

AISLAMIENTO DE METAPNEUMOVIRUS HUMANO (HMPV) A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS¹

HUMAN METAPNEUMOVIRUS ISOLATION USING CLINICAL RESPIRATORY SAMPLES

² Lilia Jadith Bernal.

³ Jaime E. Castellanos.

Resumen

Objetivo: El objetivo de este trabajo fue establecer una metodología para el aislamiento de una cepa de hMPV a partir de hisopados nasales provenientes de pacientes con sintomatología de enfermedad respiratoria aguda.

Materiales y métodos: A partir de 12 muestras positivas por fluorescencia para hMPV, se hizo la inoculación en células LLCMK2 (epiteliales de riñón de mono *Rhesus*) con un medio de mantenimiento que contenía tripsina como proteasa. Se evaluó el efecto citopático diario por 10 días y se tomaron células infectadas que se utilizaron para la prueba de fluorescencia y para confirmar la infección. Se utilizó RT-PCR para corroborar la presencia del virus.

Resultados: En 8 de las 12 muestras procesadas, se logró aislar el hMPV, confirmándose la infección por fluorescencia y RT-PCR.

Abstract

Objective: The aim of this work was to establish a laboratory protocol to isolate human metapneumovirus (hMPV) using as a source confirmed respiratory secretion samples from symptomatic patients.

Methods: Twelve respiratory secretion samples confirmed for hMPV by immunofluorescence were inoculated on LLCMK2 primate cells using trypsin to improve the virus binding. The cytopathic effect was evaluated during 10 days, then they were stained with an hMPV specific antibody and culture supernatants were used to detect viral RNA by RT-PCR.

Results: We isolated hMPV in 8 out of 12 samples. Monkey cells were susceptible to infection and showed viral replication in both immunocytochemistry and molecular tests and even syncytia formation.

Recibido el 05/14/2015

Aprobado el 06/16/2015

1. Artículo de investigación
2. Odontólogo. Magister en Farmacología, Universidad Nacional de Colombia. Grupo Patogénesis Infecciosa, Universidad Nacional de Colombia.
3. PhD. Grupo de Virología, Grupo de Virología, Vicerrectoría de Investigaciones, Universidad El Bosque castellanosjaime@unbosque.edu.co

Conclusiones: A pesar de ser un virus de crecimiento lento y difícil de aislar según los reportes, en este trabajo se logró aislar el hMPV a partir de muestras clínicas frescas, lo cual resulta de gran utilidad en futuros estudios sobre la patogénesis de la infección respiratoria.

Palabras claves: metapneumovirus humano, infección respiratoria aguda, aislamiento viral, tripsina, inmunofluorescencia, RT-PCR.

Conclusion: Despite the hMPV has low replication rates in culture, causing difficulties to isolate it, in this work we accomplish the viral isolation in eight samples that had been previously confirmed containing hMPV. These clinical isolates are a useful tool to study the respiratory infection pathogenesis.

Keywords: human metapneumovirus, acute respiratory infection, viral isolation, immunofluorescence, RT-PCR

INTRODUCCIÓN

La infección respiratoria aguda constituye una de las causas más importantes de hospitalización de pacientes pediátricos y, la mayoría de las veces, es causada por virus. Afecta de manera significativa a la población, aumentando anualmente las cifras de morbilidad y mortalidad, y generando grandes afectaciones a nivel social y económico para los servicios de salud y las comunidades. Los síntomas de la enfermedad respiratoria asociada a virus, pueden variar de leves a graves, incluidos los casos fatales por neumonías en niños, personas inmunosuprimidas o de la tercera edad (1). Entre los muchos agentes causantes de infección respiratoria aguda, se encuentra el metapneumovirus humano (hMPV), el cual es reconocido como un importante agente implicado en infecciones de las vías respiratorias bajas, en lactantes y en niños menores de cinco años (2).

El hMPV fue descrito por primera vez en 2001, después de su aislamiento en recién nacidos y menores de cinco años que cursaban con infecciones que producían sintomatología similar a la inducida por el virus sincitial respiratorio (VSR), pero de etiología desconocida (3). Posteriormente, en un estudio de seroprevalencia, se demostró que la mayoría de niños de cinco años presentaban anticuerpos específicos contra el hMPV y se reportó que este virus ha estado circulando en humanos al menos por 50 años (3). En nuestros días, el hMPV ha ganado reconocimiento por ser considerado un agente importante en las infecciones respiratorias en todo el mundo, y porque afecta principalmente a la población pediátrica y a ancianos, aunque su impacto al parecer es sustancialmente menor, comparado con el producido por el V (4).

El hMPV pertenece a la familia Paramyxoviridae, a la subfamilia Pneumovirinae y se encuentra dentro del género *Metapneumovirus*, en el cual también está incluido el pneumovirus aviar (4,5). Es un virus de ARN de sentido negativo, no fragmentado, que posee un genoma con 8 genes, de aproximadamente 13 kb (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5'), que codifica para nueve proteínas, debido a que el gen para M2 posee dos marcos de lectura abiertos que traducen dos proteínas, la M2-1 y M2-2 (1,6).

En el hMPV se presentan dos genotipos (A y B), los cuales pueden circular simultáneamente, aunque durante las epidemias generalmente predomina un genotipo. En cada genotipo se encuentran establecidos dos subgrupos (A1, A2, B1 y B2), debido a la variabilidad de la secuencia de la proteína G (proteína de unión) y de la proteína F (proteína de fusión) (7)

El hMPV se encuentra circulando en todo el mundo y tiene una aparición estacional, presentándose en los países de la zona tórrida a finales del invierno y principios de la primavera, aunque se han reportado infecciones en las demás temporadas del año, mientras que en países tropicales las infecciones ocurren permanentemente durante todo el año.

El virus se transmite por contacto directo o cercano con secreciones contaminadas, como saliva o secreciones nasales, y se sabe que el periodo de incubación es de cuatro a seis días. La infección por hMPV es indistinguible clínicamente de la generada por otros virus respiratorios. Los pacientes infectados pueden resultar asintomáticos o pueden presentar desde infec-

ción respiratoria aguda leve hasta neumonía grave. La mayoría de los pacientes presentan tos, congestión nasal, sibilancias, odinofagia, fiebre y, en los casos más graves, neumonía y bronquiolitis (7). Uno de los principales problemas que se presentan durante el proceso infeccioso, es la dificultad de generar una respuesta inmunitaria duradera, por lo cual se presentan nuevas infecciones a lo largo de la vida del individuo. A pesar de las importantes alteraciones que genera este virus y de la alta prevalencia con la que afecta a la población, en la actualidad no existen un tratamiento terapéutico ni una vacuna para el manejo de la infección por hMPV.

Algunos de los problemas que se presentan para la identificación de este virus, son su lento crecimiento *in vitro* y el bajo efecto citopático que induce (estructuras similares a sincitios). El aislamiento del virus a partir de muestras clínicas resulta difícil y requiere un tiempo prolongado (de 10 a 14 días), además de que se necesita una proteasa exógena para garantizar la replicación *in vitro* (3). Debido a estas razones, el diagnóstico se basa principalmente en técnicas de biología molecular. En estudios previos se ha observado que, a pesar de obtener un resultado positivo en pruebas como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), la inoculación de la muestra en células LLCMK2 difícilmente genera efecto citopático; así, la tasa de aislamiento resulta significativamente baja (1,9 %), lo cual evidencia la dificultad para aislar este patógeno (8,9). Las células LLCMK2 (epiteliales de riñón de mono *Rhesus*) y Vero E6 (epiteliales de riñón de mono verde africano) han demostrado ser los modelos adecuados para el aislamiento de este virus (10-12).

En nuestro país, se ha reportado previamente la circulación del virus en población pediátrica y adulta, mediante el uso de RT-PCR e inmunofluorescencia (13,14); sin embargo, no hay estudios donde se informen el aislamiento y la producción de cosechas del virus.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras

Se tomaron 12 muestras de hisopados nasales de pacientes con sintomatología asociada a enfermedad respiratoria (tomados en un tiempo menor de cinco días después del inicio de los síntomas), que resultaron positivos por fluorescencia directa para hMPV, utilizando D³ Ultra™ DFA Respiratory Virus Screening & ID Kit (Diagnostic Hybrids). Las muestras son parte del "Estudio latinoamericano de vigilancia de virus respiratorios", el cual cuenta con el aval ético del Laboratorio de Virología de la *Naval Medical Research Unit-Six* (NAMRU-6) en Lima (Perú).

Cultivo celular y determinación de la concentración óptima de tripsina

Antes de la inoculación fue necesario determinar la concentración óptima de tripsina (proteasa), por lo cual se probaron concentraciones previamente reportadas de 4 µg/ml, 2 µg/ml, 1 µg/ml y 0,5 µg/ml; se encontró que la de 2 µg/ml no generaba daño evidente en la monocapa celular, por lo cual fue utilizada durante los diferentes procedimientos. Para la inoculación de las muestras, se sembraron células LLCMK2 en frascos de cultivo de 75 cm², hasta que alcanzaron una confluencia del 70 % usando DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), con suplemento de suero fetal bovino (SFB) al 10 %, antibióticos (100 UI/ml de penicilina más 100 µg/ml de estreptomycin) y antifúngico (anfotericina B).

Inoculación de la muestra y cosechas virales

Las muestras fueron inoculadas desarrollando el siguiente protocolo: las células se lavaron con PBS (solución salina tampón de fosfato), se agregaron 200 µl de la muestra y se completó a un volumen final de 1 ml con el medio de mantenimiento. Se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂ durante una hora, agitando de manera suave cada 15 minutos. Después de una hora de adsorción, se retiró el inóculo viral y se agregaron 20 ml del medio de mantenimiento (DMEM sin SFB más antibióticos y antifúngico, con suplemento de 2 µg/ml de tripsina).

Al décimo día de la infección, se tomó una muestra de las células inoculadas y se procesó por fluorescencia directa; cuando esta prueba era positiva, se recogió la cosecha viral. Para esto, el frasco de cultivo se congeló a -80 °C, después se descongeló y, por disociación mecánica, se lisaron las células para asegurar la liberación de los viriones. La suspensión celular se recolectó y se centrifugó a 2.000 rpm, a 4 °C durante 10 minutos. El sobrenadante se suplementó con albúmina sérica bovina (0,5 %), se hicieron alícuotas de 1 ml y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Inmunofluorescencia para hMPV

La muestra de células infectadas fue procesada por inmunofluorescencia. Las células se colocaron en una lámina de vidrio y se fijaron con metanol-acetona a -20 °C durante 15 minutos, y se almacenaron a -20 °C hasta su uso. Posteriormente, las células se hidrataron con PBS; los sitios inespecíficos fueron bloqueados con suero de cabra al 10 % en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Como anticuerpo primario se

utilizó el anticuerpo monoclonal hMPV 57 (abcam®), que reconoce la nucleoproteína del virus en dilución 1/250, preparado en PBS y con 5 % de suero de cabra durante dos horas a 37 °C, con excepción del control interno de especificidad al que no se adicionó anticuerpo primario. Posteriormente, se adicionó el anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón acoplado a Alexa 549, Invitrogen®) a una concentración final de 2 µg/µl, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con Hoechst y las laminillas se montaron sobre láminas portaobjetos, utilizando Vectashield® Mounting Media). Las células se observaron al microscopio (Zeiss Axio Imager.A2), utilizando un sistema de fluorescencia X-Cite® serie 120Q y el software AxioVision.

RT-PCR para virus

Una alícuota del sobrenadante de las células inoculadas, se utilizó para evaluar la presencia de ARN viral. El ARN se extrajo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante (Invitrogen); se utilizó reactivo TRIzol® LS para la extracción a partir de líquidos (sobrenadantes de células infectadas por virus). Brevemente, al sobrenadante se le agregó TRIzol® en una proporción de 3:1; posteriormente, a esta mezcla se le adicionó cloroformo para producir la disociación del complejo nucleoproteico. La fase acuosa generada, donde se encontraba el ARN, se transfirió a un nuevo tubo y se adicionó isopropanol para lograr la precipitación de este ácido nucleico; después se lavó con etanol al 75 % en agua desionizada tratada con dietilpirocarbonato y, finalmente, se volvió a suspender el *pellet* que contenía el ARN en agua libre de ARNasas. El ARN se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop, ND 1000) y se almacenó a -80 °C hasta su uso.

A partir de este ARN, se sintetizó el ADN complementario. La transcripción inversa se llevó a cabo siguiendo las condiciones recomendadas por el fabricante de la enzima (M-MLV: *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* de Invitrogen®): solución tampón M-MLV IX (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT), 1.000 ng de ARN, 1 µl de cebadores hexámeros aleatorios (Promega®), 0,5 mM de dNTP y 2 U de enzima M-MLV, en un volumen final de 20 µl a 37 °C durante una hora. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para confirmar la presencia de ARN viral, se llevó a cabo en un termociclador T100 de BioRad.

Para la PCR, se utilizaron oligonucleótidos específicos para el virus, a una concentración final de 0,125 µM (NL-N-F 5'-CATATAAGCATGCTATATTAAGAGTCTC-3';

NL-N-R 5'-CCTATTTCTGCAGCATATTTGTAATCAG-3', que amplificaron una región de 163 pb pertenecientes al gen N del virus) (15), polimerasa GoTaq® DNA (Promega®), MgCl₂ a una concentración final de 2,5 mM y 0,2 mM de dNTP.

Las condiciones de amplificación fueron 95 °C durante 3 minutos y 45 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos y 72 °C por 30 segundos. Los amplicones se separaron en un gel de agarosa al 2 % y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio. Las muestras con resultado positivo en la prueba de RT-PCR, se volvieron a inocular en células LLCMK2, para realizar cuatro cosechas virales sucesivas, de manera similar a lo anteriormente descrito.

RESULTADOS

Se logró el aislamiento de hMPV en 8 de las 12 muestras clínicas procesadas con el empleo de células LLCMK2, lo cual fue confirmado con el uso de RT-PCR (figura 1). Además de esto, mediante fluorescencia se observó la infección celular debido a la presencia de marcación específica y se evidenció la formación de sincitios (figura 2). En 5 de las 12 muestras se evidenció la formación de sincitios al décimo día después de la infección (figura 3).

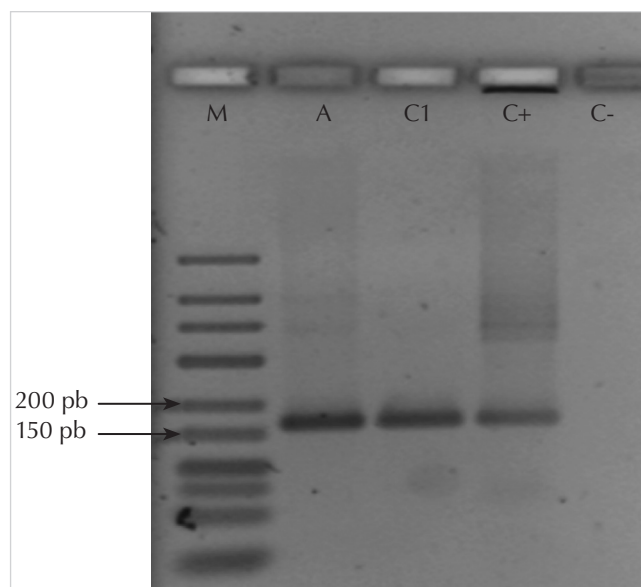


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Confirmación de un aislamiento viral y cosecha número 1. Se muestra el amplicón obtenido utilizando como plantilla el cDNA obtenido a partir del sobrenadante de las células infectadas y los oligonucleótidos específicos NL-N-F y NL-N-R. Producto esperado: 163 pb; M: marcador de peso molecular (GeneRuler™); A: aislado viral; C1: cosecha número 1; C+: control positivo; C-: control negativo

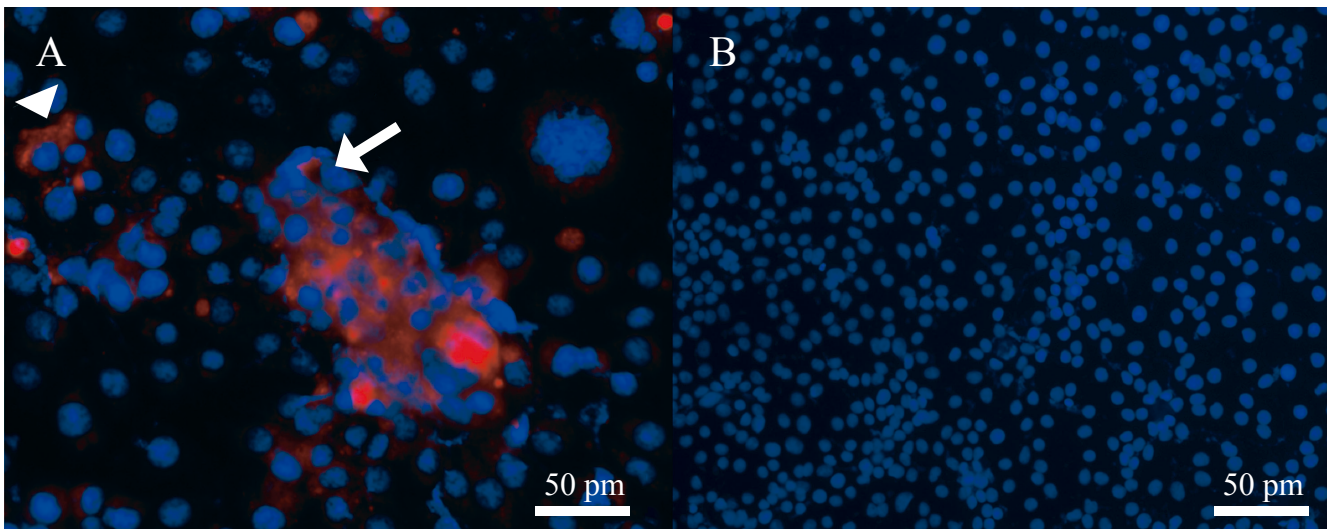


Figura 2. Inmunofluorescencia para hMPV. Células LLCMK2 infectadas con hMPV, décimo día después de la infección. A. Células infectadas: en rojo se observa la marcación específica para hMPV (cabeza de flecha), en azul, los núcleos teñidos con Hoechst; la flecha señala la formación de un sincitio. B. Células no infectadas: se observa integridad de los núcleos, no se evidencia marcación para hMPV ni formación de sincitios. Las barras corresponden a 50 µm.

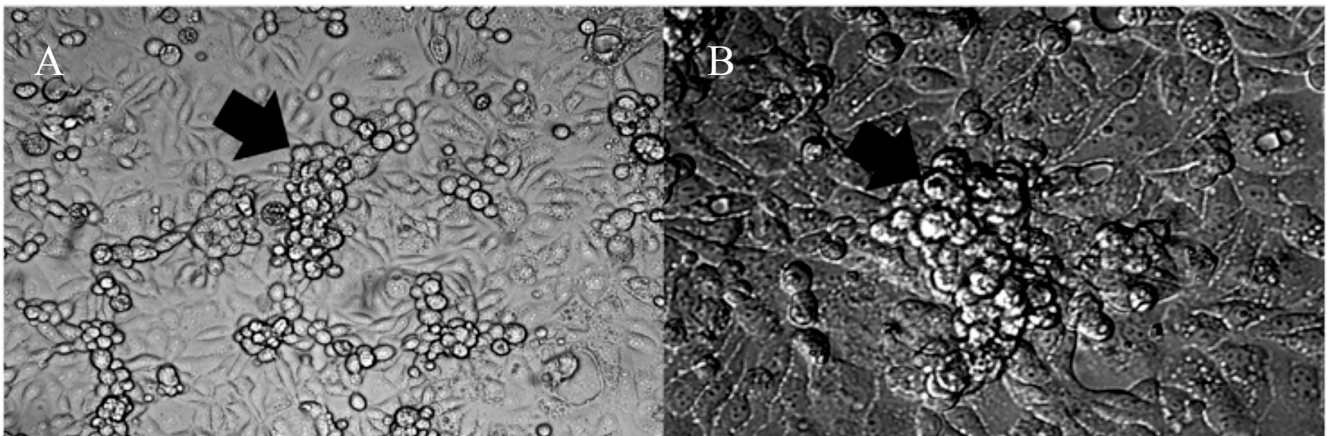


Figura 3. Células LLCMK2 inoculadas con muestra positiva para hMPV por fluorescencia directa al décimo día después de la infección. Las flechas señalan la formación de sincitios. A: 10X; B: 20X.

DISCUSIÓN

Los resultados revelan una proporción de aislamiento de 8/12 muestras procesadas, además de la evidente formación de sincitios. La aparición de este efecto citopático ha sido reportado en algunos estudios, en los que se demostró la aparición de sincitios en diferentes tiempos después de la infección, lo cual se relaciona con la presencia de la proteína F, que resulta crucial en la fusión de la envoltura viral y la célula huésped, facilitando la entrada del virus, además de su importante participación en la fusión célula-célula, que conduce a la organización de los sincitios (16). En algunos estu-

dios se reportan porcentajes muy bajos de éxito en el aislamiento de hMPV; por ejemplo, Williams, et al., reportaron el aislamiento en 22 de las 248 muestras evaluadas (9 %) con el uso de células LLCMK2 y Vero (17). Por otra parte, Abiko, et al., con el empleo de células LLCMK2, lograron aislar hMPV en 79 de 4.112 muestras (1,9 %). En el presente estudio, se logró una tasa de aislamiento del 66 % (9).

Este resultado positivo (aislamiento exitoso de hMPV) indica que, a pesar de las dificultades reportadas en este procedimiento, es posible realizarlo a partir de muestras clínicas frescas, lo cual podría utilizarse en

otros estudios, por ejemplo, en estudios de vigilancia centinela. A partir de estos aislados virales, podrán hacerse investigaciones adicionales en modelos *in vivo* e *in vitro* que permitan dilucidar características moleculares y celulares propias del virus, que conlleven un acercamiento respecto al comportamiento de este importante patógeno viral en la población.

REFERENCIAS

1. Bernal L, Barbosa J, Castellanos JE. El metapneumovirus humano, una amenaza adicional para los niños. *Innovación y Ciencia*. 2013;20:40-7.
2. Eggleston H, Gunville C, Miller J, Sontag M, Mourani P. A comparison of characteristics and outcomes in severe human metapneumovirus and respiratory syncytial virus infections in children treated in an intensive care unit. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:1330-4.
3. van den Hoogen B, De Jong J, Groen J, Kuiken T, Groot R, Fouchier R, et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001;7:719-24.
4. Griffin DE. Alphaviruses. En: *Fields Virology*. Knipe DM, Howley P. Eds. 6th Ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. pp 651-686
5. van den Hoogen B, Bestebroer T, Osterhaus A, Fouchier R. Analysis of the genomic sequence of a human metapneumovirus. *Virology*. 2002;295:119-32.
6. Feuillet F, Lina B, Rosa-Calatrava M, Boivin G. Ten years of human metapneumovirus research. *J Clin Virol*. 2012;53:97-105.
7. Haas L, Thijsen S, Elden L, Heemstra K. Human metapneumovirus in adults. *Viruses*. 2013;5: 87-110.
8. Døllner H, Risnes K, Radtke A, Nordbø S. Outbreak of human metapneumovirus infection in Norwegian children. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:436-40.
9. 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 line in isolates collected in Yamagata, Japan, in 2004 and 2005. *J Clin Microbiol*. 2007;45:1912-9.
10. Boivin G, Abed Y, Pelletier G, Ruel L, Moisan D, Cote 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.
11. 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.
12. Chan P, Tam J, Lam C, Chan E, Wu A, Li C, et al. Human metapneumovirus detection in patients with severe acute respiratory syndrome. *Emerg Infect Dis*. 2003;9:1058-63.
13. Espinal D, Hurtado I, Arango A, García J, Laguna-Torres V, Jaramillo S. Metapneumovirus humano en niños: primeros casos en Colombia. *Biomédica*. 2012;32:174-8.
14. Barbosa J, Pulido P, Rey-Benito G, Méndez J, Castellanos J, Páez A. Human respiratory syncytial virus and metapneumovirus in patients with acute respiratory infection in Colombia, 2000–2011. *Rev Panam Salud Pública*. 2014;36:101-9.
15. Maertzdorf J, Wang C, Brown J, Quinto J, 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.
16. Herfst S, Mas V, Ver L, Wierda R, Osterhaus A, Fouchier R. Low-pH- induced membrane fusion mediated by human metapneumovirus F protein is a rare, strain-dependent phenomenon. *J Virol* . 2008;82:8891-5.
17. Williams J, Harris P, Tollefson S, Halburnt-Rush L, Pingsterhaus J, Edwards K, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med*. 2004;350:443-50.