

### *Detección de Metapneumovirus Humano en niños menores de 5 años hospitalizados en Paraguay*

*Detection of Human Metapneumovirus in Children under Age 5 Hospitalized in Paraguay*

Cynthia Vázquez, Shirley Villalba, María Liz Gamarra, María Liz Bobadilla, María José Ortega, Carmen Arellano, Claudia Candia, Sonia Figueredo, Juan Torales, Mercedes Carrillo<sup>(1)</sup>

#### Resumen

El Metapneumovirus humano (hMPV) constituye una importante causa de Infecciones Respiratorias Agudas (IRAs) en niños hospitalizados. En Paraguay, las IRAs están entre las primeras causas de hospitalización durante la infancia, siendo los virus los principales agentes causales. Sin embargo, aún persiste una alta proporción de casos sin etiología identificada.

La pandemia de Influenza en el año 2009, condujo a una intensificación de la vigilancia de las infecciones respiratorias, lo cual permitió al mismo tiempo la búsqueda de otros virus como el hMPV. Nuestro objetivo fue detectar hMPV en niños hospitalizados por IRAs en Paraguay durante el año 2009. Fueron estudiadas 240 muestras respiratorias de niños <5 años internados por IRAs en Paraguay durante el año 2009, que habían resultado negativas para otros virus respiratorios.

Fue utilizado el reactivo LightMix Kit human MPV de TIBMOLBIOL, para la detección del gen N de hMPV por PCR en Tiempo Real, siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. De las 240 muestras estudiadas, 29 (12%) resultaron positivas para hMPV, con la mayor detección en julio y agosto; predominando en mayores de 1 año. Los principales signos y síntomas fueron tos, fiebre y dificultad respiratoria; y las complicaciones más frecuentes neumonía y bronquiolitis. Estos resultados proveen las primeras evidencias en Salud Pública, de la importancia del hMPV asociado a niños hospitalizados por IRAs en Paraguay.

#### Pabras clave:

Rev Soc Bol Ped 2013; 52 (1): 43-49: Metapneumovirus humano, hMPV, Infecciones Respiratorias Agudas, IRAs, Niños hospitalizados.

#### Summary

Human metapneumovirus (hMPV) is a significant cause of acute respiratory infection (ARI) in hospitalized children. In Paraguay, ARI is one of the leading causes of childhood hospitalization, with viruses being the primary causal agents. However, a large number of cases of unknown etiology remain.

The influenza pandemic of 2009 led to intensified vigilance concerning respiratory infections and more thorough efforts to confirm the presence of viruses such as hMPV. Our objective was to detect hMPV in children hospitalized for ARI in Paraguay during 2009. We studied respiratory samples from 240 children age <5 years hospitalized for IRAs in Paraguay during 2009 who had tested negative for other respiratory viruses.

We used the hMPV-reactive LightMix® kit from TIB MOLBIOL for the detection of the nucleoprotein (N) gene by real-time PCR according to manufacturer-specified procedures. Of the 240 samples studied, 29 (12%) were positive for hMPV, with the highest rates detected in July and August (winter) predominating in children over 1 year of age. The most common signs and symptoms were cough, fever, and respiratory distress; while the most common complications were pneumonia and bronchiolitis. These results provide the first evidence concerning the prevalence of hMPV in children hospitalized for ARI in Paraguay.

#### Key words:

Rev Soc Bol Ped 2013; 52 (1): 43-49: Human metapneumovirus, hMPV, acute respiratory infection, ARI, hospitalized children.

1. Laboratorio Central de Salud Pública. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Asunción-Paraguay.

Correspondencia: Dra. Cynthia Vázquez. Laboratorio Central de Salud Pública. Venezuela y Florida. Asunción, Paraguay. E-mail: cynthiavlm@yahoo.com

(1) Artículo original del Paraguay, publicado en *Pediatría (Asunción)* 2011; 38: 199-204 y que fue seleccionado para su reproducción en la XVII Reunión de Editores de Revistas Pediátricas del Cono Sur. Chile 2012.

## Introducción

Las infecciones respiratorias agudas (IRAs), son una importante causa de morbi-mortalidad en el mundo<sup>(1)</sup>. En niños pequeños, el virus respiratorio sincicial humano (VRS), es el agente causal más frecuente en IRAs<sup>(1-3)</sup>. Un pneumovirus anteriormente desconocido, fue aislado en muestras de aspirado nasofaríngeo de niños, hace una década<sup>(4)</sup>. Este virus, denominado metapneumovirus humano (hMPV), al igual que el VRS, se ha clasificado en la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, pero en un género diferente, *Metapneumovirus*<sup>(4-7)</sup>. Las manifestaciones clínicas asociadas a este virus, varían desde síntomas respiratorios leves, hasta infección respiratoria aguda baja, como neumonía y bronquiolitis; a menudo acompañada de fiebre, mialgia y vómitos.

Desde su descubrimiento en Holanda, el hMPV se ha detectado en diversos países, con incidencias variables dependiendo de las condiciones de estudio<sup>(8-11)</sup>. En Sudamérica, se ha publicado la detección en Brasil, Argentina y Chile, con incidencias de 11%, 17%, y 5,4% respectivamente<sup>(12-14)</sup>. En Paraguay, las IRAs están entre las primeras causas de consulta y hospitalización durante la infancia (Anuario 2009 DGEEC), siendo los virus, los principales agentes causales. Sin embargo, aún persiste una alta proporción de casos sin etiología identificada<sup>(15)</sup>.

La emergencia de un nuevo virus pandémico de Influenza en el año 2009, condujo a una intensificación de la vigilancia de las infecciones respiratorias, así como al incremento de la demanda de atención en los servicios de salud con el consecuente aumento en la toma de muestras respiratorias. Esto contribuyó al mismo tiempo, a la investigación de otros agentes no incluidos en la vigilancia regular de virus respiratorios, como el hMPV.

## Objetivo

Nuestro objetivo fue detectar hMPV en niños menores de 5 años hospitalizados por IRAs en distintas regiones del Paraguay durante el año 2009.

## Materiales y métodos

En el marco de la Vigilancia Nacional de influenza y otros virus respiratorios, fueron recibidas durante el año 2009 en el Laboratorio Central de Salud Pública, 367 muestras respiratorias de niños menores de 5 años hospitalizados por IRAs en servicios de salud de todas las regiones Sanitarias del Paraguay. Las muestras fueron procesadas por diferentes métodos para el diagnóstico virológico de influenza A y B (IAV, IBV), así como de VRS, parainfluenza (PIV), y adenovirus (AdV). En las muestras negativas para todos estos virus regularmente incluidos en la vigilancia, se investigó la presencia de hMPV.

**Tipo de estudio:** Fue realizado un estudio retrospectivo, observacional, descriptivo de corte transversal.

**Colecta de Muestras:** Muestras de hisopado nasal y faríngeo, fueron recolectados en medio de transporte viral comercial, conservados a 4°C y remitidas en forma refrigerada al LCSP dentro de las 72 horas después de su recolección. En pacientes hospitalizados en unidades de cuidados intensivos, se recolectaron otros tipos de muestras como: aspirados nasofaríngeos, aspirados traqueales, y lavados bronquioalveolares. Posteriormente, estas muestras son fraccionadas en alícuotas para la realización de Inmunofluorescencia, cultivo celular y pruebas moleculares.

**Extracción de ARN viral:** El ARN viral fue extraído a partir de 200  $\mu$ L de la suspensión de cada muestra clínica, utilizándose el método de extracción automatizado de Ácidos Nucleicos con el equipo *MagNa Pure Compact Instrument*, utilizando el Kit de aislamiento de RNA Roche *MagNa Pure Compact Nucleic Acid Isolation*, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

**Diagnóstico Molecular de Influenza:** La detección de influenza tipo A y B; y la subtipificación de las muestras positivas para IAV, fueron realizadas siguiendo el protocolo no publicado de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la polimerasa en

Tiempo Real (qRT-PCR) de los Centros de Control y Prevención de Enfermedades Atlanta/GA/USA (CDC), para los virus estacionales (A/H1, A/H3); y el protocolo publicado por CDC en abril del 2009 para el virus pandémico A/H1 2009<sup>(16)</sup>. Fue utilizado un termociclador Stepone de Applied Biosystem.

**Detección de Virus Respiratorios por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):** Se realizó mediante la detección de antígenos de PIV 1/2/3, VRS y AdV en las secreciones respiratorias por la técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales específicos disponibles comercialmente (Respiratory Panel, Milipore, USA). La lectura se realizó con microscopio de epi-iluminación Nikon con lámpara de halógeno, y se consideró un resultado positivo cuando se observaron por lo menos 2 células con inclusiones fluorescentes características en todo el pocillo<sup>(17,18)</sup>.

**Detección de hMPV:** Fue utilizado el reactivo LightMix Kit human MPV de TIBMOLBIOL, para la detección del gen N de hMPV por PCR en Tiempo Real, siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante, utilizando un termociclador LightCycler 2.0 (Roche, Alemania).

**Datos clínico-epidemiológicos:** Fueron obtenidos mediante el llenado por el médico tratante, de un formulario con datos demográficos (edad, sexo y procedencia del paciente), servicio de consulta, fechas de inicio de los síntomas y de toma de muestra, tipo de muestra recolectada, signos/síntomas clínicos y sospecha diagnóstica del médico tratante.

**Análisis estadístico:** Los resultados obtenidos y los datos de las fichas clínico-epidemiológicas fueron cargados en una hoja de cálculo del programa Microsoft Excel.

Posteriormente fueron analizados con herramientas de Estadística Descriptiva y fue aplicado el test de chi cuadrado para análisis de significancia estadística utilizando el paquete computacional SPSS para Windows, considerando estadísticamente significativo un valor P igual o menor que 0,05.

## Resultados

De enero a diciembre del año 2009, un total de 367 especímenes de niños menores de 5 años fueron testados para la detección de influenza y otros virus respiratorios comunes, resultando el 34% (127) de ellos positivos para al menos uno de los virus estudiados: 54 IAV (15%), 50 VRS (14%), 22 PIV (6%) y 1 AdV8 (0,3%). Se realizó la búsqueda de hMPV en las 240 muestras restantes, de las cuales 29 (12%), resultaron positivas para el virus investigado.

La distribución de los casos positivos por edad se muestra en la figura 1; los virus influenza y hMPV, fueron significativamente más frecuentes en el grupo de 1 año y mayores ( $p < 0,05$ ), mientras que con el VRS ocurrió a la inversa encontrándose la mayor prevalencia en los menores de un año ( $p < 0,05$ ). El hMPV fue el segundo en frecuencia en los mayores de 1 año después, del virus pandémico de influenza (*Figura 1*).

La etiología viral en función a las semanas epidemiológicas (SE), se muestra en la *Figura 2*. El primer caso de hMPV fue detectado en la SE 24, coincidiendo con el pico de detección de influenza durante la pandemia. La mayoría de los casos de hMPV se encontró en los meses invernales de julio y agosto, mientras que el VRS predominó en la primavera aunque fue detectado prácticamente durante todo el año al igual que el PIV.

Los signos y síntomas más frecuentes en los casos positivos se resumen en la *Tabla 1*. Entre las complicaciones clínicas resaltantes, la Neumonía fue significativamente más frecuente en los casos de influenza, mientras que la Bronquiolitis tuvo correlación significativa con el VRS. El análisis estadístico no demostró correlación significativa entre alguna complicación clínica y la positividad para hMPV.

El mayor número de casos de hMPV provino del Departamento Central<sup>(19)</sup> y de la Capital<sup>(6)</sup>, aunque también fueron detectados casos en Alto Paraná<sup>(2)</sup>,

Figura 1. Distribución de agentes virales detectados por grupos de edades. Paraguay 2009.

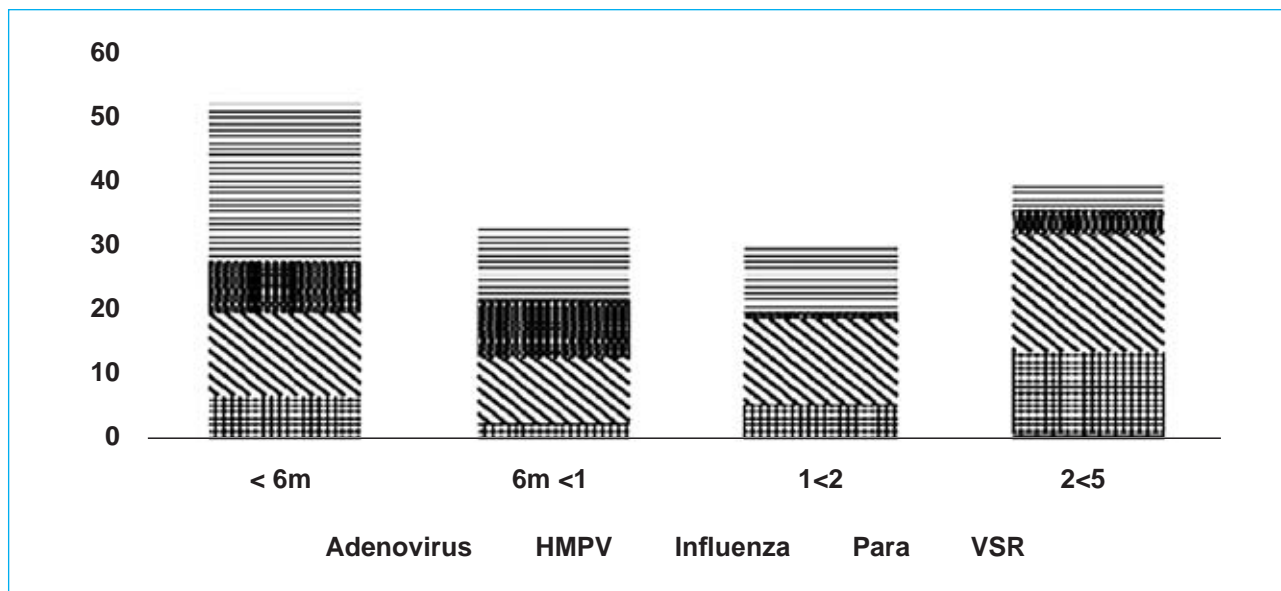
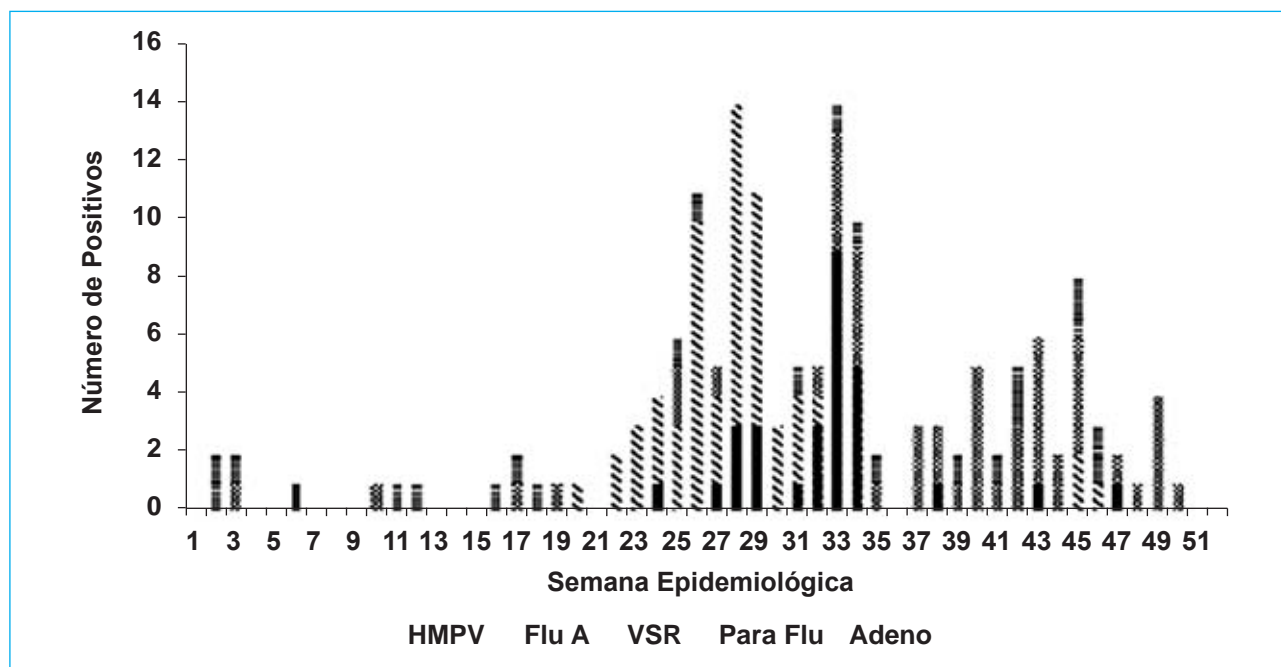


Figura 2. Frecuencia de agentes virales en menores de 5 años por semana epidemiológica. Paraguay 2009.



Paraguari<sup>(1)</sup> y Guaira<sup>(1)</sup>. No se observó diferencia significativa de positividad para los virus respiratorios entre los pacientes de sexo masculino y femenino en ningún grupo de edad. En la **Tabla 2**, se resumen las características demográficas de los pacientes cuyas muestras fueron analizadas para hMPV.

### Discusión

El metapneumovirus humano es el agente causal de una proporción significativa de IRAs en niños hospitalizados a nivel mundial<sup>(14,19,20)</sup>. En este estudio, detectamos hMPV en 12% de niños menores de 5

**Tabla 1. Características clínicas por agente viral detectado en menores de 5 años hospitalizados. Paraguay 2009.**

Variable	Agente Viral				
	hMNV (n=29)	VRS (n=50)	IV (n=54)	PIV (n=22)	AdV (n=1)
<b>Signos y Síntomas</b>					
Tos	97%	88%	83%	86%	100%
Fibrere	86%	68%	83%	73%	100%
Díseña	55%	52%	67%	50%	100%
Obstrucción Nasal	52%	68%	52%	55%	100%
Dolor de Garganta	45%	12%	30%	9%	100%
Sibilancias	21%	18%	6%	9%	0%
Mialgias	17%	0%	15%	14%	0%
Dolor de oído	7%	0%	4%	0%	0%
Diarrea	7%	4%	7%	5%	0%
Vómitos	1%	2%	4%	0%	0%
<b>Complicaciones</b>					
Neumonía	24%	28%	54%	14%	0%
Bronquiolitis	14%	24%	15%	5%	0%

hMNV: metapneumovirus; IV; influenza virus; VRS; virus respiratorio sincial; AdV; adenovirus; PIV; parainfluenza virus.

**Tabla 2. Características demográficas de pacientes analizados y positivos para hMPV.**

	Muestras analizadas	hMPV Positivos	
		N	(%)
<b>Región Sanitaria</b>			
I	2	0	-
II	9	0	-
III	5	0	-
IV	2	1	(3,5)
V	6	0	-
VII	7	0	-
VIII	4	0	-
IX	8	1	(3,5)
X	6	2	(6,9)
XI	122	19	(65,5)
XIII	10	0	-
XIV	2	0	-
XVI	3	0	-
XVIII	54	6	(20,6)
<b>Edad</b>			
< 1 año	138	10	(34,5)
1 año	41	6	(20,7)
2 años	20	2	(6,9)
3 años	21	2	(6,9)
4 años	20	9	(31,0)
<b>Sexo</b>			
Masculino	131	17	(59)
Femenino	109	12	(41)

años hospitalizados por IRAs en Paraguay durante el año 2009, en quienes no se detectaron otros virus respiratorios. Sin embargo, considerando que se investigó la presencia de hMPV solamente en las muestras negativas para los demás virus estudiados, estimamos que la prevalencia podría ser mayor si se incluyeran las coinfecciones.

En este estudio la detección de hMPV fue significativamente mayor en niños mayores de 1 año, mientras que el VRS afectó significativamente más a los menores de 1 año, en concordancia con investigaciones previas<sup>(14,19,21)</sup>. No obstante otros autores presentan hallazgos opuestos<sup>(22-23)</sup>, con mayor prevalencia en niños más pequeños, consideramos que esta diferencia podría estar dada por las coinfecciones con VRS, las cuales no han sido analizadas en este trabajo.

La variación estacional en la prevalencia del hMPV ha sido demostrada en varias investigaciones<sup>(24, 25)</sup>, sin embargo aunque en este estudio se observó una mayor detección viral durante el invierno, necesitamos realizar un seguimiento más prolongado en el tiempo para estimar la estacionalidad del virus en el Paraguay.



La Influenza A/H12009, fue el virus más prevalente mundialmente durante el año 2009<sup>(26)</sup>, lo cual condujo a subdiagnosticar otras etiologías virales que pesan en la demanda de atención médica y hospitalizaciones, pudiendo llevar a sobrestimar las tasas de infección por influenza, así como a la prescripción inapropiada de antibióticos en los casos de etiología no identificada. En el periodo de tiempo y rango de edad estudiados, el hMPV ocupó el tercer lugar en cuanto a frecuencia después de IAV y VRS. Teniendo en cuenta que el año 2009 fue un año atípico por la circulación de un virus pandémico, que predominó en casi todos los grupos de edades desplazando a los demás virus; estimamos que en años no pandémicos el hMPV podría encontrarse entre los dos más frecuentes (en el panel de virus estudiados) junto con el VRS, que normalmente es el de mayor prevalencia en menores de 5 años<sup>(1-3)</sup>, y aún más si incluyéramos la investigación de coinfecciones por estos dos virus.

Esta prevalencia de hMPV en niños hospitalizados, en nuestro conocimiento no reportada previamente en Paraguay, apunta a la potencial severidad de la enfermedad respiratoria relacionada a este virus, el cual podría ser responsable de una mayor proporción de las hospitalizaciones por IRAs, que lo previamente sospechado por los médicos. En nuestra opinión el hMPV debería ser considerado en la lista de posibles causas de hospitalizaciones por IRAs, y su detección implementada en forma regular para disminuir los casos con etiología desconocida.

En conclusión, este trabajo provee evidencias concretas de la relevancia del hMPV en niños paraguayos hospitalizados por IRAs; así como información útil acerca del comportamiento clínico-epidemiológico del virus en nuestro país. Esperamos que estos resultados ayuden a definir localmente la importancia de hMPV como una posible causa de IRA grave en este grupo de pacientes, y a extender las investigaciones a otros grupos de riesgo, especialmente ancianos e inmunocomprometidos.

## Referencias

1. Monto AS. Epidemiology of viral respiratory infections. *Am J Med.* 2002;112:4S-12S.
2. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986;140:543-46.
3. Kim HW, Arrobio JO, Brandt CD. Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infection. *Am J Epidemiol.* 1973;98:216-25.
4. Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med.* 2001;7:719-24.
5. Seal BS, Sellers HS, Meinersmann RJ. Fusion protein predicted amino acid sequence of the first US avian pneumovirus isolate and lack of heterogeneity among other US isolates. *Virus Res.* 2000;66:139-47.
6. Dar AM, Munir S, Goyal SM, Abrahamsen MS, Kapur V. Sequence analysis of the nucleocapsid and phosphoprotein genes of avian pneumoviruses circulating in the US. *Virus Res.* 2001;79:15-25.
7. Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus AD, Fouchier RA. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology.* 2002;295:119-32.
8. Peret TC, Boivin G, Li Y, Couillard M, Humphrey C, Osterhaus A, et-al. Characterization of human metapneumoviruses isolated from patients in North America. *J Infect Dis.* 2002;185:1660-63.
9. Bastien N, Ward D, Van Caesele P, Brandt K, Lee SHS, McNabb G, et-al. Human metapneumovirus infection in the Canadian population. *J ClinMicrobiol.* 2003;41:4642-46.
10. Osterhaus A, Fouchier R. Human metapneumovirus in the community. *Lancet.* 2003;361:890-91.
11. 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.
12. Cuevas E, Ben Nasser AM, Dove W, Gurgel RQ, Greensill J, Hart CA. Human metapneumovirus and respiratory syncytial virus, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1626-28.
13. Galiano M, Videla C, Puch SS, Martínez A, Echavarría M, Carballal G. Evidence of human metap-

- neumovirus in children in Argentina. *J Med Virol.* 2004;72:299-303.
14. Luchsinger V, Escobar C, Avendaño LF. Detection of human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory infection in Santiago, Chile. *Rev Méd Chile.* 2005;133:1059-1064.
  15. Bobadilla ML, Vazquez C, Ortega MJ, Villalba S, Coluchi N. Agentes virales como causa de infecciones respiratorias agudas en niños menores de 5 años: VI Congreso Paraguayo de Infectología. Asunción: Sociedad Paraguaya de Infectología; 2007.
  16. CDC protocol of real time RT-PCR for influenza A (H1N1). Disponible en: [www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html](http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr/en/index.html)
  17. Kendal AP, Pereira MS, Skehel J. Immunofluorescence Assay: concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance. Washington: Organización Sanitaria Panamericana; 1982.
  18. Ray CG, Minnich LL. Efficiency of immunofluorescence for rapid detection of common respiratory viruses. *J Clin Microbiol.* 1987;25(2):355-57.
  19. Van den Hoogen BG, Van Doornum GJ, Fockens JC, Cornelissen J, Byer W, Groot R, et-al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. *J Infect Dis.* 2003; 188:1571-77.
  20. Williams J, Edwards K, Weinberg G, Griffin M, Hall C, Zhu Y, et-al. Population-Based incidence of human metapneumovirus in hospitalized children. *J Infect Dis.* 2010;201:1890-1898.
  21. Peiris J, Tang W, Chan K, Khong P, Guan Y, Lau Y et-al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. *Emerg Infect Dis.* 2003;9: 628-33.
  22. Heikkinen T, Osterback R, Peltola V, Jartti T, Vainionpää R. Human metapneumovirus infection in children. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:101-106.
  23. Arabpour M, Samarbafzadeh AR, Makvandi M, Shamsizadeh A, Percivalle E, Englund J. The highest prevalence of human metapneumovirus in Ahwaz children accompanied by acute respiratory infections. *Ind J Med Microbiol.* 2008:123-26.
  24. Williams JV, Wang CK, Yang CF, Tollefson SJ, House FS, Heck JM, et-al. The role of human metapneumovirus in upper respiratory tract infections in children: a 20-year experience. *J Infect Dis.* 2006;193:387-95.
  25. 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.
  26. World Health Organization. Pandemic (H1N1) 2009 – [http://www.who.int/csr/don/2009\\_10\\_02/en/index.html](http://www.who.int/csr/don/2009_10_02/en/index.html).