

CAT
Critically Appraised Topic

**De rol van moleculaire diagnostiek bij kinderen met een
'community-acquired pneumonia'.**

Author: Dr. Wim Maurissen

Supervisor: Dr. Els Oris

Date: 15/05/2012

Expiry date: 15/05/2014

CLINICAL BOTTOM LINE

De definitie van een community-acquired pneumonie (CAP) bij kinderen wordt volgens de World Health Organization (WHO) enkel gesteld op basis van klinische tekens. De jaarlijkse Europese incidentie van een community-acquired pneumonie voor de introductie van het zeven valent pneumococcon vaccin is 33/10.000 bij 0-5 jarigen en 14.5/10.000 bij 0-16 jarigen.

Bij kinderen is het moeilijk voor de behandelende geneesheer om het etiologisch agens (virus of bacterie) te bepalen aangezien het meestal onmogelijk is om een goed staal te bekomen op de plaats van de infectie. Klinisch en radiologisch is het zeer moeilijk om een onderscheid te maken tussen een pneumonie die veroorzaakt wordt door een virus of een bacterie. Op basis van een nasopharyngeaal aspiraats of een nasopharyngeale wisser kan een eventueel aanwezig virus (of atypische bacterie) opgespoord worden dat de etiologie van de pneumonie kan verklaren.

Het is nuttig om bij gehospitaliseerde patiënten snel het etiologisch agens te trachten op te sporen zodat eventueel de gepaste anti-virale therapie opgestart kan worden (vb. neuraminidase inhibitoren tegen Influenza) en het isolatiebeleid in het ziekenhuis op dit resultaat toegepast kan worden. Ook is dit opsporen zinvol zodat er een beter epidemiologisch overzicht kan gemaakt worden.

Studies tonen aan dat indien respiratoire virussen snel gedetecteerd worden met een moleculaire test, dit een totale kostbesparing met zich meebrengt. De verklaring voor die besparing ligt vooral in het verminderen van het aantal hospitalisatiedagen. Er werd geen vermindering in het antibioticaverbruik aangetoond. De performantie karakteristieken van de moleculaire testen zijn superieur t.o.v. de traditionele technieken. De sensitiviteit en de specificiteit tussen real time multiplex PCR assay in vergelijking met zijn corresponderende single target PCR zijn vergelijkbaar. Indien kleine hoeveelheden van een respiratoir virus gedetecteerd worden kan dit mogelijk wijzen op asymptomatische kolonisatie van het virus.

Dit suggereert dat cutoff waardes voor de verschillende virussen zouden kunnen bepaald worden.

Het gebruik van een multiplex PCR voor het opsporen van virussen heeft een praktische beperking. Het is belangrijk dat de turnaround time zeer kort wordt gehouden. Het heeft dus geen zin om deze testen één keer per week in batch uit te voeren. Bij voorkeur is de test beschikbaar in het weekend en op feestdagen. Enkel door het gebruik van een automatisch systeem kan hieraan voldaan worden. Zo een systeem is heel recent beschikbaar op de markt. (www.filmattay.com)

CLINICAL/DIAGNOSTIC SCENARIO

Community-acquired pneumonie (CAP) is verantwoordelijk voor één vijfde van de kindersterfte in de wereld, waarvan 70% in de derde wereldlanden. (1) De Europese incidentie van CAP, gedefinieerd als koorts, klinische tekens en een infiltraat op RX-Thorax (deze definitie verschilt van de WHO definitie (2)) bij kinderen opgenomen in een ziekenhuis in een voorheen gezond kind is naar schatting jaarlijks 33/10.000 bij 0-5 jarigen en 14.5/10.000 bij 0-16 jarigen (populatie gebaseerde studies). (3,4) Dit was de jaarlijkse incidentie voor de introductie van het pneumococcon vaccin. Na de introductie van het zeven valent pneumokokken conjugaat vaccin werd er een vermindering van het aantal opnames voor CAP aangetoond met 19% in de UK. (5) De moeilijkheid bij kinderen is het bepalen van het etiologisch agens van de CAP. Dit wegens de moeilijkheid om een goed staal te bekomen op de plaats van de infectie. Het bekomen van een goed sputum staal bij kinderen is slechts mogelijk na een inductie procedure. Dergelijke procedure is niet veilig bij een kind met respiratoire distress. Ook bestaat er een terughoudendheid bij kinderen voor het uitvoeren van invasieve diagnostische procedures zoals een long aspiraats, bronchoalveolaire lavage en een transthoracale long punctie. (6) Het uitvoeren van een bacteriële cultuur op een nasopharyngeaal aspiraats toont ons enkel kolonisatie met normale flora waaronder ook bacteriën die de oorzaak kunnen zijn van de pneumonie. Bacteriëmie komt slechts voor in minder dan 10% van de bacteriële CAP's. (2) Er kan klinisch of radiologisch eveneens geen betrouwbaar onderscheid gemaakt worden tussen een virale of een bacteriële pneumonie. (7) Hierdoor is de etiologie van een CAP in veel gevallen niet gekend, met als consequentie dat veel kinderen een therapie met antibiotica krijgen voor een niet bacteriële infectie, waardoor er bacteriële resistentie tegen antibiotica ontwikkeld wordt.

In het Ziekenhuis Oost-Limburg wordt naast de klassieke cultuur op respiratoire stalen en hemoculturen, *Mycoplasma pneumoniae* (kwalitatief) op vraag van de behandelende geneesheer opgespoord op een nasopharyngeaal aspiraats via een in house ontwikkelde real-time PCR. Verder kan influenza A, influenza B en influenza A subtype 2009 H1N1 op nasopharyngeale aspiraten of nasopharyngeale swabs kwalitatief bepaald worden via multiplex

real-time PCR (Cepheid Xpert Flu) op de GeneXpert. Het Respiratoir Syncytial Virus kan kwalitatief op nasopharyngeale aspiraten of nasofaryngeale swabs worden opgespoord met een snelle immuunchromatografische membraan assay (BinaxNOW RSV test).

Het doel van deze CAT bestaat erin om na te gaan of moleculaire testen, een haalbare meerwaarde kunnen bieden in de diagnostiek van CAP bij kinderen. Hiervoor zal een antwoord worden gegeven op volgende vragen. Wat zijn de performantie karakteristieken? Is moleculaire diagnostiek kost effectief? Voor welke indicaties is het nuttig om een moleculaire test uit te voeren bij een CAP?

QUESTION(S)

- 1) Vraag 1: Wat zijn de performantie karakteristieken?
- 2) Vraag 2: Is moleculaire diagnostiek kost effectief?
- 3) Vraag 3: Voor welke indicaties is het nuttig om een moleculaire test uit te voeren bij een CAP?

SEARCH TERMS

- 1) MeSH Database (PubMed): MeSH term: “community-acquired pneumonia in children”, “real-time PCR”, “influenza”, multiplex PCR”, “cost analysis”.
- 2) PubMed Clinical Queries (from 1966; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>): Systematic Reviews; Clinical Queries using Research Methodology Filters (diagnosis + specific, diagnosis + sensitive, prognosis + specific)
- 3) IDSA guidelines; British thoracic society guidelines

RELEVANT EVIDENCE/REFERENCES

1) *Guidelines and Recommendations (most recent topics on top)*

1 A) Bradley JS, Byington CL, Shah SS, *et al.* 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. *Clinical Infectious Diseases* 2011;53:25-76.

1 B) Harris M, Clark J, Coote N, *et al.* British thoracic society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax* 2011;66:1-23.

2) *Original Articles*

1. Williams BG, Gouws E, *et al.* Estimates of world-wide distribution of child deaths from acute respiratory infections. *Lancet Infect Dis* 2002;2:25-32.

2. Cevey-Macherel M, Galetto-Lacour A, *et al.* Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized children based on WHO clinical guidelines. *Eur J Pediatr*, 2009;168:1429-1436.
3. Senstad AC, Suren P, Brauteset L, *et al.* Community-acquired pneumonia (CAP) in children in Oslo, Norway. *Acta Paediatr* 2009;98:332-336.
4. Clark JE, Hammal D, Hampton F, *et al.* Epidemiology of community-acquired pneumonia in children seen in hospital. *Epidemiol Infect* 2007;135:262-269.
5. Koshy E, Murray J, *et al.* Impact of seven-valent pneumococcal conjugate vaccination (PCV7) programme on childhood hospital admissions for bacterial pneumonia and empyema in England: national time-trends study. 1997-2008. *Thorax* 2010;65:770-774.
6. Murdoch DR, O'Brien KL, Scott AG, *et al.* Breathing New Life into Pneumonia Diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009;47:3405-3408.
7. Korppi M, Don M, Valent F, *et al.* The value of clinical features in differentiating between viral, pneumococcal and atypical bacterial pneumonia in children. *Acta Paediatr* 2008;97:943-947.
8. Kok J, Blyth CC, *et al.* Comparison of a Rapid Antigen Test with Nucleic Acid Testing during Cocirculation of Pandemic Influenza A/H1N1 2009 and Seasonal Influenza A/H3N2. *Journal of Clinical Microbiology* 2010;48:290-291.
9. Novak-Weekley SM, Marlowe EM, *et al.* Evaluation of the Cepheid® Xpert® Flu Assay for Rapid Identification and Differentiation of Influenza A, Influenza A 2009 H1N1, and Influenza B. *Journal of Clinical Microbiology* 2012, published online ahead of print.
10. Popow-Kraupp T, Aberle JH. Diagnosis of Respiratory Syncytial Virus Infection. *The Open Microbiology Journal* 2011;5:128-134.
11. Miernyk K, Bulkow L, *et al.* Performance of a rapid antigen test (Binax NOW® RSV) for diagnosis of respiratory syncytial virus compared with real-time polymerase chain reaction in a pediatric population. *Journal of Clinical Virology* 2011;55:240-243.

12. Weinberg GA, Erdman DD, *et al.* 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.
13. Gharabaghi F, Hawan A, *et al.* Evaluation of multiple commercial molecular and conventional diagnostic assays for the detection of respiratory viruses in children. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17: 1900-1906.
14. Jansen R, Schinkel J, *et al.* Development and evaluation of four-tube real time multiplex PCR assay covering fourteen respiratory viruses, and comparison to its corresponding single target counterparts. *Journal of Clinical Virology* 2011,51:179-185.
15. Loens K, Goossens H and Ieven M. Acute respiratory infection due to *Mycoplasma pneumoniae*: current status of diagnostic methods. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010,29:1055-1069.
16. Blanco S, Loreto F, *et al.* Comparison of 2 molecular assays and a serologic test in diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection in paediatrics patients. *Diagnostic Microbiology and infectious Disease* 2011,71:463-466.
17. Zhang L, Zong Z, *et al.* PCR versus serology for diagnosing *Mycoplasma pneumoniae* infection: A systematic review and meta-analysis. *Indian J Med Res* 2011,134:270-280.
18. Mahony JB, Blackhouse G *et al.* Cost analysis of multiplex PCR testing for diagnosing respiratory virus infections. *Journal of Clinical Microbiology* 2009,47:2812-2817.
19. Cilla G, Onate E, *et al.* Viruses in community-acquired pneumonia in children less ten 3 years old: high rate of viral co-infection. *Journal of medical virology* 2008;80:1843-1849.
20. Shah SS, Dugan MH, *et al.* Blood cultures in the emergency department evaluation of childhood pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*, 2011;30:475-479.
21. Korppi M. Pneumococcal serology in children's respiratory infections. *Eur J Clin Microbiol*, 2008;27:167-175.
22. Eastham KM, Freeman R, *et al.* Clinical features, aetiology and outcome of empyema in children in the north east of England. *Thorax* 2004;59:522-525.

23. Dowell SF, Garman RL, 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;32:824-825.
24. Jansen R, Wieringa J, et al. Frequent detection of respiratory viruses without symptoms: toward defining clinically relevant cutoff values. *Journal of Clinical Microbiology* 2011;49:2631-2636.
25. Bonner AB, Monroe KW, 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;112:363-367.
26. Byington CL, Castillo H, et al. The effect of rapid respiratory virus diagnostic testing on antibiotic use in a children's hospital. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:1230-1234.
27. Doan QH, Kisson, 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 illnesses. *J Pediatr* 2009;154:91-95.
28. Michelow IC, Olsen K, et al. Epidemiology and clinical characteristics of community-acquired pneumonia in hospitalized children. *Pediatrics* 2004;113:701-707.
29. Ruuskanen O, Lahti E, et al. Viral pneumonia. *Lancet* 2011;377:1264-1275.

Vraag 1: Wat zijn de performantie karakteristieken?

Virale pathogenen

Influenza A, Influenza A 2009 H1N1 en Influenza B

Accurate assays met snelle turnaround time kunnen zorgen voor een correct gebruik van anti-virale therapie, het reduceren van antibiotica gebruik, en het reduceren van de verspreiding van het virus. Een snelle antigeen test heeft een suboptimale negatieve predictieve waarde (Influenza A 2009 H1N1 = 76.2% en Non-Influenza A 2009 H1N1 = 90.2%) en de lage sensitiviteit (Influenza A 2009 H1N1 = 53.4% en Non-Influenza A 2009 H1N1 = 74.2%). Als gouden standaard in deze studie werd een nucleïnezuur test gebruikt. (8) Een negatieve antigeen test moet wegens de lage sensitiviteit met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Cepheid heeft een automatisch systeem ontwikkeld (Xpert Flu) dat de staal voorbereiding en een real-time PCR uitvoert voor influenza A, influenza A 2009 H1N1 en influenza B. De analytische performantie karakteristieken zijn zeer goed en zijn weergegeven in attachment 1 (Financial support by grant from Cepheid, Inc.) De test is gemakkelijk in gebruik, alle reagentia zitten in een cartridge en de hands-on time is ongeveer 2 minuten. De turn-around-time is ongeveer 70 minuten. (9) Deze test wordt in het ZOL gebruikt.

Respiratory syncytial virus (RSV)

De laboratorium diagnose van een RSV infectie is mogelijk door cultuur, detectie van virale antigenen en amplificatie van virale nucleïnezuren.

Het nadeel van een cultuur is de trage turnaround time en dat er technische expertise nodig is voor de uitvoering. Het voordeel is een hogere sensitiviteit dan de snelle antigeen test en dat de mogelijkheid bestaat om het virus te karakteriseren dat nuttig kan zijn voor de bevestiging van nosocomiale transmissie. (10)

In het ZOL wordt gebruik gemaakt van een snelle antigeen test (Binax NOW® RSV) op een nasopharyngeaal aspiraat of een nasopharyngeale wisser. De sensitiviteit van deze test is hoog (89%) bij kinderen die zich presenteren met een bronchiolitis. Bij kinderen met een andere diagnose was de sensitiviteit slechts 38%. Vooral als de test uitgevoerd wordt enkele dagen na het begin van de symptomen daalt de sensitiviteit. De specificiteit is hoog (>92%), zelfs buiten het RSV seizoen. Een positief RSV resultaat moet niet geconfirmeerd worden. (11) Deze test en andere antigeen detectie testen zijn minder sensitief dan nucleïnezuur amplificatie assays (12). Studies die moleculair diagnostische testen vergeleken met cultuur of antigeen detectie

testen toonden allen de superieure sensitiviteit aan van de nucleïnezuur testen, onafhankelijk van de patiënten populatie. Het detecteren van virus specifieke antilichamen is niet nuttig voor de diagnose van een RSV infectie. Ondanks een ernstige RSV infectie is er meestal geen serologische respons waarneembaar. (10)

De soort en kwaliteit van de staalafname beïnvloeden de sensitiviteit en specificiteit van alle virale detectie methodes. Nasopharyngeale aspiraten zijn gevoeliger voor de detectie van RSV dan nasopharyngeale swabs (Rayon swab). (10) Recent zijn nieuwe 'flocked-nasopharyngeale swabs' ontwikkeld, die een grotere opbrengst hebben van virus geïnfecteerde cellen dan met de conventionele nasopharyngeale swabs. (10)

Multiplex PCR Assays

De nucleïnezuur amplificatie testen zijn superieur t.o.v. de klassieke diagnostische methodes (directe fluorescente antilichaam detectie (DFA) en virale kweek) in het identificeren van meer virussen met een hogere sensitiviteit en specificiteit. De recent ontwikkelde moleculaire multiplex assay laat een simultane detectie toe van meerdere targets in dezelfde reactie. Gharabaghi et al vergeleek de sensitiviteit en specificiteit van vier commerciële multiplex PCR assays met DFA en virus isolatie voor de detectie van respiratoire virussen bij kinderen. DFA en virale cultuur waren minder gevoelig dan PCR voor de meeste virussen. Tussen de vier multiplex PCRs is de Seeplex RV15 het gevoeligst voor alle targets behalve voor enterovirus en rhinovirus. De specificiteit was zeer goed voor alle assays. (attachment 2) (13) Jansen *et al* vergeleek de sensitiviteit en de specificiteit tussen een real time multiplex PCR assay (14 virussen) met zijn corresponderende single target PCR bij 133 kinderen met een acute respiratoire infectie. Deze multiplex toonde een zeer goede specificiteit voor de 14 virussen en de sensitiviteit was hoog behalve voor klinische stalen met hoge 'cycle thresholds' (CT) voor enterovirus. (14) De detectielimiet voor de multiplex PCR is vergelijkbaar met de individuele single target PCR's en lag tussen de 40 en 50 copies/reactie voor elke target. De mediane CT waarden bij de multiplex PCR waren nooit hoger dan de single target assays, en voor de meeste virussen waren de mediane CT waarden van de multiplex assay statistisch lager dan de single target assay. De variatie coëfficiënt (CV) range voor de multiplex PCR (0.4% (hCoV) en 3.3% (PIV3)) was slechts matig hoger in vergelijking met de CV range voor de single target assay (0.3% (hPeV) en 1.0% (hBoV)). (14)

Mycoplasma pneumoniae

Het uitvoeren van een cultuur van *Mycoplasma pneumoniae* duurt verschillende weken en heeft slechts een sensitiviteit van 60%. De sensitiviteit van serologische testen hangt af van het moment wanneer het eerste serum wordt afgenomen na de start van de ziekte en van het verkrijgen van een tweede serum 3 tot 4 weken na de start van de symptomen. De diagnose van een *M. pneumoniae* infectie wordt gesteld door een seroconversie of een viervoudige titer stijging van IgG tussen de twee serum stalen. Meestal wordt er slechts één serum staal afgenomen tijdens de acute fase van de ziekte. Aangezien IgM antistoffen vroeger ontstaan dan IgG antistoffen, worden IgM antistoffen gebruikt voor de vroege serologische diagnose van een *M. pneumoniae* infectie. Indien men gebruik maakt van deze test moet men er rekening mee houden dat een deel van de patiënten geen IgM antistoffen produceren. Ook patiënten met een reïnfectie produceren niet altijd IgM antistoffen. Een IgM bepaling detecteert een acute infectie met een hogere sensitiviteit als de test uitgevoerd wordt 7 dagen na het starten van de symptomen. Bij sommige patiënten zullen de IgM antistoffen nog later opkomen. IgM antistoffen kunnen maanden na de acute infectie nog persisteren. (15)

PCR van nasopharyngeale aspiraten zijn gedurende de vroege fase van de ziekte superieur aan serologie voor het diagnostiseren van een *M. pneumoniae* infectie bij kinderen. Gedurende de eerste week na het ontstaan van de symptomen kan bij 23-81% van de gevallen een serologische respons gedetecteerd worden, terwijl met PCR 96-100% gedetecteerd kan worden. Blanco et al. vergeleek twee commerciële PCR assays (een real-time en een oligochromatografische test) bij nasopharyngeale aspiraten van kinderen. De gevoeligheid van de real-time PCR was 93.7% en van de oligochromatografische test 78.1% met een zeer goede specificiteit voor de twee 'nucleic acid amplification techniques'. (16) Volgens de meta-analyse van Zhang et al. bekomt real-time PCR betere performantie karakteristieken dan de klassieke PCR technieken. Er werd wel een grote heterogeniteit aangetoond tussen de verschillende geïnccludeerde studies waardoor de auteurs suggereerden dat er een belangrijke rol voor PCR testen in de diagnostiek naar *M. pneumoniae* infecties weggelegd is, maar dat deze serologie (vanaf week 2 na de start van de symptomen) niet kunnen vervangen. (17)

Vraag 2: Is moleculaire diagnostiek kost effectief?

Mahony et al. bepaalde de economische impact van de implementatie van een multiplex PCR assay voor respiratoire virussen (xTAG RVP test) in een routine hospitaal laboratorium. Er werd een kost-analyse studie uitgevoerd waarbij de kost van de xTAG RVP test vergeleken werd met de conventionele testen (directe fluorescente antilichaam detectie (DFA) en virale kweek (SVC)). Er werden vier diagnostische strategieën opgesteld waarbij voor elke strategie de kost bepaald werd. De grafische voorstelling van de verschillende strategieën is weergegeven in attachment 3. (18) De kost van elke strategie bevat niet alleen de kost van de

virale test maar ook de kost van de volledige hospitalisatie. De gebruikte prevalentie (in de populatie) was 63.2% voor respiratoire virale infecties bij kinderen (de totale prevalentie in pediatrie cases over de 2 jaar van de studie). De performantie karakteristieken van elke laboratorium test worden weergegeven in attachment 4. De laboratorium kosten voor het detecteren van respiratoire virussen, zijn de kosten van het materiaal samen de kosten van arbeid (nodig voor een batch van 20 specimens). De kosten van het materiaal (reagentia en plastic ware) en kosten van arbeid (\$28.00/u plus 30% per 10 jaar anciënniteit) zijn \$13.80 voor DFA, \$23.20 voor SVC en \$80 voor de xTAG RVP test. (Canadese dollars (1 Canadese dollar = 0.76 Euro))

De gemiddelde hospitaalkost per diagnostische status (true positive, false positive, true negative, false negative) werd bepaald. Deze bevat de kosten van de ziekenhuisopname (duur opname, uitgevoerde onderzoeken en antibiotica gebruik). Een opname op de afdeling pediatrie kost per dag \$690.72 en op een pediatrie intensieve afdeling \$1548. Een dag isolatie (droplet) kost \$1662.12. De totale hospitaalkost (\neq laboratoriumkost) per patiënt en per diagnostische status werd bepaald en weergegeven in attachment 5. Deze data laten zien dat er een meerkost is voor een ziekenhuis indien de diagnose van een respiratoire virus infectie gemist wordt. Attachment 6 geeft een berekening van de gemiddelde gewogen kosten per patiënt voor elk van de vier diagnostische strategieën weer. De kosten voor elke diagnostische strategie werden berekend door de proportie van patiënten (in een bepaalde diagnostische status: true positive, false positive, true negative, false negative) te vermenigvuldigen met de kosten geassocieerd met elke diagnostische status. De resulterende gewogen kosten van de verschillende diagnostische statussen werden opgeteld voor elke diagnostische strategie en zo werd de gewogen kost voor elke diagnostische strategie berekend. De gemiddelde kost per onderzochte case was het hoogst voor DFA + cultuur en het laagst voor xTAG RVP test alleen. Bijna de volledige besparing geassocieerd met het gebruik van de xTAG RVP test alleen is te wijten aan de vermindering in opnameduur. Indien de prevalentie van respiratoire virus infecties hoger is dan 11% zal de xTAG RVP test alleen de goedkoopste strategie zijn, terwijl DFA alleen de goedkoopste strategie is als de prevalentie lager is. In een 24 maanden epidemiologische studie van respiratoire virale infecties bij kinderen in de community werd een prevalentie van 63% bekomen met in de laagste zomermaand een prevalentie van 36% en de hoogste wintermaand een prevalentie van 87%. Dit suggereert dat de xTAG RVP test alleen de goedkoopste strategie is het hele jaar door. Er werd geen verminderd antibiotica verbruik waargenomen bij de xTAG RVP test strategie. Mogelijks komt dit doordat na ontslag het antibiotica verbruik niet bijgehouden werd. (18)

Het grote nadeel van dit model is dat de output niet te veralgemenen is. De output is namelijk afhankelijk van de input parameters en die zijn van land tot land anders. Bij deze test is het cruciaal dat de turnaround time zo laag mogelijk gehouden wordt. Dit kan enkel met een

automatisch PCR systeem en niet in een batch van 20 specimen die bij bovenstaande berekening gebruikt wordt. Zo een automatisch multiplex PCR systeem is zeer recent beschikbaar op de markt maar kost voorlopig veel meer dan de traditionele multiplex PCR. Aangezien er in België geen terugbetaling voorzien is voor een dergelijk multiplex PCR, zal de kost voor het uitvoeren van deze volledig ten laste vallen van de patiënt of door het ziekenhuis gedragen moeten worden.

Vraag 3: Voor welke indicaties is het nuttig om een moleculaire test uit te voeren bij een CAP?

De etiologie van CAP bij kinderen zijn van bacteriële (al dan niet atypisch) en/of virale aard. De mogelijke bacteriële oorzaken van CAP bij kinderen zijn *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* en *Moraxella catarrhalis*. Atypische bacteriën die een CAP kunnen veroorzaken bij kinderen zijn *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia pneumoniae* en *Legionella pneumophila*. Virale oorzaken van CAP zijn RSV, parainfluenza, influenza, adenovirus, rhinovirus, varicella zoster virus, cytomegalovirus, herpes simplex virus, enterovirus, humaan metapneumovirus, humaan bocavirus en coronavirus. Er zijn zeker nog andere virussen die een CAP kunnen veroorzaken bij kinderen.

Bacteriën (typische en atypische) werden geïdentificeerd in 53% van de gehospitaliseerde kinderen met een CAP. Een pneumonie veroorzaakt door *Streptococcus pneumoniae* werd gedocumenteerd in 46% van de kinderen. Een virus werd gevonden in 67% waarvan een gemengde bacterieel-virale infectie voorkwam bij 33% van de kinderen. (2) In de studie van Cilla et al. waarbij opgenomen kinderen van 1 tot 35 maanden met een CAP werden geïncubeerd, detecteerde men in 66% van de gevallen ten minste 1 virus. Twee of meer virussen werden in 27% van de gevallen gedetecteerd. Het meest frequent voorkomend virus was RSV (19.8%), gevolgd door Human Boca Virus (14.2%), Rhinovirus (13.6%), Human Metapneumovirus (11.5%), Parainfluenza virussen (11.2%), Influenza virussen (7.4%), Coronavirus (6.5%) en Adenovirus (3.3%). De seizoens gebonden distributie van de meest frequent gedetecteerde virussen is weergegeven in attachment 7. (19) Virussen worden frequenter geïdentificeerd bij kinderen met een CAP jonger dan 1 jaar dan bij kinderen tussen twee en drie jaar. (77% vs 59%) Virale co-infectie treedt ook meer op bij kinderen jonger dan één jaar dan kinderen tussen de één en de drie jaar (25% vs 15%) (19)

Volgens de British Thoracic Society guidelines is er is geen indicatie om een microbiologische analyse uit te voeren bij kinderen met een CAP die niet in het ziekenhuis opgenomen dienen te worden (1 B).

Hemoculturen dienen enkel te gebeuren bij gehospitaliseerde kinderen met een ernstige CAP of indien er complicaties opgetreden zijn. De prevalentie van bacteriëmie was <10% bij kinderen met een CAP. (1B, 20) *S. pneumoniae* wordt slechts in < 5% uit de hemoculturen gekweekt bij patiënten met een CAP veroorzaakt door een pneumokok. (21) De totale impact van hemoculturen op het klinisch beleid is beperkt wegens de lage prevalentie van bacteriëmie. Een gramkleuring en cultuur van opgehoest sputum wordt aanbevolen bij gehospitaliseerde volwassenen met een CAP. Deze test kan slechts zelden uitgevoerd bij gehospitaliseerde kinderen, omdat niet altijd een adequaat specimen bekomen kan worden. Bij oudere kinderen en adolescenten met een ernstige CAP is het aanbevolen om een poging te ondernemen om een adequaat sputum staal te bekomen voor gramkleuring en cultuur. (1 A) Het bekomen van een goed sputum staal bij kinderen na een inductie procedure is niet veilig bij een kind met respiratoire distress en wordt afgeraden. (6) Een nasopharyngeale bacteriële cultuur is niet nuttig bij kinderen omdat normale flora van de oropharynx eveneens de bacteriën omvat die verantwoordelijk kunnen zijn voor een pneumonie. (2) Een cultuur van pleuravocht toont meestal geen groei. De reden hiervoor is dat de kinderen met een CAP meestal reeds antibiotica gekregen hebben voordat een pleuravocht punctie uitgevoerd wordt. Eastham *et al.* vond groei van pneumokokken in het pleuravocht bij slechts 9% van de kinderen met een bewezen pneumokokken pneumonie. De pneumokokken PCR was positief in 68% van de gevallen en in 25% van de gevallen was de pneumokokken antigen test positief op het pleuravocht. (22)

Een positieve urinaire antigen test bij kinderen voor de detectie van *S. pneumoniae* is sterk geassocieerd met pneumokokken kolonisatie. Een positief resultaat van een pneumokokken antigen test kan geen betrouwbaar verschil maken tussen kinderen met een pneumokokken pneumonie en nasopharyngeale kolonisatie door pneumokokken. (23) Er is onvoldoende informatie over de negatief predictieve waarde van deze test om het gebruik ervan voor het uitsluiten van pneumokokken als oorzaak van CAP bij kinderen aan te bevelen. (1 A) Deze test wordt dus niet aanbevolen voor de diagnose van een pneumokokken pneumonie bij kinderen.

De hoge gevoeligheid van PCR laat de detectie van minimale hoeveelheden van virale nucleïne-zuren toe. Maar men kan zich vragen stellen over de klinische relevantie van een positief test resultaat. Indien kleine hoeveelheden van een respiratoir virus gedetecteerd worden kan dit mogelijks wijzen op asymptomatische kolonisatie van het virus. Jansen *et al* heeft een case control studie uitgevoerd bij asymptomatische en symptomatische kinderen. Een PCR detectie van 14 respiratoire virussen werd uitgevoerd op nasale aspiraten en het resultaat werd gekwantificeerd in copies per milliliter. Bij 72% van de cases en bij 28% van de controles werd minstens 1 virus teruggevonden. Bij de kinderen jonger dan 1 jaar werden in 47% van de controles minstens 1 virus teruggevonden. RSV werd zelden gedetecteerd bij controles. Een

positief RSV resultaat is dus (waarschijnlijk) altijd klinisch relevant. Er werden significante verschillen waargenomen in de hoeveelheid gedetecteerd virus tussen cases en controles. Dit suggereert dat cutoff waarden voor de verschillende virussen zouden kunnen bepaald worden om zo het onderscheid trachten te maken tussen kolonisatie en oorzakelijk agens. (24)

De klinische studie van Bonner *et al* toont een significante reductie in antibiotica gebruik en bijkomende diagnostische testen aan indien er een positieve snelle influenza test bekomen werd bij kinderen tijdens het influenza seizoen. (25) In een retrospectieve studie werd eveneens een significante reductie in antibiotica gebruik aangetoond voor gehospitaliseerde kinderen met een positieve RSV, parainfluenza 1,2,3 of adenovirus test, vergeleken met een negatieve test. (26) In de studie van Doan *et al* werd in tegenstelling met de vorige 2 studies geen significant verschil aangetoond van antibiotica gebruik en bijkomende testen tussen virus positieve (multivirus testing), virus negatieve en niet geteste patiënten. (27) Een lage respiratoire inflammatie geïnduceerd door een virale infectie is voorbeschikkend voor een bacteriële surinfectie. Hierdoor is het moeilijk om een bacteriële co-infectie uit te sluiten bij een laboratorium bevestigde virale infectie. Een virale en bacteriële co-infectie werd gedetecteerd in 23% tot 33% van gehospitaliseerde kinderen met een CAP. (2,28) Een positieve influenza test zou de nood voor additionele testen en antibiotica gebruik mogelijks kunnen verminderen, terwijl een correcte antivirale therapie kan worden opgestart. Kinderen die niet respiratoir falen met een positieve snelle test voor een respiratoir virus hebben geen antibiotica nodig volgens de IDSA guidelines. (1 A) Er bestaat evenwel geen consensus hierover. Sommige experts raden aan om bij alle patiënten met een CAP antibiotica te geven aangezien het onmogelijk is om een bacteriële (sur)infectie uit te sluiten. (29)

Voor het behandelen van CAP bij kinderen, is het belangrijk om het onnodig voorschrijven van macrolide therapie te minimaliseren, hetgeen een inadequate therapie kan zijn voor *S. pneumoniae*, terwijl het de optimale therapie is voor kinderen met een CAP veroorzaakt door *Mycoplasma pneumoniae*. Correcte en snelle diagnose van *M. pneumoniae* is van groot belang om een adequate antibiotica therapie te geven. Het stellen van de diagnose is gebaseerd op een laboratorium test aangezien het niet mogelijk op basis van klinische tekens en symptomen. Het is niet gedefinieerd bij welke leeftijd van de patiënt met een CAP er een grotere kans bestaat dat deze veroorzaakt wordt door *M. pneumoniae*. Het testen van *M. pneumoniae* is nuttig indien de 'pretest probabiliteit' voor een *M. pneumoniae* infectie intermediair of hoog is. De test moet niet gebeuren bij kinderen indien de waarschijnlijkheid voor een *M. pneumoniae* infectie laag is (vals positieve resultaten kunnen voorkomen). Er wordt aanbevolen om zowel serologie als een moleculaire test uit te voeren bij kinderen met het vermoeden van een *M. pneumoniae* infectie. (1 A, 17)

Conclusie

Sensitieve en specifieke testen voor de snelle etiologische diagnose van een CAP bij kinderen worden volgens de IDSA guidelines aanbevolen bij de evaluatie van kinderen met een ernstige CAP. (1 A) Multiplex PCRs voor respiratoire virussen hebben goede performantiekarakteristieken. Deze testen zijn nuttig bij gehospitaliseerde patiënten zodat de gepaste anti-virale therapie opgestart kan worden (vb. neuraminidase inhibitoren tegen Influenza, Ribavirin tegen RSV) en het isolatiebeleid in het ziekenhuis op hun resultaat kan toegepast worden. Ook is dit opsporen zinvol zodat er een beter epidemiologisch overzicht kan gemaakt worden. Er zou een vermindering in opnameduur zijn indien snel de diagnose van een virale pneumonie gesteld wordt, hetgeen een kostprijs daling met zich meebrengt. Een verminderd antibiotica verbruik wordt niet in alle studie aangetoond. Een bacteriële co-infectie niet kan worden uitgesloten.

Indien kleine hoeveelheden van een respiratoir virus gedetecteerd worden kan dit mogelijks wijzen op asymptomatische kolonisatie van het virus. Dit suggereert dat cutoff waardes voor de verschillende virussen zouden kunnen bepaald worden.

Het gebruik van een multiplex PCR voor het opsporen van virussen heeft een praktische beperking. Het is zeer belangrijk dat de turn-around time zeer kort wordt gehouden. Het heeft dus geen zin om deze testen één keer per week in batch uit te voeren. Bij voorkeur moet de test beschikbaar kunnen zijn in het weekend en op feestdagen. Enkel door het gebruik van een automatisch systeem kan hieraan voldaan worden. Zo een systeem is voor Influenza op de markt en wordt in het ZOL gebruikt. Een automatisch systeem Multiplex systeem voor 18 virussen en 3 bacteriële targets is heel recent beschikbaar op de markt, maar is kostelijk. (www.filmattay.com)

ATTACHMENTS

Attachment 1 (9)

Prospective Specimens: Xpert Flu Compared to Culture – Corrected After Discrepant Analysis by Sequencing

Virus	No. of Specimens ^a					Sensitivity (%) (95% CI)	Specificity (%) (95% CI)	PPV (%) (95% CI)	NPV (%) (95% CI)
	N	Cs+X+	Cs-X+	Cs+X-	Cs-X-				
Nasal Aspirate/Wash									
Influenza A Virus	342	9	0	1	332	90.0 (55.5-99.8)	100 (99.1-100.0)	100 (71.7-100.0)	99.7 (98.3-100.0)
Influenza A Virus novel H1N1	342	7	1	0	334	100 (65.2-100.0)	99.7 (98.3-100.0)	87.5 (47.4-99.7)	100 (99.1-100.0)
Influenza B Virus	342	9	0	0	333	100 (71.7-100.0)	100 (99.1-100.0)	100 (71.7-100.0)	100 (99.1-100.0)

Nasopharyngeal Swab									
Influenza A Virus	297	12	0	0	285	100 (77.9-100.0)	100 (99.0-100.0)	100 (77.9-100.0)	100 (99.0-100.0)
Influenza A Virus novel H1N1	297	7	1	0	289	100 (65.2-100.0)	99.7 (98.1-100.0)	87.5 (47.4-99.7)	100 (99.0-100.0)
Influenza B Virus	297	8	0	0	289	100 (68.8-100.0)	100 (99.0-100.0)	100 (68.8-100.0)	100 (99.0-100.0)

^aCs+/- = culture positive/negative, sequencing of 2009 H1N1 target & sequencing of specimens that disagree with Xpert results; X+/-=Xpert Flu positive/negative.

Attachment 2 (13)

TABLE 3. Sensitivity of direct fluorescent antibody (DFA), culture and four multiplex assays for detection and identification of respiratory viruses. Number of positives (within brackets)

Target	DFA	Culture	Resplex II Panel v2.0	Seeplex RV15	xTAG [®] RVP	xTAG [®] RVP Fast
INFA	76.7% (46)	60.3% (35)	96.9% (62)	96.9% (62)	98.4% ^a (63)	93.7% ^b (60)
INFB	78.4% (29)	75.0% (21)	100% (37)	100% (37)	100% (36)	64.9% (24)
PIV (1-4)	72.4% (21)	61.5% (16)	82.9% (34)	97.6% (40)	85.4% (35)	65.8% (26)
PIV1	76.9%	66.7%	86.7%	93.3%	71.4%	46.7%
PIV2	55.5%	44.4%	88.9%	100%	100%	77.8%
PIV3	100%	66.7%	100%	85.7%	71.4%	42.8%
PIV4	–	–	60.0%	100%	100%	100%
hMPV	68.6% (24)	43.3% (13)	82.0% (32)	97.4% (38)	97.4% (38)	92.3% (36)
RSV (A/B)	93.5% (130)	86.5% (96)	84.0% (121)	100% (144)	88.2% (127)	91.7% (132)
RSVA	–	–	90.4%	100%	85.5%	92.5%
RSVB	–	–	79.3%	100%	98.3%	94.8%
ADV	38.1% (8)	44.4% (8)	71.4% (15)	100% (21)	85.7% (18)	52.4% (11)
BoV	–	–	75.0% (18)	100% (24)	–	100% (24)
CoV OC43/HKU1	–	–	92.6% (25)	100% (27)	48.1% (13)	59.3% (16)
CoV 229E/NL63	–	–	100% (17)	100% (17)	88.2% (15)	88.2% (15)
Enterovirus/rhinovirus	–	–	96.7% (172)	71.7% (127)	93.8% (167)	97.7% (174)

^aBased on combination of INFA + HI + H3 + H5.

^bBased on combination of INFA + HI + H3.

Attachment 3 (18)

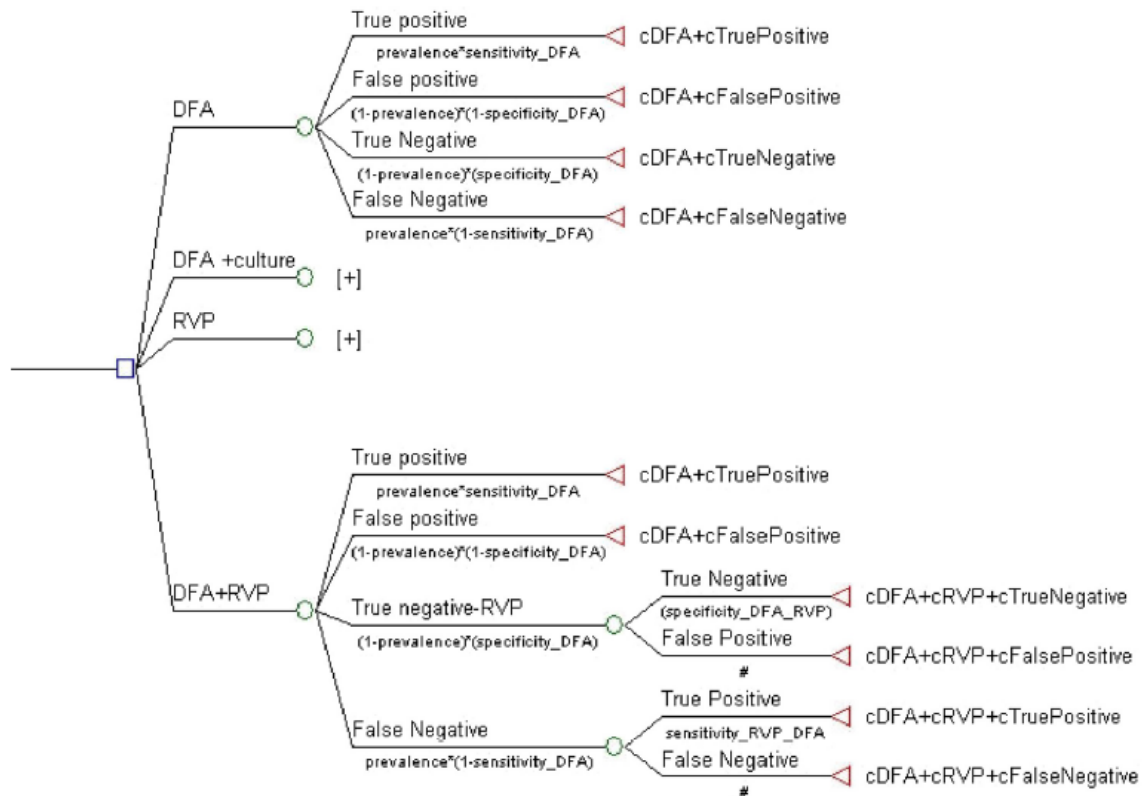


FIG. 1. Graphical representation of the decision tree model showing four nodes representing the four diagnostic strategies. The model was constructed on the basis of a comparison of the costs (c) for the four diagnostic strategies. The model shows four nodes representing the four diagnostic strategies, and each of those nodes is expanded to show each of the four true diagnostic statuses for each diagnostic strategy and the costs associated with each diagnostic status. The number of patients with each diagnostic status, viz., true positive, false positive, true negative, and false negative, was determined for each of the four diagnostic strategies from the chart review. The costs for each testing arm was then determined by using laboratory test costs and all hospital-associated costs.

Attachment 4 (18)

TABLE 1. Sensitivity and specificity of the diagnostic tests used in the model^a

Test	Sensitivity (%)	Specificity (%)
DFA	70	98
DFA + culture	72	98
xTAG RVP	94	98

^a The sensitivity of DFA was taken from the literature (6, 13, 17), where DFA was compared to at least one other test, including at least one molecular test, and where test performance was calculated by using a combined reference standard for positivity. The sensitivity of DFA plus SVC was set at 72%, which showed a 2% increase in the positive detection rate obtained in our laboratory during the study period when SVC was used. The sensitivity of the xTAG RVP test reflects the median sensitivity for 12 respiratory viruses detected by the xTAG RVP test (4). The specificity of each test was set at 98%.

TABLE 2. Breakdown of cost per case by diagnostic status

Diagnostic status	Cost (\$)			
	Hospitalization	Tests and investigations	Antibiotics	Total
True positive	2,347	60	6	2,413
False negative	4,697	53	6	4,756
True negative	5,166	55	6	5,228
False positive	5,186	55	6	5,248

TABLE 3. Calculation of weighted costs for each diagnostic strategy by using proportions and actual costs

Test	Viral test result	Diagnostic status	Proportion	Cost (\$)	Weighted cost (\$) ^a
RVP ^b	Positive	True positive	0.592	2,493.00	1,476
	Positive	False positive	0.007	5,327.00	39
	Negative	True negative	0.363	5,307.00	1,926
	Negative	False negative	0.038	4,836.00	61
	Total		1.000		3,623
DFA	Positive	True positive	0.441	2,426.80	1,070
	Positive	False positive	0.007	5,260.80	39
	Negative	True negative	0.363	5,240.80	1,900
	Negative	False negative	0.189	4,769.80	901
	Total		1.000		3,911
DFA + culture	DFA positive	True positive	0.441	2,426.80	1,070
	DFA positive	False positive	0.007	5,260.80	37
	DFA negative, culture positive	True positive	0.004	2,447.45	9
	DFA negative, culture positive	False positive	0.007	5,281.45	38
	DFA negative, culture negative	True negative	0.356	5,261.45	1,872
	DFA negative, culture negative	False negative	0.185	4,790.45	887
	Total		1.000		3,914
DFA + RVP	DFA positive	True positive	0.441	2,426.80	1,070
	DFA positive	False positive	0.007	5,260.80	37
	DFA negative, RVP positive	True positive	0.045	2,506.80	114
	DFA negative, RVP positive	False positive	0.007	5,340.80	39
	DFA negative, RVP negative	True negative	0.356	5,320.80	1,893
	DFA negative, RVP negative	False negative	0.144	4,849.80	697
	Total		1.000		3,849

^a The weighted cost is proportion × cost.

^b RVP, xTAG RVP test.

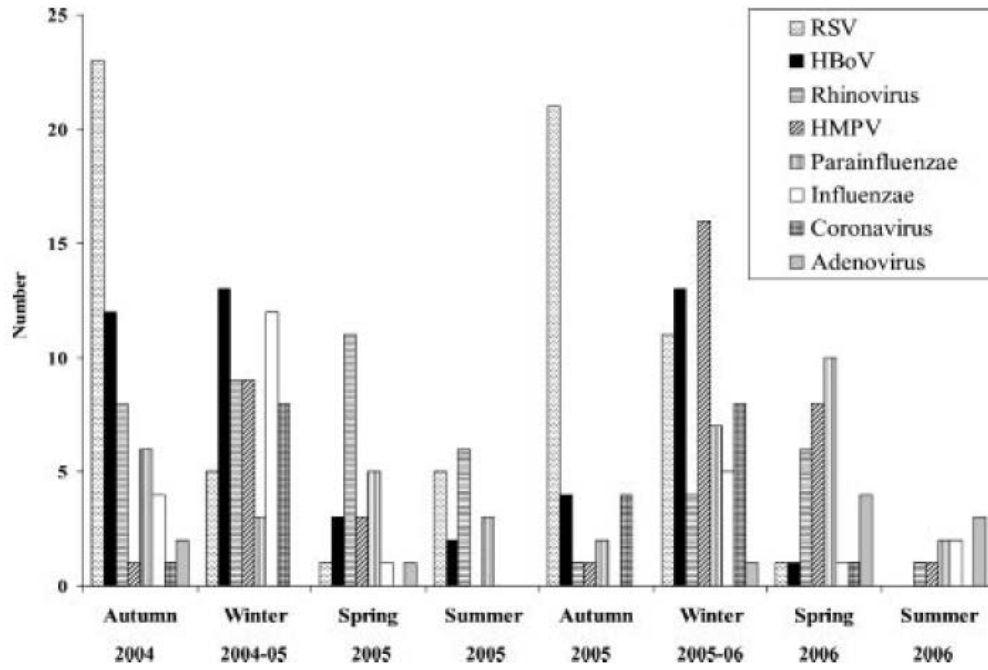


Fig. 2. Seasonal distribution of the most frequently detected viruses in 338 episodes of community-acquired pneumonia in Gipuzkoa (Basque Country, Spain) between October 2004 and September 2006.