

Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques étiologiques des infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois

Recommendations for the use of diagnostic testing in low respiratory infection in children older than three months

Titre court : Utilisation des nouveaux outils diagnostiques dans les infections respiratoires basses de l'enfant.

Auteurs

Groupe de Pilotage

V Houdouin¹, G Pouessel^{2,19}, F Angoulvant³, J Brouard⁴, J Derelle⁵, M Fayon⁶, A Ferroni⁷, JP Gangneux⁸, I Hau⁹, M Le Bourgeois¹⁰, M Lorrot¹¹, J Menotti¹², N Nathan¹³, A Vabret¹⁴, F Wallet¹⁵.

Groupe de Cotation

S Bonacorsi¹⁶, R Cohen¹⁷, J de Blic¹⁸, A Deschildre¹⁹, V Gandemer²⁰, I Pin²¹, A Labbe²², P Le Roux²³, A Martinot²⁴, S Rammaert²⁵

Groupe de Recherche sur les Avancées en Pneumo-Pédiatrie (GRAPP)

JC Dubus²⁶, C Delacourt²⁷, C Marguet²⁸.

1 : Service des Maladies Digestives et Respiratoires de l'Enfant, Hôpital Universitaire Robert Debré, Université Paris Diderot, APHP, Inserm U1016, Paris.

2 : Service de pédiatrie, centre hospitalier de Roubaix

3 : Service d'Accueil des Urgences Pédiatriques, Unité d'Epidémiologie Clinique - INSERM CIE5. Hôpital Robert Debré, APHP, Paris.

- 4 : Service de Pédiatrie Médicale, EA4655 U2RM, CHU de Caen, Caen.
- 5 : Service de médecine infantile et de génétique clinique, Hôpital d'enfants, Vandoeuvre, Nancy.
- 6 : CHU de Bordeaux, Département Pédiatrique, Centre d'Investigation Clinique (CIC 0005), Bordeaux.
- 7 : Service de Microbiologie, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris.
- 8 : Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Pontchaillou - CHU de Rennes, Rennes.
- 9 : Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil. Créteil.
- 10 : Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, APHP, Paris.
- 11 : Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Universitaire Robert Debrè, Université Paris Diderot, Inserm CIE5, APHP.
- 12 : Service de Parasitologie-Mycologie, hôpital Saint-Louis, AP-HP et Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris.
- 13 : Service de Pneumologie Pédiatrique - Hôpital Universitaire Armand Trousseau, Paris, APHP.
- 14 : Service de virologie, EA4655 U2RM, CHU de Caen, Caen
- 15 : Centre de Biologie et Pathologie, Institut de Microbiologie-Service de Bactériologie, CHU Lille.
- 16 : Service de Microbiologie, Hôpital Universitaire Robert Debrè, Université Paris Diderot, Inserm CIE5, APHP.
- 17 : Service de Microbiologie, Centre Hospitalier Intercommunal de Créteil. Créteil.
- 18 : Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris
- 19 : Unité de pneumologie et allergologie, clinique de pédiatrie, Hôpital Jeanne de Flandre, CHRU Lille
- 20 : Unité d'hémato-oncologie et greffes de moelle, UMR 6290 Université de Rennes 1 CHU Hôpital Sud- Rennes.

- 21 : Pédiatrie, CHU de Grenoble ; INSERM U823, Université Joseph Fourier, Grenoble.
22 : Service des Urgences Pédiatriques, CHU estaing, Clermont-Ferrand.
23 : Service de pédiatrie, Groupe hospitalier, Le Havre.
24 : Clinique de Pédiatrie, CHRU de Lille et Université de Lille 2
25: Université Paris-Descartes, Sorbonne Paris Cité, APHP, Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Hôpital Necker-Enfants Malades, Institut Imagine, Paris
26 : Unité de Pneumopédiatrie, CNRS URMITE 6236, CHU Timone-Enfants, Marseille.
27 : Service de Pneumologie et Allergologie Pédiatriques, Hôpital Universitaire Necker-Enfants Malades, APHP, Paris.
28 : Pneumologie et Allergologie Pédiatrique, CHU-Charles Nicole Université de Rouen, Rouen.

Abréviations :

AI: Aspergillose Invasive

BG : antigènes beta-(1-3)-D-glucanes

ECBC : Examen cyto bactériologique des crachats

ED : Examen Direct

GRAPP : Groupe de Recherche sur les Avancées en PneumoPédiatrie

GM : Antigènes galactomannanes d'*Aspergillus*

HAS : Haute Autorité de Santé

IF Immunofluorescence

IFI : Infection Fongique Invasive

IRB : Infection Respiratoire Basse

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire.

PCT : Procalcitonine

SP²A : Société Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie Pédiatrique

TDR : Test de Diagnostic Rapide

VARS : Voies Aériennes Respiratoires Supérieures

VPP : Valeur Prédictive Positive

VPN : Valeur Prédictive Négative

Abstract

Recommendations for the use of diagnostic testing in low respiratory infection in children older than three months, were produced by the Groupe de Recherche sur les Avancées en Pneumo-Pédiatrie (GRAPP) under the auspices of the French Paediatric Pulmonology and Allergology Society (SP2A). The Haute Autorité de Santé (HAS) methodology, based on the Formalized Consensus, was used. A first panel of experts analyzed the English and French literature to provide a second panel of experts with recommendations to validate. Only the recommendations are presented here, but the full text is available at the website of the French Paediatric Pulmonology and Allergology Society (SP2A).

1/Introduction et Méthodes.

L'apparition de nouveaux outils pour le diagnostic des infections respiratoires basses de l'enfant (IRB) nécessite une réflexion sur la pertinence de leur utilisation dans la prise en charge thérapeutique. La Société Pédiatrique de Pneumologie et d'Allergologie (SP²A) a proposé d'établir des recommandations chez l'enfant de plus de trois mois, qui ont été divisées en cinq volets: diagnostic du pneumocoque, diagnostic virologique, diagnostic des germes atypiques (*Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydomphila pneumoniae*), indications de la procalcitonine, et diagnostic des infections fongiques (pneumocystose et aspergillose invasive). La méthode utilisée pour la conduite de ces recommandations est inspirée du guide méthodologique « Bases méthodologiques pour l'élaboration de recommandations professionnelles par consensus formalisé » publié par la Haute Autorité de Santé (HAS) en janvier 2006¹. La recherche bibliographique a utilisé la base de données bibliographiques automatisées Embase avec combinaisons de mots clés MeSH et la recherche bibliographique sur moteur internet PubMed. La littérature en anglais et en français a été analysée. Les membres du groupe de pilotage étaient libres d'ajouter toute bibliographie pertinente. Cette recherche a identifié les recommandations

pour la pratique clinique, les conférences de consensus, les articles de décision médicale et les revues de la littérature et/ou méta-analyses. La littérature en anglais et en français a été analysée. Chaque membre du groupe de pilotage, par groupe de deux ou quatre, s'est vu attribué un volet de la thématique générale. La première réunion du groupe de pilotage a été consacrée à la présentation orale bibliographique. L'élaboration de recommandations a été réalisée après la présentation orale par chaque sous-groupe. Chaque sous-groupe a rédigé des propositions avec leur argumentaire qui ont été ensuite reformulées par le coordonnateur du groupe et adressées au groupe de cotation de façon à assurer une cotation initiale. Chaque recommandation a été cotée sur une échelle de 1 et 9 (1 : recommandation totalement inappropriée et 9 : totalement appropriée). L'attribution du niveau de preuve scientifique fourni par la littérature ainsi que la gradation des recommandations ont utilisé la classification proposée par le guide du consensus formalisé de l'HAS et issue du « guide d'analyse de la littérature et gradation des recommandations » publié par l'ANAES en Janvier 2000. Cette classification comprend 4 niveaux de preuve scientifique (côtés de 1 à 4) et 3 niveaux de gradations des recommandations (côtés de A à C).

[A] : une recommandation de grade A est fondée sur une preuve scientifique établie par des études de fort niveau de preuve comme des essais comparatifs randomisés de forte puissance et sans biais majeur, des méta-analyses d'essais comparatifs randomisés ou des analyses de décision basée sur des études bien menées (niveau 1)

[B] : une recommandation de grade B est fondée sur une présomption scientifique fournie par des études de niveau intermédiaire de preuve, comme des essais comparatifs randomisés de faible puissance, des études comparatives non randomisées bien menées ou des études de cohorte (niveau 2)

[C] : une recommandation de grade C est fondée sur des études de moindre niveau de preuve,

comme des études cas-témoins (niveau 3), des études comparatives comportant des biais importants, des études rétrospectives, des séries de cas ou des études épidémiologiques descriptives (transversale, longitudinale) (niveau 4)

[□] : en l'absence de preuve scientifique, des recommandations ont été proposées et gradées comme correspondant à un avis d'experts recueilli au sein des membres du groupe de pilotage. Le manque de preuve scientifique n'implique en rien que la recommandation n'est pas pertinente, mais qu'au contraire le groupe d'experts estime cette recommandation importante car fondée sur une pratique clinique, même s'il n'existe pas, à ce jour, d'étude pouvant attester de cette pertinence.

2/Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques dans les infections respiratoires basses de l'enfant à pneumocoque : évaluation des outils et indications.

2.1/Introduction.

Le diagnostic d'infection respiratoire basse à pneumocoque permet au niveau individuel une meilleure prise en charge, avec notamment une antibiothérapie adéquate, et au niveau collectif une surveillance épidémiologique permettant d'adapter les recommandations et le suivi de l'évolution des résistances. Il n'y a pas de « gold standard » pour le diagnostic bactériologique des pneumonies ni chez l'adulte ni chez l'enfant. L'enfant, beaucoup plus fréquemment que l'adulte, pose le problème du portage fréquent de *Streptococcus pneumoniae* au niveau des voies aériennes supérieures. La colonisation du rhinopharynx débute dès les premiers mois de la vie, atteint son maximum en âge préscolaire puis décline progressivement. Pour poser le diagnostic d'infection respiratoire basse à pneumocoque, il faut donc avoir des outils qui permettent de différencier le portage de l'infection.

2.2/Description des types de prélèvements nécessaires au diagnostic des IRB à *Streptococcus pneumoniae*.

Le diagnostic de certitude repose sur l'isolement du pneumocoque sur des prélèvements *à priori* stériles tels que le sang et le liquide pleural. Pour comparer les nouveaux outils diagnostiques, les études se réfèrent essentiellement aux hémocultures. La quantité de sang à prélever est fonction du poids de l'enfant. En pratique, les hémocultures sont réservées aux enfants hospitalisés ou vus aux urgences.

Dans la plupart des études, l'examen cyto bactériologique des crachats (ECBC) fait partie des outils diagnostiques. Cependant, cet examen ainsi que l'expectoration induite sont difficiles à réaliser chez le petit enfant. Lorsque cela est possible, un ECBC peut être réalisé chez le grand enfant, là encore seulement pour les pneumonies nécessitant une hospitalisation sous certaines conditions. Il existe des critères de qualité pour interpréter correctement un ECBC : au moins 25 leucocytes et moins de 10 cellules épithéliales par champ. Ces critères permettent de sélectionner l'ECBC le plus proche de l'aspiration trachéale². L'examen direct des ECBC permet de suspecter la responsabilité du pneumocoque dans 31 à 68% des cas selon les études. La culture des ECBC permet le diagnostic dans 28 à 86% des pneumopathies à pneumocoque identifiées par une bactériémie, un antigène soluble urinaire positif ou une PCR dans le sang chez les adultes³. Si l'on ne s'intéresse qu'aux pneumopathies à pneumocoque diagnostiquées par la clinique, la radiologie et l'hémoculture positive, l'examen direct et la culture de l'ECBC (correctement effectué et prélevé sans antibiothérapie préalable) suggère un pneumocoque dans 57% et 79% des pneumonies aiguës communautaires (PAC) respectivement. La valeur prédictive positive (VPP) de l'expectoration diminue en cas d'antibiothérapie ou de retard d'acheminement du prélèvement (si le prélèvement n'est pas conservé au froid)⁴. Les limites de l'ECBC sont également liées à la grande variabilité intra et inter-technicien⁵⁻⁶. Chez l'enfant, l'ECBC est donc un outil diagnostique qui ne peut être utilisé que sous certaines conditions.

Le prélèvement pharyngé n'est pas un bon outil pour le diagnostic de pneumocoque compte-tenu du portage.

Les urines sont prélevées pour la recherche de l'antigénurie pneumococcique. Elles doivent être fraîches et non concentrées.

Le lavage broncho-alvéolaire (LBA) est un examen invasif réservé à des situations particulières qui doit être effectué selon les recommandations de l'ERS ⁷.

2.3/ Description des outils diagnostiques dans les infections respiratoires basses à *S. pneumoniae*.

2.3.1/ Examen direct et culture.

Le diagnostic classique du pneumocoque est basé sur l'examen direct et la culture. L'aspect typique des pneumocoques à l'examen direct (*cocci* à Gram positif lancéolés) disparaît en cas de traitement antibiotique, rendant difficile son identification par des critères morphologiques. L'interprétation d'une culture positive est facile dans un liquide normalement stérile comme le sang, ou le liquide pleural au cours d'une pleurésie. Toutefois, dans une pneumopathie communautaire non compliquée, seules 3 à 10% des hémocultures sont positives. Pour les échantillons tels que l'expectoration, les prélèvements distaux ou le LBA, le portage nasopharyngé fréquent chez l'enfant rend leur interprétation difficile. On distingue alors la colonisation de l'infection par des seuils dont la justification n'a jamais été établie chez l'enfant. Ces seuils sont 10^7 UFC/ml pour l'ECBC et 10^4 UFC/ml pour le LBA.

2.3.2/ PCR.

La Polymerase Chain Reaction (PCR), comme la culture, n'est facilement interprétable que sur des prélèvements ne contenant pas le germe de façon commensale: liquide pleural, sang. Il n'existe pas de kit commercial de PCR ciblant le pneumocoque pour les prélèvements pulmonaires ou sanguins à la différence du liquide céphalo-rachidien. Deux méthodes de PCR sont décrites dans la littérature: une PCR spécifique ciblée uniquement sur le pneumocoque, et une PCR universelle bactérienne (ARN 16S) qui nécessite une étape de séquençage.

Plusieurs PCR spécifiques au pneumocoque existent en fonction des cibles génétiques choisies,

avec une sensibilité et une spécificité différentes⁸⁻¹¹: La PCR détectant le gène de la pneumolysine (*ply*) et la PCR détectant le gène de l'autolysine (*lytA*). Deux nouvelles cibles ont été récemment décrites: le fragment *Spn9802* (portion spécifique de l'ARNr16S) et le gène *psaA* (pneumococcal surface antigen).

La PCR universelle ARN 16S est ciblée sur un gène présent chez toutes les bactéries, codant pour l'ARN ribosomal 16S. La séquence de ce gène est connue pour plus de 4000 espèces. Elle met en évidence la plupart des bactéries classiques sans diagnostic présomptif de départ. Elle nécessite une étape de séquençage. Sa sensibilité est variable en fonction de l'espèce bactérienne (10 à 100 UFC/ml) et est souvent inférieure à celle des PCR spécifiques qu'il faut donc privilégier. De plus, la cible 16S différencie mal *S. pneumoniae* des autres streptocoques oraux. Cette PCR universelle est utilisée sur des prélèvements habituellement stériles, pour lesquels on suspecte une infection mono-bactérienne autre que *S. pneumoniae*. Elle a été bien évaluée sur les liquides pleuraux dans les pleuropneumopathies mais pas dans le sang¹².

2.3.2.1/PCR *S. pneumoniae* dans le sang.

La sensibilité de la PCR dans le sang est très variable en fonction des cibles spécifiques utilisées (29 à 100%) et semble meilleure chez l'enfant^{3, 13-14}. La spécificité chez l'enfant est moins bonne en raison du portage. La PCR détectant le gène de la pneumolysine (*ply*) dans le sang³ est peu spécifique et peut être positive dans le sang des porteurs pharyngés sains¹³⁻¹⁴. La PCR détectant le gène de l'autolysine (*lytA*) est plus sensible et spécifique que celle utilisant la cible *ply*¹⁵⁻¹⁶, et ne semble pas être influencée par un portage⁸. Deux nouvelles cibles: le fragment *Spn9802* et le gène *psaA* semblent spécifiques mais peu d'études ont été publiées à ce jour, avec une moindre sensibilité de *psaA* par rapport à *lytA*¹⁷.

2.3.2.2/PCR *S. pneumoniae* dans les prélèvements respiratoires.

Il n'existe pas de données dans la littérature qui ont évalué l'intérêt de la PCR spécifique *S. pneumoniae* dans l'expectoration ou le LBA chez l'enfant. Les rares études ayant évalué l'intérêt

de la PCR spécifique *S. pneumoniae* dans l'expectoration ont été faites chez l'adulte en utilisant la cible *ply*¹⁸⁻¹⁹. L'utilisation d'une PCR spécifique *S. pneumoniae* est potentiellement plus intéressante à réaliser dans le LBA que dans une expectoration, car le LBA, moins contaminé par la flore ORL, donne des résultats plus spécifiques. Cependant, là encore, très peu d'études sont disponibles, réalisées uniquement chez l'adulte avec la cible *ply*²⁰. Actuellement la contamination des ECBC et de façon moindre le LBA par la flore ORL rendent difficile l'interprétation de la positivité de ces PCR.

2.3.2.3/PCR *S. pneumoniae* dans le liquide pleural.

La meilleure sensibilité de la PCR par rapport à la culture prend ici tout son intérêt, d'autant plus qu'en pratique clinique, les enfants atteints de pleurésie purulente ont souvent reçu une antibiothérapie préalable. Plusieurs études pédiatriques confirment l'intérêt de la PCR dans le diagnostic des pleurésies purulentes à pneumocoque de l'enfant. Les publications anciennes utilisaient la PCR *ply*^{12, 21}, les plus récentes la PCR *lytA*²². Le Monnier *et al.*¹² ont étudié prospectivement 78 enfants atteints de pleurésie purulente dont 60% avaient reçu une antibiothérapie préalable. L'analyse du liquide pleural par culture et PCR a authentifié une bactérie dans 77% des échantillons, 51% étant du pneumocoque. Parmi les 40 enfants ayant une pleurésie prouvée à *S. pneumoniae*, la PCR 16S, confirmée par la PCR *ply*, a augmenté la détection bactérienne dans 43% des cas. L'étude finlandaise de Lahti *et al.*, a évalué la PCR *ply* dans le liquide pleural de 12 enfants²¹. La culture était positive pour un patient, la PCR dans le liquide pleural pour 9 enfants. L'étude australienne de Strachan *et al.*²², sur 137 enfants atteints de pleurésie purulente, a montré une plus grande sensibilité de la PCR *lytA* par rapport à la culture du liquide pleural (49,6% versus 8,1%)²². Par ailleurs, la PCR permet un sérotypage du pneumocoque grâce à l'étude moléculaire directe sur le liquide pleural⁹.

2.3.3/Antigène Binax.

Le BinaxNOW® *S.pneumoniae*, est un test rapide par immunochromatographie qui détecte le

polysaccharide C de surface de tous les types de *S. pneumoniae*. Il existe des réactions croisées avec d'autres streptocoques alpha-hémolytiques (*Streptococcus mitis* et *Streptococcus oralis*).

2.3.3.1/Test BinaxNOW® dans les urines.

Le portage nasopharyngé est fréquent chez les enfants (7 à 22%) et est responsable de nombreux faux positifs du BinaxNOW® urinaire, comme l'a montré initialement Dowell *et al*²³. Dans cette étude, les auteurs ont étudié prospectivement les résultats du BinaxNOW® chez 88 enfants présentant une pneumonie clinico-radiologique et chez 198 témoins dont 21% étaient colonisés à *S. pneumoniae*. Les auteurs n'ont pas trouvé de différence significative entre le taux de BinaxNOW® positif chez les enfants présentant une pneumonie et les témoins. Un BinaxNOW® positif était très corrélé à la colonisation nasopharyngée à *S. pneumoniae*. Les auteurs ont donc conclu que le Binax n'avait pas d'indication dans le diagnostic des pneumonies de l'enfant. Cependant, cette étude ne différenciait pas les résultats par tranche d'âge. La sensibilité du BinaxNOW® pour la détection d'une infection à *S. pneumoniae* des voies aériennes inférieures de l'enfant est insuffisante puisqu'elle varie entre 66 et 92% selon les études, tout comme sa spécificité qui varie entre 62 et 75%²⁴⁻²⁵. Il n'a pas non plus été retrouvé de corrélation entre la charge bactérienne et la positivité du BinaxNOW®²⁴. Le BinaxNOW® a aussi été évalué dans une population d'enfants présentant une pathologie pulmonaire chronique sous-jacente. Là encore, il n'a pas montré d'intérêt pour mettre en évidence la présence d'une pneumonie à *S. pneumoniae*²⁶. Enfin, ce test peut rester positif longtemps après l'infection, y compris après une antibiothérapie ou après une vaccination antipneumococcique^{14, 27-30}. Le BinaxNOW® a également été utilisé par certaines équipes sur le sang, les urines concentrées et/ou congelées, le LBA, et le liquide pleural: l'étude de Bagett *et al.* réalisée sur 15 flacons a montré l'existence de faux positifs sur des flacons d'hémocultures non inoculés³¹. Jacobs *et al.*, en testant le BinaxNOW® sur le LBA de patients adultes, ont retrouvé une sensibilité de 95% et une spécificité de 86% avec 10 faux positifs sur 96 patients³². Ce résultat n'a pas été conforté par des études pédiatriques. Enfin, le BinaxNOW® sur urines concentrées semble avoir une meilleure sensibilité mais une spécificité plus faible^{24,26}. Chez l'adulte, la sensibilité et la spécificité du test

varient de 77% à 88% et de 67% à 100% respectivement ^{29, 33}. Chez l'adolescent, pour qui le portage du pneumocoque est proche de l'adulte, le BinaxNOW® pourrait être utilisé en cas de doute diagnostique sur une infection respiratoire basse à pneumocoque. Les limites de cet examen chez l'adulte comme chez l'enfant sont la présence de faux négatifs, de faux positifs avec des espèces proches du pneumocoque et de positivité à distance d'une infection à pneumocoque ²⁷.

2.3.3.2/Test BinaxNOW® dans le liquide pleural.

Le BinaxNOW® est un test très intéressant dans le liquide pleural. Son interprétation est facile, le liquide pleural étant normalement stérile. Sa réponse est rapide et son coût faible par rapport à celui des diagnostics moléculaires. Dans l'étude de *Le Monnier et al*, la sensibilité du Binax NOW® était de 90%, la spécificité de 95%, la VPP de 95% et la VPN de 90% pour des pleurésies diagnostiquées par culture et/ou PCR ¹². La spécificité a sans doute été sous évaluée car les 2 faux positifs retrouvés correspondaient probablement à d'authentiques infections à pneumocoques. Les résultats n'ont pas été modifiés après congélation de l'échantillon. *Martinon-Torres et al.* ont étudié prospectivement 55 enfants atteints de pleuropneumopathie. *S. pneumoniae* a été identifié par culture et/ou PCR *ply* chez 51% d'entre eux ³⁴. La détection d'antigène pneumococcique réalisée chez ces enfants a montré une sensibilité de 96% (2 faux négatifs). Dans une étude espagnole de *Casado Flores et al.*, sur 73 liquides pleuraux d'enfants dont 60 étaient positifs par culture et/ou PCR *ply* à *S. pneumoniae*, la sensibilité du BinaxNOW® sur le liquide pleural était de 88%, la spécificité de 71%, la VPP de 97% et la VPN de 38 % ³⁵. Dans l'étude de *Strachan et al.*, le Binax NOW® avait une sensibilité de 83,8%, une spécificité de 93,5%, une VPP de 93,4% et une VPN de 84,1%, comparé aux résultats obtenus par hémoculture, culture et /ou PCR *lytA* dans le liquide pleural ²².

La recherche d'antigènes pneumococciques par BinaxNOW® semble donc être un très bon examen diagnostique sur le liquide pleural. Il n'existe pas de réaction croisée avec d'autres genres bactériens, et les possibles réactions croisées avec les *S. oralis* ou *mitis* éventuellement

détectés ne posent pas de problème diagnostique car ils ne sont pas responsables de pleurésie purulente.

2.3.3.3/Test BinaxNOW® dans le sang et le LBA.

Le BinaxNOW® a également été utilisé par certaines équipes sur le sang et le LBA avec de nombreux faux positifs³¹⁻³².

2.4/Recommandations.

Pour la prise en charge des pneumopathies de l'enfant :

- Les techniques actuelles de PCR pneumocoque dans le sang ne sont pas recommandées en routine, car elles n'influencent pas la prise en charge clinique des malades même si elles permettent d'augmenter la sensibilité du diagnostic de pneumonie à pneumocoque (Grade A).
- Les techniques actuelles de PCR pneumocoque ne sont pas recommandées dans les expectorations (Expert).
- Chez l'enfant, le BinaxNOW® urinaire n'est pas recommandé en raison de faux positifs liés au portage fréquent et asymptomatique du pneumocoque (Grade A).
- Chez l'adolescent, dans un contexte de suspicion de pneumopathie à pneumocoque clinique et radiologique, l'antigène soluble urinaire (BinaxNOW®) peut être une aide pour le diagnostic (Expert).

Pour la prise en charge des pleurésies de l'enfant :

- L'analyse bactériologique classique (direct et culture) du liquide pleural doit être réalisée systématiquement en cas d'épanchement pleural associé ou non à une pneumonie (Grade A).
- La recherche d'antigènes pneumococciques par BinaxNOW® dans le liquide pleural est recommandée pour le diagnostic de pleuropneumopathie à pneumocoque chez l'enfant, même après le début des antibiotiques et même chez un enfant vacciné contre le pneumocoque (Grade B).

- Si le BinaxNOW® et la culture sont négatifs, la réalisation d'une PCR ciblée sur le gène *lytA* du pneumocoque sur le liquide pleural est recommandée pour les laboratoires qui en disposent (Expert).
- Si la PCR pneumocoque dans le liquide pleural est négative, la recherche diagnostique pourrait être complétée par la réalisation de PCR ADN_{r16S} ciblant d'autres germes rencontrés dans les pleurésies de l'enfant (Expert).

3/Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques virologiques au cours des IRB de l'enfant de plus de trois mois : évaluation des outils et indications.

3.1/Prérequis.

En dehors des études épidémiologiques, le diagnostic d'une infection virale n'a d'intérêt que si des conséquences cliniques immédiates peuvent être tirées du résultat. L'identification rapide d'un virus peut éviter la réalisation d'examens complémentaires inutiles, réduire le taux d'hospitalisation chez l'enfant fébrile et faciliter la prescription précoce d'antiviraux tout en évitant la prescription abusive d'antibiotiques³⁶. Il convient toutefois de rester prudent car des co-infections (virus et/ou bactéries et/ou atypique) sont possibles. La présence d'un virus ne peut éliminer la présence d'une bactérie, et le diagnostic d'un pathogène viral au cours d'une pneumopathie ne permet aucunement d'exclure le bénéfice éventuel d'une antibiothérapie. En pathologie respiratoire, la clinique est peu spécifique: l'association entre un virus et un tableau clinique reste faible³⁷. Tous les virus respiratoires peuvent être incriminés dans les infections respiratoires basses mais le VRS, les Rhinovirus et Enterovirus, les Adenovirus et la grippe³⁸ sont les plus impliqués chez les enfants de moins de 5 ans hospitalisés. Les épidémies sont plus ou moins régulières, et intenses selon les années, et se chevauchent. La pertinence de détecter un virus selon le tableau clinique et la saisonnalité est discutable mais peut être orientée par les données épidémiologiques régionales. Elles sont accessibles *via* les réseaux de surveillance de la grippe et des autres infections respiratoires (réseau GROG en population générale, réseau RENAL en milieu hospitalier).

3.2/Mise en évidence d'antigènes viraux intra-cellulaires par immunofluorescence.

Les tests d'immunofluorescence sont directs ou indirects, ils permettent la mise en évidence des antigènes viraux intra-cellulaires *via* une lecture au microscope à IF. Actuellement, les anticorps monoclonaux permettant un test d'IFD sont disponibles pour 8 cibles virales incluant VRS, métapneumovirus, le virus de la grippe A et B, virus parainfluenzae 1, 2 et 3, l'adénovirus. Cette technique est simple et relativement rapide. Elle permet une évaluation directe de la qualité du prélèvement respiratoire, jugée sur le nombre de cellules respiratoires visibles sur le frottis. La mise en évidence d'antigènes viraux signe une réplication active du virus dans les voies respiratoires.

3.3/Techniques de détection d'antigènes extra-cellulaires par immunochromatographie.

Ces tests sont appelés Tests de Diagnostic Rapide ou TDR. Ils ont essentiellement été développés pour 3 cibles virales : la grippe A et B, le VRS. Leur avantage principal est leur facilité d'utilisation avec un délai de réponse allant de 15 à 30 mn. La lecture est colorimétrique. Ces tests ne permettent pas de vérifier la richesse en cellules du prélèvement. La quantité d'antigènes présente dans le prélèvement modifie la performance du test, et explique la sensibilité variant de 10 à 96% pour les TDR. La quantité d'antigènes dépend aussi du type et sous-type viral (moindre pour H1N1), de l'âge du patient (meilleure chez le jeune enfant), du moment du prélèvement (meilleure au cours ^{14, 36} des premiers jours de la maladie, ou au pic de l'épidémie), et de la sévérité du tableau clinique ^{14, 36, 39-40}. Le TDR Grippe en pédiatrie ambulatoire pourrait modifier la prise en charge des enfants et permettre une rationalisation des soins par la prescription rapide d'antiviraux (lorsqu'ils sont nécessaires) ^{36, 39}. Dans les services d'urgences, l'utilisation des TDR permet de réduire le nombre de radiographies thoraciques, d'antibiothérapies, de raccourcir le temps de passage aux urgences, de diminuer le recours aux autres examens complémentaires ⁴¹⁻⁴⁵.

3.4/Mise en évidence de génomes viraux ADN ou ARN par méthodes de biologie

moléculaire.

Ces techniques sont basées pour la plupart sur les techniques de PCR. Elles sont précédées d'une étape de transcription inverse (RT) en cas de génome ARN (RT-PCR). Ces techniques ont pour avantage d'être adaptables à tous les virus, d'être sensibles et spécifiques et permettent une standardisation et une automatisation. Les trousse de détection multiplex ont connu un développement spectaculaire et de nombreuses trousse enregistrées « Communauté Européenne » sont actuellement disponibles⁴⁶⁻⁵⁰. La sensibilité comparée de ces différentes trousse est très difficile à établir et il n'existe pas actuellement de données publiées incluant tous les formats. La très grande sensibilité de ces techniques permet la détection même lorsque le virus se réplique à bas niveau (en début de contamination ou en phase d'excrétion virale, ou lors d'infection pauci symptomatique). Le diagnostic virologique dans les pneumopathies hospitalisées en période épidémique est utile pour initier le traitement antiviral adapté selon les recommandations⁵¹. Pour les patients immunodéprimés, le diagnostic étiologique le plus exhaustif possible est nécessaire pour, au niveau individuel, adapter les traitements et, au niveau collectif, prévenir les épidémies intra-hospitalières. Le diagnostic moléculaire par PCR multiplex répond à cette indication mais n'a pas été évaluée chez l'enfant en termes d'intérêt clinique et thérapeutique.

3.5/Les prélèvements respiratoires.

La qualité du prélèvement est déterminante. Le diagnostic virologique respiratoire direct nécessite un prélèvement riche en cellules respiratoires ciliées, réalisé le plus tôt possible après l'apparition des symptômes cliniques⁵² au niveau du site de répllication des virus. En pratique courante il faut privilégier les prélèvements de nez aux prélèvements isolés dits de « gorge ». Ils se pratiquent par écouvillonnage ou par lavage-aspiration. L'aspiration nasale ou naso-pharyngée constitue le prélèvement optimal pour la détection des virus respiratoires, mais l'écouvillonnage donne de très bons résultats, est plus facile à réaliser, et génère moins de contamination pour l'entourage⁵³. La combinaison naso- et oro-pharynx des différents écouvillons dans le même pot

de prélèvement augmente l'efficacité de détection des virus respiratoires⁵⁴⁻⁵⁵.

3.6/Recommandations.

- Le prélèvement pour la recherche étiologique virale doit être réalisé le plus précocement par rapport au début de l'infection, pour augmenter la sensibilité (Grade A).
- L'aspiration nasale ou nasopharyngée est le mode de prélèvement à privilégier pour les tests d'IF et de biologie moléculaire chez les enfants; la réalisation de l'écouvillon risque d'être mal faite chez les enfants en âge préscolaire. (Expert).
- Si le mode de prélèvement choisi est l'écouvillon, il faut privilégier l'écouvillonnage nasal profond (Grade A).
- Pour le TDR, l'écouvillonnage doit être effectué de préférence sur un écouvillon floqué, en suivant les recommandations du fabricant (Grade A).
- Le choix des TDR de la grippe et leur utilisation sont plus ou moins pertinentes et doivent être décidés tous les ans selon les données épidémiologiques fournies par les réseaux de surveillance de la grippe (Grade A).
- Le TDR de la grippe doit être réalisé au cours des IRB de l'enfant, en période épidémique, en ambulatoire, aux urgences ou en hospitalisation, si des conséquences immédiates peuvent être tirées du résultat positif pour l'enfant et son entourage (Expert).
- En hospitalisation, lors de la période épidémique, l'utilisation de l'IF, élargie au maximum de virus respiratoires, est à privilégier au TDR si le plateau technique le permet et si des conséquences immédiates peuvent être tirées du résultat pour l'enfant et son entourage (Expert).
- En hospitalisation, lors de la période épidémique, le diagnostic virologique par biologie moléculaire, est à réaliser si les autres tests diagnostiques viraux sont négatifs et si des conséquences immédiates lors de l'hospitalisation peuvent être tirées du résultat pour l'enfant et son entourage. Celui-ci doit alors utiliser le plus de cibles virales possibles (Expert).
- Chez les enfants immunodéprimés, au cours d'une IRB, l'IF puis la PCR multiplex en cas de négativité de l'IF doivent être réalisées. (Expert).

4/Recommandations sur l'utilisation du dosage de la procalcitonine (PCT) dans le diagnostic des infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois : évaluation et indications.

4.1/ Prérequis.

La procalcitonine (PCT) est une prohormone de la calcitonine synthétisée par les cellules C de la thyroïde. Le dosage de la PCT repose sur une méthode immuno-enzymatique sandwich en une étape et détection finale en fluorescence. Deux générations de dosage sont rapportées dans la littérature. Les tests de deuxième génération (Kryptor et BIO Mérieux) ont des limites inférieures de sensibilité plus performantes respectivement de 0,05 ng/ml et 0,09 ng/ml. Une seule étude pédiatrique récente concernant les infections respiratoires basses de l'enfant utilise le test Kryptor de deuxième génération⁵⁶. Le dosage peut être réalisé sur sérum ou sang total. La cinétique d'augmentation de la PCT au cours des infections bactériennes est plus précoce que celle des autres marqueurs biologiques usuels. C'est un marqueur plus spécifique que la CRP ou le taux de polynucléaires neutrophiles au cours des infections bactériennes graves de l'enfant. Les études portant sur la PCT au cours des IRB de l'enfant sont trop hétérogènes pour permettre une comparaison systématique sur la performance diagnostique de la PCT par rapport à ces autres marqueurs inflammatoires (globules blancs, CRP). Les moyens diagnostiques utilisés pour identifier l'agent pathogène sont variables: PCR, sérologies, ECBC, IF. Parmi ces études, peu sont prospectives. Lorsque les études se rapportent aux IRB exclusivement⁵⁷⁻⁶⁶ la sensibilité, la spécificité et la valeur de l'aire sous la courbe de la PCT pour différencier une étiologie bactérienne d'une étiologie virale sont variables. Il existe un chevauchement des valeurs de la PCT et des autres marqueurs inflammatoires (CRP, globules blancs) entre les pneumopathies virales et bactériennes, y compris à pneumocoque^{31, 58-66}. Ce chevauchement ne permet pas de fixer un seuil discriminant. La PCT semble cependant avoir une meilleure spécificité que la CRP pour le diagnostic d'une IRB à pneumocoque.

L'élaboration des stratégies thérapeutiques guidées par la valeur de la PCT dans les infections respiratoires basses a été proposée chez les adultes⁶⁷⁻⁷¹. Une seule étude a évalué cette approche

chez 319 enfants hospitalisés, âgés de 1 mois à 14 ans⁷². Cette population suivie pendant une durée de 1 mois après l'hospitalisation a été randomisée en deux groupes. Dans le premier groupe (n=155), l'antibiotique a été prescrit systématiquement pour une durée minimale de 7 jours et dans le second (n=155), le choix de l'instauration ou de l'arrêt de l'antibiothérapie a été guidé par la valeur de la PCT au seuil de 0,25 ng/ml. Les auteurs montrent que le dosage de la PCT à deux reprises permettrait de réduire le nombre (-14%) et la durée (-5,5j) des antibiothérapies. Dans une étude rétrospective, Cohen et coll. montrent que l'élévation de la PCT pourrait être un marqueur de bonne réponse aux Béta-lactamines⁷³. Des études complémentaires sont par conséquent nécessaires chez l'enfant pour confirmer la place de la PCT et des autres marqueurs inflammatoires comme élément décisionnel de mise en route d'une antibiothérapie.

4.2/Recommandations.

-La PCT, comme les autres marqueurs inflammatoires (CRP, globules blancs), analysée isolément ou en combinaison aux autres marqueurs inflammatoires, ne permet pas de poser le diagnostic d'IRB bactérienne ou virale (Grade A).

-L'utilisation de la PCT comme élément décisionnel pour débiter une antibiothérapie et pour évaluer la durée de cette antibiothérapie, comme les autres marqueurs inflammatoires (CRP, globules blancs), nécessite d'être confirmée par des études complémentaires chez l'enfant (Grade B).

5/Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques dans les infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois à *Mycoplasma pneumoniae* et *Chlamydomphila pneumoniae* : évaluation des outils et indications.

5.1/Pré Requis.

Le diagnostic d'infection respiratoire basse à *Mycoplasma pneumoniae* ou à *Chlamydomphila pneumoniae* repose habituellement sur l'évolution clinique et la réponse au traitement; les examens complémentaires ne sont habituellement pas nécessaires. Les techniques microbiologiques conventionnelles de culture ne sont pas recommandées⁷⁴⁻⁷⁶.

5.2/ Sérologie.

5.2.1/ *M. pneumoniae*

La sérologie permet un diagnostic indirect rétrospectif. Elle ne doit donc être réalisée que si le diagnostic est indispensable. La présence d'IgM, témoignant d'une primo-infection, est observée chez l'enfant. Les IgM apparaissent une semaine après le début des symptômes et les IgG deux semaines après pour disparaître au bout de plusieurs mois. La sensibilité et la spécificité de la sérologie varient dans la littérature en fonction des techniques utilisées. Il existe un taux important de faux négatifs: 20 % des sérums précoces ne montrent pas de présence d'IgM s'ils sont prélevés trop tôt. Si le prélèvement n'est pas réalisé de façon trop précoce, avec une trousse ELISA de bonne qualité, la sensibilité et la spécificité chez l'enfant sont proches de 90% ⁷⁷⁻⁸¹, le témoin positif de ces études étant une PCR positive plus ou moins couplée à un diagnostic clinique.

5.2.2/ *C. pneumoniae*

Pour *C. pneumoniae*, il faut un délai minimum de 3 semaines pour l'apparition des IgM. Le délai d'apparition des IgG est de 6 à 7 semaines, et ils persistent plusieurs mois, parfois à un titre élevé longtemps après le traitement ⁸²⁻⁸³. Lors d'une réinfection, les IgM n'apparaissent pas et les IgG augmentent après 2 semaines. La technique de micro-immuno-fluorescence préconisée aux USA est une méthode peu applicable pour un diagnostic en temps réel. De plus, c'est une technique peu standardisable et subjective ⁸⁴. Les techniques sérologiques ELISA basées sur les trousse commerciales permettent la mise en évidence d'IgG et d'IgM et présentent une sensibilité et une spécificité médiocre ⁸⁵.

5.3/PCR .

5.3.1/ Quels prélèvements, quelles techniques?

M. pneumoniae adhérant aux cellules respiratoires, les résultats de la PCR sont conditionnés par

la qualité du prélèvement. Les aspirations nasales semblent meilleures pour la PCR que les prélèvements de gorge^{77, 86-87}. La PCR peut être réalisée sur écouvillons mis en milieu de transport. L'idéal est de coupler les deux prélèvements obtenus par aspiration nasale et prélèvement pharyngé dans un même milieu de transport. Le laboratoire doit être capable d'apprécier la conformité du prélèvement et l'absence d'inhibiteurs de l'amplification au cours de la PCR^{78,81}. Le LBA et le brossage bronchique sont également des prélèvements adaptés, contrairement aux expectorations, trop contaminées⁸⁸. La PCR dans le sang a été également évaluée mais avec une mauvaise sensibilité par rapport aux prélèvements respiratoires⁸⁹. La sensibilité de détection des techniques de PCR est de l'ordre de 10 bactéries par ml de produit pathologique. Les données de la littérature concernent un grand nombre de mises au point, toutes populations confondues (adultes et enfants); elles utilisent le plus souvent des techniques «maison» en PCR conventionnelle ou en PCR temps réel, couplant parfois la recherche de plusieurs cibles en une seule PCR (multiplex). Plus récemment, quelques études utilisant des kits commerciaux en situation réelle d'épidémie ont montré des résultats variables.

5.3.2/ *M. pneumoniae*

Pour *M. pneumoniae*, les cibles amplifiées le plus souvent utilisées sont l'adhésine P1 ou l'ADNr16S⁹⁰. Les différentes mises au point techniques reprennent des prélèvements en rétrospectif et s'appuient sur une définition clinique et/ ou sérologique, avec des sensibilités et spécificités variant de 97-100 % et 99-100 %⁹¹⁻⁹⁴. Les études prospectives utilisent soit une « PCR maison » en temps réel soit des kits commerciaux, et trouvent des valeurs de sensibilité-spécificité de 87-93% en définissant les cas d'infections sur la base d'arguments cliniques, radiologiques, sérologiques et/ou de culture bactérienne^{78, 80, 95}. Le portage sain chez l'enfant diagnostiquée par méthode de biologie moléculaire est de l'ordre de 20%⁹⁶. La méthode directe d'amplification génique par PCR ne permet donc pas pour le moment de différencier portage et infection⁹⁶. Il faut donc réaliser et interpréter la présence d'un signal PCR positif dans un contexte d'IRB comme évocateur d'infection à *M. pneumoniae*.

Ainsi les techniques de PCR présentent la meilleure sensibilité et spécificité pour le diagnostic

d'infection à *M. pneumoniae*, même si elles ne permettent pas encore de différencier le portage sain de l'infection.

5.3.3/ *C. pneumoniae*

La cible amplifiée dans la mise au point de PCR correspond toujours à un fragment du gène codant pour une protéine de membrane externe (OmpA). Si les mises au point techniques relatent des performances du même ordre que pour *M. pneumoniae*, peu de données sont disponibles dans l'application en pratique quotidienne chez l'enfant. Ainsi déjà en 2007, la FDA ne préconisait pas l'utilisation de la PCR dans le diagnostic des IRB⁷⁶. En effet, *C. pneumoniae* peut faire partie de la flore commensale oro-pharyngée de l'hôte, rendant plus délicate l'interprétation d'un résultat positif d'une PCR. Dans un contexte d'IRB chez l'enfant de plus de trois mois, il reste donc difficile d'interpréter une PCR *C. pneumoniae* positive même en association avec les résultats de la sérologie. Ceci ne peut donc être un diagnostic certain et reste un diagnostic tardif qui ne modifiera donc pas la prise en charge.

5.4/Recommandations

- Si le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae* est nécessaire, les techniques de PCR dans les 7 jours qui suivent le début des symptômes sont celles qui présentent la meilleure sensibilité et spécificité même si elles ne permettent pas de différencier le portage sain de l'infection (Grade A).
- Le LBA reste le prélèvement de choix pour la PCR, mais le prélèvement nasopharyngé ou nasal sont également possibles (Grade A).
- Si l'évolution le nécessite, l'approche optimale pour le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae* est d'associer à la PCR une sérologie prélevée au plus tôt une semaine après le début des symptômes (Expert).
- Si la PCR n'a pas été réalisée et si le diagnostic est nécessaire, la sérologie devra être prélevée au plus tôt une semaine après le début des symptômes pour éviter les faux négatifs (Expert).
- Chez l'enfant la présence d'IgM signant l'infection aiguë, un deuxième prélèvement n'est alors

pas nécessaire (Expert).

- Si la première sérologie ne montre pas d'IgM et si le diagnostic est nécessaire, une deuxième sérologie, à la recherche d'IgM et d'IgG, sera réalisée deux à trois semaines après la première (Grade B).

- Actuellement, la sérologie *C. pneumoniae* présente une sensibilité et une spécificité insuffisantes pour le diagnostic d'IRB chez l'enfant de plus de trois mois, et n'est pas recommandée (Grade B).

- L'amplification génique n'est pas recommandée pour le diagnostic d'IRB à *C. pneumoniae* compte tenu de la faible prévalence de *C. pneumoniae* et du fait que la PCR ne permet pas de différencier portage chronique et infection (Grade B).

6/Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques de la pneumocystose de l'enfant dans les infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois : évaluation des outils et indications.

6.1/Prérequis.

La pneumocystose pulmonaire a été décrite initialement chez des enfants non immunodéprimés mais dénutris après la seconde guerre mondiale⁹⁷. Les déficits immunitaires innés⁹⁸⁻⁹⁹, les enfants bénéficiant d'une greffe d'organe⁹⁹⁻¹⁰⁰, les enfants bénéficiant d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques, les enfants atteints de tumeurs solides, d'hémopathies malignes ou qui reçoivent un traitement immunosuppresseur sur la population lymphocytaire T (les traitements utilisant la corticothérapie prolongée, la cyclosporine, le méthotrexate, l'endoxan, les analogues des purines) semblent plus à risque pour la pneumocystose^{99, 101}. Chez l'enfant atteint par le VIH, le risque de pneumocystose est étroitement lié au taux de lymphocytes T CD4⁺, en sachant que chez l'enfant de 1 à 6 ans un taux < 1000 CD4/mm³ correspond déjà à un déficit modéré et que l'on parle de déficit sévère au-dessous de 500 /mm³. Les études épidémiologiques de séroprévalence montrent que l'exposition à *P. jirovecii* chez l'enfant sain survient précocement avant l'âge de deux ans¹⁰²⁻¹⁰⁵. Cette primo-infection est mise en évidence chez 10% à 15% des

enfants par méthode de PCR ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Chez les enfants infectés par le VIH, la présentation habituelle comporte une triade associant fièvre, toux sèche et dyspnée d'installation progressive, associée radiologiquement à une pneumopathie alvéolo-interstitielle ^{99, 108}. Chez les enfants non infectés par le VIH, la présentation clinique peut être en tout point semblable à une infection bactérienne classique. L'hypoxémie est souvent plus sévère et la dyspnée plus importante ^{99, 109}. Le tableau radiologique est habituellement celui d'une pneumopathie interstitielle mais cette présentation radiologique peut être absente.

6.2/Quels prélèvements?

La sensibilité et la spécificité des méthodes de diagnostic varient en fonction du type de prélèvement et du statut VIH du patient. Le LBA reste la procédure de choix pour le diagnostic ¹¹⁰⁻¹¹¹, mais le diagnostic peut être effectué sur les aspirations nasopharyngées et les expectorations induites chez l'enfant par biologie moléculaire¹¹².

6.3/ Quels examens réaliser pour la recherche de *P. jirovecii* ?

6.3.1/Les outils diagnostiques classiques.

Le diagnostic classique repose sur la mise en évidence microscopique des différentes formes de *Pneumocystis* : formes trophiques, prékystiques ou kystiques ¹¹³. La coloration de May-Grünwald Giemsa et sa variante RAL-555 (RAL Diagnostics) mettent en évidence les formes trophiques et les kystes. La coloration argentique de Gomori-Grocott et la coloration au Bleu de Toluidine mettent en évidence les kystes. La sensibilité du diagnostic microscopique est supérieure à 75% sur le LBA si le patient est infecté par le VIH ^{110-111, 113-115}. Chez le patient non infecté par le VIH, la sensibilité du diagnostic microscopique est souvent inférieure à 50% sur le LBA¹¹⁶. L'IF indirecte présente une meilleure sensibilité par rapport aux techniques de coloration classique pour la mise en évidence des formes kystiques¹¹⁷⁻¹¹⁹.

6.3.2/ Les outils diagnostiques moléculaires.

Plusieurs techniques de biologie moléculaire ont été développées¹⁰⁶. Le diagnostic moléculaire par PCR permet d'améliorer la sensibilité du diagnostic, particulièrement chez les patients immunodéprimés séronégatifs pour le VIH^{116, 120-121}. Les avantages de la PCR sont multiples : très bonne sensibilité et spécificité, avec une bonne VPN^{116, 122}. Mais la PCR conventionnelle ne permet pas de différencier colonisation et infection¹²³. La quantification des charges fongiques par PCR en temps réel permet cette distinction¹²⁴⁻¹³⁰. Cette technique quantitative est validée chez l'adulte mais pas chez l'enfant, et il n'existe pas actuellement de consensus sur les seuils, ni de méthode standardisée.

Chez l'enfant séropositif pour le VIH, la PCR n'est pas indispensable sur le LBA car la sensibilité du diagnostic microscopique par IF est suffisante. Chez l'enfant immunodéprimé séronégatif pour le VIH, le diagnostic microscopique est moins sensible et le diagnostic moléculaire doit être demandé si le diagnostic microscopique est négatif en cas de suspicion de pneumonie à *Pneumocystis*.

6.4/ Recommandations.

- La recherche de *P. jirovecii* doit être réalisée chez des enfants chez qui il existe des symptômes cliniques évocateurs de pneumocystose pulmonaire, et pour lesquels le terrain à risque est connu ou suspecté: déficit immunitaire inné, infection par le VIH, immunosuppression par chimiothérapie, traitement immunosuppresseur, corticothérapie prolongée, greffes d'organes ou de moelle, dénutrition sévère (Grade A).
- Le LBA reste le prélèvement de choix pour le diagnostic de pneumocystose pulmonaire, mais l'aspiration nasopharyngée et l'expectoration induite si l'enfant est en âge de la réaliser sont également possibles (Grade C).
- La recherche de *Pneumocystis* par diagnostic moléculaire effectué sur écouvillons nasopharyngés et rinçages oro-pharyngés reste à valider chez l'enfant en cas de suspicion de pneumocystose pulmonaire (Expert).

- Chez l'enfant avec une suspicion de pneumonie à *Pneumocystis*, la biologie moléculaire sera réalisée systématiquement si le diagnostic microscopique est négatif, quelque soit le type de recueil en dehors du LBA chez l'enfant séropositif pour le VIH pour lequel le diagnostic microscopique seul suffit (grade B).

7/Recommandations sur l'utilisation des nouveaux outils diagnostiques pour le diagnostic des infections fongiques invasives à champignons filamenteux responsables d'infections respiratoires basses de l'enfant de plus de trois mois : évaluation des outils et indications.

7.1/Prérequis.

Les pathologies liées à *Aspergillus* spp. se présentent sous la forme d'un continuum anatomo-clinique, depuis la simple colonisation, jusqu'à l'infection invasive. Elles dépendent notamment de facteurs sous-jacents. Le poumon est impliqué dans 70% des aspergilloses invasives. Pour les populations pédiatriques, quatre études peuvent être retenues¹³¹⁻¹³⁴ avec des populations de 28 à 76 patients. Elles retrouvent la neutropénie comme facteur de risque principal, en particulier pour une valeur inférieure à 500/mm³ sur une durée de plus de 10 jours. Les leucémies aiguës sont les terrains le plus à risque, mais également les déficits immunitaires primitifs de l'enfant, les transplantations (essentiellement de cellules souches hématopoïétiques allogéniques), les traitements immunosuppresseurs ciblant les lymphocytes T ou la corticothérapie au long cours. Pour la corticothérapie, des valeurs seuils sont évoquées : 0,3 mg/kg/j de prednisone plus de 3 mois ou 1 mg/kg/j de méthylprednisolone plus de 3 semaines. Des aspergilloses invasives (AI) chez des sujets immunocompétents ont également été publiées, mais surtout dans la population adulte¹³⁵.

Afin de mieux définir les infections fongiques invasives, des critères ont été révisés en 2008 par les experts du Mycoses Study Group (MSG) du groupe européen de l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* (EORTC)¹³⁶. Ils déterminent 3 niveaux de classification : prouvé, probable et possible pour l'AI de l'adulte, critères qu'il est proposé d'utiliser également en pédiatrie. Pour poser le diagnostic d'AI pulmonaire prouvée, il est nécessaire d'identifier

l'agent fongique dans une biopsie profonde ou un prélèvement à l'aiguille dirigée, soit à l'ED soit en culture, en excluant les produits du LBA. Le diagnostic des AI probables repose sur des critères de terrain, des arguments clinico- radiologiques et des critères biologiques. Les critères biologiques reposent soit sur des tests directs avec la découverte d'*Aspergillus spp.* à l'ED ou par culture, dans l'expectoration, le LBA ou le brossage bronchique, soit sur des tests indirects. Ceux-ci correspondent à la détection d'antigènes galactomannane d'*Aspergillus* dans le sérum ou le LBA, ou de beta-(1-3)-D-glucane sérique. Si les preuves biologiques sont absentes, on parle alors d'AI possible.

7.2/Sur quels prélèvements?

Les principaux échantillons sur lesquels la recherche de champignons est pertinente sont le LBA, plus rarement les expectorations, les biopsies tissulaires et notamment pulmonaires, sinusiennes ou cérébrales, et parfois le sang.

7.3/Les performances du diagnostic mycologique sur le LBA?

L'ED et la culture sont complémentaires car ils apportent des informations différentes. La mise en évidence de filaments à l'ED est d'une grande spécificité mais peut-être délicate pour différencier les types de filaments des différents genres fongiques. Ces difficultés sont identiques lors de l'examen histologique après coloration au May Grunwald Giemsa ou coloration de Gomori-Grocott¹³⁷. La sensibilité de l'ED et de la culture varient en fonction du terrain des patients. Dans un suivi prospectif des AI sur l'ensemble d'un établissement, la sensibilité du diagnostic mycologique (ED +/- culture) était de 69%, mais de 85% dans une population de patients non neutropéniques, contre 58% dans une population neutropénique¹³⁸. Au sein même d'une population majoritairement atteinte d'hémopathies, la sensibilité de la culture variait de 52% à 88% selon le terrain sous-jacent¹³⁹.

7.4/Les marqueurs solubles de l'angio-invasion.

Il faut distinguer 3 marqueurs solubles évalués dans le cadre des IFI à champignons filamenteux :

la détection d'antigènes galactomannanes d'*Aspergillus* (GM), la détection d'antigènes beta-(1-3)-D-glucanes (BG) et la détection d'ADN circulant par PCR. Les évaluations ont été essentiellement effectuées dans des populations adultes d'hématologie, plus rarement chez des patients hospitalisés en réanimation ou dans d'autres services.

7.4.1/ Détection d'antigène galactomannane d'*Aspergillus* (GM).

C'est le test majeur pour lequel nous avons le plus d'évaluations. Les principaux résultats de la littérature montrent de manière intéressante que les performances varient avec les catégories de population concernées (hémopathies, allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, transplantation d'organes, pathologies pulmonaires chroniques). Outre les différences de sensibilité en fonction du terrain sous-jacent, notons que même au sein de la population neutropénique, il a été rapporté que plus la neutropénie était profonde, plus la sensibilité du test était élevée¹⁴⁰. Très peu de données sont disponibles chez l'enfant. La positivité de ce test, qui permet de classer un épisode d'AI comme probable chez l'adulte, n'est toutefois pas considérée comme classante chez l'enfant selon l'EORTC/MSG du fait des données limitées dans ce contexte¹³⁶. Cependant, quelques séries rapportent des résultats intéressants, et la majorité des centres réalise dorénavant cette détection en pratique de routine¹⁴¹⁻¹⁴². La question essentielle qui se pose en pédiatrie est la possibilité de fausse positivité, estimée entre 10 et 15%¹⁴³. La détermination du taux de GM se fait classiquement en dépistage 2 fois par semaine dans le sérum chez les patients à très haut risque. En cas de signe clinique évocateur, la détermination peut se faire soit dans le sérum, soit dans le LBA (seuil de positivité proposé par l'industriel à 0,5)¹⁴⁴.

7.4.2/ Détection d'antigène beta-(1-3)-D-glucane

La détection d'antigènes beta-(1-3)-D-glucane (BG) a été intégrée à la dernière classification de l'EORTC/MSG¹³⁶ pour le diagnostic des IFI à *Aspergillus*, *Candida* et *Pneumocystis jirovecii*. Seule une série limitée de cas pédiatriques souligne son intérêt potentiel¹⁴⁵. La pratique actuelle est de donner plus d'importance à la valeur prédictive négative qu'à la sensibilité de ce test.

7.4.3/ Place de la PCR ?

La PCR sur le sang en test de screening a encore récemment été réfutée comme un argument de classification des AI, du fait du manque d'homogénéité dans les techniques d'extraction, d'amplification voire même dans les modalités d'interprétation¹³⁶. En revanche, rappelons que la biologie moléculaire sur biopsie tissulaire et même sur LBA, reste un outil sensible de diagnostic et permet une identification moléculaire précise¹⁴⁶.

7.5/Recommandations.

Définitions des patients à risque proposées à partir de l'analyse de la littérature.

- Patients à très haut risque aspergillaire : neutropénie profonde post-chimiothérapie (PNN $<500/\text{mm}^3$ plus de 14 jours ou $<100/\text{mm}^3$ quelle que soit la durée), greffe de cellules souches hématopoïétiques, déficits immunitaires combinés sévères, aplasie médullaire sévère (Grade A).
- Patients à haut risque : corticothérapie haute dose dans le cadre du traitement d'une leucémie aiguë lymphoblastique, leucémie aiguë myéloblastique en rechute ou réfractaire, neutropénie post-chimiothérapie d'une durée inférieure à 14 jours, transplantation d'organe solide, granulomatose septique chronique, nouveau-nés en réanimation néonatale (Grade A).

Dépistage d'une aspergillose invasive.

- Le dépistage d'une aspergillose invasive est recommandé chez un enfant à très haut risque (Grade A).
- Il est recommandé d'effectuer la détection d'antigène GM d'*Aspergillus* dans le sérum, 2 fois par semaine, en répétant les mesures si nécessaire (Grade A).
- Pour le dépistage d'une aspergillose invasive chez un enfant à très haut risque (hémopathie), en complément d'une détection GM positive, compte tenu des taux élevés de faux positifs, l'utilisation complémentaire de BG dans le sang est recommandée pour augmenter la spécificité de diagnostic d'aspergillose invasive (Grade B).

Diagnostic d'une aspergillose invasive.

- La recherche d'une aspergillose invasive est justifiée chez un enfant à haut risque et très haut risque (Grade A).
- Pour le diagnostic d'une aspergillose invasive chez un enfant à haut risque et très haut risque, en plus de la clinique et de l'imagerie, il est recommandé de réaliser la détection d'antigène GM d'*Aspergillus* dans le sérum et le LBA quand il est disponible (Grade A).
- La recherche de GM dans le LBA devra alors être associée aux autres techniques de diagnostic mycologique classique (ED et culture) (Grade A).
- La PCR sur le LBA ou la biopsie pulmonaire peuvent être effectuées en cas de doute sur une culture négative ou de coinfection, s'il n'existe pas d'autres sites plus accessibles (expert).

Conflits d'intérêts : aucun

Références

1. HAS. Guide méthodologique "Base méthodologiques pour l'élaboration de recommandations professionnelles par consensus formalisé". www.has-sante.fr 2006.
2. Murray PR, Washington JA. Microscopic and bacteriologic analysis of expectorated sputum. Mayo Clin Proc 1975;50:339-44.
3. Avni T, Mansur N, Leibovici L, et al. PCR using blood for diagnosis of invasive pneumococcal disease: systematic review and meta-analysis. J Clin Microbiol 2010;48:489-96.
4. Nagendra S, Bourbeau P, Brecher S, et al. Sampling variability in the microbiological evaluation of expectorated sputa and endotracheal aspirates. J Clin Microbiol 2001;39:2344-7.
5. Cooper GM, Jones JJ, Arbique JC, Flowerdew GJ, Forward KR. Intra and inter technologist variability in the quality assessment of respiratory tract specimens. Diagn Microbiol Infect Dis 2000;37:231-5.
6. Musher DM, Montoya R, Wanahita A. Diagnostic value of microscopic examination of Gram-stained sputum and sputum cultures in patients with bacteremic pneumococcal pneumonia. Clin Infect Dis 2004;39:165-9. Epub 2004 Jul 1.
7. de Blic J, Midulla F, Barbato A, et al. Bronchoalveolar lavage in children. ERS Task Force on bronchoalveolar lavage in children. European Respiratory Society. Eur Respir J 2000;15:217-31.
8. Azzari C, Cortimiglia M, Moriondo M, et al. Pneumococcal DNA is not detectable in the blood of healthy carrier children by real-time PCR targeting the *lytA* gene. J Med Microbiol 2011;60:710-4. Epub 2011 Feb 24.
9. Azzari C, Moriondo M, Indolfi G, et al. Molecular detection methods and serotyping performed directly on clinical samples improve diagnostic sensitivity and reveal increased incidence of invasive disease by *Streptococcus pneumoniae* in Italian children. J Med Microbiol 2008;57:1205-12.
10. El Aila NA, Emler S, Kaijalainen T, et al. The development of a 16S rRNA gene based PCR for the identification of *Streptococcus pneumoniae* and comparison with four other species specific PCR assays. BMC Infect Dis 2010;10:104.

11. Park HK, Lee HJ, Kim W. Real-time PCR assays for the detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 2010;310:48-53.
12. Le Monnier A, Carbonnelle E, Zahar JR, et al. Microbiological diagnosis of empyema in children: comparative evaluations by culture, polymerase chain reaction, and pneumococcal antigen detection in pleural fluids. *Clin Infect Dis* 2006;42:1135-40.
13. Murdoch DR. Molecular genetic methods in the diagnosis of lower respiratory tract infections. *Apms* 2004;112:713-27.
14. Murdoch DR, Jennings LC, Bhat N, et al. Emerging advances in rapid diagnostics of respiratory infections. *Infect Dis Clin North Am* 2010;24:791-807.
15. Carvalho Mda G, Pimenta FC, Gertz RE, Jr., et al. PCR-based quantitation and clonal diversity of the current prevalent invasive serogroup 6 pneumococcal serotype, 6C, in the United States in 1999 and 2006 to 2007. *J Clin Microbiol* 2009;47:554-9.
16. Sheppard CL, Harrison TG, Morris R, et al. Autolysin-targeted LightCycler assay including internal process control for detection of *Streptococcus pneumoniae* DNA in clinical samples. *J Med Microbiol* 2004;53:189-95.
17. Carvalho Mda G, Tondella ML, McCaustland K, et al. Evaluation and improvement of real-time PCR assays targeting *lytA*, *ply*, and *psaA* genes for detection of pneumococcal DNA. *J Clin Microbiol* 2007;45:2460-6.
18. Johansson N, Kalin M, Giske CG, et al. Quantitative detection of *Streptococcus pneumoniae* from sputum samples with real-time quantitative polymerase chain reaction for etiologic diagnosis of community-acquired pneumonia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60:255-61.
19. Yang S, Lin S, Khalil A, et al. Quantitative PCR assay using sputum samples for rapid diagnosis of pneumococcal pneumonia in adult emergency department patients. *J Clin Microbiol* 2005;43:3221-6.
20. Abdeldaim G, Herrmann B, Korsgaard J, et al. Is quantitative PCR for the pneumolysin (*ply*) gene useful for detection of pneumococcal lower respiratory tract infection? *Clin Microbiol Infect* 2009;15:565-70.
21. Lahti E, Mertsola J, Kontiokari T, et al. Pneumolysin polymerase chain reaction for diagnosis of pneumococcal pneumonia and empyema in children. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2006;25:783-9.
22. Strachan RE, Cornelius A, Gilbert GL, et al. A bedside assay to detect *Streptococcus pneumoniae* in children with empyema. *Pediatr Pulmonol* 2011;46:179-83. doi: 10.1002/ppul.21349.
23. Dowell SF, Garman RL, Liu G, et al. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2001;32:824-5.
24. Dominguez J, Blanco S, Rodrigo C, et al. Usefulness of urinary antigen detection by an immunochromatographic test for diagnosis of pneumococcal pneumonia in children. *J Clin Microbiol* 2003;41:2161-3.
25. Michelow IC, Lozano J, Olsen K, et al. Diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* lower respiratory infection in hospitalized children by culture, polymerase chain reaction, serological testing, and urinary antigen detection. *Clin Infect Dis* 2002;34:E1-11.
26. Navarro D, Garcia-Maset L, Gimeno C, et al. Performance of the Binax NOW *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen assay for diagnosis of pneumonia in children with underlying pulmonary diseases in the absence of acute pneumococcal infection. *J Clin Microbiol* 2004;42:4853-5.
27. Blaschke AJ. Interpreting assays for the detection of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 2011;52:S331-7.
28. Charles PG. Early diagnosis of lower respiratory tract infections (point-of-care tests). *Curr Opin Pulm Med* 2008;14:176-82.
29. Klugman KP, Madhi SA, Albrich WC. Novel approaches to the identification of *Streptococcus pneumoniae* as the cause of community-acquired pneumonia. *Clin Infect Dis* 2008;47:S202-6.
30. Werno AM, Murdoch DR. Medical microbiology: laboratory diagnosis of invasive pneumococcal disease. *Clin Infect Dis* 2008;46:926-32.
31. Baggett HC, Rhodes J, Dejsirilert S, et al. Pneumococcal antigen testing of blood culture broth to enhance the detection of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;31:753-6.
32. Jacobs JA, Stobberingh EE, Cornelissen EI, et al. Detection of *Streptococcus pneumoniae* antigen in bronchoalveolar lavage fluid samples by a rapid immunochromatographic membrane assay. *J Clin Microbiol*

2005;43:4037-40.

33. Gutierrez F, Masia M, Rodriguez JC, et al. Evaluation of the immunochromatographic Binax NOW assay for detection of *Streptococcus pneumoniae* urinary antigen in a prospective study of community-acquired pneumonia in Spain. *Clin Infect Dis* 2003;36:286-92.
34. Martinon-Torres F, Dosil-Gallardo S, Perez Del Molino-Bernal ML, et al. Pleural antigen assay in the diagnosis of pediatric pneumococcal empyema. *J Crit Care* 2011;5:5.
35. Casado Flores J, Nieto Moro M, Berron S, et al. Usefulness of pneumococcal antigen detection in pleural effusion for the rapid diagnosis of infection by *Streptococcus pneumoniae*. *Eur J Pediatr* 2010;169:581-4.
36. de La Rocque F, Lecuyer A, Wollner C, et al. Impact of influenza rapid diagnostic tests (IRDT) on the diagnosis of influenza and on the management of influenza in children in ambulatory pediatric setting. *Arch Pediatr* 2009;16:288-93.
37. Poehling KA, Edwards KM, Weinberg GA, et al. The underrecognized burden of influenza in young children. *N Engl J Med* 2006;355:31-40.
38. Gaunt ER, Harvala H, McIntyre C, et al. Disease burden of the most commonly detected respiratory viruses in hospitalized patients calculated using the disability adjusted life year (DALY) model. *J Clin Virol* 2011;52:215-21.
39. Cohen R, Thollot F, Lecuyer A, et al. Impact of the rapid diagnosis downtown in the assumption of responsibility of the children in period of influenza. *Arch Pediatr* 2007;14:926-31.
40. Hurt AC, Alexander R, Hibbert J, et al. Performance of six influenza rapid tests in detecting human influenza in clinical specimens. *J Clin Virol* 2007;39:132-5.
41. Bonner AB, Monroe KW, Talley LI, et al. Impact of the rapid diagnosis of influenza on physician decision-making and patient management in the pediatric emergency department: results of a randomized, prospective, controlled trial. *Pediatrics* 2003;112:363-7.
42. Bradley JS, Byington CL, Shah SS, et al. Executive summary: the management of community-acquired pneumonia in infants and children older than 3 months of age: clinical practice guidelines by the Pediatric Infectious Diseases Society and the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2011;53:617-30.
43. Doan Q, Enarson P, Kisson N, et al. Rapid viral diagnosis for acute febrile respiratory illness in children in the Emergency Department. *Cochrane Database Syst Rev* 2009:CD006452.
44. Doan QH, Kisson N, Dobson S, 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;154:91-5.
45. Noyola DE, Demmler GJ. Effect of rapid diagnosis on management of influenza A infections. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:303-7.
46. Pabbaraju K, Wong S, Tokaryk KL, et al. Comparison of the Luminex xTAG respiratory viral panel with xTAG respiratory viral panel fast for diagnosis of respiratory virus infections. *J Clin Microbiol* 2011;49:1738-44.
47. Reijans M, Dingemans G, Klaassen CH, et al. RespiFinder: a new multiparameter test to differentially identify fifteen respiratory viruses. *J Clin Microbiol* 2008;46:1232-40.
48. Renois F, Talmud D, Huguenin A, et al. Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol* 2010;48:3836-42.
49. Wang W, Ren P, Sheng J, et al. Simultaneous detection of respiratory viruses in children with acute respiratory infection using two different multiplex reverse transcription-PCR assays. *J Virol Methods* 2009;162:40-5.
50. Wong S, Pabbaraju K, Lee BE, Fox JD. Enhanced viral etiological diagnosis of respiratory system infection outbreaks by use of a multitarget nucleic acid amplification assay. *J Clin Microbiol* 2009;47:3839-45.
51. HAS. AVIS 13 décembre 2011 relatif à l'actualisation des recommandations d'utilisation des antiviraux en période de circulation du virus A(H1N1). 2011;<http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapports>.
52. Brittain-Long R, Westin J, Olofsson S, et al. Prospective evaluation of a novel multiplex real-time PCR assay for detection of fifteen respiratory pathogens-duration of symptoms significantly affects detection rate. *J Clin Virol* 2010;47:263-7.

53. Chan KH, Peiris JS, Lim W, et al. Comparison of nasopharyngeal flocked swabs and aspirates for rapid diagnosis of respiratory viruses in children. *J Clin Virol* 2008;42:65-9.
54. Kim C, Ahmed JA, Eidex RB, et al. Comparison of nasopharyngeal and oropharyngeal swabs for the diagnosis of eight respiratory viruses by real-time reverse transcription-PCR assays. *PLoS One* 2011;6:e21610.
55. Lieberman D, Shimoni A, Keren-Naus A, et al. Pooled nasopharyngeal and oropharyngeal samples for the identification of respiratory viruses in adults. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010;29:733-5.
56. Morgenthaler NG, Struck J, Fischer-Schulz C, et al. Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin. *Clin Chem* 2002;48:788-90.
57. Resch B, Gusenleitner W, Muller W. Procalcitonin, interleukin-6, C-reactive protein and leukocyte counts in infants with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:475-6.
58. Schutzle H, Forster J, Superti-Furga A, et al. Is serum procalcitonin a reliable diagnostic marker in children with acute respiratory tract infections? A retrospective analysis. *Eur J Pediatr* 2009;168:1117-24.
59. Diez-Padriza N, Bassat Q, Machevo S, et al. Procalcitonin and C-reactive protein for invasive bacterial pneumonia diagnosis among children in Mozambique, a malaria-endemic area. *PLoS One* 2010;5:e13226.
60. Don M, Valent F, Korppi M, et al. Efficacy of serum procalcitonin in evaluating severity of community-acquired pneumonia in childhood. *Scand J Infect Dis* 2007;39:129-37.
61. Korppi M, Remes S. Serum procalcitonin in pneumococcal pneumonia in children. *Eur Respir J* 2001;17:623-7.
62. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004;113:701-7.
63. Moulin F, Raymond J, Lorrot M, et al. Procalcitonin in children admitted to hospital with community acquired pneumonia. *Arch Dis Child* 2001;84:332-6.
64. Prat C, Dominguez J, Rodrigo C, et al. Procalcitonin, C-reactive protein and leukocyte count in children with lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:963-8.
65. Toikka P, Irjala K, Juven T, et al. Serum procalcitonin, C-reactive protein and interleukin-6 for distinguishing bacterial and viral pneumonia in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:598-602.
66. Khan DA, Rahman A, Khan FA. Is procalcitonin better than C-reactive protein for early diagnosis of bacterial pneumonia in children? *J Clin Lab Anal* 2010;24:1-5.
67. Briel M, Christ-Crain M, Young J, et al. Procalcitonin-guided antibiotic use versus a standard approach for acute respiratory tract infections in primary care: study protocol for a randomised controlled trial and baseline characteristics of participating general practitioners. *BMC Fam Pract* 2005;6:34.
68. Christ-Crain M, Jaccard-Stolz D, Bingisser R, et al. Effect of procalcitonin-guided treatment on antibiotic use and outcome in lower respiratory tract infections: cluster-randomised, single-blinded intervention trial. *Lancet* 2004;363:600-7.
69. Christ-Crain M, Stolz D, Bingisser R, et al. Procalcitonin guidance of antibiotic therapy in community-acquired pneumonia: a randomized trial. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174:84-93.
70. Kristoffersen KB, Sogaard OS, Wejse C, et al. Antibiotic treatment interruption of suspected lower respiratory tract infections based on a single procalcitonin measurement at hospital admission--a randomized trial. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:481-7.
71. Schuetz P, Christ-Crain M, Thomann R, et al. Effect of procalcitonin-based guidelines vs standard guidelines on antibiotic use in lower respiratory tract infections: the ProHOSP randomized controlled trial. *Jama* 2009;302:1059-66.
72. Esposito S, Tagliabue C, Picciolli I, et al. Procalcitonin measurements for guiding antibiotic treatment in pediatric pneumonia. *Respir Med* 2011;105:1939-45.
73. Cohen JF, Leis A, Lecarpentier T, et al. Procalcitonin predicts response to beta-lactam treatment in hospitalized children with community-acquired pneumonia. *PLoS One* 2012;7:e36927.
74. Daxboeck F, Krause R, Wenisch C. Laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Clin Microbiol Infect* 2003;9:263-73.
75. She RC, Thurber A, Hymas WC, et al. Limited utility of culture for *Mycoplasma pneumoniae* and

- Chlamydomphila pneumoniae for diagnosis of respiratory tract infections. *J Clin Microbiol* 2010;48:3380-2.
76. Wolf J, Daley AJ. Microbiological aspects of bacterial lower respiratory tract illness in children: atypical pathogens. *Paediatr Respir Rev* 2007;8:212-9
 77. de Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis* 1993;17:S83-9.
 78. Dekeyser S, Bonnel C, Martinet A, et al. Usefulness of PCR test for the management of a *Mycoplasma pneumoniae* outbreak in Bethune Hospital (Pas-de-Calais, France). *Pathol Biol (Paris)* 2011;59:83-7.
 79. Petitjean J, Vabret A, Gouarin S, Freymuth F. Evaluation of four commercial immunoglobulin G (IgG)- and IgM-specific enzyme immunoassays for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Clin Microbiol* 2002;40:165-71.
 80. Petitjean-Lecherbonnier J, Vabret A, Gouarin S, Dina J, Legrand L, Freymuth F. *Mycoplasma pneumoniae* infections: retrospective study in Basse-Normandie, 1997-2005. Epidemiology--diagnostic utility of serology and PCR for a rapid diagnostic. *Pathol Biol (Paris)* 2006;54:603-11.
 81. Templeton KE, Scheltinga SA, Graffelman AW, et al. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2003;41:4366-71.
 82. de Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, et al. Serologic diagnosis of chlamydial and *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Ann Biol Clin (Paris)* 2006;64:409-19.
 83. Hammerschlag MR. Pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae* in children: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Pulmonol* 2003;36:384-90.
 84. Burillo A, Bouza E. *Chlamydomphila pneumoniae*. *Infect Dis Clin North Am* 2010;24:61-71.
 85. Miyashita N, Ouchi K, Kawasaki K, et al. Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydomphila pneumoniae*. *Respirology* 2008;13:427-31.
 86. Michelow IC, Olsen K, Lozano J, et al. Diagnostic utility and clinical significance of naso- and oropharyngeal samples used in a PCR assay to diagnose *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia. *J Clin Microbiol* 2004;42:3339-41.
 87. Skakni L, Sardet A, Just J, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples from pediatric patients by polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992;30:2638-43.
 88. Bebear CM. Pathogenesis and laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Arch Pediatr* 2008;15:1253-6.
 89. Daxboeck F, Khanakah G, Bauer C, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in serum specimens from patients with mycoplasma pneumonia by PCR. *Int J Med Microbiol* 2005;295:279-85.
 90. Ieven M, Ursi D, Van Bever H, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients. *J Infect Dis* 1996;173:1445-52.
 91. Gullsby K, Storm M, Bondeson K. Simultaneous detection of *Chlamydomphila pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* by use of molecular beacons in a duplex real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2008;46:727-31.
 92. McDonough EA, Barrozo CP, Russell KL, et al. A multiplex PCR for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, and *Bordetella pertussis* in clinical specimens. *Mol Cell Probes* 2005;19:314-22.
 93. Miyashita N, Saito A, Kohno S, et al. Multiplex PCR for the simultaneous detection of *Chlamydia pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae* and *Legionella pneumophila* in community-acquired pneumonia. *Respir Med* 2004;98:542-50.
 94. Ursi D, Ieven M, Noordhoek GT, et al. An interlaboratory comparison for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples by the polymerase chain reaction. *J Microbiol Methods* 2003;53:289-94.
 95. Touati A, Pereyre S, Bouziri A, et al. Prevalence of *Mycoplasma pneumoniae*-associated respiratory tract infections in hospitalized children: results of a 4-year prospective study in Tunis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010;68:103-9.
 96. Spuesens EB, Fraaij PL, Visser EG, et al. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory

- tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med* 2013;10:e1001444.
97. Gajdusek DC. *Pneumocystis carinii*; etiologic agent of interstitial plasma cell pneumonia of premature and young infants. *Pediatrics* 1957;19:543-65.
 98. Freeman AF, Davis J, Anderson VL, et al. *Pneumocystis jirovecii* infection in patients with hyper-immunoglobulin E syndrome. *Pediatrics* 2006;118:e1271-5.
 99. Saltzman RW, Albin S, Russo P, Sullivan KE. Clinical conditions associated with PCP in children. *Pediatr Pulmonol* 2011;18:21577.
 100. Zaoutis TE, Webber S, Naftel DC, et al. Invasive fungal infections in pediatric heart transplant recipients: incidence, risk factors, and outcomes. *Pediatr Transplant* 2011;15:465-9.
 101. Thomas CF, Jr., Limper AH. *Pneumocystis pneumonia*. *N Engl J Med* 2004;350:2487-98.
 102. Meuwissen JH, Tauber I, Leeuwenberg AD, et al. Parasitologic and serologic observations of infection with *Pneumocystis* in humans. *J Infect Dis* 1977;136:43-9.
 103. Peglow SL, Smulian AG, Linke MJ, et al. Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J Infect Dis* 1990;161:296-306.
 104. Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, et al. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics* 1978;61:35-41.
 105. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis* 2001;32:855-61.
 106. Huang L, Morris A, Limper AH, et al. An Official ATS Workshop Summary: Recent advances and future directions in pneumocystis pneumonia (PCP). *Proc Am Thorac Soc* 2006;3:655-64.
 107. Totet A, Latouche S, Lacube P, et al. Typing of *Pneumocystis carinii* f.sp. *hominis* isolates from nasopharyngeal aspirates of immunocompetent infants with bronchiolitis by dihydropteroate synthase gene analysis. *J Eukaryot Microbiol* 2001;Suppl:121S.
 108. Ruffini DD, Madhi SA. The high burden of *Pneumocystis carinii* pneumonia in African HIV-1-infected children hospitalized for severe pneumonia. *Aids* 2002;16:105-12.
 109. Kovacs A, Frederick T, Church J, et al. CD4 T-lymphocyte counts and *Pneumocystis carinii* pneumonia in pediatric HIV infection. *Jama* 1991;265:1698-703.
 110. Baughman RP, Dohn MN, Frame PT. The continuing utility of bronchoalveolar lavage to diagnose opportunistic infection in AIDS patients. *Am J Med* 1994;97:515-22.
 111. Tollerud DJ, Wesseler TA, Kim CK, et al. Use of a rapid differential stain for identifying *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage fluid. Diagnostic efficacy in patients with AIDS. *Chest* 1989;95:494-7.
 112. Samuel CM, Whitelaw A, Corcoran C, et al. Improved detection of *Pneumocystis jirovecii* in upper and lower respiratory tract specimens from children with suspected pneumocystis pneumonia using real-time PCR: a prospective study. *BMC Infect Dis* 2011;11:329.
 113. Aliouat-Denis CM, Chabe M, Demanche C, et al. *Pneumocystis* species, co-evolution and pathogenic power. *Infect Genet Evol* 2008;8:708-26.
 114. Kroe DM, Kirsch CM, Jensen WA. Diagnostic strategies for *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Semin Respir Infect* 1997;12:70-8.
 115. Procop GW, Haddad S, Quinn J, et al. Detection of *Pneumocystis jirovecii* in respiratory specimens by four staining methods. *J Clin Microbiol* 2004;42:3333-5.
 116. Azoulay E, Bergeron A, Chevret S, et al. Polymerase chain reaction for diagnosing pneumocystis pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest* 2009;135:655-61.
 117. Harris JR, Marston BJ, Sangrue N, et al. Cost-effectiveness analysis of diagnostic options for pneumocystis pneumonia (PCP). *PLoS One* 2011;6:e23158.
 118. Kovacs JA, Ng VL, Masur H, et al. Diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia: improved detection in sputum with use of monoclonal antibodies. *N Engl J Med* 1988;318:589-93.
 119. Lautenschlager I, Lyytikäinen O, Jokipii L, et al. Immunodetection of *Pneumocystis carinii* in bronchoalveolar lavage specimens compared with methenamine silver stain. *J Clin Microbiol* 1996;34:728-30.
 120. Durand-Joly I, Chabe M, Soula F, et al. Molecular diagnosis of *Pneumocystis pneumonia*. *FEMS Immunol*

Med Microbiol 2005;45:405-10.

121. Krajicek BJ, Limper AH, Thomas CF, Jr. Advances in the biology, pathogenesis and identification of *Pneumocystis pneumonia*. *Curr Opin Pulm Med* 2008;14:228-34.
122. Turner D, Schwarz Y, Yust I. Induced sputum for diagnosing *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV patients: new data, new issues. *Eur Respir J* 2003;21:204-8.
123. Vargas SL, Pizarro P, Lopez-Vieyra M, et al. *Pneumocystis* colonization in older adults and diagnostic yield of single versus paired noninvasive respiratory sampling. *Clin Infect Dis* 2010;50:e19-21.
124. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1531-7.
125. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods* 2008;75:258-61.
126. Flori P, Belleste B, Durand F, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol* 2004;53:603-7.
127. Fujisawa T, Suda T, Matsuda H, et al. Real-time PCR is more specific than conventional PCR for induced sputum diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in immunocompromised patients without HIV infection. *Respirology* 2009;14:203-9.
128. Huggett JF, Taylor MS, Kocjan G, et al. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Pneumocystis jirovecii* DNA in bronchoalveolar lavage fluid of HIV-infected patients. *Thorax* 2008;63:154-9.
129. Larsen HH, Huang L, Kovacs JA, et al. A prospective, blinded study of quantitative touch-down polymerase chain reaction using oral-wash samples for diagnosis of *Pneumocystis pneumonia* in HIV-infected patients. *J Infect Dis* 2004;189:1679-83.
130. Meliani L, Develoux M, Marteau-Miltgen M, et al. Real time quantitative PCR assay for *Pneumocystis jirovecii* detection. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50:651.
131. Abbasi S SJ, Hughes WT, Flynn PM. Aspergillosis in children with cancer: A 34-year experience. *Clin Infect Dis* 1999;29:1210-9.
132. Al-Rezqi A, Hawkes M, Doyle J, Richardson SE, Allen U. Invasive mold infections in iatrogenically immunocompromised children: an eight-yr review. *Pediatr Transplant* 2009;13:545-52.
133. Hatziaorou E, Walsh TJ, Tsanakas JN, et al. *Aspergillus* and the paediatric lung. *Paediatr Respir Rev* 2009;10:178-85.
134. Walmsley S DS, King S, Schneider R, et al. Invasive *Aspergillus* Infections in a pediatric hospital: a ten year review;. *Pediatr Infect Dis J* 1993;12:673-82.
135. Gangneux JP, Camus C, Philippe B. Epidemiology of invasive aspergillosis and risk factors in non neutropaenic patients. *Rev Mal Respir* 2010;27:e34-46.
136. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis* 2008;47:674-83.
137. Guarner J, Brandt ME. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 2011;24:247-80.
138. Cornillet A, Camus C, Nimubona S, et al. Comparison of epidemiological, clinical, and biological features of invasive aspergillosis in neutropenic and nonneutropenic patients: a 6-year survey. *Clin Infect Dis* 2006;43:577-84.
139. Lortholary O, Gangneux JP, Sitbon K, et al. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005-2007). *Clin Microbiol Infect* 2011;17:1882-9.
140. Cordonnier C, Botterel F, Ben Amor R, et al. Correlation between galactomannan antigen levels in serum and neutrophil counts in haematological patients with invasive aspergillosis. *Clin Microbiol Infect* 2009;15:81-6.
141. Castagnola E, Furfaro E, Caviglia I, et al. Performance of the galactomannan antigen detection test in the diagnosis of invasive aspergillosis in children with cancer or undergoing haemopoietic stem cell transplantation. *Clin*

Microbiol Infect 2010;16:1197-203.

142. Steinbach WJ, Addison RM, McLaughlin L, et al. Prospective Aspergillus galactomannan antigen testing in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:558-64.

143. Wheat LJ, Walsh TJ. Diagnosis of invasive aspergillosis by galactomannan antigenemia detection using an enzyme immunoassay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:245-51.

144. Guo YL, Chen YQ, Wang K, et al. Accuracy of BAL galactomannan in diagnosing invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *Chest* 2010;138:817-24.

145. Mularoni A, Furfaro E, Faraci M, et al. High Levels of beta-D-glucan in immunocompromised children with proven invasive fungal disease. *Clin Vaccine Immunol* 2010;17:882-3.

146. Sun W, Wang K, Gao W, et al. Evaluation of PCR on bronchoalveolar lavage fluid for diagnosis of invasive aspergillosis: a bivariate metaanalysis and systematic review. *PLoS One* 2011;6:e28467.