

Rev Biomed 2005; 16:13-19.

Diagnóstico molecular de un brote de bronquiolitis en la ciudad de Cienfuegos, Cuba, en 2002.

Artículo Original

Clara Savón-Valdés, Odalys Valdés-Ramírez, Grehete González-Muñoz, Lídice Palerm-Caravallo, Guelsys González-Báez, Angel Goyenchea-Hernández.

Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios. Departamento de Virología Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN.

Introducción. La bronquiolitis es una enfermedad aguda de las vías respiratorias que aparece en la primera infancia y se caracteriza inicialmente por un cuadro catarral. En más de la mitad de los casos hay progresión de la infección hacia el tracto respiratorio inferior requiriendo hospitalización en los niños menores de un año. Los agentes etiológicos principales capaces de producir este cuadro son el Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSRH), seguido del Parainfluenzavirus tipo 3 (PiVH-3). Ambos virus son difíciles de aislar, por lo que en este brote se aplicaron técnicas moleculares de diagnóstico. El objetivo de este trabajo fue determinar el agente casual de un brote de bronquiolitis, incluyendo un paciente fallecido, en niños menores de 6 meses en la Provincia de Cienfuegos, Cuba.

Materiales y Métodos. Un total de 19 muestras clínicas (exudados nasofaríngeos) fueron colectadas entre junio-julio del 2002 de niños ingresados en la sala de respiratorio del Hospital Pediátrico Universitario "Paquito González Cueto", de la Provincia de Cienfuegos, Cuba, con diagnóstico

clínico de bronquiolitis. Para corroborar el diagnóstico clínico fueron utilizadas dos reacción en cadena de la polimerasa (RCP) Múltiple una para el VSRHA y B y la segunda para el diagnóstico simultáneo de los Parainfluenza virus 1, 2 y 3.

Resultados. Se obtuvieron un total de 8 muestras positivas para un 42% de positividad total, 3(16%) de ellas resultaron positivas al VSRH subtipo A, y 5 (26.3%) al PiVH-3, incluyendo el paciente fallecido.

Conclusiones. El diagnóstico molecular por RCP, nos permitió dar una respuesta rápida y precisa a las autoridades de Salud sobre la etiología de este brote, en un grupo de edad de alto riesgo a las infecciones respiratorias agudas, como es la población menor de un año. (*Rev Biomed 2005; 16:13-19*)

Palabras clave: Bronquiolitis, Virus Sincitial Respiratorio (VSR), Parainfluenzavirus tipo 3 (PiVH-3), Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

SUMMARY.

Molecular diagnosis of a bronchiolitis outbreak in Cienfuegos, Cuba 2002.

Solicitud de sobretiros: Dra. Clara Savón Valdés, Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí, Departamento de Virología "Centro Colaborador OPS/OMS para el Control de Enfermedades Virales". Autopista Novia del Medio Día, Km 6 1/2, Apartado Postal 601, Ciudad de la Habana, Cuba. Tel 202-0450 Fax (537) 204 6051 E-mail: clara@ipk.sld.cu

Recibido el 30/Agosto/2004. Aceptado para publicación el 7/Enero/2005.

Este artículo está disponible en <http://www.uady.mx/sitios/biomedic/revbiomed/pdf/rb051612.pdf>

Introduction. Bronchiolitis is an acute disease of the respiratory airway which appears during infancy; its clinical features begin with a common cold. But in more than a half of these patients it progresses to a lower respiratory tract infection requiring hospitalization mainly in the population under 1 year of age. The main agents which are able to produce this clinical feature are the Human Respiratory Syncytial virus (HRSV) followed by the Parainfluenza virus type 3 (HPIV-3). The isolation of both viruses is difficult, so sensitive molecular techniques were applied. The main objective of this study was to determine the etiological agents of this bronchiolitis outbreak in infants under 6 months of age in Cienfuegos Province during 2002.

Materials and Methods. A total of 19 clinical samples (nasopharyngeal swabs) were collected between June and July 2002 from infants admitted to the respiratory ward of the Paediatric University Hospital Paquito González Cueto in Cienfuegos with a clinical diagnosis of bronchiolitis. To confirm the clinical diagnosis two Multiplex PCR were applied; the first one for the diagnosis of HRSV A and B and the second for the simultaneous detection of HPIV 1, 2, and 3.

Results. Of the 19 samples studied 8 were positive, and 42% of general positivity was obtained. 3 of (16%) were positive to HRSV Subtype A and 5 (26.3%) to HPIV-3, including the fatal case.

Conclusions. The application of the molecular diagnosis using these multiplex PCR, allowed us to give a rapid and accurate answer to the Health authorities about the etiology of this outbreak in a high risk age group which is the population under 1 year of age. (*Rev Biomed 2005; 16:13-19*)

Key words: Bronchiolitis, Human Respiratory Syncytial Virus (HRSV), Parainfluenzavirus Type 3 (HPIV-3), Polymerase Chain Reaction (PCR).

INTRODUCCIÓN.

La bronquiolitis es una enfermedad aguda de las vías respiratorias que aparece en la primera infancia y que clínicamente se caracteriza por un cuadro catarral con hiperinsuflación torácica, en el contexto de una

infección viral (1). En más de la mitad de los casos hay progresión de la infección hacia el tracto respiratorio inferior, que desencadena un cuadro de bronquiolitis y neumonía, requiriendo hospitalización y tratamiento en los niños menores de un año, en la mayoría de los casos (2).

El Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSRH), es el patógeno más importante del tracto respiratorio interior en lactantes menores de 6 meses y niños pequeños. Este virus es el responsable del 50% de las bronquiolitis en lactantes y del 25% de las neumonías. Otros virus, como el virus Parainfluenza, le siguen en importancia clínica, específicamente el Parainfluenza tipo 3 (PiVH-3); éstos son capaces de producir cuadros de bronquiolitis severos en lactantes menores de 6 meses de edad (3).

Los métodos de diagnóstico clásico, tales como el aislamiento viral y la serología resultan ineficaces por la demora en el diagnóstico, para la toma de decisiones terapéuticas, como es la administración de sustancias antivirales (4).

Las técnicas moleculares de diagnóstico basadas en la amplificación del ácido nucleico como la Reacción en Cadena de la polimera (PCR), han demostrado ser altamente sensibles, rápidas y específicas en la detección del genoma viral directamente de la muestra clínica, si se tiene en cuenta que en el exudado nasofaríngeo de un lactante sólo hay una concentración de 2×10^4 ufp/mL de virus y que el PiVH-3 es extremadamente sensible a los cambios de temperatura, a lo que frecuentemente se ven sometidos durante la transportación, la dificultad que entraña el aislamiento de estas entidades, hacen que el diagnóstico molecular constituya una magnífica alternativa en el diagnóstico (5, 6).

En Cuba las infecciones respiratorias agudas constituyen un grave problema de Salud. Estas ocupan el primer lugar de morbi-mortalidad en el contexto de las enfermedades infecciosas (7). Goyenechea y colaboradores estudiaron durante 10 años el patrón estacional de VSRH. Estos autores demostraron que el patrón estacional de Cuba es similar al de los países templados, pero ocasionalmente también se producen brotes locales y casos esporádicos en la temporada

Diagnóstico molecular de un brote de bronquiolitis.

lluviosa (8).

El objetivo de este trabajo fue determinar el agente causal de un brote de bronquiolitis, incluyendo un paciente fallecido, en niños menores de 6 meses en la Provincia de Cienfuegos.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Muestras Clínicas. Las muestras clínicas (exudados nasofaríngeos) fueron colectados en la Sala de Respiratorio del Hospital Universitario Pediátrico "Paquito González Cueto", de Cienfuegos, Cuba. Un total de 19 muestras fueron colectadas en el período comprendido entre junio-julio de 2002. La edad promedio de los pacientes fue 4.3 meses y en todos los casos se contó con el consentimiento informado de sus padres o tutores.

Criterio de Selección. Sólo fueron seleccionados aquellos pacientes con 24 horas de ingreso y 48 horas del comienzo de los síntomas, con objetivo de descartar una posible infección nosocomial.

Medio de transporte. Los exudados fueron colocados en medio de transporte con antibióticos para prevenir las contaminaciones bacterianas (9).

Extracción de ARN. Para la extracción de ARN se utilizó el método propuesto por Casas y colaboradores (10). La muestra del paciente fallecido fue macerada en el tampón de lisis propuesto por esta autora, se centrifugó y luego se continuó con el protocolo normal de extracción.

Células. Para la multiplicación de las cepas prototipos

o patrones se utilizaron las células de carcinoma laríngeo epidermoide Hep-2 y células de carcinoma humano mucoepidermoide NCIH-292, ambas procedentes del American Type Culture Collection (ATCC, Bethesda, MD), las cuales fueron crecidas de acuerdo a los protocolos propuestos (11).


Cepas Patrones o Prototipos (Control positivo). Como cepas prototipos para VSRH se utilizaron la Cepa Long del subtipo A y la CH18536 como subtipo B. Las cepas de PiVH fueron las siguientes: PiVH-1 (cepa C 35), PiVH-2 (cepa Greer) y PiVH-3(C-243).

Control Negativo. Se empleó agua libre de RNAasa Promega.

Detección del Virus Sincitial Respiratorio Humano. Para la detección y tipificación del VSRH en A y B se realizó mediante un PCR anidado para el gen de la proteína de fusión (F) el cual amplifica los fragmentos de VSR tipos A y B de 356 pb y 294 pb respectivamente de acuerdo con el protocolo propuesto por Pérez-Breña en 1998 (12). Para este primer paso se utilizó el estuche de RT/PCR Access System Promega. La mezcla de reacción se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En la segunda amplificación se empleó la Amplitaq polimersa (Perking Elmer) de alta fidelidad que entre sus ventajas está que el nivel de amplificación es superior. Para la segunda amplificación se añadieron 2 µL del producto amplificado de la primera reacción. La secuencia de los cebadores se muestra en el cuadro 1.

Cuadro 1

Cebadores del PCR anidado para la detección del Virus Sincitial Respiratorio tipo A y B.

Cebadores	Posición (nucleótidos)	Secuencia 5'  -3'
Primera	reacción	de amplificación
F4(+)	323---342	ACAATCGRGCCAGAAGAGAA
F5(-)	743----721	GTTACACCTGCATTAACACTRAA
Segunda	reacción	de amplificación
F8 A(+)	364----386	ACACTCAACAATACCAAAAAWAC
F10A(-)	720----700	TTCCCTGGTAATCTCTAGTAG
F12 B(+)	364----386	ACAATCAATACCACAAAAAACCT
F14B(-)	720----700	ATTCTCTGGTGATTCCAACAA

Cebadores de polaridad positiva (+) y cebadores de polaridad (-).

Detección de los Parainfluenzavirus humanos.

La detección y tipificación de los parainfluenza virus 1, 2, 3 se realizó mediante un PCR anidado descrito por Echevarría en 1998 (13). Ésta se basa en la utilización de una combinación de pares de cebadores preparados de regiones conservadas del gen de la hemaglutinina y neuroaminidasa de cada serotipo en la primera amplificación. Como en el PCR anterior para la primera amplificación se utilizó el estuche RT/Access System Promega y se siguieron las instrucciones del fabricante. En la segunda amplificación también se utilizó una mezcla de cebadores que permiten la diferenciación, por el tamaño del ADN específico fácilmente de cada parainfluenzavirus 317 pb, 203 pb, 140 pb para el PiVH-1, PiVH-2 y PiVH-3, respectivamente. La secuencia de los cebadores se muestra en el cuadro 2.

RESULTADOS.

En el período estudiado comprendido desde finales de junio-julio/02, se analizaron 19 muestras clínicas (exudados nasofaríngeos), mediante dos PCR anidados múltiple para el diagnóstico del Virus Sincitial Respiratorio Humano (VSRH) y Parainfluenza


virus humano 1, 2 y 3.

De las 19 muestras analizadas, se obtuvieron un total de 8 casos positivos (42%), de estos 3(16%) fueron positivos a VSRH tipo A y 5 (26.3%) al PiVH-3.

En el cuadro 3 se muestran las características generales de los 8 casos positivos; Como se observa, la mayoría de los pacientes fueron mayores de 6 meses de edad. Solamente 1 caso fue ingresado durante el mes de junio y 7 de ellos en el mes de julio. Se observó una mayor incidencia en los niños que en las niñas; 5 niños resultaron positivos. El agente etiológico diagnosticado en los pulmones del niño fallecido fue el PiVH-3; esto no había sido informado anteriormente en nuestro país.

En la figura 1 (a, b) se observan los productos de los PCR anidados de VSRH y PIVH. En el gel de la izquierda se observan los 3 casos positivos con fragmentos de ADN de 356 pb por lo que se detectó el VSRH tipo A; en el gel b se observan 5 casos positivos a PiVH-3, donde se visualizan los fragmentos de ADN de 140 pb, ambos en geles de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio respectivamente.

Cuadro 2
Cebadores del PCR anidado para la detección de los Parainfluenza Virus 1, 2 y 3.

Cebadores	Posición (nucleótidos)	Secuencia (5'  3')
Primera reacción de amplificación		
PIP1 +	748-768	CCTTAAATTCAGATATGTAT
PIP1 -	1206-1225	GATAAATAATTATTGATACG
PIP2 +	803-822	AACAATCTGCTGCAGCATT
PIP2 -	1291-1310	ATGTCAGACAATGGGCAAAT
PIP3 +	762-781	CTGTAAACTCAGACTTGGA
PIP3 -	1220-1239	TTTAAGCCCTTGTCAACAAC
Segunda reacción de amplificación		
PIS1 +	780-801	CCGGTAATTTCTCATACCTATC
PIS1 -	1076-1096	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG
PIS2 +	845-866	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT
PIS2 -	1027-1048	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA
PIS3 +	884-905	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT
PIS3 -	966-986	TAAATCTTGTGTTGAGATTG

Cebadores de polaridad positiva (+), Polaridad negativa (-)

Diagnóstico molecular de un brote de bronquiolitis.

Cuadro 3

Características generales de los casos ingresados en el Hospital Universitario Paquito González Cueto. Cienfuegos 2002.

No Lab	Sexo	Edad	Fecha	Diagnost.Clinico	Diagnost.Laboratorio
42/02	F	2M	27/6	Bronquiolitis	PiVH-3
46/02	M	4M	17/7	Bronquiolitis	VSR-A
47/02	M	5M	18/7	Bronquiolitis	VSR-A
48/02	M	4M	18/7	Bronquiolitis	VSR-A
49/02 *	M	3M	18/7	Bronquiolitis	PiVH-3
51/02	M	8M	18/7	Neumonía	PiVH-3
55/02	F	5M	18/7	Bronquiolitis	PiVH-3
57/02	F	8M	18/7	Bronquiolitis	PiVH-3

*Fallecido a las 24 horas del ingreso.

DISCUSIÓN.

En Cuba las infecciones respiratorias agudas (IRA), juegan un papel fundamental en los índices de morbi-mortalidad, en el contexto de las enfermedades infecciosas (7). Los estudios realizados por Goyenechea en la población infantil menor de 1 año durante 10 años definieron el patrón estacional del VSRH en Cuba. Este autor concluyó que este patrón es coincidente con el de los países templados, es decir otoño, invierno y primavera (8), pero otros investigadores han descrito la aparición de casos

esporádicos y brotes locales durante todo el año (4, 14).

Se conoce muy poco sobre la estacionalidad del PiVH-3 en Cuba, pero autores como Hall (3), aseveran que los brotes de PiVH-3 son anuales y fundamentalmente en primavera verano y que además es frecuente encontrarlo cocirculando con VSRH. Esto quizás pudiera explicar el predominio del PiVH-3 en este brote de bronquiolitis en la Ciudad de Cienfuegos y la cocirculación con el tipo A del VSRH obtenido en este estudio. De los 5 casos positivos al

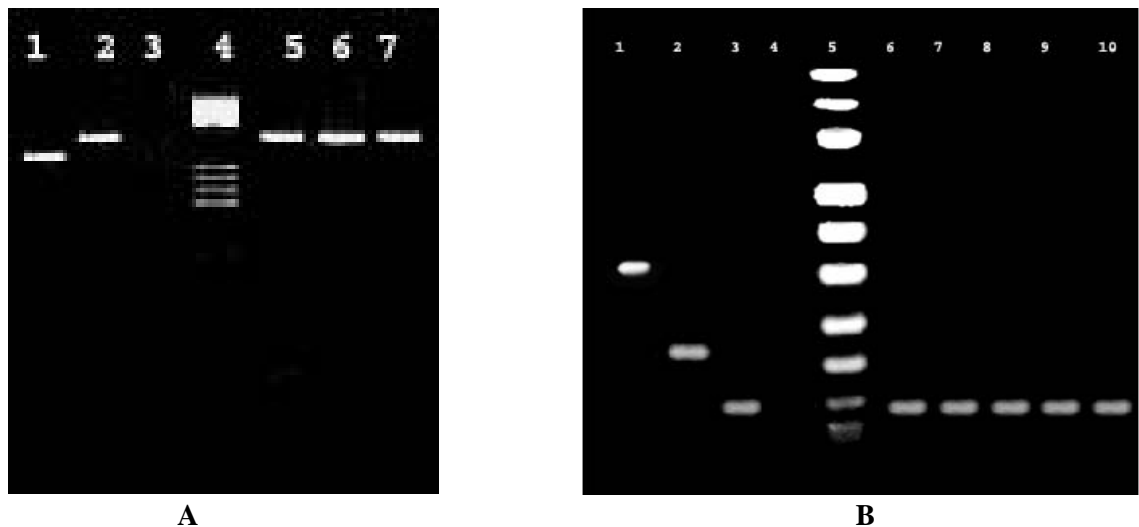


Figura 1

A

A) Resultados de la PCR de diagnóstico de las muestras clínicas. Carril 1 cepa prototipo VSRH B CH18536, carril 2 Cepa prototipo VSRH A Long, carril 3 control negativo, carril 4 marcador de peso molecular, carriles 5, 6, 7 muestras clínicas positivas a VSRH A.

B

B) Resultados de PCR Múltiplex de diagnóstico de Parainfluenzavirus. Carril 1 cepa prototipo de PiVH-1, carril 2 cepa prototipo de PiVH-2, carril 3 cepa prototipo de PiVH-3, carril 4 control negativo, carril 5 marcador de peso molecular, carriles 6,7, 8, 9 y 10 muestras clínicas positivas al PiVH-3.

PiVH-3 encontrados, 4 fueron hospitalizados en el mes de julio, por lo que coincide plenamente con lo planteado por Hall.

En nuestro estudio encontramos una edad promedio de 4.8 meses en los casos positivos, lo cual es compatible con lo encontrado por otros investigadores, como Hall y colaboradores (16) y Shay y colaboradores (17); estos autores describen a estos virus como los agentes etiológicos virales de la infancia. Así por ejemplo, en los lactantes menores de 6 meses en los Estados Unidos se reporta que del 50 al 90% de las hospitalizaciones son debidas a bronquiolitis por estos virus y la primo infección raramente es asintomática, localizándose la bronquiolitis y la neumonía por VSRH y PiVH-3 en los lactantes menores de 6 meses (15, 16).

Durante el estudio de este brote, se encontró un lactante de 3 meses de edad que fue hospitalizado con diagnóstico clínico de bronquiolitis y en menos de 24 horas evolucionó hacia un distress respiratorio y la muerte. Este paciente se le diagnosticó un PiVH-3 aplicando una técnica tan sensible como el PCR-Múltiplex descrito por Echevarría (13). En la literatura sólo hemos encontrado un reporte que quizás pueda ayudarnos a explicar este desenlace fatal tan poco frecuente en nuestro país. Así por ejemplo, Grubor (18) plantea que al producirse la amplificación en las proteínas de superficie, compiten con los niveles de ARNm defensivo que pueden reducir la replicación del parainfluenzavirus tipo 3 (PiV0-3) en ovejas recién nacidas con neumonía. Por otro lado, existen similitudes entre los PiV0-3 y el PiVH-3 en las secuencias nucleotídicas. Es probable que en este caso la velocidad de amplificación de las proteínas de superficie haya superado los niveles de ARNm defensivo y por ende la carga viral haya sido muy elevada, esto unido a corta edad del paciente contribuyeran a esta evolución tórpida del cuadro hasta provocar la muerte.

Llama la atención que a pesar de haber sido hospitalizados todos los pacientes y que el diagnóstico de los casos seleccionados se realizó por técnicas muy sensibles como las descritas por Pérez-Breña y Echevarría (12, 13), para la detección de estos virus

sólo obtuvimos un 42% de positividad total, por lo que pensamos que algún otro factor haya estado influyendo.

Inicialmente descartamos que sean factores inherentes a la transportación de la muestra y la calidad de la misma; ya que entre las ventajas del PCR está la factibilidad de realizar un diagnóstico preciso, aún cuando la calidad de la muestra se encuentre por debajo de los patrones establecidos. Entre estos un medio de transporte virológico inadecuado como ocurrió en este caso que se utilizó una solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS), recomendada sólo para colecta de muestras de virus Influenza en lugar de medio de transporte virológico descrito para el transporte y conservación de estos virus o baja carga viral. Ambas condiciones pueden impedir el aislamiento viral, pero no la amplificación por PCR (9), por lo que nos inclinamos a pensar en la presencia de otro virus respiratorio, capaz de producir un cuadro clínico de bronquiolitis. El nuevo Metapneumovirus humano (MPVH), recientemente descubierto en 2001, por Van Den Hoogen y Osterhaus (18), produce cuadros de clínicos de bronquiolitis en niños muy similares a VSRH. Estos investigadores realizaron un estudio retrospectivo en casos de bronquiolitis y encontraron que alrededor de 15 % de los casos negativos a VSRH son diagnosticados como MPVH. Otros autores, como Greensill, han descrito brotes de bronquiolitis con la presencia de este nuevo virus, en coinfecciones con VSRH (19).

En el 2002 el Sistema Nacional de Vigilancia de IRA detectó un aumento de la circulación del PiVH-3 en niños menores de un año en la Ciudad de la Habana, en un estudio seroepidemiológico por inhibición de la hemoaglutinación (IH) se encontraron Títulos Promedios Geométricos (TPG) de 27.7, relativamente altos para este grupo de edad (República de Cuba Ministerio de Salud Pública. Informe Anual 2002).

El diagnóstico molecular por PCR nos permitió dar una respuesta rápida y precisa sobre la etiología de este brote en un grupo de edad de alto riesgo a las infecciones respiratorias agudas, como es la población menor de un año.

Diagnóstico molecular de un brote de bronquiolitis.

AGRADECIMIENTOS.

Los autores agradecen al Dr. Domingo Hernández del Centro Provincial de Higiene y Epidemiología de la Provincia Cienfuegos del MINSAP por su valiosa cooperación en la Colecta y envío de las muestras clínicas al Laboratorio Nacional de Referencia de Virus Respiratorios del Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" y muy especialmente a los Dres. Pilar Pérez Breña y Juan Emilio Echaverría del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III de España, por habernos suministrado tan amablemente los cebadores y las cepas prototipos o controles que fueron utilizados en este trabajo.

REFERENCIAS.

- 1.- Welliver J R, Welliver RC. Bronchiolitis. *Pediatr Rev* 1993;14:134-9.
- 2.- Neves JL, Fonseca C, Cardoso MJ, Azevedo A, Bonito A. Relación entre subtipo del Virus Respiratorio Sincitial y la gravedad Clínica en la bronquiolitis. *An Esp Ped* 2001; 54 (6): 558-65.
- 3.- Hall BC. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001; 344:1917-28.
- 4.- Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol* 2001; 11:103-16.
- 5.- Freymuth F, Vabret F, Galateau-Salle F, Ferey G, Eugene J, Petitjean E, *et al.* Detection of respiratory syncytial virus, parainfluenzavirus 3, adenovirus and rhinovirus sequence in respiratory tract of infants by polymerase chain reaction and hybridisation. *Clin Diagn Virol* 1997; 8: 31-40.
- 6.- Savón C, Valdés O, Aguilar J, Goyenechea A, González-Muñoz G, Palerm L, *et al.* Diagnóstico del virus sincitial respiratorio en una población pediátrica en dos temporadas epidémicas. (2000-2001).Cuba. *Rev Lati Microbiol* 2002; 44(Suppl 1):21-2.
- 7.- Cancio R, Savón C, Oropesa S, Abreu I, Pérez L, Hernández B *et al.* Diagnóstico rápido de los principales virus respiratorios en la Ciudad de la Habana 1995-1997. *Rev Argentina Microbiol.* 2000; 32:21-6.
- 8.- Goyenechea A, Bello M, Clua A, Savón C, Valdivia A, Oropesa S, *et al.* Determinación de los anticuerpos fijadores del complemento al virus sincitial respiratorio. Estudio longitudinal en una población menor de un año. Ciudad de la Habana. *Rev Med Trop* 1994; 46:79-85.
- 9.- Organización Panamericana de la Salud. Manual de Procedimientos Diagnósticos de las Infecciones Respiratorias Agudas de Etiología Viral. La Habana 2003.
- 10.- Casas I, Powell L, Klapper P E, Cleator G M. New method for extraction of viral RNA and DNA from cerebrospinal fluid for use in the polymerase chain reaction assay. *J Virol Methods* 1995; 53:25-36.
- 11.- American Type Culture Collection (ATCC).Catalogue of Cell Lines and Hybridomas 7thed Rockville MD. ATCC; 1992. p47.
- 12.- Pérez-Breña P. Estudio comparativo de cepas de virus respiratorio sincitial seleccionadas según criterios clínicos epidemiológicos (disertación de tesis doctoral Universidad Complutense de Madrid 1998).
- 13.- Echevarría JE, Erdman D, Swierkoz E M, Holloway B, Anderson L. Simultaneous detection and identification of human Parainfluenza Viruses 1,2 and 3 from clinical samples by Multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1388-91.
- 15.- Valdés O, Martínez I, Valdivia A, Cancio R, Savón C, Goyenechea A, *et al.* Unusual antigenic and genetic characteristics of human respiratory syncytial virus isolated in Cuba. *J Virol* 1998; 72:7589-92.
- 16.- Hall CB, McCarthy CA. Respiratory Syncytial Virus. En: Mandell GI, Bennett JE, Dolin R eds. Philadelphia: Churchill Livingstone; 2000. p. 1782-1801.
- 17.- Shay DK, Holman RC, Newman RD, Lui LL, Stout J W, Anderson LL. Bronchiolitis associated to hospitalizations among US Children.1980-1996. *JAMA* 1999; 282: 1440-6.
- 18.- Grubor B, Gallup JM, Meyerholz DK, Crouch, EC, Evans RB, Brogden KA *et al.* Enhanced surfactant protein and defensin mRNA levels and reduced viral replication during Parainfluenza Virus Type 3 pneumonia in neonatal lambs. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004; 11:599-607.
- 18.- Van Den Hoogen, de Jong JC, Groen J, Kuriken T, Fouchier R, Osterhaus A. Newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Medicine* 2001; 7:719-24.
- 19.- Greensill J, Mcnamara P, Dove W, Flanagan B, Smyth R L, Hart A. Human Metapneumovirus in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Emerg Infect Dis* 2003; 18:372-5.