

# Infecciones respiratorias por metapneumovirus en lactantes hospitalizados

M.<sup>a</sup>L. García García<sup>a</sup>, C. Calvo Rey<sup>a</sup>, F. Martín del Valle<sup>a</sup>, M.R. López Huertas<sup>b</sup>, I. Casas Flecha<sup>b</sup>, R. Díaz-Delgado<sup>a</sup> y P. Pérez-Breña<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa. Leganés. Madrid. España. <sup>b</sup>Servicio de Virología. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid. España.

## Antecedentes

El metapneumovirus humano es un virus de reciente descripción al que se atribuyen infecciones respiratorias que afectan fundamentalmente a la población infantil.

## Objetivos

Conocer la incidencia de infecciones por metapneumovirus en lactantes hospitalizados, así como sus características clínicas y la posible presencia de coinfecciones con otros agentes virales.

## Pacientes y métodos

Estudio prospectivo realizado de septiembre a junio de 2003 en todos los niños menores de 2 años ingresados en la Unidad de Lactantes del Hospital Severo Ochoa de Leganés (Madrid), por infección respiratoria. La detección de agentes virales se realizó mediante recogida de aspirado nasofaríngeo y realización de inmunofluorescencia directa y/o reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR). Descripción de las características clínicas y epidemiológicas de los procesos respiratorios de los pacientes con detección positiva para metapneumovirus humano.

## Resultados

Ingresaron 200 lactantes con patología respiratoria durante el período mencionado, de los cuales en 18 se detectó infección por metapneumovirus humano (9% de los pacientes). El metapneumovirus humano supuso un 13,8% de los aislamientos virales positivos. El 100% de estos niños ingresaron en marzo-abril. La edad media fue de  $6,7 \pm 6,1$  meses. El 38,8% desarrolló una bronquiolitis y en el 55,5% se objetivó un episodio recurrente de sibilancias. El 55,5% de los niños precisó oxigenoterapia durante el ingreso. Se encontraron coinfecciones con otros agentes virales en el 33,3% de estos pacientes.

## Conclusiones

El metapneumovirus humano es un agente viral muy frecuente en los lactantes afectados de enfermedad respiratoria, causando fundamentalmente bronquiolitis y episodios recurrentes de sibilancias. Es más frecuente en primavera y tiene una alta tendencia a la coinfección con otros virus.

## Palabras clave:

*Infecciones respiratorias. Lactantes. Metapneumovirus humano.*

## RESPIRATORY INFECTIONS DUE TO METAPNEUMOVIRUS IN HOSPITALIZED INFANTS

### Background

Human metapneumovirus (hPMV) is a recently identified virus that is recognized as a cause of respiratory tract illness in the pediatric population.

### Objectives

To determine the incidence of respiratory tract infections caused by hPMV in hospitalized infants and to describe the clinical characteristics and possible presence of coinfection with other viral agents.

### Patients and methods

We performed a prospective study from September to June 2003 in all children aged less than 24 months who were admitted to the Severo Ochoa Hospital (Leganés, Madrid) with a respiratory tract infection. Virological diagnosis was made with a direct immunofluorescent assay and/or reverse transcriptase-polymerase chain reaction on specimens obtained from nasopharyngeal washing. Demographic and clinical data from patients with an hPMV respiratory tract infection were analyzed.

**Correspondencia:** Dra. M.<sup>a</sup>L. García García.  
Servicio de Pediatría. Hospital Severo Ochoa.  
Avda. Orellana, s/n. 28911 Leganés. Madrid. España.  
Correo electrónico: marialuzgarcia@terra.es

Recibido en mayo de 2004.

Aceptado para su publicación en mayo de 2004.

## Results

During the study period, 200 infants were admitted with a respiratory tract infection, of which 18 (9%) had an hPMV infection. HPMV was the viral agent isolated in 13.8% of positive nasopharyngeal washings. All patients were admitted between March and April. The mean age was  $6.7 \pm 6.1$  months. The most common diagnoses were recurrent wheezing (55.5%) and bronchiolitis (38.8%). Oxygen therapy was required by 55.5% of infants during hospitalization. Coinfection with other respiratory viruses was confirmed in 33.3% of the patients.

## Conclusions

Human metapneumovirus is a major cause of respiratory tract illness in hospitalized infants. This virus causes mainly bronchiolitis and recurrent wheezing and is more frequent in spring. Coinfection with other respiratory viruses is frequent.

## Key words:

*Respiratory tract infection. Infants. Human metapneumovirus.*

## INTRODUCCIÓN

El metapneumovirus humano es un virus de reciente descripción, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae* (al igual que el virus respiratorio sincitial [VRS]), género *Metapneumovirus*. Fue descrito por primera vez en Holanda por Van der Hoogen<sup>1</sup>, en niños con infección respiratoria, si bien se considera que este virus circula en el hombre desde hace más de 40 años. Posiblemente la dificultad para aislar este tipo de virus en cultivos celulares ha retrasado su identificación como patógeno frecuente de las infecciones respiratorias infantiles. Ha sido desde la introducción de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método habitual para el diagnóstico de estas infecciones en el aspirado nasofaríngeo, cuando se han empezado a detectar infecciones por el metapneumovirus humano, tanto en adultos como en niños de todo el mundo<sup>2-10</sup>.

El metapneumovirus humano es un virus ARN de características muy similares al VRS, con el que comparte no sólo similitudes morfológicas, sino también parecida capacidad infectiva y un espectro de patología superponible. Al metapneumovirus humano se le atribuyen infecciones respiratorias de vías altas y bajas, desde cuadros catarrales a neumonías, suponiendo la bronquiolitis la principal manifestación clínica de la infección primaria<sup>11</sup>. También parece tener un papel importante en los episodios recurrentes de sibilancias en los primeros años de la vida.

Desde el punto de vista epidemiológico se considera que la infección por metapneumovirus humano ocurre en los meses de invierno con un patrón similar a la infección por VRS, pero hay todavía pocos trabajos prospectivos que estudien su comportamiento a lo largo de todo el año.

En este estudio se describen las infecciones respiratorias causadas por metapneumovirus humano durante la temporada 2002-2003, recogidas de forma prospectiva, en los lactantes ingresados en el Hospital Severo Ochoa de Leganés (Madrid), sus características clínicas y epidemiológicas, así como la presencia de coinfecciones con otros agentes virales.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio prospectivo para detectar las infecciones por metapneumovirus humano en todos los lactantes menores de 2 años hospitalizados por enfermedad respiratoria en el Hospital Severo Ochoa de Leganés (Madrid), durante los meses de septiembre de 2002 a junio de 2003. Para ello se tomaron muestras de aspirado nasofaríngeo al ingreso de los pacientes y se recogieron las características clínicas, epidemiológicas y analíticas que se detallan a continuación.

## Variables analizadas

En todos los pacientes se recogió la edad en el momento del ingreso, la fecha de ingreso, la presencia de fiebre igual o superior a 38 °C axilar durante el proceso, la necesidad de oxigenoterapia (cuando la saturación de hemoglobina es < 95%), la presencia de infiltrados radiológicos, la duración del ingreso, la administración de antibioticoterapia, los antecedentes de prematuridad o de enfermedad broncopulmonar subyacente, el número absoluto de leucocitos al ingreso, la proteína C reactiva, el hemocultivo cuando se consideró necesario, así como el diagnóstico final.

Las variables cuantitativas se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE) y las variables cualitativas como proporciones.

Los diagnósticos finales se definieron como:

1. Bronquiolitis: primer episodio de disnea espiratoria de comienzo agudo, con signos previos de infección respiratoria viral, asociado o no a distrés respiratorio o neumonía (Criterios de McConnochie<sup>12</sup>).
2. Episodio recurrente de sibilancias.
3. Neumonía: condensación pulmonar sin broncospasmo asociado.
4. Síndrome febril en el que se descarta otra etiología infecciosa.

## Estudio virológico

Las secreciones respiratorias obtenidas mediante aspirado nasofaríngeo, se remitieron al Servicio de Virología del Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III de Madrid, donde se procesaron en las 24 h siguientes a su recogida. Se realizó inmunofluorescencia y PCR para VRS-A y B, adenovirus, influenza A y B, y parainfluenza 1, 2, 3 y 4 en todas las muestras de aspirado nasofaríngeo.

La determinación de la presencia del metapneumovirus humano se llevó a cabo mediante dos ensayos independientes de reacción en cadena de la polimerasa-transcripción inversa (RT-PCR) en dos genes diferentes, el gen correspondiente a la proteína matriz (M) y el de la polimerasa viral (L). Los oligonucleótidos iniciadores se diseñaron utilizando todas las secuencias de metapneumovirus humano disponibles en las bases de datos públicas.

Para el ensayo del gen de M se ha utilizado una PCR semianidada. La extracción del ácido nucleico se ha llevado a cabo utilizando el método de extracción con isotiocianato de guanidinio<sup>13</sup>. La primera parte del ensayo o RT-PCR, se ha efectuado utilizando un kit comercial (Qiagen One Step Rt-PCR Kit, Qiagen, California, EEUU). La mezcla de reacción se ha sometido a una primera incubación para sintetizar el ADN complementario (ADNc), seguida de 45 ciclos complejos a distintas temperaturas para realizar la amplificación del ADN. En la segunda reacción, semianidada, los productos de la primera reacción se han sometido a 35 ciclos de amplificación. Los productos finales de la amplificación se han analizado por electroforesis en un gel de agarosa, que se sometía a tinción con bromuro de etidio, obteniéndose una banda de 687 pb. Para la amplificación del fragmento del gen de L se han utilizado los oligonucleótidos iniciadores descritos por Van den Hoogen et al<sup>14</sup>. De ellos, el iniciador inverso se marcó con biotina en el extremo 5'. Para la RT-PCR se utilizó también el Kit de Qiagen One Step RT-PCR. El ADN amplificado y marcado resultante se ha sometido a una hibridación en membrana con una sonda específica, tras la cual la membrana se lavaba y finalmente se trataba con un conjugado de estraptavidina-peroxidasa (Roche, Indiana EE.UU.). Los productos resultantes se han detectado por quimioluminiscencia con reactivos de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Gran Bretaña).

Para asegurar la especificidad de los resultados los fragmentos amplificados de las muestras clínicas que se mostraron positivas al virus, se secuenciaron en un secuenciador automático (ABI prism 3700, de Applied Biosystems). Las secuencias se alinearon y compararon (mediante el programa Macaw versión 2.0.5) con las publicadas en las bases de datos.

## RESULTADOS

Ingresaron en la Unidad de Lactantes del Hospital Severo Ochoa un total de 200 niños entre septiembre de 2002 y junio de 2003 con enfermedad respiratoria. Se aisló metapneumovirus en 18 niños (9% del total de infecciones respiratorias). En la tabla 1 se recoge la distribución de todos los virus aislados en el aspirado nasofaríngeo de estos niños.

Los 18 niños con infección por metapneumovirus ingresaron en su totalidad en los meses de marzo y abril. La edad media fue  $6,7 \pm 6,1$  meses, y el 72% de ellos (13 ca-

sos) fueron varones. Presentaron fiebre igual o superior a 38 °C axilar el 61% de los niños (11 casos) y necesitaron oxigenoterapia por saturación de hemoglobina inferior al 95% el 55,5% de los pacientes (10 casos). En 3 pacientes se encontró infiltrado en la radiografía de tórax. Se administró tratamiento antibiótico a 4 pacientes, siendo tres de ellos los que tenían infiltrado radiológico. El hemocultivo fue negativo en todos ellos. La leucocitosis media fue  $11.632 \pm 3.849/\mu\text{l}$ . El diagnóstico final fue bronquiolitis en 7 casos (38,8%), episodio recurrente de sibilancias en 10 casos (55,5%) y síndrome febril en un paciente. Todos los niños con infiltrado radiológico tenían broncospasmo asociado. La duración del ingreso fue de  $4,4 \pm 1,6$  días. Tres de los niños tenían antecedentes patológicos, dos de ellos eran pretérmino, uno presentaba displasia broncopulmonar y una niña padecía síndrome de Down. Esta paciente presentó una insuficiencia respiratoria grave con infiltrados bilaterales y derrame pleural, precisó ingreso en cuidados intensivos y ventilación mecánica. Ningún paciente falleció. En la tabla 2 se resumen los datos clínicos más relevantes.

Se detectaron coinfecciones con otros virus en el 33,3% de los niños infectados por el metapneumovirus humano (tabla 3), siendo el adenovirus el agente encontrado en el 66,6% de los casos.

TABLA 1. Aislamientos virales en los lactantes con infección respiratoria

Virus	Nº de pacientes (%)
VRS	73 (36,5)
Adenovirus	28 (14)
Metapneumovirus	18 (9)
Influenza	11 (5,5)
Negativos	70 (35)
<b>Total</b>	<b>200</b>

VRS: virus respiratorio sincitial.

TABLA 2. Características clínicas de los pacientes con infección por metapneumovirus

	Nº de pacientes (%)
Fiebre > 38 °C	11/18 (61)
Hipoxia	10/18 (55,5)
Infiltrado pulmonar en radiografía	3/18 (15,7)
Bronquiolitis	7/18 (38,8)
Episodio de sibilancias recurrente	10/18 (55,5)
Coinfección por otro virus	6/18 (33,3)
Patología subyacente	3/18 (15,7)
Ingreso en UCIP	1/18
Curación	18/18 (100)

UCIP: unidad de cuidados intensivos pediátricos.

TABLA 3. **Coinfecciones entre metapneumovirus y otros virus**

Virus	Nº de pacientes
Metapneumovirus + adenovirus	4
Metapneumovirus + Influenza	1
Metapneumovirus + VRS	1
<b>Total</b>	<b>6/18 (33,3%)</b>

VRS: virus respiratorio sincitial.

## DISCUSIÓN

Este trabajo describe la serie más amplia de infecciones por metapneumovirus publicada hasta ahora en España y pone de manifiesto la importancia del metapneumovirus humano en las infecciones respiratorias de los lactantes.

En nuestro estudio prospectivo a lo largo de toda una temporada epidemiológica, las infecciones por metapneumovirus humano han supuesto el 9% de todas las infecciones respiratorias que han precisado ingreso, sólo superadas por VRS y adenovirus y constituyen el 13,8% del total de aislamientos virales. En las escasas series pediátricas previamente publicadas los autores estiman una frecuencia entre el 4-25% de las infecciones respiratorias en pacientes hospitalizados<sup>11,15,16</sup>, lo que demuestra que nos encontramos ante uno de los agentes más importantes en las enfermedades respiratorias infantiles.

Destacan, por su escasa frecuencia, la serie española publicada por Vicente et al<sup>15</sup> y la francesa de Freymouth et al<sup>11</sup>, que describen un 4,1 y 6,6% de infecciones respiratorias causadas por metapneumovirus humano, frente a nuestra serie (9%). En cambio, la serie finlandesa publicada por Jartti et al<sup>17</sup> obtiene también un 9% y la italiana<sup>16</sup> llega hasta el 25%. Estas diferencias se pueden explicar por el distinto período de inclusión de los pacientes en cada caso. En las dos primeras series, los pacientes fueron seleccionados de noviembre a febrero, posiblemente coincidiendo con la epidemia de VRS, mientras que la italiana recoge los pacientes de enero a mayo y nosotros de septiembre a junio. En el 100% de nuestros casos el aislamiento se hizo en marzo-abril, por lo que las series española y francesa podrían haber perdido estos casos si realmente el metapneumovirus humano es más frecuente en primavera como apuntan otros autores en Japón<sup>18</sup> y Hong-Kong<sup>19,20</sup>. Además, en algunos trabajos<sup>11</sup> se estudian sólo las muestras de aspirado nasofaríngeo previamente negativas para otros virus, por lo que no se detectan las posibles coinfecciones virales con metapneumovirus humano, disminuyendo así la incidencia real de este agente.

El diagnóstico virológico se llevó a cabo mediante la amplificación de fragmentos correspondientes a dos genes virales, utilizando dos tipos de ensayos diferentes

basados en RT-PCR. Se seleccionaron dos genes correspondientes a dos proteínas que necesitan un alto grado de conservación para que su función en el virus no se vea alterada. El primero corresponde a una proteína estructural (proteína M) que debe interconectar con otros componentes del virión para mantener la envuelta viral, y el segundo a una proteína enzimática (polimerasa viral o proteína L), cuya función resulta totalmente imprescindible para la multiplicación del virus. La elección de estas proteínas, cuyas secuencias admiten pocas mutaciones, permite esperar poder identificar cualquier virus hMNV, por lo que la sensibilidad debe ser elevada. Por otra parte, el hecho de llevar a cabo los dos ensayos en genes diferentes, asegura también la especificidad de la identificación del virus. La minuciosidad de la técnica virológica empleada en nuestra serie, contribuye sin duda al alto porcentaje de virus aislados en nuestros pacientes.

En cuanto a las características clínicas de las infecciones por metapneumovirus humano, nuestros datos coinciden con los publicados previamente, en el sentido de que ocasionan fundamentalmente bronquiolitis (38,8%) y episodios recurrentes de sibilancias (55,5%), con una sintomatología que parece indistinguible a la del VRS. Aunque en algunos trabajos<sup>11</sup> el porcentaje de bronquiolitis parece mayor, llegando hasta un 62%, el escaso número de pacientes seleccionados en la mayoría de ellos, no permite extraer conclusiones ciertas al respecto. Los pacientes se incluyen además con distintos criterios, agrupando niños de distintas edades e incluso adultos. Peiris et al<sup>20</sup> en 32 niños en Hong Kong, encuentra un 10% de bronquiolitis y un 23% de exacerbaciones asmáticas causadas por metapneumovirus humano, pero incluye pacientes de hasta 6 años. Respecto a aspectos más concretos como la fiebre, también los datos son variados y oscilan entre un 100% de los niños para Peris et al<sup>20</sup>, hasta ser infrecuente en adultos<sup>21</sup>.

Tampoco son comparables los datos de hipoxia, por las mismas razones. En nuestra serie se apreció hipoxia en el 55%, mientras que otros autores la encuentran en el 31% de sus casos, pero de nuevo incluyen niños mayores<sup>22</sup>. Aunque muchos trabajos notifican la presencia de neumonías entre los pacientes afectados de infecciones por metapneumovirus humano o de infiltrados radiológicos acompañando a cuadros de broncospasmo, es imposible obtener datos fiables de frecuencia de éstos. Si tomamos todos los datos en conjunto, tenemos que afirmar que en nuestra serie la infección por metapneumovirus es relativamente grave en lactantes, como pone de manifiesto el elevado porcentaje de hipoxia, e incluso la necesidad de ingreso en cuidados intensivos en una paciente. Estos datos contrastan con los publicados por Vicente et al<sup>15</sup> en Guipúzcoa, que considera que es una infección poco frecuente y de menor gravedad que la producida por el VRS. Entre los dos trabajos, como ya se ha mencionado existen diferencias que pueden justificar esta opinión,

como es la diferente época de recogida de datos y el hecho de que Vicente et al<sup>15</sup> incluya pacientes que no necesitaron ingreso, partiendo nuestro trabajo de niños ya ingresados.

En una serie previa de nuestro grupo<sup>23</sup>, sobre 617 lactantes con infecciones respiratorias virales, el 63% fueron bronquiolitis y el 24,6% episodios recurrentes de sibilancias, pero estos porcentajes cambiaron al 79,8% de bronquiolitis y 16% episodios de sibilancias recurrentes si el agente implicado era el VRS. Los niños con infección por VRS tuvieron una edad media de  $7,1 \pm 5,3$  meses, muy parecida a los pacientes con infección por metapneumovirus humano, una frecuencia de infiltrados radiológicos de un 37% y una duración del ingreso de  $6,6 \pm 3,5$  días, ambos superiores a los presentados por los niños infectados por metapneumovirus humano.

Respecto a la población diana de las infecciones por metapneumovirus humano, parece que afecta claramente a niños pequeños, en los que la infección reviste mayor gravedad, si bien se detecta también en adultos, donde a menudo es leve o asintomática<sup>21</sup>. Estudios de seroprevalencia han demostrado que a los 5 años el 100% de los niños han pasado una infección por metapneumovirus humano<sup>1,24</sup>. Muchos autores piensan que la infección es especialmente frecuente en pacientes inmunodeprimidos y en prematuros<sup>22</sup>. En nuestra serie, el 15,7% de los pacientes tenían estos factores de riesgo: dos recién nacidos pretérmino y una niña síndrome de Down, que precisó ventilación mecánica.

Otro aspecto que cabe destacar de nuestros pacientes es el elevado porcentaje de coinfecciones virales encontradas (33,3%). Aunque ya se ha referido en la literatura médica la presencia de coinfecciones del metapneumovirus humano con otros virus<sup>5,13-18,23</sup>, la frecuencia de las mismas es muy variable, desde anecdótica hasta un 12,5% para Chan<sup>19</sup>, y un 23,7% para los canadienses<sup>5</sup>. Dos circunstancias hacen que se infraestime la existencia de las coinfecciones en otros trabajos; en primer lugar, como ya se ha mencionado, la recogida de muestras puede no corresponder con la máxima incidencia estacional de metapneumovirus humano y, por otro lado, y más importante, en muchos trabajos sólo se realiza la detección de metapneumovirus humano en las muestras de aspirado nasofaríngeo negativas para otros virus. Los agentes coinfectantes son muy variados, siendo los más referidos influenza y adenovirus, seguidos con menor frecuencia de VRS, parainfluenza y citomegalovirus. Lo que sí parece claro es la gran tendencia del metapneumovirus humano a coinfectar con otros agentes. Se desconoce hasta el momento si la infección doble con otros virus puede contribuir a aumentar la gravedad del cuadro clínico.

De los datos expuestos hasta ahora se desprende que, aunque según los estudios de seroprevalencia las infecciones por metapneumovirus humano son muy frecuen-

tes en la población y suelen cursar con manifestaciones leves, el metapneumovirus humano puede producir también infecciones moderadas y graves, sobre todo en lactantes y niños pequeños, como muestra nuestra serie.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. No se han obtenido muestras de aspirado nasofaríngeo en niños sin enfermedad respiratoria, por lo que no se ha podido estudiar el papel del virus metapneumovirus humano en controles sanos. Tampoco se han obtenido muestras en niños no ingresados, con procesos respiratorios leves, ya que el objetivo del estudio era conocer el papel de metapneumovirus humano en las infecciones respiratorias que precisan hospitalización. Se precisan amplios estudios prospectivos que identifiquen claramente las características epidemiológicas y clínicas de las infecciones por metapneumovirus humano, su verdadera importancia, su gravedad y su similitud con las infecciones por VRS. Asimismo, sería interesante estudiar el papel de las infecciones por metapneumovirus humano en el desarrollo posterior de asma en la infancia.

Parece fundamental, como ya reconocen algunos autores<sup>27</sup>, incorporar la detección del metapneumovirus humano en el abordaje diagnóstico de los lactantes y niños con infección respiratoria. Si bien en la actualidad no se dispone de una herramienta terapéutica específica, sí parece al menos evidente la utilidad de identificar el agente etiológico de esta patología, para evitar tratamientos antibióticos innecesarios en el caso de aparición de infiltrados radiológicos y para conocer a largo plazo la evolución de estos niños.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RAM, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med* 2001;7:719-24.
2. Nissen MD, Siebert DJ, Mackay IM, Sloots TP, Withers SJ. Evidence of human metapneumovirus in Australian children. *Med J Aust* 2002;176-88.
3. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785-90.
4. Jartti T, Van den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus ADME, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393-4.
5. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus: A new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330-4.
6. Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:897-901.
7. Stockton J, Stephenson I, Fleming D. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:897-901.

8. Rawlinson W, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003;187:11314-8.
9. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagn B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003;9:372-5.
10. Peret T, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus AD, et al. Characterization of human metapneumovirus isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;185:11:1660-3.
11. Freymouh F, Vabret A, Legrand L, Etteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J, et al. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:92-4.
12. McConnochie K. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11-3.
13. Casas I, Powell L, Klapper PE, Cleator GM. New method for the extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995;53:25-36.
14. Van Den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, Groot Rd R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis* 2003;188:1571-7.
15. Vicente D, Cilla G, Montes M, Pérez-Trallero E. Human metapneumovirus and community-acquired respiratory illness in children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:602-3.
16. Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987-91.
17. Jartti T, Van der Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393-4.
18. Takao S, Shimozone H, Kashiwa H, Shimazu Y, Fukuda S, Kuwayama M, et al. Clinical study of pediatric cases of acute respiratory disease associated with human metapneumovirus in Japan. *Jpn J Infect Dis* 2003;56:127-9.
19. Chan PK. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1058-63.
20. Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;9:628-33.
21. Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785-90.
22. Esper F BD, Weibel C, Martinello RA, Khan JS. Human metapneumovirus infection in the United States: Clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;187:1407-10.
23. García García ML, Ordoñas Gabin M, Calvo Rey C, González Álvarez MI, Aguilar Ruiz J, Arregui Sierra A, et al. Infecciones virales de vías respiratorias inferiores en lactantes hospitalizados: etiología, características clínicas y factores de riesgo. *An Esp Pediatr* 2001;55:101-7.
24. Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* 2003;281-3.
25. Boivin G, De Serres G, Cote S, Ruel L, Moisan D, Cote S, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:634-40.
26. Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043-5.
27. Ulloa-Gutiérrez R. Metapneumovirus humano: un nuevo agente en el diagnóstico diferencial de la infección respiratoria. *An Pediatr (Barc)* 2003;59:129-30.