

Diagnóstico etiológico de las infecciones respiratorias agudas de origen vírico en un hospital pediátrico de Gran Canaria

Fernando Artiles-Campelo^a, María del Carmen Pérez-González^a, Araceli Caballero-Hidalgo^b y María J. Pena-López^a

^aServicio de Microbiología. ^bUnidad de Investigación. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. España.

OBJETIVO. Las infecciones respiratorias agudas (IRA) de origen vírico son una causa frecuente de consulta y hospitalización pediátrica. El objetivo de este estudio fue conocer la etiología de dichas infecciones en la isla de Gran Canaria.

MÉTODOS. Durante 3 años (de mayo de 2002 a mayo de 2005) se recogieron 1957 lavados nasofaringeos de 1.729 niños atendidos en Urgencias con síntomas compatibles con IRA. En todas las muestras se realizó una técnica rápida de detección de antígeno de virus respiratorio sincitial (VRS) y, en las que se obtuvo resultado negativo, inmunofluorescencia (IF) y cultivo celular (CC).

RESULTADOS. La mediana de edad fue de 2 meses (intervalo: 0,03-119). Se identificó el agente causal del cuadro respiratorio en 1.032 niños (59,7%). El VRS se detectó en 769 niños (74,5%). Los demás virus identificados, por orden de frecuencia, fueron: virus *parainfluenza*, rinovirus, adenovirus, virus de la gripe, enterovirus y coronavirus. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar la edad y el tipo de virus detectado: los adenovirus fueron responsables de cuadros en niños de mayor edad (mediana: 6 meses; intervalo: 1-74). Hubo 6 casos de infección mixta. La sensibilidad de la IF en relación con el CC fue del 55,8%, y la especificidad del 99,2%.

CONCLUSIONES. Los virus respiratorios son responsables de un alto número de casos de IRA, principalmente el VRS. Su identificación es determinante en el tratamiento clínico de los pacientes y en el empleo adecuado de antibacterianos y antivirales.

Palabras clave: Infección respiratoria aguda. Virus respiratorios. Diagnóstico etiológico. Pediatría. Gran Canaria.

Etiology of acute viral respiratory tract infections in children from Gran Canaria, the Canary Islands (Spain)

OBJECTIVE. Acute respiratory tract infections (ARTI) of viral origin are a frequent cause of pediatric consultations and hospital admissions. The aim of this study was to investigate the etiology of these infections in Gran Canaria, the Canary Islands, (Spain).

METHODS. From May 2002 through May 2005, 1957 nasopharyngeal washings were collected from 1729 children presenting with ARTI to the Pediatric Emergency Unit. A rapid antigen detection method was performed in every sample to identify respiratory syncytial virus (RSV). An immunofluorescence assay (IFA) and cell culture (CC) was used in RSV-negative samples.

RESULTS. Median age was 2 months (range, 0.03-119). A viral agent was identified in 1032 children (59.7%). RSV was detected in 769 children (74.5%). Other viruses identified, in order of frequency, were parainfluenza viruses, rhinoviruses, adenoviruses, influenza viruses, enteroviruses, and coronaviruses. Statistical differences were found between age and the type of virus detected: Adenoviruses caused respiratory infections in older children (median age: 6 months; range: 1-74). There were 6 mixed infections. Sensitivity of IFA as compared to CC was 55.8%, and specificity was 99.2%.

CONCLUSIONS. Respiratory viruses are responsible for a large number of ARTI cases in children from Gran Canaria, RSV being the major cause. Viral identification is determinant for managing these patients and making a proper use of antibacterial and antiviral drugs.

Key words: Acute respiratory tract infection. Respiratory viruses. Etiologic diagnosis. Pediatrics. Gran Canaria.

Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) producidas por virus son una de las causas más frecuentes de consulta y hospitalización pediátrica, debido a su morbimortalidad¹. Se estima que cada niño experimenta de 2 a 7 casos de IRA cada año². Existe una gran diversidad de cuadros clínicos asociados a estas infecciones, con distintos niveles de gravedad, desde resfriado común hasta procesos con afectación de vías respiratorias bajas, como la bronquiolitis.

Correspondencia: Dr. F. Artiles-Campelo.
Servicio de Microbiología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.
Barranco de la Ballena, s/n. 35010 Las Palmas de Gran Canaria. España.
Correo electrónico: fernandoartiles@canariatelecom.com

Manuscrito recibido el 23-1-2006; aceptado el 1-6-2006.

tis y la neumonía, que pueden requerir en algunos casos la ventilación mecánica del paciente. Los agentes etiológicos relacionados con dichos cuadros son el virus respiratorio sincitial (VRS), los virus *parainfluenza* (VPI), los virus de la gripe, los adenovirus, los rinovirus, los enterovirus, los coronavirus y los metaneumovirus humanos.

La presentación clínica suele ser similar en todos los virus implicados, pero puede variar ligeramente en función del agente etiológico. El VRS es la principal causa de bronquiolitis, que se presenta todos los años de manera epidémica en los meses de invierno y comienzo de la primavera³. Los VPI son los siguientes agentes detectados en frecuencia como causa de IRA; se presentan a lo largo de todo el año, con picos en otoño y primavera^{4,5}. Los virus de la gripe tienen un patrón estacional similar al VRS. Los adenovirus producen infecciones en cualquier época del año, debido a la eliminación fecal en niños sanos, y afectan en mayor medida a niños mayores de 6 meses^{6,7}. La frecuencia del resto de los virus (rinovirus, coronavirus, enterovirus y el recientemente descrito metaneumovirus humano⁸) en patología respiratoria no está adecuadamente descrita debido a las limitaciones para su detección e identificación.

El diagnóstico virológico convencional se basa en técnicas de detección antigenética y en el cultivo celular, aunque en los últimos años se están desarrollando métodos de amplificación genética (reacción en cadena de la polimerasa [PCR] convencional, PCR en tiempo real) que complementan dicho diagnóstico⁹⁻¹².

El objetivo de nuestro estudio fue conocer la etiología viral de las IRA que presentaron los niños atendidos en el servicio de urgencias de un hospital pediátrico. Además, se comparó la rentabilidad diagnóstica de la detección de antígeno por inmunofluorescencia y el cultivo celular para los virus de la gripe, los VPI y los adenovirus.

Material y métodos

Pacientes

Se incluyeron en el estudio todos los niños menores de 14 años atendidos en el Hospital Universitario Materno Infantil de Gran Canaria, que cubre una población de 126.806 niños, por sospecha clínica de IRA desde mayo de 2002 a mayo de 2005.

Muestras

Se recogieron 1.957 lavados nasofaríngeos pertenecientes a 1.729 niños. Se analizaron de manera retrospectiva las características epidemiológicas (sexo, edad, fecha del proceso) y la orientación diagnóstica en el momento de la presentación del cuadro clínico, así como la necesidad de ingreso. Se recogieron los datos de las pruebas de diagnóstico virológico y se analizaron los resultados.

Métodos diagnósticos

a) *Detección antigenética*. Se realizó un cribado inicial del VRS por una técnica rápida de detección de antígeno por enzimoinmunoanálisis (EIA) (*Directigen RSV*, *Becton Dickinson*, *Maryland, EE.UU.*) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En las muestras en que se obtuvo resultado negativo o no interpretable se realizó la detección de antígenos de VRS, adenovirus, virus de la gripe A/B y VPI (1, 2 y 3) mediante una técnica de inmunofluorescencia (IF) indirecta con anticuerpos monoclonales específicos (*Viral Respiratory Panel 1, Screening and Identification IFA Kit*, *Light Diagnostics*, *Chemicon International, Temecula, EE.UU.*). Sólo se consideraron válidos los

resultados obtenidos en muestras con un número adecuado de células epiteliales (> 20/preparación). A partir de octubre de 2003 se amplió el estudio con la detección antigenética de los coronavirus (*anticuerpo monoclonal Anti-Coronavirus OC-43, Chemicon International, Temecula, EE.UU.*) y la tipificación del VRS (*anticuerpos monoclonales RSV/RSVA, Chemicon International, Temecula, EE.UU.*) b) *Cultivo celular*. Se inocularon las muestras EIA-negativo en las líneas celulares HEp-2 (*carcinoma epidermoide de laringe, Centro Nacional de Microbiología, Madrid*) y MRC-5 (*fibroblastos de pulmón fetal humano, Vircell, Granada*) mediante cultivo convencional: se incubaron a 37 °C en rotación continua y se observaron microscópicamente durante un máximo de 2 semanas. En las líneas que presentaron efecto citopático compatible con alguno de los virus investigados se procedió a la identificación por IF con anticuerpos monoclonales específicos (descrito anteriormente). Los enterovirus se identificaron por IF (*Monoclonal anti-Enterovirus, Dako, Glostrup, Dinamarca*). Los rinovirus se identificaron por su incapacidad para multiplicarse a pH ácido, con incubación a 33 °C. Además, se inocularon las líneas celulares HEp-2, LLC-MK2 (*riñón de mono Rhesus, Vircell, Granada*) y MDCK (*riñón de perro Madin-Darby, Centro Nacional de Microbiología, Madrid*) por técnica de *shell vial*¹³. Tras centrifugación e incubación a 37 °C (33 °C para la línea MDCK) durante 48-72 h, se procedió a la tinción con anticuerpos monoclonales específicos (descrito anteriormente).

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se presentaron mediante índices de centralización y dispersión: mediana e intervalo. Se contrastó la hipótesis de normalidad de dichas variables mediante el test de Kolmogorov-Smirnov para una sola muestra. Las diferencias entre grupos en función de las variables cualitativas se contrastaron mediante la prueba de chi cuadrado. La comparación de medias para más de dos grupos se realizó mediante la H de Kruskal-Wallis y para dos grupos con la U de Mann-Whitney. El nivel de significación estadística se estableció para una $p < 0,05$. El análisis de los datos se efectuó con el paquete estadístico SPSS, versión 11.5 para Windows.

Resultados

Se recogieron 1.957 muestras pertenecientes a 1.729 pacientes: 1.026 niños (59,3%) y 703 niñas (40,7%). En los pacientes con más de una muestra, sólo se consideró para el estudio la primera muestra recibida.

La relación varón:mujer fue 1,45:1. La mediana de edad fue 2 meses (intervalo: 0,03-119). El cuadro clínico diagnosticado con más frecuencia en el momento de la admisión hospitalaria fue la bronquiolitis, presente en el 75,9% de los niños. El 74,9% de los niños atendidos precisó ingreso hospitalario.

Se detectó el virus responsable del cuadro respiratorio en 1.032 niños (59,7%). La relación de virus identificados por sexo, grupos de edad y necesidad de ingreso se muestra en la tabla 1. El virus identificado con más frecuencia fue el VRS, cuya distribución mensual acumulada se muestra en la figura 1. Desde que se realizó la tipificación del VRS se diagnosticaron 266 casos de VRS A y 209 casos de VRS B. Todos los casos de VRS A se presentaron en la temporada 2003-2004 y todos los casos de VRS B se presentaron en la temporada 2004-2005. El 80,7% de los pacientes con VRS A precisó ingreso, frente al 53,6% de los pacientes con VRS B ($p < 0,001$). La distribución de los virus más frecuentes después del VRS se muestra en la figura 2. Los casos de infección por VPI, segundos agentes en frecuencia, se han presentado durante todo el período

TABLA 1. N.º de casos diagnosticados en relación con los virus identificados, el sexo, la edad y la necesidad de ingreso

Virus	N.º de casos (%)				
	Totales	Ingresos	Varones	Edad ≤ 2 m	Edad > 2 m
VRS	769 (74,5)*	558 (72,6)	469 (60,9)	417 (54,4)	352 (45,6)
VPI 3	81 (7,8)	68 (83,9)	49 (60,5)	33 (40,7)	48 (59,3)
VPI 2	10 (1,0)	7 (70)	4 (40)	3 (30,0)	7 (70,0)
VPI 1	13 (1,3)	11 (84,6)	8 (61,5)	5 (38,5)	8 (61,5)
IA	24 (2,3)	19 (79,2)	10 (41,7)	9 (37,5)	15 (62,5)
IB	7 (0,7)	2 (28,6)	3 (42,8)	3 (42,9)	4 (57,1)
ADV	44 (4,3)	39 (88,6)	26 (59,1)	3 (6,8)	41 (93,2)
RV	65 (6,3)	14 (21,5)	46 (70,8)	34 (52,3)	31 (47,7)
EV	15 (1,5)	10 (66,7)	10 (66,7)	7 (46,7)	8 (53,3)
CV	4 (0,3)	2 (50)	4 (100)	2 (50,0)	2 (50,0)
Total+	1.032 (100)	730 (71,4)	629 (60,9)	516 (50,0)	516 (50,0)
No virus	697 (100)	528 (75,8)	300 (43,0)	361 (51,8)	336 (48,2)

*De éstos, 654 (85%) fueron positivos por EIA (cribado inicial).

VRS: virus respiratorio sincitial; VPI: virus *parainfluenza*; IA: virus de la gripe A; IB: virus de la gripe B; ADV: adenovirus; RV: rinovirus; EV: enterovirus; CV: coronavirus; m: meses.

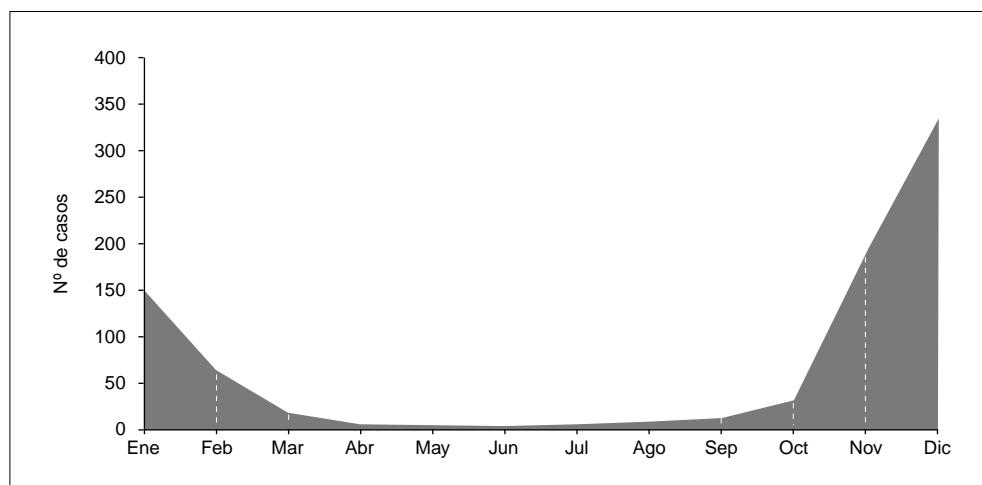


Figura 1. Distribución de VRS agrupados por meses (2002-2005). VRS: virus respiratorio sincitrial.

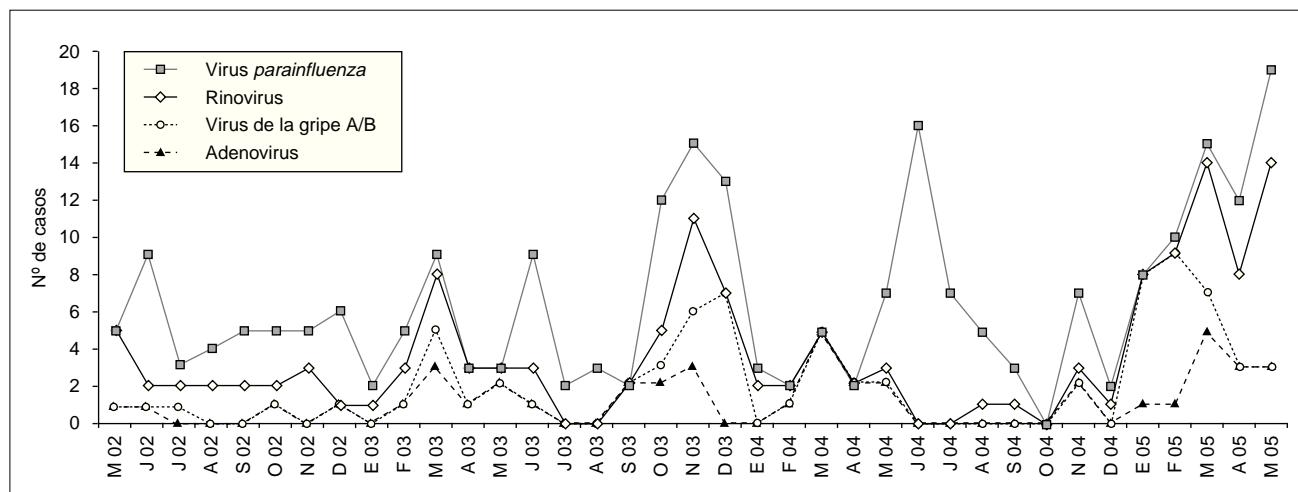


Figura 2. Distribución de virus aislados por meses.

TABLA 2. Sintomatología inicial asociada a los casos de IRA

Cuadro clínico	VRS	VPI	VI	ADV	RV	CV	EV	Total (+)	Total (-)
Bronquiolitis	660 (85,8)	81 (73,8)	17 (54,8)	30 (63,2)	44 (67,9)	3 (75,0)	8 (53,3)	843 (81,7)	470 (67,4)
Neumonía	13 (1,7)	5 (4,8)	1 (3,2)	4 (9,1)	1 (1,5)	0	1 (6,7)	25 (2,4)	17 (2,4)
Catarro de vías altas	19 (2,4)	5 (4,8)	4 (12,9)	2 (4,5)	10 (15,4)	1 (25,0)	1 (6,7)	42 (4,1)	57 (8,1)
Síndrome febril	9 (1,2)	3 (2,9)	5 (16,1)	1 (2,3)	2 (3,1)	0	2 (13,3)	22 (2,1)	22 (3,1)
Broncospasmo	21 (2,7)	1 (0,9)	3 (9,7)	5 (11,4)	4 (6,2)	0	1 (6,7)	35 (3,4)	27 (3,9)
Distrés respiratorio	47 (6,1)	9 (8,7)	1 (3,2)	2 (4,5)	4 (6,2)	0	2 (13,3)	65 (6,3)	104 (14,9)
Total	769	104	31	44	65	4	15	1032	697

VRS: virus respiratorio sincitial; VPI: virus *parainfluenza*; VI: virus *influenza*; ADV: adenovirus; RV: rinovirus; CV: coronavirus; EV: enterovirus.

de estudio, con un ligero predominio en primavera. Los VPI 3 han sido los más numerosos, con picos epidémicos en primavera y verano. El mes con mayor número de casos fue junio, en particular en 2004. La participación de los VPI 3 en invierno ha sido casi nula. Los casos de infección por VPI 1 han sido poco numerosos y se han distribuido mayoritariamente en otoño, con casos aislados en primavera e invierno. Lo mismo ha ocurrido con los casos de infección por VPI 2. Los rinovirus han sido la tercera causa de IRA y se han distribuido de manera heterogénea a lo largo de los 3 años de estudio. Han producido una patología más benigna, lo que se pone de manifiesto en el bajo número de ingresos. Los casos de adenovirus se han distribuido a lo largo de todo el año y han requerido el ingreso de la mayoría de los niños. Además, han sido los virus aislados más frecuentemente en niños mayores (mediana: 6 meses; intervalo: 1-74; $p < 0,001$). Los virus gripales han tenido una participación escasa como causa de IRA. Los casos se han distribuido en los meses de otoño e invierno. El subtipo B sólo se ha identificado en la temporada 2004-2005. Se diagnosticaron 6 coinfecciones (1,6%): un caso de VRS y adenovirus, un caso de VRS y VPI 3, un caso de VRS y enterovirus, un caso de adenovirus y rinovirus, un caso de adenovirus y VPI 3, y un caso de VPI 2 y VPI 3.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y los virus detectados, ni tampoco entre la presentación clínica inicial y los virus detectados. No obstante, el síndrome mayoritario en todos los tipos de virus ha sido la bronquiolitis, tal como se muestra en la tabla 2.

En las 1.075 muestras con EIA negativo (1.058) o no interpretable (17) se comparó la técnica de IF con el cultivo celular (tabla 3). De los 17 pacientes con resultado de EIA no interpretable, 8 fueron diagnosticados de infección por VRS por técnica de IF y/o cultivo, en uno se aisló VPI 3, en otro se aisló enterovirus y en los 7 restantes el estudio virológico fue negativo.

Discusión

Los virus son los principales agentes causales de IRA en niños, lo que se pone de manifiesto en el elevado número de diagnósticos alcanzado. El VRS fue el principal agente causal en todas las edades, al igual que en otros estudios clínicos y epidemiológicos¹⁴⁻¹⁷, con un patrón estacional si-

TABLA 3. Rentabilidad diagnóstica de la IF frente al cultivo en VPI, virus de la gripe y adenovirus

Virus	IF	CC		S (%)	E (%)	VPP (%)	VPN (%)
		+	-				
VPI 3	+	55	5	72,4	99,5	91,7	97,9
	-	21	994				
VPI 2	+	5	0	50,0	100	100	99,5
	-	5	1.065				
VPI 1	+	6	0	46,2	100	100	99,3
	-	7	1.062				
IA	+	17	2	77,3	99,8	89,5	99,5
	-	5	1.068				
IB	+	5	0	71,4	100	100	99,8
	-	2	1.068				
ADV	+	8	0	18,2	100	100	96,6
	-	36	1.031				
Total	+	96	7	55,8	99,2	93,2	92,2
	-	76	896				

IF: inmunofluorescencia; VPI: virus *parainfluenza*; CC: cultivo celular; S: sensibilidad; E: especificidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; IA: virus de la gripe A; IB: virus de la gripe B; ADV: adenovirus.

milar al observado en el resto del territorio español. Así mismo, destacamos la aparición cíclica de los subtipos A y B durante las temporadas 2003-2004 y 2004-2005, respectivamente. Otros autores han observado que ambos subtipos aparecen simultáneamente¹⁸, por lo que sería interesante subtipar los VRS durante un período más largo para establecer con exactitud si el comportamiento en nuestra área es realmente cíclico. Por otro lado, se ha descrito que el VRS A produce cuadros respiratorios más graves que el VRS B¹⁹, lo cual podría justificar, en parte, el mayor número de ingresos de niños infectados por dicho subtipo en nuestro estudio.

Los VPI han destacado como segunda causa de IRA y su aparición tanto epidémica como no epidémica ha sido un dato de interés en nuestro estudio, puesto que son agentes que se describen sobre todo en otoño y primavera en climas templados. En cuanto a los virus gripales, nuestros datos coinciden con los descritos en España en la temporada 2003-2004, caracterizada por una actividad gripe moderada, con un comienzo temprano de los casos y picos en las semanas epidemiológicas 46 y 47, con predominio de virus de la gripe A; y en la temporada 2004-2005, caracterizada por una actividad gripe alta, de comienzo más

tardío, con picos en las semanas 2 y 3, y con predominio de virus de la gripe A y casos esporádicos de virus de la gripe B^{20,21}. En conjunto, su participación en cuadros respiratorios ha sido escasa y se ha circunscrito casi por completo a la temporada invernal.

Los rinovirus han sido la tercera causa de IRA en nuestro estudio. Esto podría deberse a las condiciones climáticas presentes en Canarias, con una temperatura media anual de 22 °C, lo cual corresponde con la temperatura primaveral en climas templados. Otro argumento sería que los niños con infección por rinovirus han presentado una sintomatología más grave de lo habitual, precisando atención hospitalaria, con la consiguiente toma de muestra y envío a nuestro laboratorio para cultivo de virus. En circunstancias normales estos virus causan cuadros leves de vías altas, por lo que su tratamiento suele ser extra-hospitalario.

Los adenovirus se han presentado en niños con más meses de edad como se ha descrito previamente⁶. Además, ha producido una elevada tasa de ingresos, por lo que consideramos que su aislamiento se relaciona con cuadros de mayor gravedad que los debidos a otros virus o con cuadros más inespecíficos. En cualquier caso, no tenemos información sobre el criterio real de ingreso en los niños con infección por adenovirus, por lo que no podemos establecer ninguna conclusión.

La identificación de enterovirus y coronavirus ha sido muy baja en el conjunto de la serie, pero consideramos importante su investigación como parte del protocolo de diagnóstico ya que pueden ser responsables de cuadros clínicos graves.

Una limitación en nuestro estudio ha sido el desconocimiento de la incidencia de IRA producidas por metaneumovirus. Se sabe que su detección en la actualidad precisa de técnicas de amplificación genética, por lo que deberán incorporarse en el diagnóstico cotidiano.

En cuanto a la sensibilidad de la IF para la detección rápida de antígenos de VPI, virus de la gripe y adenovirus, ha sido baja si la consideramos de manera global, sobre todo debido a la baja sensibilidad de la técnica para detectar los adenovirus. Esto puede explicarse por la gran variedad de subtipos de adenovirus causantes de infección respiratoria. La especificidad ha sido muy alta para todos los virus. El valor predictivo positivo global ha sido también bajo.

En cuanto a las infecciones mixtas, la tasa es menor a la descrita por otros autores^{10,22}, probablemente porque no hemos investigado otros virus respiratorios en las muestras con EIA positivo y porque no se han empleado técnicas de amplificación genética que aumentarían la sensibilidad diagnóstica. Teniendo en cuenta que en la mayoría de las coinfecciones participa el VRS, nuestros datos pueden subestimar la incidencia real de las mismas, por lo que creemos que deberían investigarse todos los virus respiratorios en todas las muestras analizadas.

Para conocer con exactitud la relación existente entre los agentes virales y el tipo de cuadro respiratorio que producen es necesaria la realización de estudios prospectivos en población pediátrica ambulatoria y hospitalizada^{16,22}, así como evaluar en qué medida están presentes los virus descritos en este estudio en niños asintomáticos.

Las conclusiones principales de nuestro estudio han sido: a) en una proporción alta de casos de IRA se ha podido establecer la etiología por métodos convencionales; b) la bronquiolitis ha sido el principal cuadro clínico producido por todos los virus estudiados, y el VRS es el agente etiológico más frecuente; c) las infecciones producidas por adenovirus han ocurrido en niños de mayor edad; d) a pesar de que no hay diferencias importantes en el patrón estacional de los virus estudiados con relación a lo descrito en otras series, hemos constatado que los rinovirus y los virus *parainfluenza* son una causa importante de IRA en cualquier época del año, y e) la sensibilidad de la detección de antígeno por IF es baja para poder tomar decisiones en el tratamiento clínico de los pacientes con IRA, en particular para los adenovirus.

Bibliografía

- Van Woensel JBM, Van Aalderen WMC, Kimpen JLL. Viral lower respiratory tract infection in infants and young children. *BMJ*. 2003;327:36-40.
- Chonmaitree T, Mann L. Respiratory infections. En: Rottbart HA, editor. *Human Enterovirus infections*. Washington: ASM Press; 1995. p. 255-70.
- Tristam DA. Respiratory syncytial virus. En: Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Yolken RH, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003. p. 1378-88.
- Henrikson KJ, Kuhn SM, Savatski LL. Epidemiology and cost of infection with human parainfluenza virus types 1 and 2 in young children. *Clin Infect Dis*. 1994;18:770-9.
- Glezen WP, Franck AL, Taber LH, Kasel JA. Parainfluenza virus type 3: Seasonality and risk of infection and reinfection in young children. *J Infect Dis*. 1984;150:851-7.
- Reina J, Ferres F, Gutiérrez O, Ruiz de Gopegui E, González-Cárdenas M. Estudio de las características clínicas y epidemiológicas de las infecciones respiratorias por adenovirus en una población infantil (1997-2003). *An Pediatr (Barc)*. 2004;61:137-42.
- Hierholzer JC. Adenoviruses. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, editors. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections*. 7th ed. Washington: American Public Health Association; 1995. p. 169-88.
- Van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier RA, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7:719-24.
- Weinberg GA, Erdman DD, Edwards KM, Hall CB, Walker FJ, Griffin MR, 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.
- Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:1003-7.
- Ieven M, Goossens H. Relevance of nucleic acid amplification techniques for diagnosis of respiratory tract infections in the clinical laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 1997;10:242-56.
- Erdman DD, Weinberg GA, Edwards KM, et al. GeneScan reverse transcription-PCR assay for detection of six common respiratory viruses in young children hospitalized with acute respiratory illness. *J Clin Microbiol*. 2003; 41:4298-303.
- Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Rapid detection of cytomegalovirus in MRC-5 cells inoculated with urine specimens by using low-speed centrifugation and monoclonal antibody to an early antigen. *J Clin Microbiol*. 1984;19:917-9.
- Noyola DE, Rodríguez-Moreno G, Sánchez-Alvarado J, Martínez-Wagner R, Ochoa-Zavala JR. Viral etiology of lower respiratory tract infections in hospitalized children in Mexico. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:118-23.
- Nokes DJ, Okiro EA, Ngama M, White LJ, Ochola R, Scott PD, et al. Respiratory syncytial virus epidemiology in a birth cohort from Kilifi District, Kenya: infection during the first year of life. *J Infect Dis*. 2004;190: 1828-32.
- De Freitas Souza LS, Gonçalves Ramos EA, Martins Carvalho F, Castro Ribeiro Guedes VM, Silva Souza L, Machado Rocha C, et al. Viral respiratory infections in young children attending day care in urban Northeast Brazil. *Pediatr Pulmonol*. 2003;35:184-91.

17. Rotzén Östlund M, Zweygberg Wirgart B, Linde A, Grillner L. Respiratory virus infections in Stockholm during seven seasons: a retrospective study of laboratory diagnosis. *Scand J Infect Dis.* 2004;36:460-5.
18. Forster J, Ihorst G, Rieger CHL, Stephan V, Frank HD, Gurth H, et al. Prospective population-based study of viral lower respiratory tract infections in children under 3 years of age (the PRI.DE study). *Eur J Pediatr.* 2004;163:709-16.
19. Papadopoulos NG, Gourtziotis D, Javadyan A, Bossios A, Kallergi K, Psarras S, et al. Does respiratory syncytial virus subtype influences the severity of acute bronchiolitis in hospitalized infants? *Resp Med.* 2004;98:879-82.
20. Arostegui Kareaga N, Montes M, Pérez-Yarza EG, Sardón O, Vicente D, Cilla G. Características clínicas de los niños hospitalizados por infección por virus Influenza. *An Pediatr (Barc).* 2005;62:5-12.
21. Centro Nacional de Epidemiología. Boletín Epidemiológico Semanal. 2004; 12(11):113-24.
22. Manjarrez ME, Rosete DP, Rincón M, Villalba J, Cravioto A, Cabrera R. Comparative viral frequency in Mexican children under 5 years of age with and without upper respiratory symptoms. *J Med Microbiol.* 2003;52: 579-83.