



# Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Original

## Estudio comparativo de inmunofluorescencia directa, enzimoimmunoanálisis y cultivo para el diagnóstico de las infecciones por metapneumovirus humano

Ignacio Calicó\*, Michael Lowak, Albert Bas, M<sup>a</sup> Teresa Betbesé, Francisco Fuentes y Natalia Loiza

Unidad de Virología, Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona, España

### INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

#### Historia del artículo:

Recibido el 26 de febrero de 2008

Aceptado el 3 de noviembre de 2008

On-line el 6 de mayo de 2009

#### Palabras clave:

Metapneumovirus humano  
Infección respiratoria  
Inmunofluorescencia  
Enzimoimmunoanálisis

### RESUMEN

**Introducción:** El metapneumovirus humano (hMPV) es el causante de un número importante de infecciones en pediatría, entre un 14 y un 22% de las infecciones respiratorias víricas con diagnóstico etiológico establecido.

Se presenta un estudio comparativo entre una técnica de inmunofluorescencia directa (IFD), una de enzimoimmunoanálisis (EIA) y el cultivo según la técnica de *shell vial*.

**Métodos:** Se procesaron 124 aspirados nasofaríngeos pertenecientes a 108 lactantes con infecciones respiratorias de vías bajas. Durante su recepción se los procesó para la IFD, para lo que se utilizó un anticuerpo anti-hMPV comercial (Diagnostic Hybrids Inc.) y se sembró en la línea celular LLC-MK2 (sólo 76 muestras) para fijarse y teñirse a las 48 h con el mismo suero citado. El resto de la muestra se procesó según la rutina diagnóstica habitual y se congeló en alícuotas para posterior estudio con EIA (Biotrin<sup>®</sup>).

**Resultados:** Veinte muestras (16,12%) fueron positivas al hMPV mediante la IFD, 27 muestras (21,77%) fueron positivas mediante el EIA y 15 muestras (19,73%) fueron positivas mediante cultivo. La IFD y el EIA coincidieron en un 92,73% de las 124 muestras. Al considerar las 3 pruebas (76 muestras) se consiguió una concordancia del 90,78%. Al considerar sólo las primeras muestras de cada enfermo (fase aguda), la sensibilidad, los valores predictivos y el índice Kappa de la IFD mejoraron y se acercaron a los obtenidos con el EIA.

**Conclusión:** Ambas pruebas de detección de antígeno son útiles en el diagnóstico de la infección aguda por hMPV en aquellos hospitales pediátricos que no dispongan de las técnicas de amplificación para este virus y necesiten un diagnóstico etiológico con urgencia, con la salvedad de que la IFD está indicada sólo en la fase inicial de la infección.

© 2008 Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

## A comparative study of direct immunofluorescence, enzyme immunoassay, and culture for diagnosing metapneumovirus infection

### ABSTRACT

**Introduction:** Human metapneumovirus (hMPV) is an important cause of lower respiratory tract infections in children, accounting for 14% to 24% of all viral respiratory infections with an etiological diagnosis. This study compares a direct fluorescent antibody (DFA) test, enzyme immunoassay (EIA), and shell-vial culture for diagnosing acute bronchiolitis in infants.

**Methods:** A total of 124 nasopharyngeal aspirates from 108 infants with lower respiratory tract infection were analyzed. Incoming samples were processed for DFA using a commercial anti-hMPV antibody (Diagnostic Hybrids Inc.<sup>®</sup>); 76 were inoculated in an LLC-MK2 cell line, and after an incubation period of 48 h, were stained and fixed with the aforementioned serum. The remaining sample was processed according to the routine diagnostic procedure and aliquots were frozen for EIA analysis (Biotrin<sup>®</sup>).

**Results:** Twenty (16.12%) samples were positive for hMPV by DFA, 27 (21.77%) by EIA, and 15 (19.73%) by culture. DFA and EIA results were consistent in 92.73% of the 124 samples. Considering the 3 techniques, the same results were obtained in 90.78% of the 76 specimens. Considering only the first specimen from each patient (acute phase), the sensitivity, predictive values, and Kappa index for DFA improved and were very close to the EIA values.

#### Keywords:

Metapneumovirus  
Respiratory tract infection  
Immunofluorescence  
Enzyme immunoassay

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: icalico@vhebron.net (I. Calicó).

**Conclusion:** DFA and EIA are useful for antigen detection in the diagnosis of acute hMPV infection, particularly in pediatric hospitals that do not have amplification techniques for this virus, and when a rapid diagnosis is required. It should be kept in mind that DFA analysis is a suitable test for this purpose only in the acute phase of the infection.

© 2008 Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## Introducción

Desde el descubrimiento hace 7 años del metapneumovirus humano (hMPV) se ha comprobado que es el segundo causante de bronquiolitis y neumonías víricas en el lactante<sup>1-3</sup>. Ocasionalmente el cuadro clínico puede simular, incluso, una tos ferina<sup>4</sup>. Posteriormente se ha implicado en infecciones de adultos, a menudo graves, en brotes hospitalarios y residencias de ancianos así como en pacientes inmunodeficientes, como los trasplantados de pulmón<sup>4,5</sup>. Estas afecciones respiratorias remedan cuadros gripales e incluso neumonías<sup>6-8</sup>.

El interés que tiene el establecer el diagnóstico etiológico rápido de la infección respiratoria vírica está en conocer el causante de la enfermedad del paciente y, por tanto, aventurar un pronóstico. En segundo lugar, el aislamiento de los niños infectados al momento del ingreso con la finalidad de evitar la difusión del agente en un centro hospitalario, al igual que se hace con los lactantes infectados por virus respiratorio sincitial (VRS). También se puede considerar la posibilidad de establecer un tratamiento con ribavirina<sup>9</sup> o en el futuro con anticuerpos monoclonales<sup>10</sup>. Todo esto justifica que se realice el diagnóstico etiológico de estas infecciones de forma sistemática.

La técnica diagnóstica más sensible es sin duda alguna la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)<sup>1-8</sup>. Sin embargo, no todos los hospitales pediátricos disponen de técnicas moleculares, principalmente de RT-PCR, para establecer de manera urgente el diagnóstico de infección por hMPV; además, derivar las muestras a otros laboratorios representa un retraso que disminuye la utilidad del resultado. Por este motivo, una de las opciones es utilizar técnicas sencillas, al alcance de muchos laboratorios, basadas en inmunofluorescencia y enzimo-inmunoanálisis, que permiten tener los resultados en pocas horas.

Si bien el aislamiento de hMPV en cultivos celulares es de gran valor confirmatorio, su complejidad y lentitud lo desaconsejan en la rutina diagnóstica, aunque su utilidad como control de técnicas en experimentación es indudable. La combinación del cultivo con la detección del patógeno mediante inmunofluorescencia, *shell vial*, ofrece el resultado en 48 h, por lo que algunos hospitales lo utilizan como referencia<sup>11,12</sup>.

Con el objetivo de evaluar técnicas rápidas de diagnóstico de hMPV en laboratorios dedicados principalmente a pediatría, se ha comparado una IFD directa sobre muestras respiratorias con un EIA, con el cultivo del hMPV como control.

## Pacientes y métodos

Se estudiaron 124 muestras correspondientes a aspirados nasofaríngeos de pacientes pediátricos con infección respiratoria aguda, principalmente bronquiolitis y neumonía, que recibieron asistencia hospitalaria entre febrero y mayo de 2007. Tras descartar mediante inmunocromatografía infección por VRS (18 muestras resultaron positivas al VRS), las muestras se procesaron el mismo día de su recepción por IFD. Algunos casos requirieron de un breve historial del enfermo.

Para la realización de la IFD se usó suero monoclonal comercial D3 DFA Metapneumovirus identification kit (Diagnostic Hybrids Inc.) de acuerdo con las recomendaciones de la firma comercial,

excepto en el proceso del frotis (se realizó extensión en porta directamente del sedimento del lavado nasofaríngeo). Siete de las 124 muestras no se incluyeron en el estudio, por su escasez en células epiteliales faríngeas y por disminuir las posibilidades de establecer el diagnóstico. El desarrollo de la técnica tardó una h y 15 min.

En el aislamiento vírico se procesaron 76 muestras, 10 de las cuales eran segundas muestras de pacientes previamente estudiados, éstas se obtuvieron 2 o más días después de la primera muestra. Con la finalidad de disminuir las posibles contaminaciones del cultivo o su invalidación por la toxicidad del espécimen, se procedió a cultivar por duplicado cada una de las 76 muestras. Simultáneamente, se les hizo la IFD y se sembraron en cultivos de células LLC-MK2 recién formados y crecidos en frascos de *shell vial*, previa descontaminación. El medio de mantenimiento utilizado fue el habitual para células epiteliales (Minimal Essential Medium, con sales de Earle, aminoácidos no esenciales, según Dulbecco, suero fetal bovino al 1%, penicilina y estreptomycin) y se añadieron 3 mg/l de tripsina (Difco 1:250). Después de 42 a 44 h de incubación a 37 °C en atmósfera de dióxido de carbono al 6% se fijaron en acetona (-30 °C) y se tiñeron mediante suero D3 IFD Metapneumovirus identification kit (Diagnostic Hybrids Inc.). Se consideraron positivos aquellos cultivos que presentaban las características descritas por Percivalle<sup>13</sup>: grupos de 2 o más células con fluorescencia clara, en grumos, punteadas o difusas, siempre intracitoplásmicas.

Es importante destacar que los cultivos dejaron de realizarse en los meses de menor incidencia de infección respiratoria: abril y mayo.

Cada muestra (de un total de 124 muestras) se alicuotó y se congeló para la posterior realización del EIA (Biotrin<sup>®</sup>) de acuerdo con las normas indicadas por el fabricante.

Posteriormente se sembraron en cultivos celulares de los tipos fibroblastos de pulmón de embrión humano y línea Hep2 y después de hacer 2 improntas de la muestra directa, se tiñeron con un suero polivalente antiviral influenza A y B, parainfluenza 1, 2, 3, adenovirus y virus respiratorio sincitial (Chemicon<sup>®</sup>). La segunda impronta se utilizó para la investigación de hMPV (Diagnostic Hybrids Inc.). Los cultivos celulares se observaron a diario hasta el séptimo día.

Con la ayuda de métodos estadísticos, en las 76 muestras en que se realizaron las 3 pruebas se calculó la concordancia, la sensibilidad, los valores predictivos positivo y negativo y el índice Kappa a los resultados obtenidos mediante IFD y mediante EIA; se tomó como método de referencia el aislamiento del hMPV.

## Resultados

De las 124 muestras estudiadas, 20 muestras (16,12%) fueron positivas a hMPV mediante IFD, 27 muestras (21,77%) fueron positivas mediante EIA y 15 muestras (19,73%) fueron positivas mediante cultivo (tablas 1 y 2).

Los resultados comparativos entre las 3 técnicas (76 muestras) se esquematizan en la tabla 1, en la que se aprecia una concordancia del 90,78%. Los resultados correspondientes a la comparación entre IFD y EIA (124 muestras) se observan en la tabla 2, caso en el que la concordancia es del 92,73%.

Se puede observar que el EIA que se utilizó para el diagnóstico de las infecciones por hMPV es la técnica más sensible de las 3, seguida del cultivo en *shell vial*. La mayor discordancia entre EIA e IFD se aprecia en 8 muestras, de las que 5 muestras pertenecían a enfermos previamente positivos con ambas técnicas, y que en una segunda muestra (que se obtuvo de 2 a 5 días más tarde) sólo se detectó virus a títulos bajos, cercanos al *cut off*, mediante EIA mientras que la IFD era negativa.

Al tomar el cultivo en *shell vial* como método de referencia y comparar las 2 técnicas estudiadas con el cultivo (tabla 3), las cifras de concordancia, sensibilidad y valor predictivo negativo van muy a favor de la técnica de EIA, que se refleja en el coeficiente Kappa; en cambio, es visiblemente inferior en la técnica de IFD. Pero si se tienen en cuenta solamente las primeras muestras obtenidas de cada paciente ( $n = 66$ ) y se desechan las muestras enviadas en los 2 a 5 días posteriores para controlar la evolución de los enfermos, todos los índices mejoran y se acercan a las muestras obtenidas mediante EIA, de manera que el coeficiente Kappa de la IFD de las primeras muestras es prácticamente el mismo que el del EIA.

En la tabla 4 se indican los virus aislados o identificados en la rutina diagnóstica, a partir de muestras respiratorias de niños previamente sanos durante el año 2007; en esta tabla también se indica la comparación con las muestras positivas incluidas en el presente estudio, y se añaden 18 muestras positivas para el VRS

(estas muestras se habían desechado en este estudio por ser previamente positivas mediante inmunocromatografía en la rutina diagnóstica y en las que no se investigó el hMPV).

En la tabla se aprecia que el hMPV es el patógeno más frecuente durante los meses que duró el estudio, mientras que al analizar el año 2007 completo, el VRS, el adenovirus y el virus parainfluenza 3 tuvieron una incidencia notablemente más alta.

## Discusión

Los resultados obtenidos muestran mejor sensibilidad de la técnica de EIA (27 muestras positivas) que la IFD (21 muestras positivas). Fueron positivas 19 muestras por ambas técnicas, sólo una muestra fue positiva mediante IFD y negativa mediante EIA. Cinco de las muestras restantes correspondían a segundas muestras de enfermos diagnosticados previamente, 48 h o más (tabla 2). Estos datos refuerzan el concepto de que la infección por hMPV es aguda y que en los casos en que la evolución es favorable, la carga vírica en el exudado respiratorio disminuye notablemente en 2 o 3 días, como sucede con el VRS. Cuando se valoran las 76 muestras que se estudiaron con las 3 técnicas, se observa que la sensibilidad del cultivo es inferior a la del EIA (tablas 1 y 2). A pesar de esto, se cree que los resultados que se obtienen por cultivo son muy aceptables debido a que las muestras fueron obtenidas muy recientemente.

Los datos estadísticos reflejados en la tabla 3 indican que la IFD tiene una sensibilidad, unos valores predictivos positivo y negativo, y en consecuencia, un índice Kappa bajos. Cuando se tienen en cuenta las muestras procesadas al inicio de la infección, obtenidas al momento del ingreso, las cifras de sensibilidad mejoran notablemente, por lo que se obtiene además un valor predictivo positivo de 100, mientras que con el EIA el valor predictivo negativo es de 98,3 y el índice Kappa se iguala en las 2 técnicas. En consecuencia, se deduce que la IFD puede usarse como prueba de diagnóstico rápido al inicio de la infección y que el EIA puede ser útil tanto en el diagnóstico rápido como en el seguimiento del enfermo, especialmente de los niños aislados antes de proceder a desocupar su cubículo.

Es importante resaltar que el hMPV fue el patógeno que se diagnosticó con mayor frecuencia durante los meses de estudio (febrero a mayo), mientras que cuando se valora el año completo la infección con este patógeno está por debajo de la del VRS, el adenovirus y el parainfluenza serotipo 3. Estos hallazgos probablemente se deben a que se escogió la época del año en la que se describe mayor incidencia de infección por hMPV, mientras disminuía la del VRS. En segundo lugar, al utilizar 3 técnicas diagnósticas para evaluar cada muestra aumentan (aunque ligeramente) las probabilidades de obtener resultados positivos. Y, finalmente, el pediatra ante una infección por un patógeno relativamente nuevo solicita un mayor número de muestras por paciente para estudiar su evolución.

**Tabla 1**

Comparación de los resultados obtenidos por técnica de inmunofluorescencia directa, enzimoimmunoanálisis y cultivo para metapneumovirus humano

IFD	EIA	Cultivo	Número de muestras
–	–	–	59
+	–	–	0
–	+	–	1
–	–	+	1
+	+	–	1
+	–	+	0
–	+	+	4
+	+	+	10
Total			76

EIA: enzimoimmunoanálisis; IFD: inmunofluorescencia directa.

**Tabla 2**

Comparación de resultados obtenidos por técnica de inmunofluorescencia directa y enzimoimmunoanálisis

IFD	EIA	Número de muestras
–	–	96
+	–	1
–	+	8
+	+	19
Total		124

EIA: enzimoimmunoanálisis; IFD: inmunofluorescencia directa.

**Tabla 3**

Estudio estadístico de los resultados obtenidos por técnica de inmunofluorescencia directa y enzimoimmunoanálisis tomando el cultivo en *shell vial* como método de referencia

	IFD $n = 76$	IFD (primeras muestras de cada paciente) $n = 66$	EIA $n = 76$
Concordancia (de acuerdo con el porcentual)	92,1%	96,9%	96,0
Sensibilidad (%)	66,6	81,2	93,3
Valor predictivo positivo (%)	90,9	100	87,5
Valor predictivo negativo (%)	92,3	96,4	98,3
Coefficiente Kappa	0,727	0,875	0,876

EIA: enzimoimmunoanálisis; IFD: inmunofluorescencia directa.

**Tabla 4**

Aislamientos víricos o detección de antígeno en niños con infección respiratoria aguda, sin enfermedad de base conocida

Virus aislado o detectado mediante IFD, EIA o ICG <sup>a</sup>	Muestras de origen respiratorio positivas estudiadas en este trabajo (n = 124+18 = 142 muestras procesadas)	Muestras de origen respiratorio positivas pertenecientes al año 2007 (n = 4.510 muestras procesadas)
VRS	22 (4+18 muestras positivas al VRS por ICG) <sup>b</sup>	333
Adenovirus	4	158
Parainfluenza serotipo 3	3	62
Metapneumovirus	28	42
Enterovirus <sup>c</sup>	2	35
Parainfluenza 1	0	25
Influenza A	2	21
Parainfluenza 2	0	11
Herpes simple <sup>d</sup>	1	9
Citomegalovirus	0	7
Influenza B	1	4
No identificados	2	30
TOTAL patógenos	65 (45,77%)	736 (16,31%)

EIA: enzimmoinmunoanálisis; IFD: inmunofluorescencia directa; VRS: virus respiratorio sincitial.

<sup>a</sup> Inmuncromatografía.

<sup>b</sup> 18 muestras positivas al virus respiratorio sincitial por cromatografía no entraron en la investigación de metapneumovirus humano.

<sup>c</sup> La mayoría presentaba amigdalitis.

<sup>d</sup> Sólo se valoraron los aislamientos en muestras de vías respiratorias bajas o biopsias.

La RT-PCR es sin duda la prueba más sensible y específica, razón por la que ha servido de referencia en diferentes estudios que evalúan técnicas novedosas como la IFD directa<sup>14–16</sup> y el EIA<sup>17</sup>. Algunos autores, al utilizar el cultivo como método de referencia, obtuvieron resultados similares a los observados en el presente estudio y llegaron a la conclusión de que las técnicas de IFD y de EIA son herramientas con sensibilidad y especificidad adecuadas para hacer el diagnóstico del hMPV directamente en muestras clínicas respiratorias. Freymouth<sup>16</sup>, tras hacer un estudio comparativo de IFD y PCR múltiple en el que se tiene en cuenta el tiempo empleado en el desarrollo de las técnicas y la sensibilidad, aconseja la combinación de las 2 técnicas como estrategia para hacer el diagnóstico etiológico de la infección respiratoria aguda en el niño.

En resumen, se puede afirmar que los centros hospitalarios pediátricos que necesiten establecer el diagnóstico de las infecciones respiratorias por hMPV con urgencia, pueden utilizar cualquiera de las 2 técnicas de detección de antígeno que se estudiaron. En este trabajo se observa además que la IFD es útil, especialmente, en la fase inicial de la infección, pero pierde sensibilidad en fases algo más avanzadas; mientras que el EIA se

puede utilizar tanto para el diagnóstico etiológico inicial como para el seguimiento, puesto que además de ofrecer mayor sensibilidad permite cuantificar la muestra respiratoria<sup>18</sup>.

## Bibliografía

- 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.
- Foulongne V, Guyon G, Rodière M, Segondy M. Human metapneumovirus infection in young children hospitalized with respiratory tract disease. *Pediatr Infect Dis J.* 2006;25:354–9.
- Ordás J, Boga JA, Alvarez-Argüelles M, Villa L, Rodríguez-Dehli, De Oña M, et al. Role of Metapneumovirus in viral respiratory infections in young children. *J Clin Microbiol.* 2006;44:2739–42.
- Dare R, Sanghavi S, Bullota A, Keightley MC, St. George K, Wadowsky RM, et al. Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. *J Clin Microbiol.* 2007;45:548–52.
- Sumino KC, Agapov E, Pierce RA, Trulock EP, Pfeifer JD, Ritter JH, et al. Detection of severe human metapneumovirus infection by real-time polymerase chain reaction and histopathological assessment. *J Infect Dis.* 2005;192:1052–60.
- Boivin G, Serres G, Hamelin ME, Côté S, Argouin M, Tremblay G, et al. An outbreak of severe respiratory tract infection due to human metapneumovirus in long term care facility. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1152–8.
- Louie JK, Schnurr DP, Pan CY, Kiang D, Carter C, Tougaw S, et al. A summer outbreak of human metapneumovirus infection in a long term care facility. *J Infect Dis.* 2007;196:705–8.
- Van der Hoogen BG. Respiratory tract infection due to human metapneumovirus among elderly patients. *Clin Infect Dis.* 2007;44:1159–60.
- Raza K, Ismailjee SB, Crespo M, Studer SM, Sanghavi S, Paterson DL, et al. Successful outcome of human metapneumovirus (hMPV) pneumonia in a lung transplant recipient treated with intravenous ribavirin. *Heart Lung Transplant.* 2007;26:862–4.
- Williams JV, Chen Z, Cseke G, Wright DW, Keefer CJ, Tollefson SJ, et al. A recombinant human monoclonal antibody to human metapneumovirus fusion protein that neutralizes virus in vitro and is effective therapeutically in vivo. *J Virol.* 2007;81:8315–24.
- Landry ML, Ferguson D, Cohen S, Peret TCT, Erdman DD. Detection of human metapneumovirus in clinical samples immunofluorescence staining of shell vial centrifugation cultures prepared from three different cell lines. *J Clin Microbiol.* 2005;43:1950–2.
- Reina J, Ferrer F, Alcoceba E, Mena A, Ruiz de Gopegui E, Figuerola J. Comparison of different cell lines and incubation times in the isolation by shell vial culture of human metapneumovirus from pediatric respiratory samples. *J Clin Virol.* 2007;40:46–9.
- Percivalle E, Sarasini A, Visai L, Revello MG, Gerna G. Rapid detection of human metapneumovirus strains in nasopharyngeal aspirates and shell-vial cultures by monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 2005;43:3443–6.
- Taylor C, Taha Y, Young B, Toms G, Fenwick F, McGuckin R. Diagnosis of human metapneumovirus by immunofluorescence-The Newcastle experience. *J Clin Virol.* 2006;36(suppl 2):P11.
- Ingram RE, Fenwick F, McGuckin R, Tafari A, Taylor C, Toms GL. Detection of human metapneumovirus in respiratory secretions by reverse-transcriptase polymerase chain reaction, indirect immunofluorescence, and virus isolation in human bronchial epithelial cells. *J Med Virol.* 2006;1223–31.
- 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 diagnosis of respiratory virus infection in children admitted to hospital with an acute respiratory illness. *J Med Virol.* 2006;78:1498–504.
- Barry-Murphy K, Sloots T, Setterquist S, Gray G, Reid S, Elliot G. Detection of human metapneumovirus in clinical specimens using a novel immunoassay. *J Clin Virol.* 2006;36(suppl 2):P12.
- Ginocchio CC. Detection of respiratory viruses using non-molecular based methods. *J Clin Virol.* 2007;40(Suppl):S11–4.