

# Estudio clínico-epidemiológico y molecular de Metapneumovirus Humano en pacientes con Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) en Venezuela

## *Clinical and epidemiological and molecular study of human metapneumovirus in patients with acute respiratory infections (ARI) in Venezuela*

CERRAF E TOVAR H<sup>1</sup>, ALESSANDRA MONCHO S<sup>1</sup>, DAVID FERNANDEZ S<sup>1</sup>,  
MARWAN S AGUILAR M<sup>1</sup>, DULCE MORÓN<sup>2</sup>.

### RESUMEN

El Metapneumovirus Humano (MPVh) ha sido asociado con Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) en pacientes de todas las edades. Estudios epidemiológicos indican la prevalencia del MPVh alrededor del mundo, sin embargo, en Venezuela poco se conoce sobre su comportamiento en la población. Este estudio pretende describir el comportamiento epidemiológico de la infección por MPVh en pacientes venezolanos. Se evaluaron por RT-PCR multiplex 1812 hisopados nasales (HN) provenientes de pacientes con diagnóstico de IRA e IRA grave (IRAG) con resultados negativos a virus Influenza, referidos al INHRR entre los años 2010 y 2013. De los Virus Respiratorios no Influenza (VRnI), el MPVh resultó ser el cuarto virus más detectado con una frecuencia de 9,1%. El 42,02 % de los casos positivos a MPVh fueron niños ≤ 5 años con 29 casos (29/69). Los pacientes positivos a MPVh cursaron IRA alta con fiebre, tos, congestión nasal, disnea/tiraje/rinorrea, malestar general y estridor; e IRAG con hospitalización (58%), neumonía (36,2%), bronquitis aguda (10,1%), bronconeumonía (2,8%), rinoфаринgitis y laringotraqueobronquitis en el 1,4%. El análisis filogenético de los MPVh demostró la aparente relación de los genotipos A2 y B2 con IRAG. Este estudio permite demostrar la importancia de la detección de otros agentes virales respiratorios y su posible relación con el desarrollo de IRA/IRAG, así como fortalece la vigilancia epidemiológica de las enfermedades respiratorias en Venezuela.

**Palabras claves:** Metapneumovirus humano, Infecciones Respiratorias Agudas Graves, Virus Respiratorios, Vigilancia Epidemiológica.

### SUMMARY

Human metapneumovirus (hMPV) has been associated with acute respiratory infections (ARI) in patients of all ages. Epidemiological studies indicate hMPV prevalence around the world, but in Venezuela little is known about its behavior in the population. This study aims to describe the epidemiological behavior of hMPV infection in Venezuelan patients. Were evaluated by RT-PCR multiplex 1812 nasal swabs (HN) from patients diagnosed with ARF and severe ARI (SARI) Influenza virus with negative results, referring to INHRR between 2010 and 2013. Of the non Respiratory Influenza Virus (VRNI), the fourth hMPV virus proved more detected at a frequency of 9.1%. The 42.02% of hMPV positive cases were children ≤ 5 years with 29 cases (29/69). HMPV positive patients were enrolled IRA with high fever, cough, nasal congestion, dyspnea/ printing / rhinorrhea, malaise and stridor; and SARI inpatient (58%), pneumonia (36.2%), acute bronchitis (10.1%), bronchopneumonia (2.8%), nasopharyngitis and croup at 1.4%. Phylogenetic analysis of the hMPV showed the apparent relationship of the A2 and B2 genotypes with SARI. This study can prove the importance of the detection of other respiratory viral agents and their possible relationship with the development of IRA / SARI and strengthens epidemiological surveillance of respiratory diseases in Venezuela.

**Keywords:** Human metapneumovirus, Severe Acute Respiratory Infections, Respiratory Viruses, Epidemiological Surveillance.

<sup>1</sup> Departamento de Virología del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). Teléfono: 0212.219.1702. email: cerraftovar@inhr.gov.ve

<sup>2</sup> División de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica. del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR). Teléfono: 0212.219.1702. email: dulce.moron@inhr.gov.ve

<sup>3</sup> Autor de correspondencia: Cerraf E. Tovar H. Telfs: 0212-219.1702 / 0416-810.8444, e-mail: cerraftovar@inhr.gov.ve/cerraftgh@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El Metapneumovirus Humano (MPVh) es un virus envuelto que pertenece al género *Metapneumovirus*, subfamilia *Pneumovirinae* y familia *Paramixoviridae*; descrito por vez primera en niños Holandeses en el año 2001, quienes cursaban un cuadro clínico de Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) con distintos grado de compromiso <sup>(1)</sup>.

El genoma del MPVh está constituido por una cadena de ARN sentido negativo de 13kb el que codifica para 8 proteínas: Matriz (M), Nucleoproteína (N), Fusión (F), Glicoproteína (G), Fosfoproteína (P), Polimerasa (L), Proteína SH y Proteína M2. Análisis filogenéticos del gen de la nucleoproteína N, Proteína F y glicoproteína G han revelado hasta la fecha 2 genotipos del MPVh; genotipo A y genotipo B; y dentro de ellos se encuentra los subtipos A1, A2, B1 y B2. Ambos genotipos han sido asociados a IRA graves (IRAG) en niños y en algunos casos en adultos y aunque pueden co-circular generalmente sólo uno de ellos es el responsable de los episodios de brotes o epidemia <sup>(2, 3)</sup>.

El MPVh se encuentra distribuido a nivel mundial de forma estacional igual que el Virus Influenza (VI) y Virus Respiratorio Sincitial (VRS). Presenta un pico a finales de invierno y principio de primavera <sup>(4)</sup>. La transmisión del MPVh ocurre por contacto directo con secreciones contaminadas que involucran saliva, moco y grandes cantidades de partículas aerosoles y el periodo de incubación del virus varía entre 4 a 6 días. Las infecciones por MPVh se han incrementado en los últimos años especialmente en niños y adultos inmunocomprometidos, causando impacto en la salud y en la economía de los países en desarrollo <sup>(5)</sup>.

Desde su descubrimiento, el MPVh ha demostrado ser capaz de provocar cuadros clínicos de IRA similares a las provocadas por el Virus Respiratorio Sincitial (VRS)<sup>(4)</sup>, afectando tanto las vías respiratorias superiores, produciendo: tos, fiebre, dificultad respiratoria, sibilantes, crepitantes, disnea-tiraje, rinorrea, expectoración, como las inferiores, causando: bronquitis aguda, neumonía y en algunos casos bronconeumonía y asma <sup>(2, 6, 7, 8)</sup>.

En Venezuela, poco se conoce sobre el comportamiento del MPVh y la relación con el desarrollo de IRA e IRAG, por lo tanto este estudio tiene como objetivo

demostrar la circulación de MPVh en pacientes con diagnóstico de IRA e IRAG referidos al INHRR entre los años 2010 y 2013, así como describir las características clínicas-epidemiológicas y los genotipos asociados pacientes Venezolanos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Tipo de estudio:** Se realizó un estudio descriptivo en muestras de pacientes con diagnóstico de IRA/IRAG referidas al INHRR provenientes de todo el territorio nacional como parte de la Vigilancia Epidemiológica entre los años 2010-2013.

**Muestras:** Las muestras empleadas en el estudio consistieron en 1812 hisopados nasales (HN) tomadas en medio de transporte viral (Sigma virocult®) de pacientes con diagnóstico de IRA y/o IRAG (con resultado negativo a virus Influenza A y B por la técnica de RT-PCR en tiempo real) y referidas al INHRR como parte de la Vigilancia Epidemiológica de IRAs del Ministerio del Poder Popular para la Salud, República Bolivariana de Venezuela, período 2010-2013.

**Procesamiento de la muestra:** La detección molecular fue realizada basándose en el protocolo previamente desarrollado y publicado <sup>(9, 10)</sup>. Todas las muestras fueron procesadas para la detección del genoma de 13 virus respiratorios no Influenza (VRnI) (Adenovirus (ADV), Enterovirus (EntV), Rinovirus (RNV), Coronavirus OC43 y 229E (CoVh), Parainfluenza 1,2,3 y 4 (PIVh), VRS A y B, MPVh y Bocavirus(BoVh). 140 ul de HN de cada paciente fue utilizado para la extracción del ARN viral mediante el kit comercial QIAamp Viral Mini kit (Qiagen®, Hilden-Germany). 5ul del ARN extraído fue amplificado por RT-PCR en una mezcla de reacción con un volumen de 45ul conteniendo: 10ul de buffer enzimático, 10pmol de cebadores sentido y antisentido dirigidos al gen que codifica para la proteína matriz (cuadro n°1). 0,4mM de dNTPs, 1,5mM de MgSO<sub>4</sub> y 2ul de mezcla de enzimas conteniendo 10U de enzima GoTaq Flexi DNA polimerase y GoScript Reverse transcriptase (cat#M8295 y cat#A5000 de Promega, respectivamente), la reacción se llevó a cabo en un termociclador marca Applied Biosystems bajo las siguientes condiciones: 45°Cx45 min, 95°Cx5 min, luego 45 ciclos a 95°Cx30seg, 53°Cx2min, 68°Cx1min y una extensión final a 68°Cx10min. Para el segundo ciclo de

amplificación (NESTED-PCR), 2ul del producto del 1er ciclo fueron añadidos a una mezcla de reacción con un volumen de 48ul conteniendo: 10ul de buffer enzimático, 10pmol de cada cebador descrito en la cuadro n°1; 1,2mM de dNTPs; 5mM de MgCl<sub>2</sub> y 2,5 U de GoTaq Flexi DNA Polimerase (Promega, Cat#M8295). La reacción se realizó bajo las siguientes condiciones: 95°Cx5min,

35 ciclos a 95°Cx30seg, 55°Cx2min y 72°Cx1min, con una extensión final a 72°Cx5min. 10ul del producto del 2do round fue combinado con 1ul de buffer se carga, corrido en un gel de agarosa al 2% bajo un voltaje de 125 voltios y visualizado en un transiluminador de UV. Las muestras positivas se determinaron porque mostraron la banda esperada de 486pb.

**Cuadro N° 1. Cebadores empleados para la detección de MPVh en muestras de HN<sup>(9, 10)</sup>**

cebador	Secuencia 5'-3'	Ciclo	Blanco	Producto
Matriz 1A	TTGTYCCTTGRTGRTCCA	RT-PCR	Proteína Matriz	486 pb
Matriz 1S	GAGTCCTAYCTAGTAGACAC			
Matriz 2A	TCTTGCAKATYYTRCTKATGCT	NESTED-PCR		
Matriz 2S	GCRGCIATGTCTGTACTTCC			

#### Secuenciación de la proteína Matriz y Análisis

**Filogenéticos:** Para este análisis fueron seleccionados cinco productos de amplificación de muestras de pacientes con desarrollo de IRAG. La banda de 486pb fue cortada del gel de agarosa y purificada mediante un kit comercial (FavorPrep™ Gel/PCR Purification Kit. Favorgen® Biotech Corp), obteniendo 40ul del producto amplificado. Dicho producto fue cuantificado con el uso de un espectrofotómetro marca eppendorff y posteriormente secuenciado en un equipo Applied Biosystems 3500 Hitachi. La secuencia obtenida junto con los electroferogramas fueron revisados en el software BioEdit v.1.0 y posteriormente la secuencia consenso fue alineada con 36 secuencias parciales de la proteína matriz y completas de MPVh obtenidas del National Center for Biotechnology Information (NCBI) y del European Bioinformatics Institute (EBI) (números de acceso **KJ627397.1, KC562231.1, JQ309663.1, JQ309660.1, JQ309647.1, JQ309646.1, JN184399.1, JN184400.1, JN184402.1, EF535506.1, JN184401.1, AF371337.2, KJ627432.1, HM197719.1, AY145263.1, KJ627414.1, KF530155.1, KC562237.1, KC562230.1, KC562226.1, KC562219.1, KC562236.1, KC403980.1, KJ627435.1, EF081359.1, FJ168778.1, FJ168779.1, AY297748.1, AY297749.1, KJ627400.1, DQ843658.1, DQ843659.1, JQ309661.1, AY525843.1, AY530589, GQ153651.1**).

Las muestras fueron enviadas a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (UEGF-IVIC), y el análisis filogenético del segmento de 486pb de la proteína matriz de MPVh se realizó con el empleo del programa MEGA versión 6.0, con el método de *Neighbour-Joining*.<sup>(11)</sup>

**Variables:** En cada caso se analizaron las variables: Grupo etario, genero, procedencia, características clínicas, genotipo circulante y frecuencia en año.

**Instrumento de recolección de datos:** Para el análisis de las variables clínico-epidemiológico se empleó la ficha de investigación de Infecciones Respiratorias Agudas del Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPPS), la cual acompaña la toma de la muestra de HN y es llenada por el médico tratante o por el personal de los servicios de epidemiología regional y los datos fueron obtenidos del Sistema Automatizado de Registro de Pacientes (EVAL)de la Gerencia de Diagnóstico y Vigilancia Epidemiológica del INHRR.

#### RESULTADOS

Con la finalidad de conocer las características de la población de estudio, se elaboró una tabla (tabla n°1) donde se muestra la distribución de los pacientes incluidos en el estudio según grupos etarios, género, procedencia y diagnóstico clínico. Luego de la clasifi-

**Tabla N° 1. Distribución de las muestras de estudio según edad, sexo, ubicación geográfica y diagnóstico clínico. Venezuela 2010 y 2013**

Total de muestras (N=1812)	
Grupo Etario (N=1808) <sup>1</sup>	n (%)
0-5 años	941 (52,0)
6-20 años	165 (9,1)
21-40 años	188 (10,4)
41-60 años	385 (21,3)
60 o más	129 (7,1)
Ubicación geográfica	n (%)
Amazonas	55 (3,0)
Anzoátegui	62 (3,4)
Apure	56 (3,1)
Aragua	126 (7,0)
Barinas	13 (0,7)
Bolívar	134 (7,4)
Carabobo	29 (1,6)
Cojedes	58 (3,2)
Delta Amacuro	126 (7,0)
Distrito Capital	127 (7,0)
Falcón	19 (1,0)
Guárico	57 (3,1)
Lara	80 (4,4)
Mérida	93 (5,1)
Miranda	116 (6,4)
Monagas	108 (6,0)
Nueva Esparta	42 (2,3)
Portuguesa	77 (4,2)
Sucre	123 (6,8)
Táchira	120 (6,6)
Trujillo	20 (1,1)
Vargas	8 (0,4)
Yaracuy	60 (3,3)
Zulia	103(5,7)
Diagnóstico clínico	n (%)
Hospitalización asociada a Bronconeumonía y Neumonía.	1253 (69,2%)
Bronquitis aguda	82 (4,5%)
Asma bronquial	40 (2,2)
Embarazo	95 (5,2)
Otra condición clínica <sup>3</sup>	342 (18,9)

<sup>1</sup> El N° difiere del total debido a que en algunas historias evaluadas no se encontraba la edad del paciente.

cación de acuerdo a estos parámetros, se puede decir que la población fue bastante heterogénea ya que se incluyeron muestras de todas las edades, desde

0 años a adultos mayores de 60 años. En cuanto al género, se evaluaron 961 (53%) pacientes del género femenino y 851 (47%) pacientes del género masculino y se incluyeron muestras de todos los estados del país. Referente al diagnóstico clínico y morbilidades, el 69,2% de pacientes requirieron hospitalización asociado a bronconeumonía y/o neumonía, mientras que el 4,2% fueron diagnosticado con bronquitis aguda, el 2,2% con asma bronquial y 18,9% presentaron factores de riesgo tales como: embarazo, cardiopatía, VIH, síndrome coqueluchoide/tosferina, anemia, diabetes, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), antecedentes de asma, hábito tabáquico y obesidad. El MPVh fue detectado en 19 estados de Venezuela durante todas las temporadas del estudio.

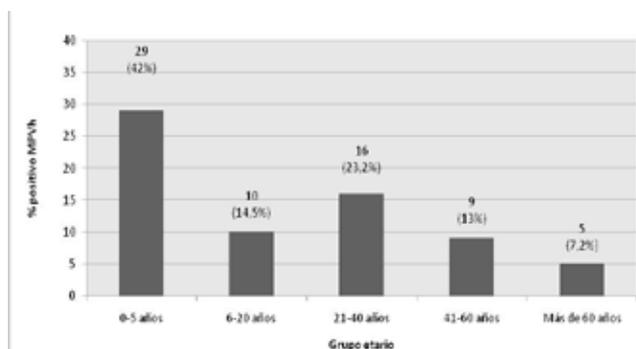
El MPVh fue detectado en todos los años de estudio y el porcentaje de positividad fue 9,1% (69/759) representando el cuarto virus más frecuente. Se detectaron también otros VRnl como el VRS (37,7%), RNV en el 22,2%, PIVs en el 13,2%, AdV en el 8,2%, EntV en el 3,8%, BoVh en 3,3% y CoVh en 2,8%. En menos del 1% de los casos se encontraron más de un VRnl. El año donde se encontró mayor frecuencia del MPVh fue el 2010 con 10,8% y la menor frecuencia fue en 2011 con 4,5%; esto podría deberse a que el número de muestras analizadas por la técnica de PCR multiplex varía en cada año (Tabla n° 2).

A pesar de que en todos los grupos etarios analizados se detectó la presencia del MPVh (figura n°1), el grupo etario con mayor frecuencia fue de 0-5 años con (42%) seguido por el grupo de adultos de 21-40 años con 23,2%. (Figura n°1).

En la figura n°2 se describen los signos y síntomas y el diagnóstico clínico más común desarrollado por pacientes positivos a MPVh. El 85,5% de los pacientes positivos a MPVh presentaron fiebre y tos, seguido por congestión nasal con 62,3%, disnea/tiraje/ri-norrea el 58% y malestar general y estridor con 46,4%. Luego cefalea (44,9%), mialgias (39,1%), estornudos (34,8%), crepitante (33,3%), dolor torácico (30,4%), sibilantes (29%), taquipnea/dolor de garganta/artrialgias (23,2%), astenia (21,7%) y odinofagia/fatiga/nauseas/vomito en 20,3%. En general, la gran mayoría de los pacientes presentaron más de uno de estos signos y

**Tabla N° 2. Virus Respiratorios no Influenza (VRnl). Caracas. Venezuela. 2010 y 2013**

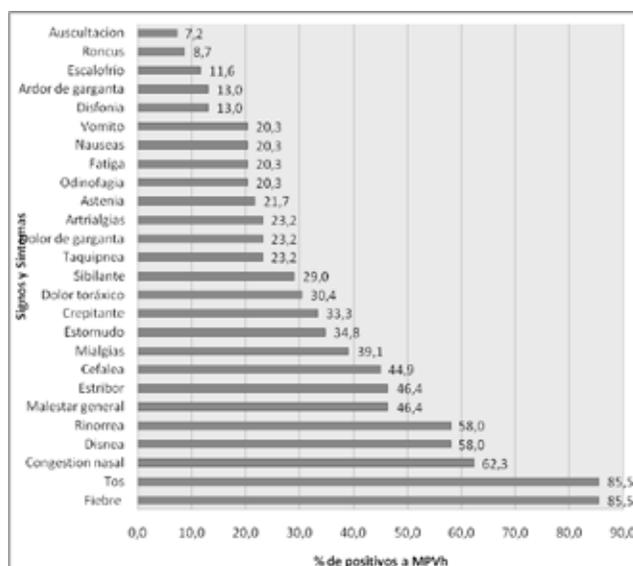
Agente etiológico	Año de estudio (N=1812)				
	2010 (n=719)	2011 (n=497)	2012 (n=448)	2013 (n=148)	Total n (%)
+VRnl	431	153	111	63	756
Metapneumovirus humano	50/431 (11,6)	5/153 (3,3)	12/111 (10,8)	2/63 (3,2)	69/756 (9,1)
VRS	167	46	57	12	282 (37,7)
Rinovirus	99	31	17	21	168 (22,2)
Parainfluenza 1,2,3 y 4	55	25	9	11	100 (13,2)
Adenovirus	2	35	13	12	62 (8,2)
Enterovirus	22	5	2	0	29 (3,8)
Bocavirus	17	4	3	1	25 (3,3)
Coronavirus OC43, NL63	19	2	0	0	21 (2,8)



**Figura N° 1. Distribución del MPVh en los distintos grupos etario Venezuela 2010-2013**

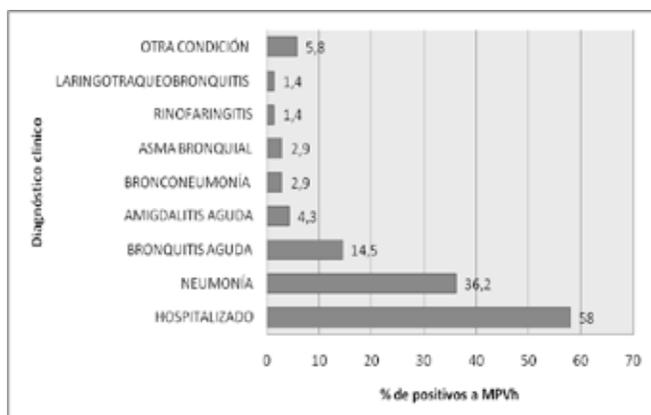
síntomas o condición clínica a la vez, desarrollando así un cuadro clínico complejo.

Con relación al diagnóstico clínico, el 92,8% de los pacientes presentaron IRA baja asociada principalmente a neumonía (36,2%), bronquitis aguda (14,5%), bronconeumonía (2,4%) y en algunos casos rinofaringitis, amigdalitis aguda (4,3%) y laringotraqueobronquitis en 1,4%. El 58% requirieron hospitalización y 2,9% presentaron asma bronquial. En niños menores de 1 año se encontró que el 90% presentaron fiebre y tos; y el 70% presentaron IRA bajas asociadas a bronconeumonía y neumonía, de los cuales el 100% de los mismos requirieron hospitalización. Solo dos (2) pacientes fallecidos con co-morbilidad resultaron positivos a MPVh.



**Figura N° 2. Características clínicas de pacientes positivos a MPVh en Venezuela 2010-2013**

Un pequeño porcentaje (5,8%) de pacientes con factores de riesgo y que desarrollaron una enfermedad de base como cardiopatías, Asma, Obesidad, VIH-EPOC, síndrome coqueluchoides y/o hábito tabáquico, Artritis reumatoide y postración resultaron positivos a MPVh. Igualmente, nueve (9) mujeres embarazadas resultaron positivas a MPVh (13%) presentando los mismos signos y síntomas (figura n°3)



**Figura N° 3. Diagnóstico clínico encontrado en los pacientes positivos a MPVh en Venezuela 2010-2013. Otra condición: Pacientes con enfermedades de base como obesidad, cardiopatías, síndrome coqueluchoides hábito tabáquico, VIH y/o EPOC.**

Un total de 36 secuencias completas y/o parciales del genoma de MPVh disponibles de la base datos del GenBank y EBI y cinco (5) secuencias provenientes pacientes con IRAG positivos a MPVh fueron utilizadas para un análisis filogenético empleando el segmento parcial amplificado de 486pb de la proteína matriz de

MPVh. En las muestras analizadas por este ensayo se encontró los genotipos A y B del MPVh. El análisis filogenético por el método *Neighbor-Joining* resultó en la formación de cuatro clados perfectamente diferenciados correspondientes a cada linaje genético o genotipo del MPVh (A1, A2, B1, B2) (Figura n°3). De los cinco (5) pacientes incluidos en este estudio, 2 pacientes (Pac.2 y Pac.5) se ubicaron dentro del clado correspondiente al genotipo A2 y 3 pacientes (Pac.1, Pac.3 y Pac.4) se ubicaron dentro del clado correspondiente al genotipo B2. Como se muestra en la tabla n°4, 4 pacientes mostraron neumonía y 1 de ellos estuvo en la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI); 4 estuvieron hospitalizados y 1 de ellos tenía un embarazo de 45 semanas. Las características clínicas de los pacientes incluidos en este tipo estudio y el genotipo asociado a los mismos se resumen en la tabla n°4.

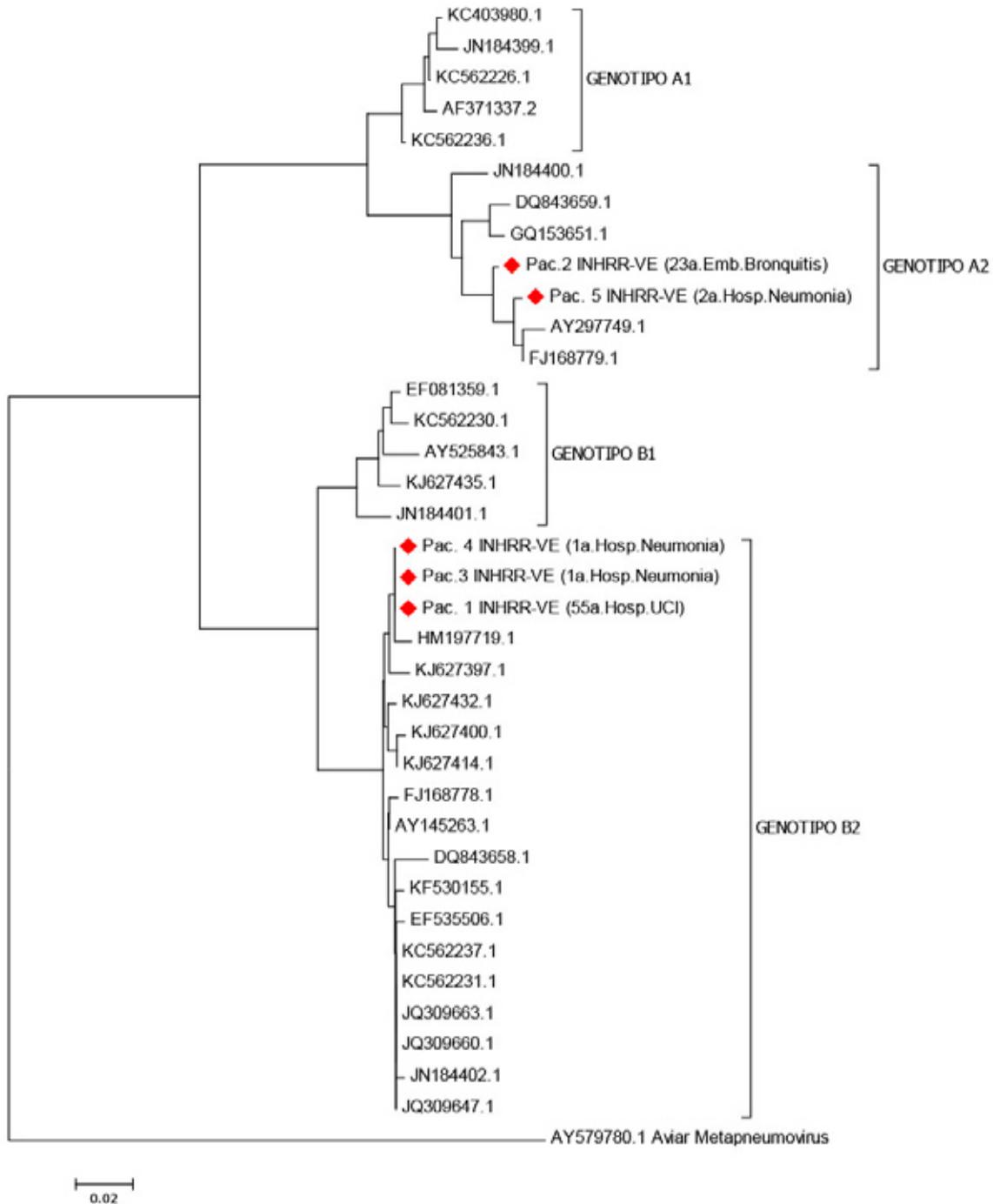
#### Discusión

En Venezuela, muy poco se conoce del MPVh en pacientes que cursan IRA o IRAG. Un estudio en el estado Zulia<sup>(10)</sup>, evidenció la circulación y la presencia de VRS (32,6%), Adenovirus (28,2%), Parainfluenza (23,9%) e Influenza (15,2%); pero no se reportaron otros agentes importantes como el MPVh, el Coronavi-

**Tabla N° 4. Pacientes con IRAG vs. Genotipos de MPVh**

Paciente	Signos y Síntomas	Infección Respiratoria Baja	Genotipo MPVh
1	EST, DIS, T, TQ.	Hospitalizado, UCI.	Genotipo B2
2	F, E, C, M, CN, R, EST, DG, T, MG, AS	Bronquitis aguda	Genotipo A2
3	F, CN, R, EST, T, DIS, SI, MG, AS	Hospitalizado Neumonía	Genotipo B2
4	CN, R, T, DIS, MG	Hospitalizado Neumonía	Genotipo B2
5	F, R, T	Hospitalizado Neumonía	Genotipo A2

Leyenda: F: fiebre; T: tos; E: escalofrío; R: rinorrea; C: cefalea; M: mialgia; T: tiraje; TQ: taquipnea; UCI: unidad de cuidados intensivos; EST: estornudo; CN: congestión nasal; D: diarrea; DIS: disnea; DG: dolor de garganta; MG: malestar general; AS: astenia.



**Figura N°4. Análisis filogenético de la secuencia de 489pb de la proteína matriz de MPVh.** El árbol muestra la formación de cuatro clados perfectamente separados y se aprecia en círculos rojos la ubicación de los cinco (5) pacientes del INHRR-VE dentro de los genotipos de MPVh. Los pacientes 1, 3 y 4 (Pac. 1, Pac. 3 y Pac. 4) pertenecen al genotipo G2; mientras que los pacientes 2 y 5 (Pac. 2 y Pac. 5) pertenecen al genotipo A2. El análisis se realizó con el programa MEGA versión 4.1 con el método de Neighbour-Joinnig, se utilizaron 1000 interacciones Bootstrap, y se compararon con el Metapneumovirus aviar.

rus, Bocavirus, Rinovirus y Enterovirus humanos. Tres eventos epidemiológicos importantes ocurridos en el país (la epidemia de Influenza AH1N1pdm del 2009 y los brotes del 2011 y 2013), brindaron una oportunidad para fortalecer la vigilancia de otros virus respiratorios no Influenza como el MPVh.

En el presente estudio se determinó la frecuencia y se describieron las características clínicas y moleculares del MPVh en muestras de pacientes que cursaban IRA e IRAG. Para ello se evaluaron por RT-PCR multiplex 1812 HN durante 4 años (2010-2013) procedentes de todo el territorio nacional, ambos sexos y de cualquier grupos etario, condición inmunológica y con resultados negativos a virus Influenza A y B. El MPVh se detectó en el 9,1% de los pacientes con infecciones por VRnI ocupando el cuarto lugar. Estos datos, son similares a otros estudios donde reportan una prevalencia igual de 9%<sup>(12)</sup>, mientras que es levemente mayor a otros estudios donde reportan 8,5%<sup>(2)</sup>, 7,2%<sup>(13, 14)</sup> y 6,9%<sup>(4)</sup>. La presencia de otros agentes virales no influenza como VRS (A y B), Adenovirus, Rinovirus, Enterovirus, Bocavirus, Coronavirus (229E y OC43) y Parainfluenza 1, 2, 3 y 4 también fue comprobada en el 41,7% de los pacientes, demostrando la complejidad etiológica del las IRA en nuestro país.

Se encontró la presencia del MPVh en 19 de 24 estados del país y en todos los grupos etarios con una frecuencia que oscila entre 7,2% (mayor de 60 años) hasta 42,2% (0-5 años) de los casos. En la población de niños  $\leq$  5 años, el MPVh se detectó en 29 casos (42,02%), un dato mucho a los reportados por Quan Tan et al. en 2014<sup>(15)</sup> de 2,9% y de 3,7%<sup>(16)</sup>; 4%<sup>(5)</sup> y 5,1%<sup>(17)</sup>. Estos datos son similares a los estudios que asocian al MPVh e IRAG en niños de esta edad. Estudios serológicos indican que antes de los 5 años se tiene contacto con el MPVh, adquiriendo una inmunidad relativamente parcial ante el genotipo involucrado en la infección<sup>(17, 18)</sup>.

Estos resultados son cónsonos con distintos estudios hallados en la literatura, recalcando una mayor frecuencia del MPVh en niños menores a 5 años, y también en adultos jóvenes. Según otros estudios se ha logrado determinar que MPVh produce entre 5-35% de los cuadros respiratorios en niños donde otro agente viral no ha podido ser reconocido<sup>(2, 5, 7, 18, 19)</sup>.

Existe una población entre 21-40 años y de 41-60 años con una frecuencia importante de MPVh (23,2% y 13%, respectivamente), la cual es superior a los encontrados por otros estudios donde indican una frecuencia entre 3% y 14% en la misma población<sup>(18, 19)</sup>. Esto podría deberse a la gran cantidad de factores de riesgo a los que se encontraba gran parte de la población de adultos analizadas en este estudio. Sin embargo hacen falta otros estudios para comprobar esta hipótesis.

Los signos, síntomas y el diagnóstico clínico observado en los pacientes con MPVh son de espectro amplio y muy similar a las reportadas en la literatura de infecciones con VSR, con alteraciones a nivel de vía respiratoria alta y baja, produciendo cuadros desde leves a graves, y en algunos casos requiriendo manejo hospitalario. El 85,5% de los pacientes +MPVh poseían diagnóstico de neumonía con hospitalización, siendo un porcentaje mayor al encontrado en otros estudios similares, donde reportan un 60% de probabilidad de desarrollar IRA o IRAG cuando hay infección por MPVh<sup>(5)</sup>. Con referente a las características clínicas en adultos con MPVh, algunos reportes indican enfermedad leve tos, ronquera, dolor de garganta, congestión nasal y rinorrea y presentar desde infecciones asintomáticas hasta presentar neumonía<sup>(11)</sup>; otros mencionan pacientes con bronconeumonía, bronquitis aguda y hospitalización entre el 4,3 al 13,2%<sup>(5, 18)</sup>. Adicionalmente, se encontró un número importante (5,8%) de pacientes con "otra condición" clínica que resultaron positivos a MPVh, hallazgo que es respaldado por estudios donde se ha encontrado el agente en el 2% de muestras de pacientes con exacerbaciones de Asma y EPOC.

El análisis filogenético de la secuencia de 489pb de la proteína matriz del MPVh llevado a cabo en cinco pacientes con IRAG, demostró la presencia de ambos linajes genéticos del virus (genotipos A y genotipo B). Los pacientes con subtipo A2 presentó bronquitis (Pac.2 INHRR-VE); y neumonía con hospitalización (Pac.5 INHRR-VE); los pacientes con genotipo B2 presentaron neumonía con hospitalización (Pac.1, Pac.3 y Pac.4). Este hallazgo evidencia la posible asociación del MPVh con los casos de IRA e IRAG. Los estudios de análisis filogenéticos del MPVh emplean los genes F y genes G, los cuales arrojan 2 linajes genéticos (A y B) y 4 sublinajes (A1, B1, A2, B2), no obstante nues-

tro estudió con la proteína matriz del virus, confirma el reporte realizado por estudios filogenéticos previos donde también hallan ambos genotipos de MPVh en pacientes con IRAG<sup>(17, 20, 21)</sup>. Este es el primer análisis que emplea la proteína matriz del MPVh y con resultados muy alentadores, no obstante hacen falta estudios filogenéticos empleando otros marcadores para confirmar de manera más precisa la presencia de ambos genotipos.

El MPVh figuró como un agente etiológico causante de un cuadro clínico característico de IRA grave en niños, adultos y mujeres embarazadas, con una frecuencia importante tanto en niños como en adultos. Existe una probabilidad relevante de padecer IRAG con neumonía y bronquitis aguda al ser infectado con MPVh. Este primer reporte de MPVh en Venezuela muestra la relevancia que en salud pública tiene la detección de agentes virales a través del Programa de Vigilancia Epidemiológica de IRA e IRAG del Ministerio del Poder Popular para la Salud. A su vez, estudios como este permiten una aproximación a la comprensión del comportamiento, evolución y emergencia de patógenos virales asociados a enfermedades respiratorias. Este estudio evidencia la importancia de la detección de agentes virales en la Vigilancia Epidemiológica y conlleva al estudio del comportamiento de virus emergentes en nuestro país, para la comprensión de la complejidad de las enfermedades respiratorias.

## AGRADECIMIENTOS

El desarrollo de esta investigación contó con la valiosa ayuda del personal de la Unidad de Atención al Paciente, de la División de Vigilancia Epidemiológica y de la Sección de Aislamiento Viral.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J., et al. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.*, 2001. 7: 719–724.
- (2) Abara S. Metapneumovirus humano: Un Nuevo agente en IRA alta y baja. *Neumol Pediatr* 2006; 1 (1): 11-13.
- (3) Williams JV, Paul A, Tollefson SJ, Halburnt-Rush L, Pingsterhaus MJ, Edward KM, et al. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N Engl J Med* 2004 January 29; 350 (5): 443-450.
- (4) Janssen K, Floré K, Piette A, Vankeeberghen A, Padalko E. Implementation of real-time RT-PCR for detection of human metapneumovirus and its comparison with enzyme immunoassay. *Arch Virol* 2010; 155:207-215.
- (5) García Mal., Calvo Rey C, Martín del Valle F, López Huertas MR, Casas F. I, Díaz D. R, Pérez-Breña P. Infecciones respiratorias por metapneumovirus en lactantes hospitalizados. *An Pediatr* 2004; 61 (3):213-218.
- (6) Bonroy C, Vankerrberghen A, Boel A, De Beenhouwer H. Use of a multiplex real-time PCR to study the incidence of human metapneumovirus and human respiratory syncytial virus infections during two winter seasons in a Belgian paediatric hospital. *Clin. Microbiol. Infect* 2007. 13: 504-509.
- (7) Mohamed ME, Reiche J, Jacobsen S, Thbit A, Badary M, Brune W, Schweiger B, Osmani A. Molecular analysis of human metapneumovirus detected in patients with respiratory tract infection in upper Egypt. *Inter J Med, Article* 2014, ID 290793.
- (8) López, M, Kuszniarz G, Imaz M, Cociglio R, Tedeschi F, Zalar P. Metapneumovirus humano (hMPV) asociado con exacerbación de asma aguda bronquial severa. *Revista argentina de microbiología* 2006. 38:140 – 142.
- (9) Coiras MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B and C Viruses, Respiratory Syncytial Virus and Adenoviruses in clinical samples by multiplex reverse transcription Nested-PCR assay. *J Med Virol* 2003; 69:32-44.
- (10) Acosta-Herrera B, Piñón A, Valdés O, Savón C, Goyenechea A, Gonzales G, Oropeza-Fernández, Gonzales G, Hernández B. Fortalecimiento del diagnóstico molecular para la vigilancia de virus respiratorios en Cuba. *Rev Biomed* 2008; 19:146-154.
- (11) Kumar et al. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. *Bioinformatics*. 2001 Dec; 17(12):1244-5
- (12) Valero N, Larreal Y, Arocha F, Gotera J, Mavarez A, Bermudez J, Moran M, Maldonado M, Espina LM. Etiología viral de las infecciones respiratorias agudas. *Inves Clin* 2009; 50 (3): 359-368
- (13) Keun Kim C, Choi J, Callaway Z, Bin Kim H, Chung Ju Y, Young-Yull K, Moon Shin B. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea. 2003-2008. *J Korean Med Sci* 2010; 25:342-347.

- (14) Kuypers J, Wringt N, Corey L, Morrow R. Detection and quantification of human metapneumovirus in pediatric specimens by real-time RT-PCR. *J Clin Vir* 2005; 33: 299-305.
- (15) Quan X, Zhao X, Lee V, y colaboradores. Respiratory viral pathogens among Singapore military servicemen 2009 – 2012: Epidemiology and clinical characteristics. *BMC Infectious diseases* 2014, 14:204.
- (16) Minoru N, Nidaira Katsuya Taira, Hirotsune Hamabata, Tatsuyoshi Kawaki, Kazuo Gushi, Youko Mahoe, et al. Molecular Epidemiology of Human Metapneumovirus from 2009 to 2011 in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis* 2012. 65, 337-340.
- (17) Huck B, Scharf G, Neumann-Haefelin D, Puppe W, Weingl J, Falcone V. Novel human metapneumovirus sublineage. *Emer. Infect. Dis.* 2006. 12 (1):147-150.
- (18) Boivin G, De Serres G, Hamelin ME, Cote S, Argouin M, Tremblay G, et al. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in a long-term care facility. *Clin. Infect. Dis.* 2007, 44: 1152–1158.
- (19) Lenneke E. M Haas, Steven F. T. Thijssen, Leontine van Elden, Karen A Heemstra. Human Metapneumovirus in Adults. *Viruses* 2013, 5: 87-110.
- (20) Albuquerque MC, Varella RB, Santos N. Acute Respiratory Viral Infections in Children in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2012. 54 (5):249-255.
- (21) Toda S, Kimura H, Noda M, Mizuka K, Matsumoto T, Suzuki, Shirabe K. Phylogenetic analysis of human metapneumovirus from children with acute respiratory infections in Yamaguchi, Japan, during summer 2009. *Jpn J Infect Dis* 2010. 63:139-140.