] Storch GA, Ettinger NA, Ockner D, Wick MR, Gaudreault-Keener M, Rossiter J, et al. Quantitative cultures of the cell fraction and supernatant of bronchoalveolar lavage fluid for the diagnosis of cytomegalovirus pneumonia in lung transplant recipients. *J Infect Dis* 1993;168:1502-6.
- [42] Ginsberg HS, Prince GA. The molecular basis of adenovirus pathogenesis. *Infect Agents Dis* 1994;2:1-8.
- [43] Leleu G, Le Junter J, Morinet F. Les pneumonies à adénovirus. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1995;6:18-22.
- [44] Vabret A, Gouarin S, Joannes M, Barranger C, Petitjean J, Corbet S, et al. Development of a PCR – and hybridisation – based assay (PCR Adenovirus Consensus®) for the detection and the species identification of adenoviruses in respiratory specimens. *J Clin Virol* 2004;31:116-22.
- [45] Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, Buzyn A, Abachin E, Blanche S, et al. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38:45-52.
- [46] Schwarze J, O'Donnell DR, Rohwedder A, Openshaw PJM. Latency and persistence of respiratory syncytial virus despite T cell immunity. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:801-5.
- [47] Alvarez R, Harrod KS, Shieh WJ, Zaki S, Tripp RA. Human metapneumovirus persists in BALB/c mice despite the presence of neutralizing antibodies. *J Virol* 2004;78:14003-11.
- [48] Kling S, Donninger H, Williams Z, Vermeulen J, Weinberg E, Latiff K, et al. Persistence of rhinovirus RNA after asthma exacerbation in children. *Clin Exp Allergy* 2005;35:672-8.