



Falta de associação entre carga viral e gravidade da bronquiolite aguda em lactentes

Ana Paula Duarte de Souza¹, Lidiane Alves de Azeredo Leitão²,
Fernanda Luisi², Rodrigo Godinho Souza², Sandra Eugênia Coutinho²,
Jaqueline Ramos da Silva², Rita Mattiello², Paulo Márcio Condessa Pitrez²,
Renato Tetelbom Stein², Leonardo Araújo Pinto²

1. Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Centro Infantil, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.
2. Laboratório de Respirologia Pediátrica, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Infant Center, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

Recebido: 22 setembro 2015.

Aprovado: 25 Fevereiro 2016.

Trabalho realizado no Centro Infantil, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS – Porto Alegre (RS) Brasil.

RESUMO

Objetivo: Investigar a correlação entre a carga viral do vírus sincicial respiratório e o tempo de internação hospitalar em lactentes com episódios de sibilância aguda.

Métodos: Este foi um estudo transversal de dois anos envolvendo lactentes de até 12 meses de idade com bronquiolite no momento da internação em um hospital terciário. Para a identificação dos vírus respiratórios foram coletadas secreções nasofaríngeas. As amostras foram analisadas (por todo o período do estudo) por imunofluorescência direta e (no segundo ano do estudo) por PCR quantitativa em tempo real para três vírus humanos (rinovírus, vírus sincicial respiratório e metapneumovírus). **Resultados:** Das 110 amostras avaliadas por imunofluorescência direta, 56 (50,9%) foram positivas para um único vírus, e 16 (14,5%) foram positivas para dois ou mais vírus. Nessas 72 amostras, o vírus mais prevalente foi o vírus sincicial respiratório, seguido por influenza. Das 56 amostras avaliadas por PCR quantitativa em tempo real, 24 (42,8%) foram positivas para um único vírus, e 1 (1,7%) foi positiva para dois vírus. Nessas 25 amostras, o vírus mais prevalente foi o vírus sincicial respiratório, seguido por rinovírus humano. A coinfeção não influenciou o tempo de internação ou outros desfechos. Além disso, não houve associação entre a carga viral de vírus sincicial respiratório e o tempo de internação.

Conclusões: A coinfeção e a carga viral do vírus sincicial respiratório não parecem influenciar os desfechos em lactentes com bronquiolite aguda.

Descritores: Bronquiolite; Coinfeção; Carga viral; Hospitalização; Vírus sincicial respiratório humano.

INTRODUÇÃO

O desconforto respiratório e a sibilância são sintomas respiratórios muito comuns em crianças e podem ser a expressão clínica de uma grande variedade de problemas no trato respiratório. Independentemente da causa, a sibilância é um motivo frequente de procura por cuidados médicos em serviços de emergência, especialmente durante os primeiros anos de vida.⁽¹⁾ A principal causa de sibilância em lactentes é a bronquiolite viral aguda, a qual é frequentemente acompanhada por outros fatores de risco, tais como o tabagismo materno e o nascimento prematuro.

Um estudo relatou que quase metade de uma população com menos de um ano de idade atendida em um serviço de emergência apresentava sintomas respiratórios.⁽²⁾ Em outro estudo, foi relatado que 17% das crianças com sibilância haviam sido internadas pelo menos uma vez durante o primeiro ano de vida.⁽³⁾ A principal causa de internação hospitalar entre aqueles lactentes foi bronquiolite aguda causada por infecção por vírus da família Paramyxoviridae, a qual incluiu o vírus sincicial respiratório (VSR) humano, do gênero *Pneumovirus*. Outros agentes que têm sido frequentemente ligados à bronquiolite e à sibilância recorrente incluem: vírus

da família Adenoviridae, inclusive os vários adenovírus humanos dentro do gênero *Mastadenovirus*; vírus da família Picornaviridae, tais como os do gênero *Enterovirus*, o qual compreende vários rinovírus humanos (HRVs, na sigla em inglês), inclusive as espécies *Human rhinovirus A, B e C*; outros vírus da família *Paramyxoviridae*, especialmente as várias espécies *Human parainfluenza virus* do gênero *Respirovirus* e *Human metapneumovirus* (HMPV) do gênero *Metapneumovirus*; e vírus da família *Orthomyxoviridae*, a qual inclui os gêneros *Influenza virus A, B e C*. A taxa de coinfeção também foi elevada. Em um estudo, o VSR ocorreu como infecção única em 68,8% das crianças com sibilância, enquanto quase um terço estava coinfectado por outro vírus respiratório.⁽⁴⁾ Os vírus mais frequentemente associados ao VSR são o HMPV e os HRVs.⁽⁵⁾ Tais infecções resultam em custos elevados para o sistema de saúde e comprometem a qualidade de vida dos lactentes e da família. Uma questão importante que ainda está aberta ao debate é o papel da carga viral, especialmente a do VSR, na determinação da gravidade dos episódios de sibilância aguda.⁽⁶⁾ No presente estudo, avaliou-se a ocorrência de infecção e coinfeção por vírus respiratórios em lactentes com sibilância no momento da admissão hospitalar, assim

Endereço para correspondência:

Leonardo A. Pinto. Hospital São Lucas da PUCRS, Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar, CEP 90.610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

Tel.: 55 51 3320-2313. Fax: 55 51 3320-3312. E-mail: leonardo.pinto@pucrs.br

Apoio financeiro: Este estudo recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

como a associação entre a carga viral e os desfechos relacionados à gravidade da doença.

MÉTODOS

Este foi um estudo transversal envolvendo lactentes de até 12 meses de idade com bronquiolite aguda admitidos em um hospital terciário — Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul — na cidade de Porto Alegre (RS) entre setembro de 2009 e agosto de 2011. Os critérios de inclusão foram ter ≤ 12 meses de idade; ter sido admitido com diagnóstico clínico de bronquiolite aguda (baseado em sintomas prodrômicos, com sibilância, estertores crepitantes e taquipneia); ter sido recrutado nas primeiras 48 h de internação; e ter história de manifestações clínicas de infecção do trato respiratório inferior (sibilância ou desconforto respiratório) há ≤ 72 h. Os pacientes com história de doença pulmonar relacionada à prematuridade (tal como a displasia broncopulmonar) foram excluídos, assim como aqueles com cardiopatia congênita, doença pulmonar crônica (fibrose cística ou bronquiolite obliterante) ou sintomas clínicos sugestivos de infecção por *Bordetella pertussis* e aqueles que haviam recebido macrolídeos previamente.

Os dados sobre as condições clínicas no momento da admissão hospitalar, os sinais vitais e os sinais de desconforto respiratório foram obtidos dos prontuários médicos. A anamnese foi realizada com os pais ou responsáveis, por meio de um questionário padronizado. As informações sobre a evolução clínica da doença até a alta, tais como o tempo de internação hospitalar, a duração da oxigenoterapia e a sibilância, assim como as informações relacionadas às variáveis demográficas na admissão, foram coletadas pelos médicos e pesquisadores do estudo.

No primeiro dia de internação, todos os pacientes foram submetidos a lavagem nasofaríngea para a identificação dos vírus respiratórios. Para evitar a inclusão de lactentes em período de convalescença, foram recrutadas e coletadas amostras apenas de pacientes com história de manifestações clínicas de infecção do trato respiratório inferior (sibilância ou desconforto respiratório) há ≤ 72 h. A coleta de amostras e a imunofluorescência são procedimentos de rotina na avaliação de lactentes com bronquiolite no Hospital São Lucas, embora a PCR não o seja. Todas as amostras coletadas durante o segundo ano do estudo foram congeladas a -80°C e armazenadas para posteriores testes de PCR.

Foi realizada imunofluorescência direta (IFD) para VSR, adenovírus, parainfluenza e influenza para a detecção de antígenos nas secreções nasofaríngeas. Para a IFD, foi utilizado um anticorpo específico marcado com fluorocromo conjugado (Biotrin, Dublin, Irlanda) para as detecções dos grupos e tipos específicos de anticorpos monoclonais e a confirmação por cultura. Esse teste foi realizado em todos os pacientes avaliados durante o período do estudo (setembro de 2009 a agosto de 2011) e foi utilizado para investigar o papel do número de vírus diferentes na determinação da gravidade da bronquiolite aguda. Foram definidos dois grupos de pacientes: aqueles infectados por um único vírus e aqueles infectados por dois ou três vírus.

As amostras coletadas no segundo ano do estudo foram submetidas à PCR em tempo real para VSR,

HRV e HMPV. O RNA total foi extraído pelo método TRIzol (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O cDNA foi sintetizado com o kit Superscript III (Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) e quantificado com o ensaio Qubit (DNA HS; Invitrogen). A qualidade do cDNA para cada paciente foi testada por amplificação do gene endógeno β -actina utilizando-se um sistema de PCR em tempo real (StepOne™; Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), incluindo TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) e *primers* específicos (Applied Biosystems). As amostras que não amplificaram a β -actina foram excluídas da análise. As reações de PCR quantitativa em tempo real foram realizadas para amplificar genes específicos de HRV, VSR e HMPV utilizando-se 4 ng de cDNA em triplicata para cada paciente. As sequências de *primers*, sintetizadas e clonadas em plasmídeos pUC57 (GenScript, Piscataway, NJ, EUA), foram utilizadas para fazer uma diluição de 10 vezes e gerar uma curva padrão iniciando-se em 4 ng. Esse teste foi realizado em todos os pacientes durante o segundo ano do estudo (setembro de 2010 a agosto de 2011) e foi utilizado para investigar o efeito da carga viral nos marcadores de gravidade da bronquiolite.

A carga viral (em cópias/ml) foi calculada a partir da quantidade de cDNA utilizada na PCR. A análise estatística da carga viral foi realizada por meio do programa GraphPad Prism, versão 5.02 (Graphpad Software, San Diego, CA, EUA).

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Protocolo nº 09/04 678). Os pais ou responsáveis legais de todos os participantes assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido.

Os dados foram resumidos como média \pm desvio-padrão ou como mediana e intervalo interquartil, dependendo de sua distribuição. As características foram comparadas entre os dois grupos. As variáveis apresentaram distribuição não paramétrica. O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar variáveis contínuas entre os grupos. Para correlacionar variáveis contínuas (por ex., a carga viral e o tempo de internação hospitalar), foram utilizados os testes de correlação de Spearman ou de Pearson. O nível de significância estatística foi de $p \leq 0,05$. A análise dos dados foi realizada por meio do programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

RESULTADOS

Entre setembro de 2009 e agosto de 2011, foram recrutados 127 pacientes, dos quais 110 preencheram todos os critérios de inclusão (primeiro episódio de sibilância). Informações clínicas foram coletadas para todos os pacientes incluídos. Em todos os 110 pacientes, as amostras nasais coletadas foram adequadas para análise por IFD, e 56 amostras foram submetidas a PCR quantitativa em tempo real para identificação de

vírus respiratórios específicos (HRV, VSR e HMPV). A média de idade dos pacientes foi de 3,21 meses, e 62 (56,3%) dos 110 pacientes eram do sexo masculino (Tabela 1). Dos 110 lactentes avaliados, 109 (99,1%) apresentavam retrações subcostais ou intercostais e necessitaram de oxigenoterapia. A média do tempo de internação foi de 6 dias, e nenhum desses lactentes foi admitido na unidade de terapia intensiva ou necessitou de ventilação mecânica (Tabela 1).

Das 110 amostras analisadas por IFD, 72 (65,4%) apresentaram resultado positivo para um vírus e 38 (34,6%) apresentaram resultado negativo. O vírus mais comum foi o VSR, o qual foi identificado em 65 (90,2%) das 72 amostras positivas, seguido por influenza, identificado em 15 (20,8%); parainfluenza, identificado em 10 (13,8%); e adenovírus, identificado em 3 (4,1%). Na amostra total, 56 (50,9%) dos 110 pacientes apresentaram resultado positivo para um vírus e 16 (14,5%) apresentaram resultado positivo para dois ou três vírus. A coinfeção não mostrou influência sobre o tempo de internação hospitalar ou qualquer outra variável (Tabela 2). Entre as 56 amostras analisadas por PCR quantitativa em tempo real (durante o segundo ano do estudo), especificamente para avaliar o impacto da carga viral, o VSR foi novamente o vírus mais frequentemente detectado, sendo identificado em 19 (76%) das 25 amostras positivas, seguido por HRV, identificado em 4 (16%), e HMPV, identificado em 2 (8%). A análise por PCR quantitativa em tempo real

mostrou que, no segundo ano do estudo, 31 (55,3%) dos 56 pacientes apresentaram resultado negativo, 24 (42,8%) apresentaram resultado positivo para um vírus, e 1 (1,7%) apresentou resultado positivo para dois vírus.

As médias das cargas virais para VSR, HRV e HMPV foram de 1.340.000 cópias/ml, 614.000 cópias/ml e 175.000 cópias/ml, respectivamente. Como se pode observar na Figura 1, a carga viral do VSR nas secreções nasais, determinada por PCR em tempo real, não mostrou correlação significativa com os marcadores de gravidade clínica em nossa casuística ($p > 0,05$). Constatamos que as cargas virais não influenciaram o tempo de internação hospitalar ou a duração dos episódios de sibilância.

DISCUSSÃO

Em nosso estudo, as cargas virais do VSR em lactentes com sibilância não influenciou o tempo de internação hospitalar, o qual foi utilizado como marcador de gravidade da bronquiolite aguda ou dos episódios de sibilância. Dado o papel das infecções virais na sibilância, a hipótese de que cargas virais elevadas ou coinfeção por diferentes tipos de vírus poderiam influenciar a história natural da sibilância aguda é razoável e lógica.⁽⁷⁾ Porém, a associação entre as cargas virais e a gravidade permanece incerta e controversa na literatura, assim como a associação

Tabela 1. Características dos pacientes de acordo com o questionário preenchido na admissão e variáveis associadas à gravidade clínica.^a

| Características | Bronquiolite aguda (primeiro episódio de sibilância) (N = 110) |
|--------------------------------------|---|
| Idade, meses | 3,21 ± 2,5 |
| Sexo masculino, n (%) | 62 (56,3) |
| Peso atual, kg | 5,66 ± 1,90 |
| Irmãos, n (%) | 67 (60,9) |
| Tempo de internação hospitalar, dias | 6,05 ± 3,22 |
| Frequência respiratória, ciclos/min | 50,58 ± 11,60 |
| SpO ₂ na admissão, % | 95,27 ± 3,42 |
| Retrações, n (%) | 109 (99,1) |
| Ventilação mecânica, n (%) | 0 (0,0) |
| Uso de esteroides orais, n (%) | 8 (7,3) |

^aResultados apresentados em média ± desvio-padrão, exceto onde indicado.

Tabela 2. Gravidade associada ao número de vírus respiratórios identificados por imunofluorescência direta.^a

| Variáveis | Número de vírus identificados | | p* |
|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------|-------|
| | 1 (n = 56) | 2-3 (n = 16) | |
| Idade, meses | 3,00 ± 2,47 | 2,38 ± 2,42 | 0,373 |
| Peso atual, kg | 5,51 ± 1,88 | 5,50 ± 1,90 | 0,974 |
| Frequência respiratória, ciclos/min | 51,09 ± 12,51 | 49,06 ± 10,53 | 0,557 |
| SpO ₂ na admissão, % | 95,14 ± 3,46 | 94,63 ± 3,52 | 0,601 |
| Dias de oxigenoterapia | 6,17 ± 2,93 | 5,44 ± 2,96 | 0,377 |
| Tempo de internação hospitalar, dias | 6,83 ± 3,22 | 5,63 ± 3,22 | 0,188 |
| Duração da sibilância, dias | 4,51 ± 2,93 | 3,81 ± 3,01 | 0,402 |

^aResultados apresentados em média ± desvio-padrão. *Comparações pelo teste t de Student.

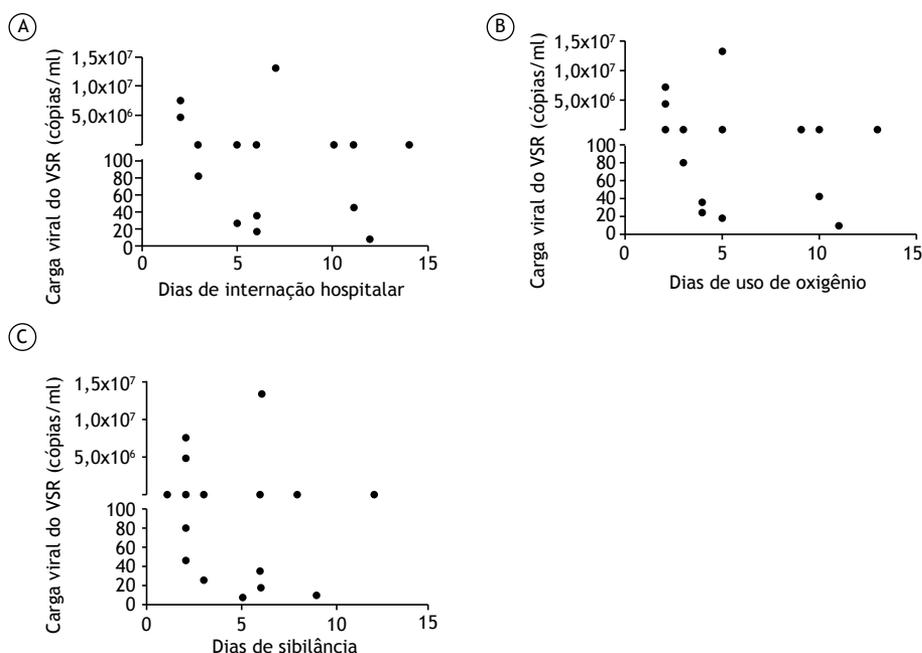


Figura 1. Carga viral do vírus sincicial respiratório (VSR), em relação a dias de internação hospitalar (A*), dias de uso de oxigênio (B) e dias de sibilância (C). * $r = -0,217$; $p = 0,372$.

entre a coinfeção e a gravidade.⁽⁸⁻¹¹⁾ Na prática clínica, o tamanho da carga viral e a infecção por mais de um vírus podem gerar incerteza quanto ao prognóstico de tais infecções.⁽⁴⁾ No presente estudo, a gravidade da sibilância aguda não foi afetada pelas cargas virais do VSR nas secreções nasofaríngeas.

Quando se utilizou a IFD para diagnosticar infecção por vírus respiratórios (influenza, parainfluenza, adenovírus ou VSR), constatou-se que aproximadamente 65% das amostras foram positivas para pelo menos um desses patógenos. Nossos resultados de IFD são semelhantes aos obtidos em estudos prévios na literatura, nos quais a taxa relatada de infecção por vírus respiratórios entre crianças com sintomas respiratórios varia de 45% a 70%.⁽¹²⁾ No presente estudo, o VSR foi o patógeno mais prevalente, seja isoladamente ou em conjunto com outro vírus.

A PCR em tempo real foi positiva para VSR, HRV e HMPV em 44,6% das amostras analisadas. Essa taxa de positividade contrasta com os 93,5% relatados em um estudo que utilizou PCR convencional e em tempo real para 12 diferentes vírus respiratórios.⁽¹³⁾ Porém, é semelhante às taxas relatadas em estudos utilizando apenas PCR em tempo real, as quais variaram de 44% a 64%.^(14,15) Nosso estudo teve poder insuficiente para analisar o impacto da coinfeção na gravidade da doença. Atualmente, os efeitos relatados da coinfeção na carga de doença entre crianças são inconsistentes e controversos. Uma possível explicação é que tais efeitos ocorrem apenas em circunstâncias específicas, tais como a coinfeção VSR/HRV⁽⁵⁾ ou a coinfeção VSR/HMPV. Além disso, vários fatores ambientais também podem ser determinantes da gravidade das infecções respiratórias virais, da mesma forma que variações

genéticas em genes ligados à resposta imune contra infecções.⁽¹³⁻¹⁵⁾

No presente estudo, acreditamos que a ausência de associação entre a carga viral e as medidas de desfecho relacionadas à gravidade destaca-se como principal resultado. Em tal análise, poder-se-ia esperar uma correlação ou tendência gráfica entre as variáveis carga viral e tempo de internação hospitalar. Porém, não houve absolutamente nenhuma tendência ou correlação entre as duas. Estudos prévios sobre a carga viral e a gravidade também relataram achados conflitantes. Poucos estudos investigaram a associação entre a gravidade da doença e a carga viral. Fodha et al.⁽¹⁰⁾ descreveram uma correlação positiva entre a carga viral do VSR e a gravidade da doença (determinada pela frequência respiratória, tempo de internação hospitalar e necessidade de admissão em unidade de terapia intensiva) em crianças internadas com infecção respiratória. Zhou et al.⁽¹⁶⁾ e Hasegawa et al.⁽¹⁷⁾ mostraram que uma maior média da carga viral do VSR associou-se a maior gravidade da doença, assim como a maior duração da internação hospitalar e sintomas. Entretanto, também há relatos de associações negativas e inversas. Martin et al.⁽¹¹⁾ relataram que o aumento da carga viral em crianças infectadas pelo VSR associou-se a diminuição de internações, do uso de antibióticos e da frequência respiratória. Em comparação com nossa amostra de pacientes, a amostra avaliada por aqueles autores foi consideravelmente maior, compreendendo 1.264 lactentes, dos quais 418 apresentaram resultado positivo para VSR por PCR quantitativa. Os autores detectaram associações inversas limitrofes (por ex., OR = 0,80; IC95%: 0,70-0,99 para internação hospitalar). Considerando-se esses achados, há que se aventar

a possibilidade de associações aleatórias ou ausência de associação entre a carga viral e a gravidade da doença em episódios de sibilância aguda.

Nosso estudo tem algumas limitações relevantes, tais como o pequeno tamanho da amostra, a coleta de uma única amostra nasal e a utilização de testes de PCR apenas em um subamostra. Porém, nossos achados contribuem para o conhecimento atual sugerindo que não há correlação entre a carga viral e a gravidade da doença respiratória em lactentes.

Em conclusão, segundo nossos resultados, a coinfeção e a carga viral não parecem influenciar os principais desfechos em bronquiolite aguda. Constatamos também que as cargas virais do VSR em lactentes com sibilância não influenciaram a gravidade dos episódios de sibilância aguda no primeiro ano de vida. Novos estudos que investiguem os efeitos da carga viral e das combinações virais podem ajudar a esclarecer essa questão importante e controversa.

REFERÊNCIAS

1. Sole D. Childhood wheezing [Article in Portuguese]. *J Bras Pneumol.* 2008;34(6):337-9. PMID: 18622498
2. Kotaniemi JT, Pallasaho P, Sovijärvi AR, Laitinen LA, Lundbäck B. Respiratory symptoms and asthma in relation to cold climate, inhaled allergens, and irritants: a comparison between northern and southern Finland. *J Asthma.* 2002;39(7):649-58. <http://dx.doi.org/10.1081/JAS-120014930>
3. Lima JA, Fischer GB, Sarria EE, Mattiello R, Sole D. Prevalence of and risk factors for wheezing in the first year of life. *J Bras Pneumol.* 2010;36(5):525-31. PMID: 21085816
4. De Paulis M, Gilio AE, Ferraro AA, Ferronato AE, do Sacramento PR, Botosso VF, et al. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J Pediatr (Rio J).* 2011;87(4):307-13. <http://dx.doi.org/10.2223/JPED.2100>
5. da Silva ER, Pitrez MC, Arruda E, Mattiello R, Sarria EE, de Paula FE, et al. Severe lower respiratory tract infection in infants and toddlers from a non-affluent population: viral etiology and co-detection as risk factors. *BMC Infect Dis.* 2013;13:41. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2334-13-41>
6. Miron D, Srugo I, Kra-Oz Z, Keness Y, Wolf D, Amirav I, et al. Sole pathogen in acute bronchiolitis: is there a role for other organisms apart from respiratory syncytial virus? *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(1):e7-e10. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e3181c2a212>
7. 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(3):213-7. <http://dx.doi.org/10.1097/INF.0b013e31815b4935>
8. Stempel HE, Martin ET, Kuypers J, Englund JA, Zerr DM. Multiple viral respiratory pathogens in children with bronchiolitis. *Acta Paediatr.* 2009;98(1):123-6. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1651-2227.2008.01023.x>
9. Franz A, Adams O, Willems R, Bonzel L, Neuhausen N, Schweizer-Krantz S, et al. Correlation of viral load of respiratory pathogens and co-infections with disease severity in children hospitalized for lower respiratory tract infection. *J Clin Virol.* 2010;48(4):239-45. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2010.05.007>
10. Fodha I, Vabret A, Ghedira L, Seboui H, Chouchane S, Dewar J, et al. Respiratory syncytial virus infections in hospitalized infants: association between viral load, virus subgroup, and disease severity. *J Med Virol.* 2007;79(12):1951-8. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21026>
11. Martin ET, Kuypers J, Heugel J, Englund JA. Clinical disease and viral load in children infected with respiratory syncytial virus or human metapneumovirus. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2008;62(4):382-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.08.002>
12. Calegari T, Queiroz DA, Yokosawa J, Silveira HL, Costa LF, Oliveira TF, et al. Clinical-epidemiological evaluation of respiratory syncytial virus infection in children attended in a public hospital in midwestern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2005;9(2):156-61. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-86702005000200006>
13. 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 Respir Viruses.* 2012;6(1):71-7. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00265.x>
14. 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(4):716-23. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.21108>
15. Jennings LC, Anderson TP, Werno AM, Beynon KA, Murdoch DR. Viral etiology of acute respiratory tract infections in children presenting to hospital: role of polymerase chain reaction and demonstration of multiple infections. *Pediatr Infect Dis J.* 2004;23(11):1003-7. <http://dx.doi.org/10.1097/01.inf.0000143648.04673.6c>
16. Zhou L, Xiao Q, Zhao Y, Huang A, Ren L, Liu E. The impact of viral dynamics on the clinical severity of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Med Virol.* 2015;87(8):1276-84. <http://dx.doi.org/10.1002/jmv.24111>
17. Hasegawa K, Jartti T, Mansbach JM, Laham FR, Jewell AM, Espinola JA, et al. Respiratory syncytial virus genomic load and disease severity among children hospitalized with bronchiolitis: multicenter cohort studies in the United States and Finland. *J Infect Dis.* 2015;211(10):1550-9. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiu658>