

RINOVIRUS. FRECUENCIA EN NIÑOS CON INFECCIÓN RESPIRATORIA AGUDA, NO INTERNADOS

DÉBORA N. MARCONE¹, CARMEN RICARTE¹, CRISTINA VIDELA¹, JORGE EKSTROM², GUADALUPE CARBALLAL¹, SANTIAGO VIDAURRETA², MARCELA ECHAVARRÍA¹¹Unidad de Virología y Laboratorio de Virología, ²Departamento de Pediatría, Hospital Universitario CEMIC, Buenos Aires, Argentina

Resumen Los métodos moleculares para diagnosticar rinovirus humanos (RVH) han aumentado la sensibilidad de detección. Esto ha permitido documentar la asociación entre los RVH y las infecciones respiratorias agudas (IRA) altas y bajas. La infección por RVH durante la infancia se asoció con posterior desarrollo de asma. Se estudió la frecuencia de RVH en 186 niños menores de 6 años ambulatorios con IRA (alta o baja), durante 2 años consecutivos (1/6/2008 - 31/5/2010). Se correlacionó la presencia de RVH con los antecedentes y características clínico-epidemiológicas. La detección de RVH se realizó con una RT-PCR en tiempo real que amplifica parte de la región 5' no codificante del genoma. Los virus respiratorios clásicos se estudiaron por inmunofluorescencia. En el 61% de los niños se detectó etiología viral. Las frecuencias fueron: RVH 27%, virus sincicial respiratorio (VSR) 16%, influenza A y B 9%, parainfluenza 8%, metapneumovirus 7% y adenovirus 0.5%. Se observaron coinfecciones duales en 8 casos, siendo RVH el más frecuente (en 4 de ellos). Los RVH circularon durante todo el período estudiado, con picos en invierno y primavera. No se observaron diferencias clínico-epidemiológicas significativas entre pacientes con o sin RVH, excepto un mayor porcentaje de niños afebriles con RVH. Los RVH fueron los virus más detectados en niños ambulatorios, principalmente en menores de 2 años, los segundos virus asociados a bronquiolitis, luego del VSR, y detectados tres veces más en los niños expuestos a tabaquismo pasivo (OR: 2,91; $p = 0.012$) que en el resto. Fueron identificados como único agente en el 28% de las bronquiolitis.

Palabras clave: rinovirus, virus respiratorios, RT-PCR tiempo real, infección respiratoria aguda, bronquiolitis, niños

Abstract *Rhinoviruses. Frequency in nonhospitalized children with acute respiratory infection.* Molecular methods for human rhinoviruses (HRV) have increased the sensitivity in their diagnosis. HRV may cause acute respiratory infections (ARI) of the upper and lower respiratory tract. HRV infection during childhood is a predictor of asthma development. In this study, the HRV frequency in outpatient children with ARI was determined, and their clinical features and previous conditions were evaluated. A total of 186 respiratory samples of children under 6 year old attending the CEMIC pediatric emergency room from June 1, 2008 to May 31, 2010, were studied. Classical respiratory viruses were detected by immunofluorescence. A real time RT-PCR that amplifies part of the 5' non coding genomic region was used for HRV detection. Viral detection was obtained in 61% of children. The frequency was: 27% for HRV, 16% for respiratory syncytial virus (RSV), 9% for influenza, 8% for parainfluenza, 7% for metapneumovirus and 0.5% for adenovirus. Dual coinfection was detected in 8 children and HRV were the most frequent, detected in 4 of them. HRV circulated during the two year period of the study, with peaks during winter and spring. No clinical difference was observed between patients with or without HRV, except an increase percent of children with HRV without fever. HRV were the most frequent viruses detected in this population, mainly in children under 2 year old, the second cause of bronchiolitis after RSV and more frequently detected in children exposed to passive smoking (OR = 2.91; $p = 0.012$), and were detected as the sole etiologic agent in 28% of bronchiolitis.

Key words: human rhinovirus, respiratory viruses, real-time RT-PCR, acute respiratory infection, bronchiolitis, children

Los rinovirus humanos (RVH) son los agentes causales más frecuentes de resfrió común. También están asociados con otitis media aguda en niños y sinusitis en adultos^{1, 2}. Estos virus, descubiertos en 1956, pertenecen a la familia *Picornaviridae*, género *Enterovirus*. Poseen un

genoma ARN de cadena simple de 7.2 kb, de polaridad positiva con un único marco de lectura³. Actualmente, existen descritos más de 100 serotipos clasificados en tres especies: A, B y C⁴.

El impacto y la asociación de RVH con diferentes cuadros clínicos han sido subestimados debido a la falta de métodos diagnósticos suficientemente sensibles y específicos. El diagnóstico puede realizarse por aislamiento en cultivo de células, ya que producen acción citopática y se pueden diferenciar de otros picornavirus por su labilidad al tratamiento con ácido. Sin embargo, algunos

Recibido: 7-VI-2011

Aceptado: 21-XII-2011

Dirección Postal: Dra. Débora N. Marcone, Unidad de Virología, Hospital Universitario CEMIC, Av. Galván 4102, 1431 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 5299-0414 e-mail: deboramarccone@hotmail.com

serotipos, incluyendo las cepas de la especie C, no crecen en cultivo. Además, el aislamiento en cultivo es costoso, muy laborioso y complejo, e implica la disponibilidad de un sector de cultivo celular en el laboratorio de rutina. La detección directa de antígenos por inmunofluorescencia no puede utilizarse para su diagnóstico, dado que no existen anticuerpos monoclonales específicos para todos los RVH por la alta variabilidad antigénica.

El desarrollo y la incorporación de métodos moleculares como la transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de polimerasa (PCR) para el diagnóstico de RVH, ha aumentado la sensibilidad de su detección. La incorporación de estos métodos para su diagnóstico, ha permitido asociar a los RVH con infecciones respiratorias, no solo del tracto superior sino también del inferior, tales como neumonía y bronquiolitis en niños⁵. Asimismo, se los ha detectado en pacientes con exacerbaciones de asma (en niños y adultos)⁶, exacerbaciones del cuadro respiratorio en pacientes con fibrosis quística⁷ y con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (en adultos)⁸. Además, la infección por RVH durante la infancia ha sido identificada como predictor de sibilancias recurrentes⁹, y de posterior desarrollo de asma en niños¹⁰.

Dado que aún no hemos encontrado datos en nuestro medio que describan el uso de RT-PCR en tiempo real para RVH, ni estudios sobre la frecuencia y las implicancias clínicas en niños atendidos en el servicio de emergencias y consultorio externo de pediatría, se planteó el objetivo de determinar la frecuencia y realizar un análisis clínico-epidemiológico de la infección por RVH en niños ambulatorios con infección respiratoria aguda (IRA) de Buenos Aires.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio de corte transversal descriptivo, en el cual se incluyeron 186 niños entre el 1 de junio, 2008 y el 31 de mayo, 2010, que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión: menores de 6 años con IRA, presentar una evolución de la enfermedad menor de 3 días, ser atendidos en el servicio de emergencias o en consultorio externo de Pediatría de CEMIC y que no fueron internados. Se requirió la firma de padres o tutores de un consentimiento informado y el llenado de una ficha clínico-epidemiológica, especialmente diseñada, completada por el médico tratante. En la misma se registraron antecedentes perinatales, personales y familiares (hiperreactividad bronquial y atopía en el paciente y familiares, vacunación, lactancia), epidemiológicos (tabaquismo pasivo, medio epidemiológico viral) y datos clínicos (fiebre, taquipnea, tos, sibilancias, entre otros). Los criterios de exclusión fueron la presencia de enfermedades concomitantes tales como: malformaciones congénitas, enfermedad fibroquística, displasia broncopulmonar, inmunodepresión, síndrome de Down, cardiopatías con hiperflujo e hipertensión pulmonar, encefalopatía crónica no evolutiva. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética Institucional (calificado internacionalmente por el *Department of Health and Human Services* (HHS), EE.UU.)

De cada niño se obtuvo al ingreso una muestra de secreciones respiratorias con hisopos flexibles (hisopados nasofaríngeos) (Copan®) en medio de transporte viral. Las mismas fueron procesadas en el día, en el laboratorio de Virología de

CEMIC para la detección de: virus sincicial respiratorio (VSR), adenovirus (AdV), influenza A (FluA), influenza B (FluB), para-influenza (PIV) 1, 2 y 3, y metapneumovirus humano (MPVh) por inmunofluorescencia (IF).

Posteriormente, a partir de 200 µl del material respiratorio conservado a -70 °C, se realizó la extracción manual del genoma viral con columnas (Qiagen®) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la detección de RVH, se realizó una RT-PCR en tiempo real en un *SmartCyclerII* (Cepheid®), utilizando un par de *primers* que amplifican un fragmento de 207 pares de bases de la región 5' no codificante (5'NCR) del genoma viral, y una sonda marcada con FAM-BHQ^{11, 12}. Se consideraron positivas aquellas muestras que superaron el umbral antes del ciclo 40.

Se definió como pacientes negativos para RVH a los niños con diagnóstico de otro virus respiratorio o negativos para los virus estudiados.

Los datos contenidos en las fichas epidemiológicas y los resultados del diagnóstico viral se almacenaron en una base de datos, utilizando el programa Excel (*Microsoft*) para el análisis estadístico. Los resultados se expresaron en porcentajes para variables nominales, y en medianas y percentiles 25 y 75 (p25 - p75) para variables continuas. Se utilizó el test exacto de Fisher para comparar las distintas variables clínico-epidemiológicas entre los 2 grupos de pacientes (RVH positivos y RVH negativos), y la prueba de Wilcoxon para comparación de medianas. Se calcularon los riesgos (*OR*) e intervalos de confianza (IC95%). En todos los casos, se tomó nivel de significación 5% ($\alpha = 0.05$).

Resultados

De los 186 niños estudiados, 104 (56%) fueron de sexo femenino, y la mediana de edad fue de 18 (0-71) meses. De los 186 niños, 166 (89%) presentaron rinitis, 161 (87%) tos, 142 (76%) fiebre, 85 (46%) taquipnea, 66 (35%) sibilancias. Los diagnósticos clínicos fueron: 64 (34%) faringitis, 47 (25%) bronquiolitis, 22 (12%) laringitis, 19 (10%) bronquitis y 12 (7%) neumonía.

Mediante el uso de la RT-PCR se obtuvo un diagnóstico positivo para RVH en 50 niños (26.9% [IC95%: 20.2 - 33.5]) de los 186 niños con IRA ambulatorios. De ellos, 112 (60%) presentaron IRA alta y 74 (40%) IRA baja; los RVH se detectaron en 32 (29%) y 18 (24%) de los pacientes con esos cuadros, respectivamente. De los RVH detectados, 37 (74%) fueron hallados en niños menores de 2 años. De los 50 niños con IRA y RVH, 19 (38%) fueron de sexo femenino y la mediana de edad fue de 15 meses, estadísticamente diferente a la mediana de edad de 20 meses de los niños sin RVH (Tabla 1). En 21 (42%) de los niños con RVH se registraron antecedentes de hiperreactividad bronquial, aunque no alcanzó significación estadística. Las manifestaciones clínicas más frecuentes de los niños con IRA y RVH fueron: 47 (94%) rinitis, 42 (84%) tos, 19 (38%) sibilancias, 18 (36%) faringitis, 14 (28%) bronquiolitis. El 38% de los niños con RVH (18/50) presentaron cuadros de IRA baja.

En esta población se observó por IF: VSR en 29 (15.6%) niños, PIV en 14 (7.5%), MPVh en 13 (6.9%), FluB en 9 (4.8%), FluA en 7 (3.8%) y AdV en 1 (0.5%) (Tabla 2).

TABLA 1.- Características clínico-epidemiológicas de 186 niños menores de 6 años con IRA atendidos en la consulta externa, CEMIC, Buenos Aires. (1/6/08-31/5/10)

	RVH positivos (n = 50)		RVH negativos (n = 136)		p*
	n	(%)	n	(%)	
Edad (meses), mediana (p25 - p75)#	15 (6-23)		20 (9-37)		0.027
Femenino/Masculino (relación)	19/31 (1:1,6)		63/73 (1:1,2)		0.324
Antecedentes					
Recién nacidos pretérmino	7	(14)	18	(13)	0.999
Hiperreactividad bronquial en paciente	21	(42)	46	(34)	0.308
Hiperreactividad bronquial en familiares	19	(38)	54	(40)	0.867
Atopía en paciente	9	(18)	31	(23)	0.550
Atopía en familiares	13	(26)	44	(32)	0.475
Hermanos escolares	25	(50)	74	(54)	0.622
Medio epidemiológico viral	24	(48)	72	(53)	0.621
Jardín maternal o infantil	27	(54)	69	(51)	0.742
Lactancia	47	(94)	128	(94)	0.999
Tabaquismo pasivo	14	(28)	16	(12)	0.012
Manifestaciones clínicas					
Fiebre	32	(64)	110	(81)	0.020
Taquipnea	17	(34)	68	(50)	0.068
Tos	42	(84)	119	(88)	0.628
Sibilancias	19	(38)	47	(35)	0.730
Tiraje	14	(28)	28	(21)	0.324
Apnea	1	(2)	1	(0,7)	0.466
Cianosis	1	(2)	1	(0,7)	0.466
Vómitos	10	(20)	13	(10)	0.077
Diarrea	2	(4)	8	(6)	0.999
Rinitis	47	(94)	119	(88)	0.287
Faringitis	18	(36)	46	(34)	0.862
Laringitis	2	(4)	20	(15)	0.069
Bronquiolitis	14	(28)	33	(24)	0.704
Bronquitis	2	(4)	17	(13)	0.106
Neumonía	2	(4)	10	(8)	0.519

*Se utilizó la prueba de Wilcoxon para comparación de medianas y el test Exacto de Fisher para comparación de antecedentes y manifestaciones clínicas. Se considera significativo $p \leq 0.05$.

#p25 - p75: percentil 25 y 75.

Se logró un diagnóstico virológico (incluyendo RVH y virus respiratorios clásicos) en 115 (61.8%) de los 186 niños menores de 6 años ambulatorios con IRA.

Se detectó coinfección viral dual en 8 (4%) niños, siendo RVH el más frecuente (2%): 2 casos RVH-PIV, RVH-VSR, RVH-MPVh, VSR-FluB, MPVh-FluA, MPVh-FluB, MPVh-PIV.

De los 47 niños con bronquiolitis, se logró el diagnóstico etiológico viral en 35 (75%) de ellos, detectándose 15 VSR (32%), 13 RVH (28%), 4 MPVh (9%), 2 FluB (4%), 2 PIV (4%) y 1 FluA (2%). En estos pacientes se detectaron 2 coinfecciones duales: RSV-FluB y MPVh-FluB.

La circulación de RVH se observó durante todo el período estudiado (1 de junio, 2008 a 31 de mayo, 2010), con picos en abril, mayo, julio y septiembre (Fig. 1).

Al comparar las manifestaciones clínicas de los pacientes RVH positivos *versus* RVH negativos, se observó un mayor porcentaje de niños afebriles con RVH ($p = 0,020$). Para el resto de las manifestaciones no se observaron diferencias significativas.

Al analizar los antecedentes de los niños con IRA, se observó una asociación positiva entre los pacientes RVH positivos y el tabaquismo pasivo ($OR = 2.91$, [IC95%:1.2 - 6.5]) ($p = 0.012$).

TABLA 2.— Detección de virus respiratorios en 186 niños menores de 6 años ambulatorios con IRA, CEMIC, Buenos Aires. (1/6/08-31/5/10)

Edad	Pacientes n								
	Total	Positivos							
		Total	RVH	VSR	PIV	MPVh	FluB	FluA	AdV
0-6 meses	24	15	8	6	0	0	1	1	0
6-12 meses	41	27	12	6	5	4	1	0	1
1 año	56	36	17	8	6	3	2	2	0
2 años	23	16	7	6	2	1	0	1	0
3 años	28	14	5	2	1	5	2	1	0
4-5 años	14	7	1	1	0	0	3	2	0
Total n (%)	186(100)	115(61)	50(27)	29(16)	14(8)	13(7)	9(5)	7(4)	1(0.5)

VSR: virus sincicial respiratorio, AdV: adenovirus, FluA: influenza A, FluB: influenza B, PIV: parainfluenza, MPVh: metapneumovirus humano, RVH: rinovirus humano. Se utilizó RT-PCR para detección de RVH; se utilizó inmunofluorescencia para el resto de los virus respiratorios.

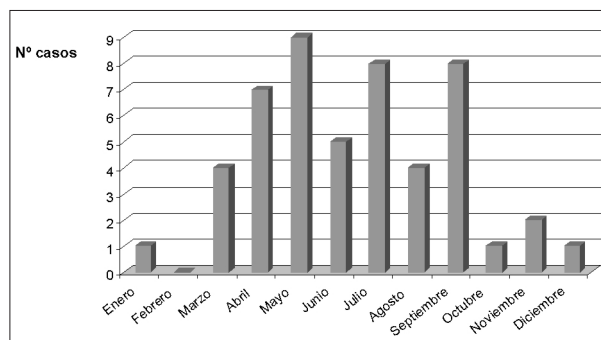


Fig. 1.— Distribución estacional de RVH en 186 niños menores de 6 años ambulatorios con IRA, CEMIC, Buenos Aires. (1/6/08-31/5/10).

Discusión

El diagnóstico de rutina de los virus respiratorios clásicos (VSR, FluA, FluB, PIV, AdV) se realiza habitualmente por detección directa de antígenos por IF. Las frecuencias de detección viral varían desde un 30% a 50%, dependiendo de la edad de la población estudiada, de la época del año, de los cuadros clínicos y de la obtención temprana de la muestra respiratoria. Uno de los primeros estudios de etiología de las IRA realizado en la Argentina entre los años 1984 y 1987, detectó por IF un 30.3% de etiología viral en 1003 niños menores de 5 años con IRA baja, la mayoría internados en hospitales públicos de Buenos Aires¹³.

Los RVH no son estudiados de rutina ya que no existen métodos rápidos como la IF, y a que clásicamente fueron asociados sólo a cuadros leves de IRA alta. Sin embargo, con el uso de métodos moleculares, el diagnóstico de RVH se ha expandido y se los ha asociado también con cuadros respiratorios bajos.

Las frecuencias de detección de RVH varían de acuerdo a la población estudiada y a la RT-PCR empleada. Algunos protocolos demostraron falta de sensibilidad para detectar algunos serotipos de RVH, y otros, falta de especificidad para diferenciarlos de los enterovirus. En este trabajo se estudió la presencia de RVH utilizando un método molecular de RT-PCR en tiempo real. Para ello, se realizó una modificación en la síntesis de *primers* del protocolo publicado por Lu et al.¹¹, a fin de aumentar la sensibilidad y especificidad¹². Esta RT-PCR demostró detectar todas las especies de RVH, incluyendo la especie C que no puede detectarse por métodos de aislamiento en cultivo.

Los RVH fueron los virus más frecuentemente detectados (27%) en nuestra población. Además, fueron los segundos virus detectados en cuadros de bronquiolitis y sibilancias, luego del VSR. Los RVH se identificaron principalmente en niños menores de 2 años. Se destaca que el 36% de nuestros pacientes con diagnóstico de RVH presentó cuadro de IRA baja. En un estudio reciente, Fairchok et al., estudiaron una población similar de 119 niños menores de 30 meses con IRA ambulatorios, que concurrían al mismo jardín maternal, y detectaron RVH como los virus más frecuentes (35%) y VSR como el más asociado a sibilancias¹⁴.

La frecuencia obtenida para MPVh en nuestra población fue del 7%. En general, el rango de su detección varía del 3% al 14%^{14, 15}. En la primera descripción de MPVh en Buenos Aires, realizada en nuestro laboratorio en 2001, se documentó por RT-PCR una frecuencia del 1%, en 100 niños menores de 5 años, negativos para los virus clásicos¹⁶.

Existen escasas publicaciones sobre el diagnóstico de virus respiratorios en niños ambulatorios y que no formen parte de una comunidad cerrada. En nuestro estudio

demostramos que el 39% de los niños atendidos en la consulta externa con IRA tuvo diagnóstico virológico por detección directa de antígenos por IF. Este porcentaje aumentó al 61% cuando se incorporó el estudio de RVH por RT-PCR en tiempo real.

En nuestro estudio observamos que en el 39% de los niños no se ha logrado un diagnóstico viral. Algunos de los virus que podrían causar IRA, y que no han sido investigados en el presente trabajo, son los bocavirus y los coronavirus. Datos preliminares de nuestro laboratorio, mostraron que la frecuencia de bocavirus por PCR fue del 17% en otra población de niños internados en CEMIC con IRA¹⁷. En un estudio aún más reciente de nuestro grupo de trabajo en niños ambulatorios, donde se utilizaron PCR múltiples en un formato de *micro-arrays* para detección de virus respiratorios, se obtuvo una frecuencia de 19% de bocavirus y 8% de coronavirus¹⁸. Sin embargo, el significado clínico de la presencia de los bocavirus en cuadros de IRA, continúa aún en estudio.

En el primer estudio realizado en nuestro medio por Cerqueiro et al., sobre la evaluación de factores de riesgo predisponentes para IRA en niños menores de 5 años, en 1990, se describió que la presencia de un familiar fumador fue un factor de riesgo asociado a IRA baja, sólo en niños ambulatorios (*OR*: 1.5)¹⁹. Coincidentemente, en nuestro estudio, el tabaquismo pasivo también se encontró asociado a la detección de RVH en niños con IRA. Los niños con IRA expuestos a tabaquismo pasivo (28%) presentaron casi 3 veces más posibilidad de estar infectados con RVH comparado a niños con IRA y RVH negativos (12%).

En conclusión, la incorporación del diagnóstico de RVH con métodos moleculares como la RT-PCR en tiempo real, contribuyó a aumentar el diagnóstico virológico en niños con IRA. El estudio de la frecuencia de los RVH en las diferentes poblaciones permitirá ampliar el conocimiento de la epidemiología y el impacto clínico de estos virus en las infecciones respiratorias.

Agradecimientos: A los médicos residentes y enfermeras por el reclutamiento y la toma de muestras; a la Lic. Beatriz Ebekian por la colaboración técnica, a la Sra. Mónica Monteavaro por el ingreso de muestras, al Dr. Fernando Poletta por la asistencia estadística.

Este trabajo fue financiado con el subsidio PICT 2006-650 (2008-2011), otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Científica (ANPCYT), cuya investigadora principal es la Dra. Marcela Echavarría.

Conflictos de interés: ninguno a declarar.

Bibliografía

- Pitkaranta A, Virolainen A, Jero J, Arruda E, Hayden FG. Detection of rhinovirus, respiratory syncytial virus, and coronavirus infections in acute otitis media by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Pediatrics* 1998; 102: 291-5.
- Pitkaranta A, Arruda E, Malmberg H, Hayden FG. Detection of rhinovirus in sinus brushings of patients with acute community-acquired sinusitis by reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol* 1997; 5: 1791-3.
- Palmenberg AC, Rathe JA, Liggett SB. Analysis of the complete genome sequences of human rhinovirus. *J Allergy Clin Immunol* 2010; 125: 1190-9.
- McErlean P, Shackelton L, Andrews E, et al. Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, human rhinovirus C (RVH C). *Plos One* 2008; 3, e1847.
- Juvé T, Mertsola J, Waris M, et al. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr Infect Dis J* 2000; 19: 293-8.
- Johnston SL, Pattermore PK, Sanderson G, et al. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 years old children. *BMJ* 1995; 310: 1225-9.
- Smyth AR, Smyth RL, Tong CY, Hart CA, Heaf DP. Effect of respiratory virus infections including rhinovirus on clinical status in cystic fibrosis. *Arch Dis Child* 1995; 73: 117-20.
- Nicholson KG, Kent J, Ireland DC. Respiratory viruses and exacerbations of asthma in adults. *BMJ* 1993; 307: 982-6.
- Lemanske RF Jr, Jackson DJ, Gangnon RE, et al. Rhinovirus illnesses during infancy predict subsequent childhood wheezing. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116: 571-7.
- Jackson DJ, Gangnon RE, Evans MD, et al. Wheezing rhinovirus illnesses in early life predict asthma development in high-risk children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 667-72.
- Lu X, Holloway B, Dare RK, et al. Real-Time reverse transcription-PCR assay for comprehensive detection of human rhinoviruses. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 533-9.
- Marcone DN, Veyer D, Videla C, et al. Comparison of four different RT-PCR for rhinovirus detection. Poster. III Simposio Internacional de Virología Clínica. 2010. Buenos Aires, Argentina.
- Weissenbacher M, Carballal G, Avila M, et al. Etiologic and clinical evaluation of acute respiratory tract infections in young argentinian children: an overview. *Clin Infect Dis*. 1990. 12: 889-98.
- Fairchok MP, Martin ET, Chambers S, et al. Epidemiology of viral respiratory tract infections in a prospective cohort of infants and toddlers attending daycare. *J Clin Virol* 2010; 49: 16-20.
- Manoha C, Espinosa S, Aho S, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV, RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 2007; 38: 221-226.
- Galiano M, Videla C, Puch SS, Martinez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of human metapneumovirus in children in Argentina. *J Med Virol* 2004; 72: 299-303.
- Cartamil S, Suarez A, Pascutto M, et al. Estudio de dos nuevos virus respiratorios en población pediátrica con infección respiratoria aguda: el Metapneumovirus (hMPV) y el Bocavirus (hBoV). *Revista Argentina de Microbiología* (Resumen de posters) 2008; 40: 78.
- Echavarría M, Marcone DN, Ricarte C, et al. Detection of 21 respiratory pathogens simultaneously using a commercial multiplex PCR device. Poster. XXVI Clinical Virology Symposium of PASCV. 2011. Daytona, Florida, USA.
- Cerqueiro MC, Murthagh P, Halac A, Avila M, Weissenbacher M. Epidemiology of acute respiratory tract infections in children. *Reviews Infect Dis* 1990; 12: 1021-7.