



Original

Coinfección vírica en las infecciones respiratorias infantiles

A. Martínez-Roig^a, M. Salvadó^b, M.A. Caballero-Rabasco^{a,*}, A. Sánchez-Buenavida^a, N. López-Segura^a y M. Bonet-Alcaina^a^a Servicio de Pediatría, Hospital del Mar, Barcelona, España^b Departamento de Genética y Microbiología, Laboratorio de Referencia de Cataluña, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 7 de abril de 2013

Aceptado el 27 de enero de 2014

On-line el 22 de marzo de 2014

Palabras clave:

Coinfección

Infecciones de vías respiratorias

Virus respiratorio sincitial

RESUMEN

Introducción: Las técnicas moleculares han permitido un mejor conocimiento de la etiología de las infecciones respiratorias infantiles. El objetivo del estudio fue analizar la coinfección viral y su relación con la gravedad clínica.

Métodos: Se estudió a pacientes pediátricos hospitalizados con diagnóstico clínico de infección respiratoria durante el periodo comprendido entre 2009 y 2010. Se recogieron datos clínicos, epidemiológicos, duración de la hospitalización, necesidad de oxigenoterapia, coinfección bacteriana y necesidad de ventilación mecánica. Etiología estudiada con técnica PCR múltiple y microarrays de baja densidad para 19 virus.

Resultados: Un total de 385 pacientes presentaron resultados positivos, 44,94% menores de 12 meses. Los virus más detectados fueron: VRS-B: 139, rinovirus: 114, VRS-A: 111, influenza A H1N1-2009: 93 y bocavirus: 77. Se detectó coinfección en el 61,81%, un 36,36% con 2 virus, 16,10% con 3 y 9,35% con 4 o más. La coinfección fue superior en 2009 con 69,79 frente 53,88% en 2010. Rinovirus/VRS-B en 10 ocasiones y VRS-A/VRS-B en 5 fueron las coinfecciones más detectadas. Menor hospitalización a mayor número de virus detectados ($p < 0,001$). Necesitaron oxigenoterapia el 26,75% (en 55,34% se aisló un virus), objetivando a mayor número de virus menor necesidad de oxígeno ($p < 0,001$). Precisarón ventilación mecánica 9 casos, 4 de ellos con coinfección bacteriana y 5 con coinfección vírica ($p = 0,69$).

Conclusiones: Objetivamos una relación inversamente proporcional entre número de virus detectados en aspirado nasofaríngeo, necesidad de oxigenoterapia y días de hospitalización. Se necesitan más estudios epidemiológicos y mejoría en las técnicas de detección cuantitativa para definir el papel de las coinfecciones víricas en la enfermedad respiratoria y su correlación con la gravedad clínica.

© 2013 SEPAR. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

Viral Coinfection in Childhood Respiratory Tract Infections

ABSTRACT

Keywords:

Coinfection

Respiratory tract infections

Respiratory syncytial virus

Introduction: The introduction of molecular techniques has enabled better understanding of the etiology of respiratory tract infections in children. The objective of the study was to analyze viral coinfection and its relationship to clinical severity.

Methods: Hospitalized pediatric patients with a clinical diagnosis of respiratory infection were studied during the period between 2009-2010. Clinical and epidemiological data, duration of hospitalization, need for oxygen therapy, bacterial coinfection and need for mechanical ventilation were collected. Etiology was studied by multiplex PCR and low-density microarrays for 19 viruses.

Results: A total of 385 patients were positive, 44.94% under 12 months. The most frequently detected viruses were RSV-B: 139, rhinovirus: 114, RSV-A: 111, influenza A H1N1-2009: 93 and bocavirus: 77. Coinfection was detected in 61.81%, 36.36% with 2 viruses, 16.10% and 9.35% with 3 to 4 or more. Coinfection was higher in 2009 with 69.79 vs. 53.88% in 2010. Rhinovirus/RSV-B on 10 times and RSV-A/RSV-B on 5 times were the most detected coinfections. Hospitalization decreased with greater number of viruses ($P < 0,001$). Oxygen therapy was required by 26.75% (one virus was detected in 55.34% of cases). A larger number of viruses resulted in less need for oxygen ($P < 0,001$). Ten cases required mechanical ventilation, 4 patients with bacterial coinfection and 5 with viral coinfection ($P = 0,69$).

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: 97512@hospitaldelmar.cat (M.A. Caballero-Rabasco).

Conclusions: An inverse relationship was found between the number of viruses detected in nasopharyngeal aspirate, the need for oxygen therapy and hospitalization days. More epidemiological studies and improved quantitative detection techniques are needed to define the role of viral coinfections in respiratory disease and its correlation with the clinical severity.

© 2013 SEPAR. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

La infección vírica respiratoria es una causa de elevada morbilidad durante la infancia. Algo más de la tercera parte de los niños en edad preescolar desarrollan infecciones de las vías respiratorias bajas durante el primer año de vida. La necesidad de hospitalización en estos casos se sitúa entre el 1 y el 2% de los pacientes^{1,2}.

El agente etiológico no siempre es conocido. Los niños con infecciones respiratorias habitualmente son seguidos de forma ambulatoria, sin estudio de la etiología de la misma y, cuando son hospitalizados, las técnicas de estudio que se utilizan habitualmente carecen de sensibilidad adecuada³.

En los últimos años ha aumentado la experiencia y el conocimiento del papel de las coinfecciones virales en las infecciones respiratorias gracias a la incorporación de las técnicas moleculares⁴⁻⁶. En la actualidad los datos clínicos existentes sobre las coinfecciones, tanto por lo que refiere al número de virus implicados como a la gravedad asociada, es variable y, a veces, discrepante. Probablemente estas diferencias estén relacionadas con los diferentes agentes etiológicos implicados según la localización geográfica y con los métodos de detección empleados.

El objetivo de nuestro trabajo fue analizar la etiología vírica de las infecciones respiratorias, así como de la realidad clínica de la coinfección, y su posible relación con la gravedad clínica a través de nuestra experiencia en los casos hospitalizados en un hospital general de Barcelona, con servicio de pediatría de segundo nivel, aplicando una técnica de *polimerasa chain reaction* (PCR) múltiple y detección mediante microarrays de baja densidad.

Pacientes, materiales y métodos

Pacientes

Se estudió prospectivamente a los pacientes pediátricos, con edades comprendidas entre 7 días y 15 años, que se hospitalizaron por infección respiratoria durante el período comprendido entre el 1 de febrero del 2009 y el 31 de diciembre del 2010 en el Servicio de Pediatría del Hospital del Mar de Barcelona. El criterio básico de inclusión era un diagnóstico inicial de: a) infección de las vías respiratorias (rinofaringitis, laringitis, traqueobronquitis o neumonía), con orientación clínica de probable infección vírica; b) síndrome gripal; c) sospecha de tos ferina; d) neumonías con orientación clínica bacteriana o empiemas, con mala evolución durante el ingreso con sospecha de probable coinfección vírica.

Se recogieron datos personales, epidemiológicos, motivo del ingreso así como su curso clínico, duración de la hospitalización, necesidades de oxígeno en los casos con saturaciones $\leq 92\%$, y necesidad de ingreso en Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP) para ventilación mecánica.

Se estudiaron los casos estratificados por grupos de edad (menores de 12 meses, entre 1 y 3 años, entre 3 y 5 años, y mayores de 5 años), la orientación diagnóstica en el momento del ingreso, los días de hospitalización agrupados en menor a 4 días, entre 5-10 días y superior a 10 días, necesidad de oxigenoterapia, necesidad de traslado a UCIP para ventilación mecánica, número de virus detectados y la presencia de coinfección bacteriana.

Muestras para estudio virológico

De cada uno de ellos se recogió un aspirado nasofaríngeo en las primeras 12 h del ingreso. En los ingresados con sospecha clínica de neumonía bacteriana, en el momento en que existía una mala evolución con sospecha de que pudiera atribuirse a una coinfección vírico-bacteriana y no a la propia de una mala respuesta al tratamiento o a la virulencia del agente etiológico, se recogía una muestra de aspirado nasofaríngeo. La técnica se realizaba en el mismo día de la extracción, excepto los fines de semana. Las muestras se conservaban a una temperatura de 2-8 °C hasta su realización.

Extracción de los ácidos nucleicos

La extracción de los ácidos nucleicos (ARN/ADN) se llevó a cabo mediante MagnaPure LC de Roche diagnostics.

Amplificación y detección

Se utilizó el kit CLART[®] *PneumoVi*, de Laboratorios Genómica, Madrid, España, capaz de detectar y caracterizar la presencia de los 19 tipos y subtipos más frecuentes de virus humanos que causan infecciones respiratorias. Los virus analizados son: adenovirus; bocavirus; coronavirus; enterovirus (echovirus); influenza virus A (subtipos H3N2 humano, H1N1 humano, B, C y H1N1/2009); metapneumovirus (subtipos A y B); parainfluenza virus 1, 2, 3, y 4 (subtipos A y B); rinovirus; virus respiratorio sincitial tipo A (VRS-A); virus respiratorio sincitial tipo B (VRS-B).

La detección de los virus se lleva a cabo mediante una técnica de reacción en cadena de polimerasa (múltiple) precedida de una transcripción inversa del ARN viral (RT-PCR) para la amplificación de un fragmento específico del genoma vírico de entre 120 y 330 pb. La visualización del amplificado se realiza en la plataforma tecnológica basada en microarrays de baja densidad: CLART[®] (Clinical Array Technology).

Cada tubo de amplificado lleva un control interno como control de amplificación.

En el año 2009 el sistema no incluía la detección del virus influenza A H1N1/2009. En el 2010 el sistema incluyó su detección. La detección de este virus, hasta que no fue incorporada en la plataforma, se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real (RT-PCR) a través de la detección de los genes M2 y HA1, con el kit comercializado por Roche.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron almacenados en una base de datos con soporte en el programa Excel y el análisis estadístico se realizó con el programa SPSS. En primer lugar se llevó a cabo la estadística descriptiva univariada. Las variables cualitativas se presentan mediante la distribución de frecuencias de los porcentajes de cada categoría. En la fase de estadística analítica, se analizó si el número de virus detectados estaba relacionado con los días de hospitalización, la edad y la necesidad de oxigenoterapia. La asociación entre estos factores se ha investigado mediante pruebas de contraste de hipótesis, con comparación de proporciones mediante la prueba

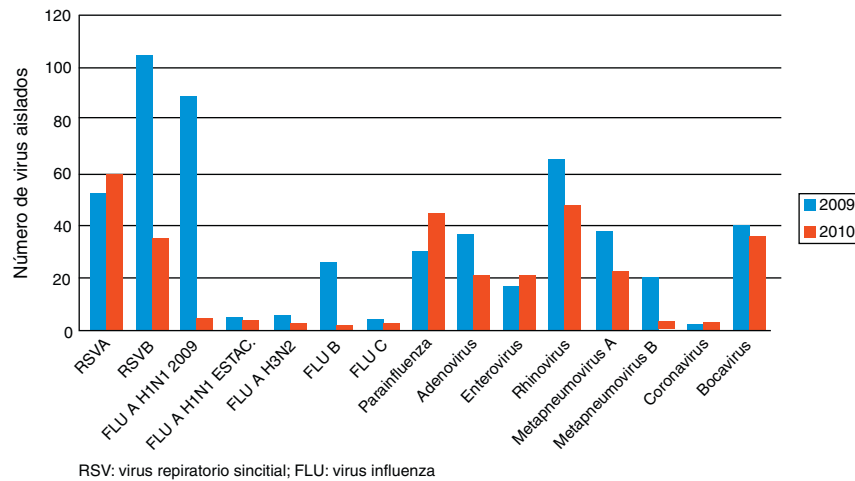


Figura 1. Virus aislados durante los años 2009 y 2010 en 385 niños ingresados en el Servicio de Pediatría del Hospital del Mar de Barcelona por infecciones de las vías respiratorias adquiridas en la comunidad.

Chi-cuadrado de Pearson. Resultados con $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados

Se analizaron 463 muestras de pacientes en edad pediátrica ingresados en el Servicio de Pediatría del Hospital del Mar de Barcelona por infecciones de vías respiratorias adquiridas en la comunidad con resultado positivo en 385 muestras (83,15%). La distribución etaria fue: menores de 12 meses 173 (44,94%), de 12 meses a 3 años 143 (37,14%), de 3 años a 5 años 53 (13,77%) y mayores de 5 años 16 (4,15%). El 44,94% de los casos se sitúan en la franja de edad menor de 12 meses. En ningún paciente existían factores de riesgo para enfermedades respiratorias. Los diagnósticos clínicos de los casos positivos correspondían a 100 bronquiolitis, 92 neumonías, 81 bronquitis, 80 infecciones respiratorias de vías altas, 25 síndromes gripales, 6 tos ferinas y un recién nacido con riesgo de infección tal como se refleja en la [tabla 1](#).

Los virus detectados se muestran en la [figura 1](#). Los 5 virus más destacados, en la suma de los 2 períodos estudiados, fueron VRS-B 139, rinovirus 114, VRS-A 111, virus influenza serotipo A H1N1-2009 93 y bocavirus 77. Los porcentajes de codetecciones de cada período fueron: a) en el 2009, el 69,79% de las infecciones estaban causadas por más de un agente vírico (134 de 192 infecciones detectadas); b) en el 2010 fueron el 53,88% (104 de 193 infecciones detectadas). Las coinfecciones más frecuentes fueron rinovirus + VRS-B en 10 ocasiones y VRS-A + VRS-B en 5.

La coinfección se presentó en el 61,81% de los estudiados con resultado positivo donde en el 36,36% se detectaron 2 virus, en el 16,10% fueron 3 virus y en el 9,35% una cifra igual o mayor a 4 virus.

Tabla 1

Relación entre el número de virus detectados y los diagnósticos observados

Diagnósticos	Número de virus detectados			Total
	1 virus	2 virus	≥ 3 virus	
Bronquiolitis	50	41	9	100
Neumonía	29	36	27	92
Bronquitis	24	32	25	81
IRVA	32	23	25	80
Síndrome gripal	5	8	12	25
Tos ferina	5	1	0	6
Riesgo de infección neonatal	1	0	0	1
Total	147	140	98	385

IRVA: infección respiratoria de vías altas.

Objetivamos una menor hospitalización a mayor número de virus detectados ($p < 0,001$) como se refleja en la [tabla 2](#) y siguiendo una asociación lineal.

Los 103 casos que necesitaron oxigenoterapia (saturaciones basales $\leq 92\%$) se pueden observar en la [tabla 3](#). Al correlacionar estos datos se observó como a menor edad aumenta el número de casos que precisan oxigenoterapia, siendo estadísticamente significativo ($p < 0,001$) y a mayor número de virus detectados menor necesidad de oxigenoterapia ($p < 0,001$).

Precisaron ingreso en UCIP para ventilación mecánica 9 casos. En la [tabla 4](#) se describe la edad, la forma clínica de presentación, los virus detectados y su diagnóstico. El agente etiológico dominante en los mismos fue VRS. No se observaron diferencias estadísticamente significativas al correlacionar la coinfección vírica y la necesidad de UCIP para ventilación mecánica ($p = 0,69$).

La sospecha clínica de coinfección bacteriana se estableció en 37 casos (8,50%) y se fundamentó por la clínica y los valores de los reactantes de fase aguda aunque solo en 2 casos se obtuvo confirmación por hemocultivo o PCR positiva a *Streptococcus pneumoniae* en el líquido pleural. En 20 de ellos se detectó un virus y en 14 de los casos, 2 virus. La duración de la hospitalización fue entre 1 y 4 días en 27 pacientes y entre 5 y 10 días en 10 pacientes. En los 8 casos diagnosticados de neumonía atípica mediante serología, se detectó coinfección vírica por un solo virus en 5 de ellos.

Discusión

El primer aspecto a resaltar de los resultados es la elevada positividad entre población sin factores de riesgo (83,15% de las muestras estudiadas), y, asimismo, de la elevada tasa de coinfección hallada (61,81%), especialmente en el primer año estudiado (69,79%). En la literatura, el tanto por ciento de coinfección oscila entre 8 y el 76% según las series⁷⁻¹⁶. En cuanto a la gravedad de los casos estudiados, se debe resaltar que un mayor número de virus detectados no es sinónimo de mayor gravedad. Según nuestros resultados, existe una relación inversamente proporcional entre el número de virus detectados y la necesidad de oxigenoterapia y días de hospitalización, siendo estadísticamente significativa ($p < 0,001$), aunque en los escasos 9 casos que precisaron ingreso en UCIP se registró un mayor dominio de casos con coinfección, pero sin significación estadística.

Existen estudios realizados en los que no se encontraron diferencias clínicas entre los pacientes con infecciones respiratorias causadas por un único agente y las causadas por múltiples virus en las muestras de aspirado nasofaríngeo estudiadas entre los niños

Tabla 2
Correlación entre los días de hospitalización y la detección de virus respiratorios

Días hospitalización	N.º de virus detectados			Total de casos por días de hospitalización (%)
	1 virus	2 virus	≥ 3 virus	
1-4 días	67	76	77	220(57,1)
5-10 días	67	53	10	130(33,8)
> 10 días	13	11	11	35(9,1)
Total casos de n.º de virus detectados (%)	147(38,2)	140(36,4)	98(25,5)	385(100)

p < 0,001.

Tabla 3
Correlación entre la edad y el número de virus detectados en los pacientes que precisaron oxigenoterapia

Edad	Número de virus detectados			Total n (%)
	1 virus	2 virus	≥ 3 virus	
< 12 m	42	22	10	74(71,84)
1a - 3a	13	7	3	23(22,33)
> 3a- 5a	1	3	1	5(4,85)
> 5a	1	0	0	1(0,98)
Total n (%)	57(55,34)	32(31,07)	14(13,59)	103

p < 0,001.

Tabla 4
Características de los pacientes ingresados en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos

Edad	Género	Clínica	Tipo de infección
21 días	Masculino	Bronquiolitis/neumonía	VRS-A + enterovirus+ adenovirus + sospecha de coinfección bacteriana
25 días	Masculino	Bronquiolitis/atelectasia	VRS-B
1 mes	Femenino	Bronquiolitis	VRS-A
2 meses	Femenino	Bronquiolitis	VRS-B
3 meses	Femenino	Bronquiolitis	VRS-A + influenza B + adenovirus
3 meses	Masculino	Bronquiolitis	Adenovirus
9 meses	Masculino	Bronquitis	Rhinovirus + bocavirus
20 meses	Femenino	Empiema	VRS-B + influenza B <i>S. pneumoniae</i>
4 años	Masculino	Empiema	VRS-A + H1N1-2009 <i>S. pneumoniae</i>

hospitalizados^{8,11,13,17-23}. Cabe destacar el estudio realizado en Sao Paulo por Camargo²², durante la epidemia de virus influenza H1N1 del 2009, donde el 21,9% de los casos presentaron coinfección sin que se asociara a una mayor morbilidad. Por el contrario también existen estudios que muestran que la coinfección es un factor de riesgo de peor evolución^{14,24-28}. De ellos destacamos un estudio realizado en Viena, por Aberle et al.¹⁴, entre 2000 y 2004: se observó que el cuadro obstructivo era más grave si en la coinfección estaba implicado el VRS y se aumentaban los días de estancia media hospitalaria en el caso de que el rhinovirus fuera el implicado y otro estudio realizado por Grensill et al.²⁶ mostró que cuando la coinfección era entre VRS y metapneumovirus, la evolución era más grave. Asimismo, en el estudio de Richard et al.²⁸ que relacionaba la coinfección con necesidad de ingreso en UCIP, llegaron a la conclusión de que la presencia de 2 o más virus implicados aumentaba la probabilidad de ingreso en UCIP en 2,7 veces. En cambio, en otro estudio realizado por Ghani et al.²⁹, en pacientes ingresados en UCIP, solo si existía una coinfección bacteriana implicaba una mayor estancia hospitalaria, sin mayor mortalidad.

También debemos considerar que la presencia prolongada de fragmentos virales, entre 5 y 6 semanas después del inicio de la sintomatología¹⁴ podría explicar la detección de más de un virus, sin que realmente tengan un papel en la patogenicidad del proceso³⁰. La epidemiología puede ayudar a establecer relaciones, pero la utilización de técnicas cuantitativas ayudaría mucho más a la interpretación de estos resultados discrepantes como sucede con la atribución o no de mayor gravedad a las coinfecciones.

Una limitación importante de nuestro trabajo, en cuanto al papel de la coinfección en las infecciones respiratorias de vías altas, es el

escaso número de este tipo de infecciones estudiadas, si se tiene en cuenta la frecuencia con que se presentan en la práctica habitual pediátrica. La no necesidad de hospitalización en la gran mayoría de las mismas limita el conocimiento de la realidad para poder extrapolar nuestros datos a la población general y un último aspecto, hasta ahora desconocido, sería el papel que a largo plazo pueden tener estas coinfecciones en el aparato respiratorio con el desarrollo de enfermedad pulmonar crónica.

Conclusiones

Aunque en nuestro estudio objetivamos una relación inversamente proporcional entre el número de virus detectados en aspirado nasofaríngeo, la necesidad de oxigenoterapia y los días de hospitalización, existen grandes discrepancias respecto a los datos de otros estudios publicados en la literatura, por lo que se necesitan más estudios epidemiológicos y mejoría en las técnicas de detección cuantitativa para definir el papel de las coinfecciones víricas en la enfermedad respiratoria y su correlación con la gravedad clínica.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-98.

2. Madhi SA, Kuwanda L, Cutland C, Klugman KP. Five-year cohort study of hospitalization for respiratory syncytial virus associated lower respiratory tract infection in African children. *J Clin Virol.* 2006;36:215–21.
3. Jin Yoo S, Kuak EY, Shin BM. Detection of 12 respiratory viruses with two-set multiplex reverse transcriptase-PCR assay using a dual priming oligonucleotide system. *Korean J Lab Med.* 2007;27:420–7.
4. Mahony J, Chong S, Merante F, Yaghoubian S, Shina T, Lisle C, et al. Development of respiratory virus panel test for the detection of twenty human respiratory viruses by using multiplex PCR and a fluid microbead-based assay. *J Clin Microbiol.* 2007;45:3056–62.
5. Brunstein JD, Cline CL, McKinney S, Thomas E. Evidence from multiplex molecular assays for complex multipathogen interactions in acute respiratory infections. *J Clin Microbiol.* 2008;46:97–102.
6. Kumar RM. The widely used diagnostics DNA microarrays- A review. *Am J Infect Dis.* 2009;5:207–18.
7. Frobert E, Escurat V, Javouhey E, Casalegno JS, Bouscambert-Duchamp M, Moulinier C, et al. Respiratory viruses in children admitted to hospital intensive care units: Evaluating the CLARTR pneumovir DNA array. *J Med Virol.* 2011;83:150–5.
8. Peng D, Zhao D, Liu J, Wang X, Yang K, Xicheng H, et al. Multipathogen infections in hospitalized children with acute respiratory infections. *Virol J.* 2009;6:155.
9. Raymond F, Carboneau J, Boucher N, Robitaille L, Boisvert S, Wu WK, et al. Comparison of automated microarray detection with real-time PCR assays for detection of respiratory viruses in specimens obtained from children. *J Clin Microbiol.* 2009;47:743–50.
10. Renois F, Talmud D, Huguenin A, Moutte L, Strady C, Cousson J, et al. Rapid detection of respiratory tract viral infections and coinfections in patients with influenza-like illnesses by use of reverse transcription-PCR DNA microarray systems. *J Clin Microbiol.* 2010;48:3836–42.
11. Suryadevara M, Cummings E, Bonville CA, Bartholoma N, Riddell S, Kiska D, et al. Viral etiology of acute febrile respiratory illnesses in hospitalized children younger than 24 months. *Clin Pediatr (Phila).* 2011;50:513–7.
12. Calvo C, García-García ML, Blanco C, Vázquez MC, Frías ME, Pérez-Breña P, et al. Multiple simultaneous viral infections in infants with acute respiratory tract infections in Spain. *J Clin Virol.* 2008;42:268–72.
13. Marguet C, Lubrano M, Gueudin M, le Roux P, Deschildre A, Forget C, et al. In very young infants severity of acute bronchiolitis depends on carried viruses. *PLoS One.* 2009;4:e4596.
14. Aberle JH, Aberle SW, Pracher E, Hutter HP, Kundi M, Popow-Kraupp T. Single versus dual respiratory virus infections in hospitalized infants: Impact on clinical course of disease and interferon-gamma response. *Pediatr Infect Dis J.* 2005;24:605–10.
15. Bonzel L, Tenenbaum T, Schrotten H, Schildgen O, Schweitzer-Krantz S, Adams O. Frequent detection of viral coinfection in children hospitalized with acute respiratory tract infection using a real-time polymerase chain reaction. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:589–94.
16. Meerhoff TJ, Houben ML, Coenjaerts FE, Kimpen JL, Hofland RW, Schellevis F, et al. Detection of multiple respiratory pathogens during primary respiratory infection: Nasal swab versus nasopharyngeal aspirate using real-time polymerase chain reaction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010;29:365–71.
17. Papadopoulos NG, Moustaki M, Tsolia M, Bossios A, Astra E, Prezerakou A, et al. Association of rhinovirus infection with increased disease severity in acute bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165:1285–9.
18. Xepapadaki P, Psarras S, Bossios A, Tsolia M, Gourgiotis D, Liapi-Adamidou G, et al. Human metapneumovirus as a causative agent of acute bronchiolitis in infants. *J Clin Virol.* 2004;30:267–70.
19. Canducci F, Debiaggi M, Sampaolo M, Marinozzi MC, Berrè S, Terulla C, et al. Two-year prospective study of single infections and co-infections by respiratory syncytial virus and viruses identified recently in infants with acute respiratory disease. *J Med Virol.* 2008;80:716–23.
20. Nascimento MS, Souza AV, Ferreira AV, Rodrigues JC, Abramovici S, Silva Filho LV. High rate of viral identification and coinfections in infants with acute bronchiolitis. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65:1133–7.
21. Martin ET, Kuypers J, Wald A, Englund JA. Multiple versus single virus respiratory infections: Viral load and clinical disease severity in hospitalized children. *Influenza Other Respi Viruses.* 2012;6:71–7.
22. Camargo C, Guatira SB, Bellei N. Respiratory viral coinfection among hospitalized patients with H1N1 2009 during the first pandemic wave in Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012;16:180–3.
23. Huguenin A, Moutte L, Renois E, Leveque N, Talmud D, Abely M, et al. Broad respiratory virus detection in infants hospitalized for bronchiolitis by use of a multiplex RT-PCR DNA microarray system. *J Med Virol.* 2012;84:979–85.
24. Flores CJC, Vizcaya AC, Araos BR, Montecinos PL, Godoy MP, Valiente-Echeverría F, et al. Human bocavirus in Chile: Clinical characteristics and epidemiological profile in children with acute respiratory tract infections. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28:504–11.
25. Marcone DN, Ellis A, Videla C, Ekstrom J, Ricarte C, Carballal G, et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized and outpatient children in Buenos Aires, Argentina. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32:E105–10.
26. Greensill J, McNamara PS, Dove W, Flanagan B, Smyth RL, Hart CA. Human metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:372–5.
27. Paranhos-Baccalà G, Komurian-Pradel F, Richard N, Vernet G, Lina B, Floret D. Mixed respiratory virus infections. *J Clin Virol.* 2008;43:407–10.
28. Richard N, Komurian-Pradel F, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:213–7.
29. Ghani AS, Morrow BM, Hardie DR, Argent AC. An investigation into the prevalence and outcome of patients admitted to a pediatric intensive care unit with viral respiratory tract infections in Cape Town, South Africa. *Pediatr Crit Care Med.* 2012;13:e275–81.
30. Brieu N, Guyon G, Rodière M, Segondy M, Foulongne V. Human bocavirus infection in children with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2008;27:969–73.