



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.



ELSEVIER  
MASSON

Disponible en ligne sur  
 ScienceDirect  
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France  
  
www.em-consulte.com

PATHOLOGIE  
BIOLOGIE

Pathologie Biologie 57 (2009) 133–141

## Métapneumovirus humain

## Human metapneumovirus

F. Freymuth<sup>a,\*</sup>, A. Vabret<sup>a</sup>, L. Legrand<sup>b</sup>, J. Dina<sup>a</sup>, S. Gouarin<sup>a</sup>,  
D. Cuvillon-Nimal<sup>c</sup>, J. Brouard<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de virologie humaine et moléculaire, CHU, avenue Georges-Clemenceau, 14033 Caen cedex, France

<sup>b</sup> Laboratoire départemental Frank-Duncombe, 14000 Caen, France

<sup>c</sup> Services de pédiatrie et de néonatalogie, CHU, avenue Georges-Clemenceau, 14033 Caen cedex, France

Reçu le 20 mars 2008 ; accepté le 11 avril 2008

Disponible sur Internet le 2 juin 2008

### Résumé

Le métapneumovirus humain (hMPV) est un nouveau *Pneumovirinae* apparenté au métapneumovirus aviaire du type C. Le génome du hMPV diffère de celui du virus respiratoire syncytial humain (RSV) par l'ordre des gènes et le manque des gènes non structuraux. Deux sous-groupes génétiques de hMPV et quatre sous-types ont été identifiés. Les infections à hMPV évoluent sous forme d'épidémies hivernales régulières, superposées à celle du RSV et d'importance à peu près égale d'une année sur l'autre. Chez les enfants hospitalisés à Caen, le hMPV est détecté dans 9,7 % des cas, après le RSV (37 %), les rhinovirus (18 %), les virus influenza (15,4 %), les adénovirus (9 %) et les virus parainfluenza (5 %). La plupart des infections à hMPV sont observées chez des enfants atteints de bronchiolites, mais par comparaison à l'infection à RSV, l'atteinte respiratoire basse et les signes de gravité sont moins fréquents. Le hMPV est très difficile à isoler en cultures des cellules. Le diagnostic a reposé jusqu'ici sur la détection moléculaire par RT-PCR. L'apparition récente des tests antigéniques permet de disposer aujourd'hui d'un test de diagnostic rapide, simple et économique.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

### Abstract

The human metapneumovirus (hMPV) is a new *Pneumovirinae* related to the avian metapneumovirus type C. hMPV genome differs from human respiratory syncytial virus (RSV) genome by the gene order and the lack of nonstructural genes. Two genetic sub-groups and four sub-types of hMPV are identified. hMPV infections evolve as regular winter outbreaks which have roughly the same size and overlapping RSV epidemics. Among hospitalized children in Caen, hMPV is detected in 9.7% of the cases after RSV (37%), rhinovirus (18%), influenza virus (14.5%), adenovirus (9%), and parainfluenza virus (5%). Most of hMPV infections are observed in children suffering from bronchiolitis, but the localization to lower respiratory tract and the severity of the disease are less frequent in comparison with RSV infections. hMPV is very difficult to isolate using cell culture. Up to now, the only way for hMPV diagnosis was the TS-CRP assays. But the recent apparition of direct antigenic tests allows us to get a fair, rapid, and economic diagnostic tool.

© 2008 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

**Mots clés :** Métapneumovirus ; Humain ; Bronchiolite ; Diagnostic

**Keywords:** Metapneumovirus; Human; Bronchiolitis; Diagnosis

Le métapneumovirus humain (hMPV) a été découvert par une équipe hollandaise en 2001 dans le nasopharynx de jeunes enfants atteints d'infection respiratoire aiguë, mais ce n'est pas

un virus nouveau puisqu'il circulait déjà en Hollande en 1958 [1]. C'est un authentique pathogène des voies respiratoires puisqu'une maladie respiratoire expérimentale peut être reproduite après infection du singe macaque [2].

Il est classé dans le genre Métapneumovirus, qui constitue avec le genre Pneumovirus (virus respiratoire syncytial [RSV]), la sous-famille des *Paramyxovirinae*, dans la famille des

\* Auteur correspondant.

Adresse e-mail : freymuth-f@chu-caen.fr (F. Freymuth).

*Paramyxoviridae*. Ce genre comprend les métapneumovirus aviaires, responsables de la rhinotrachéite de la dinde et d'infections respiratoires aiguës chez d'autres oiseaux [3,4].

## 1. Propriétés du hMPV

En microscopie électronique, le hMPV se présente sous l'aspect des particules, grossièrement sphériques, d'environ 100 nm de diamètre (Fig. 1). Il comporte une enveloppe lipidique hérissée de projections et contient une nucléocapside dont la longueur est comprise entre 200 et 1000 nm, et le diamètre est de 17 nm.

### 1.1. Génome viral

Il est constitué d'un ARN négatif monobrin d'environ 13 KDa, comportant depuis l'extrémité 3', les gènes codant pour la nucléoprotéine N, la phosphoprotéine P, la protéine de matrice M, la protéine de fusion F, un facteur d'élongation de la transcription et de la régulation de la synthèse de l'ARN M2, une petite protéine hydrophobe de surface SH, la glycoprotéine majeure d'attachement G et le complexe polymérase L. Par rapport au RSV, le génome du hMPV n'a pas les deux gènes NS, et la position des gènes G et F est différente.

Les analyses phylogénétiques montrent que, parmi les membres de la sous-famille des *Pneumovirinae*, le hMPV est étroitement apparenté au sérotype C des pneumovirus aviaires, et qu'il existe des deux sous-groupes de hMPV [5,6]. Elles permettent d'identifier deux sous-groupes majeurs de hMPV et deux sous-groupes mineurs à l'intérieur de chacun d'eux [7–10]. La souche de référence du hMPV est la souche hollandaise : NETH-001 ; elle appartient au sous-groupe 1 ou A selon les auteurs. Les virus prototypes des deux sous-groupes de hMPV sont les souches canadiennes CAN97-83 (groupe 1 ou A) et CAN97-83 (groupe 2 ou B). Entre les deux sous-groupes de hMPV, tous les gènes ont de 81 à 87 % d'identité en séquences nucléotidiques, sauf les gènes SH et G

qui sont notablement plus divergents : 59 et 37 % d'identité en séquences nucléotidiques et en acides aminés pour G, et 69 et 59 % pour SH [11].

### 1.2. Protéines virales F et G

Le gène F du hMPV comporte 1,620 bases et code pour une protéine de 539 acides aminés. Comme celle du RSV, la protéine F du hMPV est une des protéines les mieux conservées du virus, bien qu'elle représente un déterminant majeur de neutralisation et qu'elle soit soumise à la pression immunologique. Elle est plus conservée entre les sous-groupes de hMPV qu'entre les sous-groupes de hRSV, ce qui entraîne une protection croisée significative entre les sous-groupes. Le gène G du hMPV comporte 660 nucléotides pour le groupe 1 et 711 pour le groupe 2 : il code pour une protéine de 231 à 236 acides aminés pour le groupe 2 et de 217 à 236 acides aminés pour le groupe 1 [12]. On observe une variation de la protéine G entre les souches du même sous-groupe, avec, par exemple, 77 et 70 % d'identité de la séquence nucléotidique et en acides aminés entre deux virus du sous-groupe 1 [11]. À l'inverse de ce qui est observé avec la protéine F, le haut degré de divergence de la protéine G, entre et à l'intérieur des sous-groupes de hMPV, réduit le rôle qu'elle peut jouer dans les neutralisations et les protections croisées entre les sous-groupes. La protéine G du hMPV est une glycoprotéine de type II comme celle du RSV. Sa structure générale lui ressemble, notamment dans la portion extracellulaire où se situent de nombreux sites de glycosylation et la plus forte variation de la structure en acides aminés. Mais elle s'en distingue par plusieurs points. Elle est plus petite que celle du RSV, et trois éléments lui manquent dans la portion extracellulaire [11,13]. Elle ne contient pas les 13 acides aminés conservés et les quatre résidus cystéines qui contribuent à former un nez cystéine ; cette structure a un rôle important dans la conformation de la protéine et la signalisation biologique [14]. Elle ne comporte pas le motif CX3C mimant un récepteur de chémokines [15]. Enfin, le second codon stop qui donne naissance à la forme soluble de la protéine G du RSV n'existe pas chez le hMPV [16]. Cette structure différente de la protéine G du hMPV lui confère certainement une variabilité et des fonctions dans l'infectivité et la protection différentes de celles de la protéine G du RSV.

### 1.3. Multiplication *in vitro*

Bien que très proches des virus aviaires, le hMPV n'infecte pas les oiseaux (dinde, poulet), et la multiplication du hMPV ne peut être tentée que sur des cellules de primates [1]. Au laboratoire l'isolement, des souches sauvages de hMPV est très difficile. Le virus a été isolé sur culture tertiaire de rein de singe et sur la lignée simienne LLC-MK2 [1,12,17]. La capacité à se développer en culture de cellules LLC-MK2 pourrait être liée au sous-groupe, l'isolement des souches du sous-groupe 2 ou B étant plus facile [14]. Il se multiplie faiblement sur les cellules Véro, A549, et la possibilité d'isoler le virus sur la lignée humaine HEp-2 a été récemment rapportée [18]. Sur les cellules permissives, la croissance virale est très lente et l'apparition

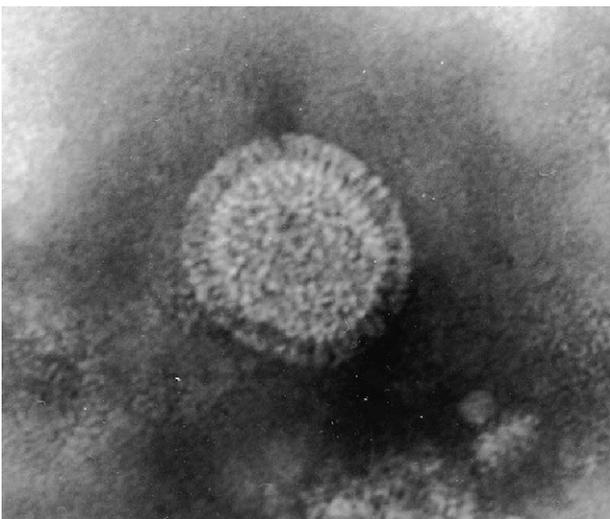


Fig. 1. Photographie en microscopie électronique d'une particule de hMPV (P. Lebon, Paris).

d'un effet cytopathogène inconstante. Les lésions cellulaires n'apparaissent pas avant la deuxième ou la troisième semaine de culture et nécessitent souvent des passages à l'aveugle. Les images de l'ECP sont peu spécifiques et elles varient selon les souches. Après plusieurs passages sur cellules LLC-MK2, certaines souches produisent des plages de lyse. Le cycle de multiplication du hMPV n'est pas connu à ce jour. Il doit ressembler à celui des métapneumovirus aviaires et des outils de génétique inverse ont été développés dans ce sens [19].

## 2. Épidémiologie de l'infection à hMPV

Depuis la description initiale du hMPV par l'équipe hollandaise en 2001 [1], le virus a été trouvé dans de très nombreux pays sur tous les continents, y compris en France [20]. Dans les pays tempérés, en Europe de l'Ouest, l'infection à hMPV a une distribution saisonnière, hivernale, recouvrant parfaitement celle due au RSV. Nous avons pu le vérifier sur deux études menées chez des enfants hospitalisés au cours des hivers 2002–2003 et 2004–2005, dans lesquels les épidémies à RSV étaient très différentes en intensité et en chronologie : épidémie plus précoce et moins intense en 2002–2003 qu'en 2004–2005. La Fig. 2 montre bien la parfaite juxtaposition des épidémies à hMPV et RSV. Comme pour le hRSV, l'épidémie à hMPV débute assez brutalement en novembre ; elle culmine en décembre ou janvier et s'éteint très progressivement en mars. Il semble qu'elle n'ait pas la même répartition saisonnière selon les climats. Ainsi l'épidémie de l'hiver 2001–2002 culminait en décembre et janvier en France [20], mais elle culminait en mars et avril au Canada [21]. Cette survenue tardive de l'épidémie à hMPV a été aussi signalée à Hong-Kong [22].

L'épidémie à hRSV apparaît régulièrement chaque année, et dans ces deux études normandes, nous avons montré que l'incidence des infections à hMPV était la même entre les deux hivers. Sur 871 aspirations nasales prélevées en 2002–2003 et 593 en 2004–2005, ne contenant aucun virus détectable par la technique traditionnelle d'IF et de culture [23], le même pourcentage d'infections à hMPV 54 (9,7 %) et 52 (8,8 %) a été observé. Parmi les études françaises, deux faites à Reims en 2001–2002 et à Montpellier en 2003–2004 retrouvent une fréquence identique de 8,5 % [24,25] ; une autre étude faite à Dijon observe une différence de fréquence entre les épidémies de 2002–2003 : 10,1 % ; 2003–2004 : 3,1 % [26]. Dans les autres pays, l'incidence de l'infection à hMPV représente assez généralement 5 à 10 % des étiologies infectieuses virales chez l'enfant hospitalisé pour une atteinte respiratoire basse, avec des extrêmes allant de 1,5 à 43 % [27]. Beaucoup des différences observées entre les études tiennent aux variations dans le recrutement des patients, la pathologie, la chronologie, les conditions expérimentales, etc. Au total, on peut donc admettre que le niveau global d'infections à hMPV est à peu près le même d'un hiver à l'autre, comme pour le RSV. Chez l'enfant hospitalisé pour une infection respiratoire aiguë, l'infection à hMPV se situe, en fréquence, au quatrième rang des infections virales, quelles que soient les études. Notre étude réalisée pendant l'hiver 2002–2003 donne un ordre de grandeur de la fréquence des différents virus impliqués dans les

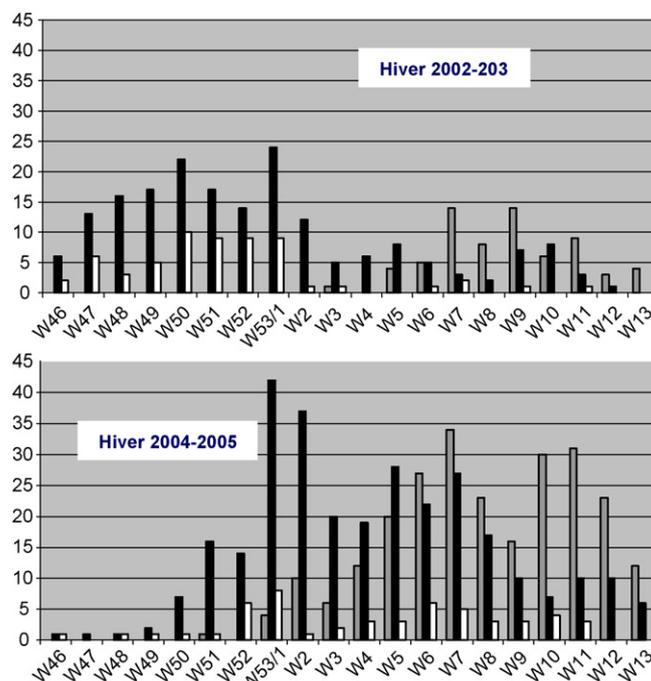


Fig. 2. Répartition saisonnière des infections à hMPV, RSV et virus influenza chez des enfants hospitalisés dans des hôpitaux normands au cours des hivers 2002–2003 et 2004–2005.

infections de ces enfants (Fig. 3). Evidemment, l'infection à RSV est majoritaire ; elle représente en général un peu plus d'un tiers (37 %) des virus identifiés chez les enfants hospitalisés. Puis viennent les infections à rhinovirus : 18 % ; les infections à virus influenza : 15,4 % (mais cette fréquence peut varier selon les années) ; l'infection à hMPV : 9,7 % ; les infections à adénovirus : 9,1 % ; les infections à virus parainfluenza : 5 %. La présence de hMPV chez les enfants asymptomatiques semble rare, mais le phénomène est difficile à analyser dans la mesure où, en période hivernale, la plupart des jeunes enfants peuvent être porteurs de virus du fait d'une infection récente, surtout s'ils sont en crèches, en nourrice, à l'école. . . Williams et al. rapportent 20 et 15 % d'infections à hMPV dans des atteintes des voies aériennes inférieures et supérieures chez l'enfant, entre 1976 et 2001, et ils ne trouvent du hMPV que dans un seul des 86 échantillons d'enfants asymptomatiques [28].

L'acquisition de l'infection par le hMPV découle du même mode de contamination respiratoire que l'infection à hRSV. À

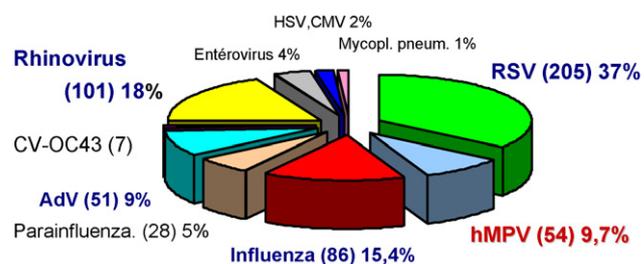


Fig. 3. Répartition des différents virus sur 556 aspirations nasales infectées par un virus au cours de l'hiver 2002–2003 (CHU de Caen).

partir d'observations faites dans l'infection expérimentale du macaque par le hMPV, on voit que les périodes d'incubation et d'excrétion virale sont courtes, de deux et huit jours, respectivement [29]. La contamination des enfants par le virus est très précoce. Les études de séroprévalence effectuées en Hollande, au Japon ou en Israël montrent que la majorité des enfants ont été infectés par le virus avant l'âge de cinq à dix ans [1,30,31]. En pathologie communautaire, l'infection à hMPV a été très peu étudiée. Lambert et al. ont recherché les virus respiratoires chez 543 enfants de moins de cinq ans atteints d'une infection respiratoire aiguë, sans facteurs de gravité. Les rhinovirus sont les virus les plus fréquemment détectés 269 (49,5 %) devant tous les autres virus, qui sont détectés dans moins de 10 % des cas. Des hMPV sont identifiés dans 33 cas (6 %) à un niveau voisin de celui des adénovirus 43 (8 %), du RSV 40 (7 %), des virus parainfluenza 33 (6 %). Des virus influenza A sont isolés dans 24 cas (4 %), et le coronavirus NL63 dans 18 cas (3 %) [32].

### 3. Clinique et physiopathologie des infections à hMPV

La majorité des études cliniques sur l'infection à hMPV ont été conduites chez des enfants hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë [27]. Les signes cliniques des infections à hMPV chez le jeune enfant sont comparables à ceux observés dans l'infection à RSV. Ils comportent des signes d'atteintes des voies aériennes supérieures et inférieures (rhinite, toux, dyspnée, *wheezing*...), et le diagnostic final est le plus souvent celui d'une bronchiolite [20,21,28,33–35]. Mais, comme pour l'épidémiologie, les résultats des études cliniques sont difficiles à comparer en raison de différences méthodologiques sur la population (pays d'origine, niveau socioéconomique, âge), l'analyse qui est rétrospective ou prospective, le type d'échantillon, la période d'étude, les critères nosologiques d'atteintes des voies aériennes inférieures. Ainsi par exemple, si l'on compare les trois dernières études françaises, de Reims [24], Montpellier [25] et Dijon [26], le diagnostic final retenu chez les enfants infectés par un hMPV est respectivement le suivant :

- celui de bronchiolite (100 %) dans la première étude ;
- de bronchiolite (65 %), de pneumonie (14 %), de crise d'asthme (5 %), d'infection des voies aériennes supérieures VAS (14 %) dans la deuxième étude ;
- de bronchiolite (51 %), de bronchite (15 %), de crise d'asthme (11 %), d'infection des VAS (29 %) dans la troisième étude.

Plusieurs travaux soulignent le rôle de cette infection dans le déclenchement des crises d'asthme [22,33,36].

D'autres manifestations cliniques ont parfois été trouvées associées aux signes respiratoires telles que otites, conjonctivites, difficultés alimentaires, diarrhées, vomissements, éruptions, convulsions fébriles [12,21,22,37]. Cependant, l'idée communément admise, par analogie avec l'infection à RSV, est que l'infection à hMPV reste limitée au tractus respiratoire. Cependant, deux observations d'encéphalites survenues chez

des enfants infectés par du hMPV peuvent suggérer une éventuelle diffusion du virus vers d'autres tissus ou organes [38,39].

Il est impossible d'étudier en détail tous les travaux cliniques sur l'infection à hMPV. Les premières études, telles que celle de Bach et al., par exemple, ne trouvaient en général aucune différence entre les infections à hMPV et RSV, notamment en ce qui concerne les motifs d'hospitalisation, les signes cliniques et la prise en charge thérapeutique [36]. Certains auteurs observaient cependant que l'infection à hMPV survenait plutôt chez des enfants plus âgés et avait tendance à être moins sévère en terme d'hypoxie ou de pneumonie [21,22,40,41]. On dispose aujourd'hui de comparaisons cliniques plus fines entre les infections à hMPV et RSV chez l'enfant hospitalisé. Dana et al. montrent, par exemple, que les infections à hMPV sont plus souvent associées à un diagnostic de pneumonie que les infections à RSV et virus influenza, et aussi plus souvent liées à un diagnostic d'asthme et moins souvent à un diagnostic de bronchiolite que l'infection à RSV. Ces auteurs soulignent que les enfants infectés par le hMPV sont un peu plus âgés et présentent plus de signes digestifs que les enfants infectés par le RSV [42]. Nous avons comparé la clinique de 46 infections à hMPV et 73 à RSV chez des nourrissons hospitalisés au cours de l'hiver 2004–2005. Les seuls éléments qui diffèrent de façon très significative ( $p < 0,001$ ) entre les deux groupes sont, à l'admission, les signes de détresse respiratoire, hMPV : 30,4 %, RSV : 60,3 %, le diagnostic final d'atteinte respiratoire basse, hMPV : 56,5 % ; RSV : 84,9 %, dont le diagnostic de bronchiolite, hMPV : 37 % ; RSV : 64,5 %, et enfin le recours à l'oxygénothérapie, hMPV : 15,2 % ; RSV : 31,5 % [43]. Manoha et al. notent une différence significative ( $p < 0,05$ ) de la fréquence d'hospitalisation des enfants entre l'infection à RSV : 67,2 % et à hMPV : 47,1 % [26].

#### 3.1. Le problème des co-infections

De nombreuses études ont signalé de fréquentes co-infections virales dans l'infection à hMPV. La plupart des virus respiratoires partagent la même saisonnalité et ont les mêmes cibles. Il n'est donc pas étonnant de les trouver associés dans un même échantillon. De plus, les techniques moléculaires, qui ont été le plus utilisées pour rechercher le hMPV, ont la capacité de détecter un portage post-aigu du virus plus prolongé que ne le font les outils traditionnels du diagnostic. Les points qui restent donc encore imprécis sont de savoir si ces co-infections sont fréquentes, et si l'existence d'une co-infection est un facteur aggravant de la pathologie respiratoire à hMPV. Maggi et al. n'observent pas une augmentation de la fréquence des bronchiolites ou des pneumonies lorsqu'un second virus respiratoire est isolé chez des enfants infectés par le hMPV [44]. Laham et al. ne relèvent aucune co-infection à RSV et hMPV dans une cohorte de 373 nourrissons présentant des signes respiratoires [45]. Lazar et al. observent que l'infection à hMPV n'aggrave pas la maladie à RSV [46]. En revanche, Greenshill et al. rapportent une grande fréquence de co-infections à RSV et hMPV ; 90 % des enfants infectés par le RSV et atteints de bronchiolites graves étaient co-infectés par le

hMPV [47]. Semple et al. montrent que la co-infection hMPV et RSV augmente de dix fois le risque pour un enfant d'être hospitalisé en réanimation pédiatrique [48]. L'association du hMPV au SARS CoV a été rapportée au Canada [18]. Mais l'hypothèse d'un pouvoir aggravant de la co-infection virale n'est pas confirmée dans l'infection expérimentale du singe [49].

### 3.2. La diversité génétique du hMPV

Toutes les études phylogénétiques montrent que les deux sous-groupes de hMPV comportent des sous-types et des variants génétiques (à l'intérieur de ceux-ci), et que tous ces génotypes circulent au cours des épidémies à l'intérieur d'un pays, comme à l'échelle mondiale. Par exemple, l'étude réalisée sur 64 souches de hMPV isolées dans diverses régions du monde montre la cocirculation des deux sous-groupes de hMPV dans les deux hémisphères [21]. La présence des quatre sous-types est également notée dans les épidémies rapportées par Foulongue et al. [25], et Monoha et al. [26]. Mackay et al. observent en Australie la circulation régulière des quatre sous-types de hMPV, A1, A2, B1, B2 au cours des épidémies survenues entre 2001 et 2004 ; le sous-groupe A prédomine au cours des hivers 2001 et 2002, le sous-groupe B au cours des hivers 2003 et 2004 ; certains hivers un sous-type est largement dominant, par exemple le sous-type A1 en 2001, A2 en 2002 et B1 en 2004 [50]. À Caen, nous avons séquencé 88 souches de hMPV détectées entre 2001 et 2005 (Fig. 4). Les résultats sont tout à fait comparables à ceux de Mackay et al. avec une majorité des souches du sous-groupe A détectées en 2001 et 2002, une majorité des souches du sous-

groupe B isolées en 2003 et 2004, et à l'intérieur des sous-groupes, une majorité de sous-types A1 en 2001, A2 en 2002 et B1 en 2004.

Donc, même si l'épidémiologie de l'infection à hMPV apparaît complexe, il semble exister une relative homogénéité de la distribution des sous-groupes entre les continents. La diversité génétique du hMPV pose aujourd'hui deux questions. La première est de savoir si les deux sous-groupes génétiques A et B correspondent à de réels sérotypes, ce qui n'a pas la même signification en terme de protection. La réponse est controversée. Van Den Hoogen et al., après étude des anticorps neutralisants obtenus par immunisation du furet, estiment que les deux sous-groupes génétiques de hMPV correspondent bien à deux sérotypes distincts [51]. Cependant, Skiadopoulos et al. montrent que la glycoprotéine F est un déterminant antigénique suffisant pour générer des neutralisations et des protections très élevées entre les deux sous-groupes de virus chez le hamster ou le singe rhésus ; ils pensent donc que les deux sous-groupes génétiques de hMPV ne sont pas formellement des sous-types antigéniques [52]. La seconde question est le lien éventuel entre sous-groupe ou génotype et gravité de l'atteinte clinique. Quelques différences ont en effet été rapportées entre les deux sous-groupes de hMPV. L'infection due au sous-groupe A serait plus fréquente chez le jeune enfant de moins de trois ans, et le sous-groupe B plus fréquemment isolé chez l'adulte [21]. En revanche, il n'y aurait pas de différences dans la gravité de l'infection par l'un ou l'autre des sous-groupes de hMPV. Agapov et al. montrent, par exemple, qu'il existe un glissement du génotype prédominant au fil des épidémies hivernales, et que, celui-ci est nécessaire au maintien du taux d'infection, mais ne modifie pas la maladie [53].

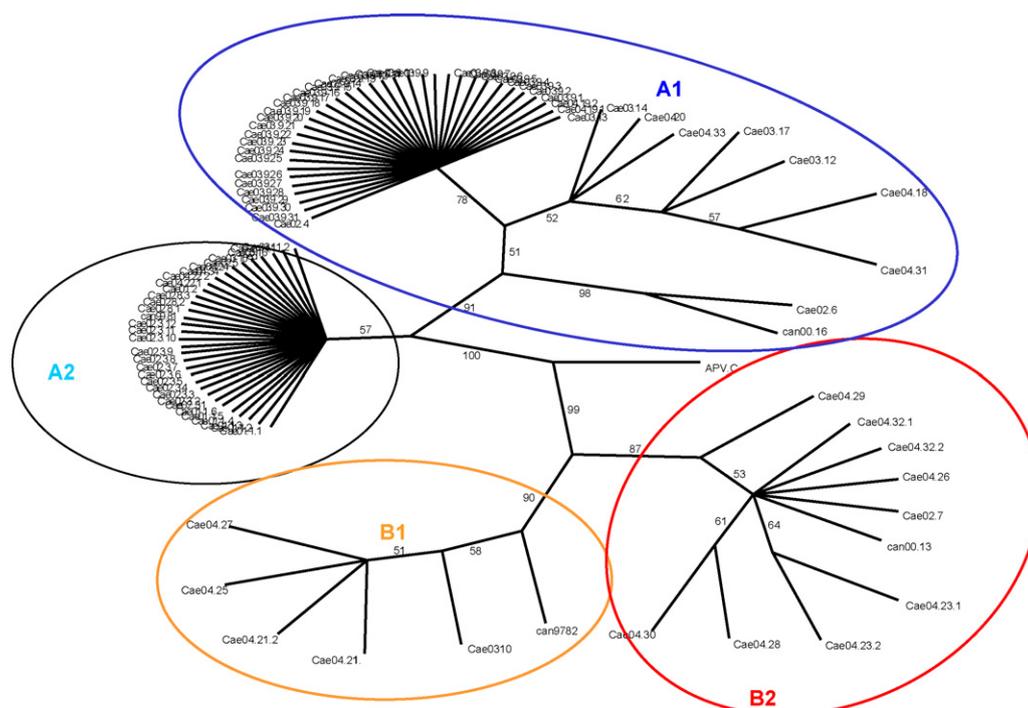


Fig. 4. Arbre phylogénétique du gène M de 88 souches de hMPV (CHU de Caen).

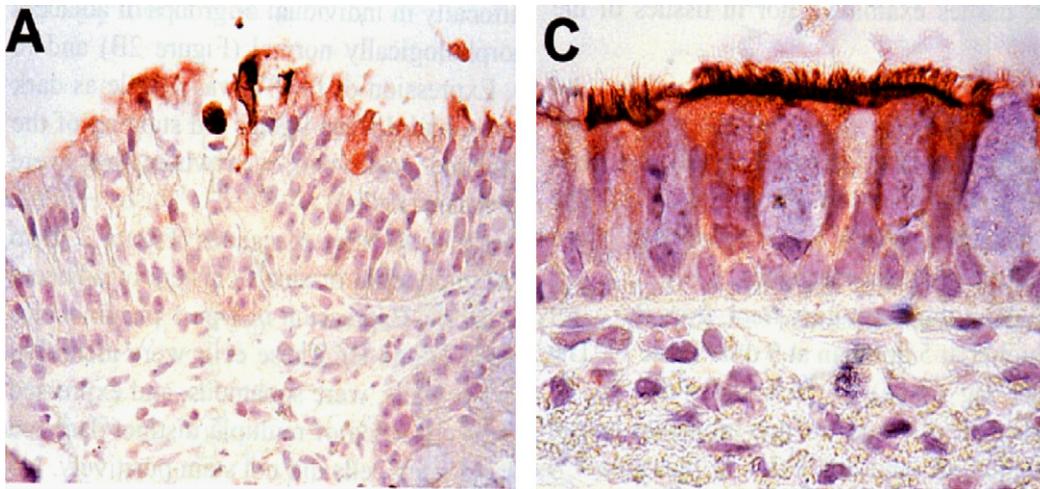


Fig. 5. Infection expérimentale du macaque par le hMPV. Marquage à l'immunoperoxydase du hMPV. Section de muqueuses nasales (A) et trachéales (B) : expression virale dans le cytoplasme (d'après Kuiken et al. [29] avec leur permission).

### 3.3. L'infection à hMPV chez l'adulte, les sujets âgés et les immunodéprimés

Comme dans l'infection à RSV, l'infection à hMPV peut entraîner une pneumonie interstitielle et peut être mortelle chez les sujets immunodéprimés, enfants ou adultes, et en particulier les greffés de moelle [12,54,55]. Le rôle des hMPV dans les infections respiratoires aiguës de l'adulte a été moins étudié. Une enquête faite à Rochester détecte 4,5 % d'infections à hMPV chez des adultes et des personnes âgées atteintes de pathologies respiratoires aiguës. Mais, comme l'infection est également décelée chez 4,1 % d'adultes asymptomatiques [56], le rôle pathogène effectif de ce virus chez l'adulte n'est pas démontré.

Chez l'adulte sain, l'infection à hMPV est souvent associée à des rhinites ou des syndromes grippaux. Stockton et al. identifient une infection à hMPV chez neuf (2,2 %) des 408 patients atteints d'un syndrome grippal pour lesquels la recherche des virus influenza et de hRSV était négative. Huit de ces patients étaient des adultes et six présentaient des signes d'atteinte du tractus respiratoire inférieur [57]. Falsey et al. observent une plus grande fréquence d'infections à hMPV chez les jeunes adultes et notent que les sujets âgés présentent des formes plus sévères [56]. Ces mêmes auteurs montrent aussi que le portage asymptomatique de hMPV et de RSV est très rare chez l'adulte, validant ainsi d'une certaine manière l'utilisation des outils moléculaires pour le diagnostic [58].

### 3.4. Physiopathologie de l'infection à hMPV

L'infection expérimentale du singe macaque cynomolgus par le hMPV permet d'étudier la physiopathologie de l'infection humaine [29]. Elle produit une atteinte clinique modérée des voies aériennes supérieures ; l'excrétion virale est maximale au quatrième jour après l'infection et disparaît au dixième jour. Les lésions de l'épithélium respiratoire sont modérées, avec une perte de la ciliature, une désorganisation de l'architecture épithéliale, un œdème intra- et intercellulaire, et

un afflux de polynucléaires neutrophiles. Après le marquage immunologique, l'expression virale s'observe surtout au pôle apical des cellules cylindriques ciliées (Fig. 5), et plus rarement dans les pneumocytes de type 1 et les macrophages alvéolaires.

Bien que la clinique des infections humaines à hMPV ou à hRSV soit la même, leur physiopathologie ne semble pas superposable [45]. Dans l'infection à RSV, on estime que les réponses inflammatoires et immunitaires immédiates jouent un rôle capital dans le déclenchement de la maladie. On observe ainsi une forte activation des polynucléaires neutrophiles et leur migration vers le poumon. À l'inverse, l'infection à hMPV entraîne la production de deux à six fois moins de cytokines inflammatoires que l'infection à RSV, et le taux de ces cytokines n'est pas plus élevé chez les enfants atteints de formes sévères et hospitalisés, que chez ceux atteints de formes légères et non hospitalisés [46]. Une étude récente de la sécrétion de cytokines dans les sécrétions respiratoires d'enfants infectés par le hMPV ou le RSV confirme et complète ces observations. Les enfants infectés par le RSV ont de grandes quantités de cytokines inflammatoires innées et une réponse adaptative faible. À l'inverse, les enfants infectés par le hMPV ont des niveaux faibles de cytokines de l'immunité innée et adaptative, et un profil Th2 plus net que chez ceux infectés par le RSV ou un virus influenza [59].

## 4. Diagnostic des infections à hMPV

Bien que le hMPV ait été initialement découvert sur culture tertiaire de rein de singe, les souches sauvages de hMPV sont très difficiles à isoler en culture cellulaire. Peu de types cellulaires sont permissifs à la réplication du hMPV. Les lignées simiennes LLC-MK2 et Véro E6 semblent les mieux adaptées [17,60]. Mais la culture doit être effectuée en présence de trypsine, la croissance virale est longue et des passages à l'insu sont souvent nécessaires. Les lésions cellulaires n'apparaissent pas avant la deuxième ou la troisième semaine de culture, et les images de l'ECP sont peu spécifiques ou manquent totalement. On observe de petits foyers des cellules rondes, non

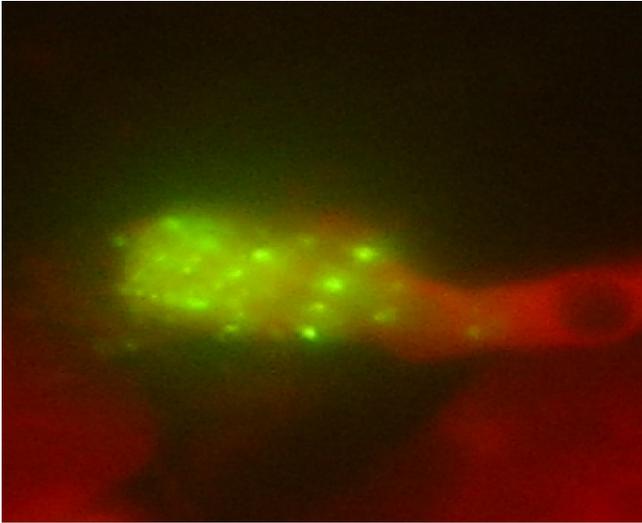


Fig. 6. Cellule respiratoire d'une aspiration nasale d'un enfant infecté par le hMPV. Localisation cytoplasmique des antigènes viraux (marquage en immunofluorescence [virologie, CHU de Caen]).

réfringentes ou de cellules multinucléées. Après plusieurs passages sur cellules LLC-MK2, les souches adaptées peuvent produire des plages de lyse.

Pour cette raison, la recherche de l'ARN du hMPV par RT-PCR a constitué la méthode de choix pour détecter une infection à hMPV, aussi bien dans les prélèvements respiratoires que sur les cultures cellulaires. La majorité des protocoles décrits dans la littérature amplifient des séquences des gènes *L*, *N*, *F* ou *M*, à l'aide d'amorces définies à partir de la souche prototype hollandaise NETH-001 (GenBank AF371337). Comme cette souche appartient au sous-groupe 1 ou A, et qu'il existe deux sous-groupes de hMPV, certaines des techniques initialement décrites pour rechercher le hMPV peuvent manquer de sensibilité pour détecter le sous-groupe 2 ou B. Les plus récentes publications proposent des outils moléculaires de RT-PCR en temps réel, et certaines détectent les deux sous-groupes majeurs et des quatre sous-types avec des niveaux de sensibilité équivalents [61–65].

La recherche directe d'antigène hMPV sur des prélèvements nasopharyngés est désormais réalisable grâce à la disponibilité de réactifs commercialisés, en Elisa ou immunofluorescence indirecte (IFA) (Fig. 6). Des anticorps monoclonaux ont été développés pour détecter le hMPV dans les prélèvements respiratoires ou les cultures avec des sensibilité et spécificité de 73,9 et 94,1 % par rapport à la détection par RT-PCR [66–68]. En collaboration avec la société Argene, nous avons développé une technique de RT-PCR temps réel pour la recherche du MPV dans les prélèvements respiratoires. Les performances du test ont été évaluées en comparaison avec celles d'une technique de RT-PCR multiplex [69] et de l'IFA, utilisant l'anticorps monoclonal développé par P. Pothier à Dijon. Sur les 132 aspirations nasales prélevées au cours de l'hiver 2006–2007, 44 sont positives par la technique de PCR temps réel. L'IFA en retrouve 41 positives (sensibilité 93 %, spécificité 100 %) ; les trois échantillons négatifs en IFA directe ont été trouvés positifs après isolement du hMPV sur culture de

cellules HuH7. La RT-PCR multiplex manque six échantillons, probablement en raison d'un problème de compétition dans les étapes de RT ou de PCR.

## 5. Traitement et prévention des infections à hMPV

Il n'existe aujourd'hui aucun traitement antiviral ni vaccins spécifiques qui puissent être utilisés dans la prise en charge des infections à hMPV. Cependant, Wyde et al. ont montré que la ribavirine et des immunoglobulines polyclonales anti-RSV avaient la même activité antivirale *in vitro* sur le hMPV que sur le hRSV [70]. Cette activité suggère que ces molécules puissent être proposées dans d'éventuelles atteintes respiratoires sévères à hMPV. Une autre molécule, le NMSO3, active contre la réplication du RSV *in vitro*, est également active contre le hMPV [71]. En revanche, l'anticorps anti-F du hRSV, le palivizumab (Synagis<sup>®</sup>) n'a pas d'activité anti-hMPV. Mais il est possible qu'un anticorps du même type soit développé pour protéger les nourrissons à risque de l'infection à hMPV.

Des vaccins hMPV candidats ont été testés chez l'animal. Un virus parainfluenza humain recombinant qui contient le gène *F* du hMPV protège l'animal contre l'infection à hMPV [52]. Injecté au hamster, un virus vecteur chimérique, virus parainfluenza 3 bovin et humain exprimant la protéine F du hMPV induit l'apparition d'anticorps protecteurs [72]. Des hMPV A et B de virus produits récemment par génétique reverse sont des outils intéressants pour la fabrication de futurs vaccins [73].

## Références

- [1] Van Den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J, Kuiken T, De Groot R, Fouchier R, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nature Med* 2001;7:719–24.
- [2] Akerlind B, Norrby B, Orvell C, Mufson MA. Respiratory syncytial virus: heterogeneity of subgroup B strains. *J Gen Virol* 1988;69:2145–54.
- [3] Alwan WH, Kozłowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med* 1994;179: 81–9.
- [4] Anderson LJ, Hierholzer JC, Tsou C, Hendry RM, Fernie BF, Stone Y, et al. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J Infect Dis* 1985;151:626–33.
- [5] Akerlind B, Norrby E. Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes A and B strains in Sweden. *J Med Virol* 1986;19:241–7.
- [6] Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G, Hanson CT, Murphy BR, Collins PL, et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. *Virology* 2003;315:1–9.
- [7] Anderson LJ, Hendry RM, Pierik LT, et al. Multicenter study of strains of respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 1991;163:687–92.
- [8] Cane PA, Pringle CR. Evolution of subgroup A respiratory syncytial virus: evidence for progressive accumulation of amino acid changes in the attachment protein. *J Virol* 1995;69:2918–25.
- [9] Cane PA, Thomas HM, Simpson AF, Evans JE, Hart CA, Pringle CR. Analysis of the human serological immune response to a variable region of the attachment (G) protein of respiratory syncytial virus during primary infection. *J Med Virol* 1996;48:253–61.
- [10] Castells E, George VG, Hierholzer JC. NCI-H292 as an alternative cell line for the isolation and propagation of the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 1990;115:277–88.
- [11] Becker S, Soukup JM. Exposure to urban air particulates alters the macrophage-mediated inflammatory response to respiratory viral infection. *J Toxicol Environ Health A* 1999;57:445–57.

- [12] Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Côté S, et al. Virological features and clinical manifestations associated with human metapneumovirus; a new paramyxovirus responsible for acute respiratory-tract infections in all age groups. *J Infect Dis* 2002;186:1330–4.
- [13] Berman S. Epidemiology of acute respiratory infections in children in developing countries. *Rev Infect Dis* 1991;13:S454–62.
- [14] Boivin G, Mackay I, Slootss TP, Madhi S, Freymuth F, Wolf D, et al. Global genetic diversity of human metapneumovirus fusion gene. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1154–7.
- [15] Breton A, Samaille J, Gaudier B, Lefebvre G, Ponte C. Isolement du virus syncytial (virus CCA de Morris) au cours de manifestations respiratoires bénignes chez des prématurés. *Arch Fr Pédiatr* 1961;18:459–67.
- [16] Brouard J, Freymuth F, Duhamel JF. Infections virales respiratoires nosocomiales en pédiatrie. In: *Infections nosocomiales et à agents transmissibles non conventionnels*. Paris: John Libbey Eurotext; 2001. p. 465–73.
- [17] Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus ADME, et al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis* 2002;185:1660–3.
- [18] Chan PKS, Tam JS, Lam CW, Chan E, Wu A, Li CK, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1058–63.
- [19] Naylor CJ, Brown PA, Edworthy N, Ling R, Jones RC, Savage CE, et al. Development of a reverse-genetics system for avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *J Gen Virol* 2004;85:3219–27.
- [20] Freymuth F, Vabret A, Legrand L, Eteradossi N, Lafay-Delaire F, Brouard J. Presence of the new human metapneumovirus in French children with bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J* 2003;22:92–4.
- [21] Boivin G, De Serres G, Côté S, Gilca R, Abed Y, Rochette L, et al. Human metapneumovirus infections in hospitalized children. *Emerg Infect Dis* 2003;9:634–40.
- [22] Peiris JS, Tang WH, Chan KH, Khong PL, Guan Y, Lau YL, et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis* 2003;9:628–33.
- [23] Freymuth F, Vabret A, Cuvillon-Nimal D, Simon S, Dina J, Legrand L, et al. Comparison of multiplex PCR assays and conventional techniques for the diagnostic of respiratory virus infections in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol* 2006;78:1498–504.
- [24] Bouscambert-Duchamp M, Lina B, Trompette A, Moret H, Motte J, Andreoletti L. Detection of human Metapneumovirus RNA sequences in nasopharyngeal aspirates of young french children with acute bronchiolitis by real-time reverse transcriptase PCR and phylogenetic analysis. *J Clin Microbiol* 2005;43:1411–4.
- [25] Foulongne V, Guyon G, Rodiere M, Segondy M. Human metepneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25:354–9.
- [26] Manoha C, Espinosa S, Aho SI, Huet F, Pothier P. Epidemiological and clinical features of hMPV. RSV and RVs infections in young children. *J Clin Virol* 2007;38:221–6.
- [27] Hamelin ME, Abed Y, Boivin G. Human metapneumovirus: a new player among respiratory viruses. *Clin Infect Dis* 2004;38:983–90.
- [28] Williams JV, Harris PA, Tollefson SJ, Halburnt–Rush LL, Pingsterhaus JM, Edwards KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004;350:443–50.
- [29] Kuiken T, Van Den Hoogen B, Van Riel DAJ, Laman JD, Van Amerongen G, Sprong L, et al. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. *Am J Pathol* 2004;164:1893–900.
- [30] Ebihara T, Endo R, Kikuta H, Ishiguro N, Yoshioka M, Ma X, et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. *J Med Virol* 2003;70:281–3.
- [31] Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fedecla A, Greenberg D, Dagan R. High seroprevalence of human metapneumovirus among children in Israel. *J Infect Dis* 2003;188:1865–7.
- [32] Lambert SB, Allen KM, Druce JD, Birch CJ, Mackay IM, Carlin JB, et al. Community epidemiology of human metapneumovirus, human coronavirus NL63, and other respiratory viruses in healthy preschool-aged children using parent-collected specimens. *Pediatrics* 2007;120:e929–37.
- [33] Jartti T, Van Den Hoogen B, Garofalo RP, Osterhaus AD, Ruuskanen O. Metapneumovirus and acute wheezing in children. *Lancet* 2002;360:1393–4.
- [34] Mullins JA, Erdman DD, Weinberg GA, Edwards K, Hall CB, Walker FJ, et al. Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis J* 2004;10:700–5.
- [35] Viazov S, Ratjen F, Scheidhauer R, Fiedler M, Roggendorf M. High prevalence of human metapneumovirus infection in young children and genetic heterogeneity of the viral isolates. *J Clin Microbiol* 2003;41:3043–5.
- [36] Bach N, Cuvillon D, Brouard J, Lafay F, Freymuth F, Legrand L, et al. Infections respiratoires aiguës à metapneumovirus humain chez l'enfant : études descriptives et comparative avec le virus respiratoire syncytium. *Arch Ped* 2004;11:212–5.
- [37] Esper F, Boucher D, Weibel C, Martinello RA, Kahn JS. Human metapneumovirus infection in the United States: clinical manifestations associated with a newly emerging respiratory infection in children. *Pediatrics* 2003;111:1407–10.
- [38] Schildgen O, Glatzel T, Geikowski T, Scheibner B, Matz B, Bindl L, et al. Human metapneumovirus RNA in encephalitis patient. *Emerg Infect Dis* 2005;11:4674–770.
- [39] Kaida A, Iritani N, Kubo H, Shiomi M, Kohdera U, Murakami T. Seasonal distribution and phylogenetic analysis of human metapneumovirus among children in Osaka City, Japan. *J Clin Virol* 2006;35:394–9.
- [40] Rawlinson WD, Waliuzzaman Z, Carter IW, Belessis YC, Gilbert KM, Morton JR. Asthma exacerbations in children associated with rhinovirus but not human metapneumovirus infection. *J Infect Dis* 2003;187:1314–8.
- [41] Van Den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen JJ, Beyer WE, De Groot R, et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalised patients. *J Infect Dis* 2003;188:1571–7.
- [42] Dana GW, Greenberg D, Kalkstein D, Shemer-Avni Y, Givon-Lavi N, Saleh N, et al. Comparison of human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, and influenza A virus lower respiratory tract infections in hospitalized young children. *Ped Infect Dis J* 2006;25:320–4.
- [43] Tripey V. Étude descriptive des infections à coronavirus humains (hors SARS-CoV) chez l'enfant. Thèse de doctorat en médecine. Université de Caen Basse-Normandie: Caen; 2006. 161 p.
- [44] Maggi F, Pifferi M, Vatteroni M, Fornai C, Tempestini E, Anzilotti S, et al. Human metapneumovirus associated with respiratory tract infections in a 3-year study of nasal swabs from infants in Italy. *J Clin Microbiol* 2003;41:2987–91.
- [45] Laham FR, Israele V, Casellas JM, Garcia AM, Lac Prugent CM, Hoffman SJ, et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. *J Infect Dis* 2004;189: 207–2056.
- [46] Lazar I, Weibel C, Dziura J, Ferguson D, Landry ML, Kahn JS. Human metapneumovirus and severity of respiratory syncytial virus disease. *Emerg Infect Dis* 2004;10:1318–20.
- [47] 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.
- [48] Semple MG, Booth JA, Ebrahimi B. Most human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus in infant nasal secretions is cell free. *J Clin Virol* 2007;40:241–4.
- [49] Fouchier RA, Kuiken T, Schutten M, Amerongen G, Van Doornum GJ, Van den Hoogen BG, et al. Aetiology: Koch's postulates fulfilled for SARS virus. *Nature* 2003;423:240.
- [50] Mackay IM, Bialasiewicz, Jacob KC, Mcqueen E, Arden KE, Nissen MD, et al. Genetic diversity of human metapneumovirus over 4 consecutive years in Australia. *J Infect Dis* 2006;193:1630–3.
- [51] Van Den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L, Cane PA, Forleo-Neto E, De Swart RL, et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. *Emerg Infect Dis* 2004;10:658–66.
- [52] Skiadopoulos MH, Biacchesi S, Buchholz UJ, Riggs JM, Surman SR, Amaro-Carambot E, et al. The two major human metapneumovirus

- genetic lineages are highly related antigenically, and the fusion (F) protein is a major contributor to this antigenic relatedness. *J Virol* 2004;78:6927–37.
- [53] Agapov E, Sumino KC, Gaudreault-Keener M, Storch GA, Holtzman MJ. Genetic variability of human metapneumovirus infection: evidence of a shift in viral genotype without a change in illness. *J Infect Dis* 2006;193:396–403.
- [54] Cane PA, Van Den Hoogen BG, Chakrabarti S, Fegan CD, Osterhaus AD. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. *Bone Marrow Transplant* 2003;31:309–10.
- [55] Pelletier G, Dery P, Abed Y, Boivin G. Respiratory tract reinfections by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. *Emerg Infect Dis* 2002;8:976–8.
- [56] Falsey AR, Erdman D, Anderson LJ, Walsh EE. Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis* 2003;187:785–90.
- [57] Stockton J, Stephenson I, Fleming D, Zambon M. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. *Emerg Infect Dis* 2002;8:897–901.
- [58] Falsey AR, Criddle MC, Walsh EE. Detection of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus by reverse transcription polymerase chain reaction in adults with and without respiratory illness. *J Clin Virol* 2006;35:46–50.
- [59] Melendi GA, Laham FR, Monsalvo AC, Casellas JM, Israele V, Polack NR, et al. Cytokine profiles in the respiratory tract during primary infection with human metapneumovirus, respiratory syncytial virus, or influenza virus in infants. *Pediatrics* 2007;120:e410–5.
- [60] Abiko C, Mizuta K, Itagaki T, Katsushima N, Ito S, Matsuzaki Y, et al. Outbreak of human metapneumovirus detected by use of the Vero E6 cell in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol* 2007;45:1912–9.
- [61] Côté S, Abed Y, Boivin G. Comparative evaluation of real-time PCR assays for detection of the human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:3631–5.
- [62] Mackay IM, Jacob KC, Woolhouse D, Waller K, Syrmis MW, Whitley DM, et al. Molecular assays for detection of human metapneumovirus. *J Clin Microbiol* 2003;41:100–5.
- [63] Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB, Quinto JD, Chu M, De Graaf M, et al. Real-time reverse transcriptase PCR assay for detection of human metapneumoviruses from all known genetic lineages. *J Clin Microbiol* 2004;42:981–6.
- [64] Kuypers J, Wright N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus specimens by real-time RT–PCR. *J Clin Virol* 2005;33:299–305.
- [65] Scheltinga SA, Templeton KE, Beersma MF, Claas EC. Diagnosis of human pneumovirus and rhinovirus in patients with respiratory tract infections by an internal controlled multiplex real-time RNA PCR. *J Clin Virol* 2005;33:306–11.
- [66] Gerna G, Sarasini A, Percivalle E, Campanini G, Rovida F, Marchi A, et al. Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and quantification in nasopharyngeal secretions from pediatrics patients. *J Clin Virol* 2007;40:236–40.
- [67] Ebihara T, Endo R, Ma X, Ishiguro N, Kikuta H. Detection of human metapneumovirus antigens in nasopharyngeal secretions by an immunofluorescent antibody test. *J Clin Microbiol* 2005;43:1138–41.
- [68] Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TC, Erdman DD. Detection of human metapneumovirus in clinical samples by immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol* 2005;43:1950–2.
- [69] Bellau-Pujol S, Vabret A, Legrand L, Dina J, Gouarin S, Petitjean J, et al. Development of three multiplex RT–PCR assays for the detection of 12 respiratory viruses. *J Clin Virol* 2005;126:53–63.
- [70] Wyde PR, Chetty SN, Jewell AM, Boivin G, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by ribavirin and immune serum globulin in vitro. *Antiviral Res* 2003;60:51–9.
- [71] Wyde PR, Myolett EH, Chetty SN, Jewell A, Bowlin TL, Piedra PA. Comparison of the inhibition of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus by NMSO3 in tissue culture assays. *Antiviral Res* 2004;63:51–9.
- [72] Tang RS, Schickli JH, Macphail M, Fernandes F, Bicha L, Spaete J, et al. Effects of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus antigen insertion in two 3' proximal genome positions of bovine/human para-influenza virus type 3 on virus replication and immunogenicity. *J Virol* 2003;77:10819–28.
- [73] Herfst S, De Graaf M, Schickli JH, Tang RS, Kaur J, Yang CF, et al. Recovery of human metapneumovirus genetic lineages A and B from cloned cDNA. *J Virol* 2004;78:8264–70.