



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

ISSN: 1676-2444

[jbpml@sbpc.org.br](mailto:jbpml@sbpc.org.br), [adagmar.andriolo@gmail.com](mailto:adagmar.andriolo@gmail.com)

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial

Negrini Parmezan, Sheila; Pasternak, Jacyr; Perosa Dezene, Ana Helena; Dalla Valle Martino, Marinês; Vieira de Souza, Andrea  
Estudo comparativo de detecção de metapneumovírus humano pelos métodos de PCR e imunofluorescência direta  
Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 47, núm. 4, agosto, 2011, pp. 427-430  
Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial  
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541961006>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

# Estudo comparativo de detecção de metapneumovírus humano pelos métodos de PCR e imunofluorescência direta

Primeira submissão em 21/09/10  
Última submissão em 21/03/11  
Aceito para publicação em 05/04/11  
Publicado em 20/08/11

## Comparative study of human metapneumovirus detection by PCR and direct immunofluorescence methods

Sheila Negrini Parmezan<sup>1</sup>; Jacyr Pasternak<sup>2</sup>; Ana Helena Perosa Dezene<sup>3</sup>; Marinês Dalla Valle Martino<sup>4</sup>; Andrea Vieira de Souza<sup>5</sup>

unitermos	resumo
Metapneumovírus humano	<p><b>Introdução:</b> O metapneumovírus humano (MPVh) causa infecções respiratórias em crianças, adultos e idosos imunodeprimidos. O diagnóstico é realizado por imunofluorescência (IF) ou biologia molecular. <b>Objetivo:</b> Detectar o MPVh em amostras clínicas pelos métodos de reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunofluorescência direta (IFD). <b>Resultados:</b> Das 202 amostras, a positividade foi de 2% e 4% para IFD e RT-PCR, respectivamente. Sensibilidade e especificidade da IFD foram de 50% e 100%, respectivamente, considerando o PCR com transcrição reversa (RT-PCR) como padrão-ouro. <b>Conclusão:</b> O estudo indica a RT-PCR como o melhor método para a identificação de MPVh em amostras clínicas respiratórias e mostra a importância da padronização do teste para inclusão na rotina laboratorial.</p>
Infecções respiratórias	
Diagnóstico molecular de vírus	

## abstract

## key words

**Introduction:** Human metapneumovirus (HMPV) is responsible for respiratory infections in children and immunocompromised adults and elders. It is commonly diagnosed by immunofluorescence or molecular biology. **Objective:** To detect HMPV in clinical samples by polymerase chain reaction (PCR) and direct immunofluorescence (DIF) methods. **Results:** Two percent of 202 samples were positive for DIF and 4% of them for reverse transcriptase PCR (RT-PCR), respectively. Considering RT-PCR as gold standard, DIF sensitivity and specificity were 50% and 100%, respectively. **Conclusion:** Not only does the study show that RT-PCR is the best method for HMPV detection in clinical respiratory samples but it also substantiates the importance of test standardization in laboratory routine.

*Human metapneumovirus*  
*Respiratory infections*  
*Virus molecular diagnosis*

1. Farmacêutica-bioquímica; analista de laboratório do Hospital Israelita Albert Einstein.

2. Doutor em Medicina; infectologista do laboratório clínico do setor de Microbiologia do Hospital Israelita Albert Einstein.

3. Mestra em Ciências da Saúde pela disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Universidade Federal de São Paulo/ Escola Paulista de Medicina (UNIFESP/EPM); pesquisadora.

4. Professora adjunta da disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP); coordenadora-médica do setor de Microbiologia do Laboratório Clínico do Hospital Israelita Albert Einstein.

5. Mestra em Ciências pela Universidade de São Paulo (USP); pesquisadora assistente do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein.

## Introdução

Os vírus respiratórios são os patógenos diagnosticados com maior frequência e o diagnóstico etiológico requer confirmação laboratorial, pois apenas com o quadro clínico não é possível reconhecer a etiologia da doença<sup>(18)</sup>. Os vírus respiratórios mais comumente diagnosticados são influenza (Flu), rinovírus, parainfluenza vírus (PIV), vírus sincicial respiratório (VSR), adenovírus (AdV) e metapneumovírus (MPVh)<sup>(6, 18)</sup>.

O metapneumovírus foi relatado pela primeira vez em 2001, causando infecção em crianças, adultos e idosos imunocomprometidos e portadores de doença crônica<sup>(5)</sup>. A sazonalidade é semelhante à do VSR, que circula de abril a junho nos países da América do Sul<sup>(1, 14)</sup>. A prevalência varia mundialmente de 2,2% a 43% em amostras respiratórias<sup>(2, 14, 15)</sup>.

O isolamento viral em cultura de células é considerado padrão-ouro para o diagnóstico laboratorial de alguns vírus, porém, o MPVh mostra pouca ou nenhuma replicação e variação no efeito citopático<sup>(19)</sup>. A detecção de antígenos por imunofluorescência (IF) é utilizada na rotina laboratorial por ser um método fácil e de rápido resultado<sup>(10, 13)</sup>. Porém, os métodos moleculares têm sido os mais utilizados, devido a sua alta sensibilidade e especificidade<sup>(7)</sup>. Os objetivos deste estudo foram detectar a presença de MPVh em amostras encaminhadas para triagem de vírus respiratórios e comparar a sensibilidade e a especificidade dos dois métodos diagnósticos utilizados.

## Materiais e métodos

### Amostragem

Foram analisadas amostras de *swab* nasal, secreção traqueal e aspirado nasofaríngeo no período de 1 de junho a 30 de julho de 2009. Foram incluídas amostras relacionadas com o exame de triagem de vírus respiratório de crianças de 0 a 5 anos, idosos e adultos imunocomprometidos e excluídas as amostras com volume insuficiente e de pacientes acima de 6 anos que não faziam parte do grupo de risco.

### Imunofluorescência direta

A pesquisa de antígenos de vírus respiratórios (VSR, influenza, adenovírus e parainfluenza) foi realizada adequadamente e as lâminas foram preparadas conforme a rotina de trabalho, sendo uma para a realização da triagem

viral (Screen Respiratory Virus Imagen, Oxoid) e uma com antígenos específicos de cada vírus. Uma terceira lâmina foi preparada para a pesquisa de MPVh (Imagen, Oxoid).

### RT-PCR para MPVh

A extração do ácido nucleico (RNA) foi realizada a partir de 140 µl da amostra para a extração de RNA total, com o Qiamp RNA Viral Mini Kit (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. A transcrição reversa foi realizada utilizando o High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems), no qual a amplificação ocorre a partir de *primers* randômicos e transcriptase reversa recombinante rMoMuLV (Moloney Murine Leukemia Virus), segundo as especificações do fabricante.

Como controle da eficiência da reação de extração de RNA, foi realizada a amplificação do gene da beta-actina humana em todas as amostras segundo Raff *et al.*<sup>(17)</sup> e os *primers* utilizados para a detecção de MPVh foram descritos por Falsey *et al.*<sup>(9)</sup> para a amplificação de um fragmento de 347 pb do gene da proteína F de MPVh.

### Análise de dados

Foram calculados os valores de sensibilidade, de especificidade e preditivos positivo e negativo a partir de uma tabela dois por dois em *software* Microsoft Office Excel, versão 2000, e os índices de concordância e Q-quadrado, em *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 17.0. Valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

## Resultados

Foram incluídas 202 amostras de 191 pacientes, 92 do sexo feminino (47%), cuja idade média correspondeu a 3,68 anos e a mediana igual a 1 ano, com variação de 2 dias a 84 anos de idade. Entre os 202 exames realizados pelo método de imunofluorescência direta (IFD) para vírus respiratórios, 39% (78) apresentaram resultado positivo e 2% (quatro amostras) destes foram positivos para MPVh. Paralelamente aos testes de IFD, foi realizada a reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR) convencional para MPVh, que obteve positividade de 4%.

Para a análise estatística, considerou-se padrão-ouro o método de RT-PCR, assim os resultados de sensibilidade, especificidade, concordância e Q-quadrado foram 50%, 100%, 0,658 e valor de  $p < 0,001$ , respectivamente. Todas

as amostras positivas por IF o foram por RT-PCR. O valor preditivo positivo da IF foi de 100% e o valor preditivo negativo, 97,98%.

## Discussão

O período de sazonalidade do MPVh ocorre paralelamente ao do VSR e isso acontece principalmente nos meses de maio e junho, sendo que alguns autores relatam aumento da sazonalidade no período de setembro e outubro no hemisfério sul<sup>(2, 14)</sup>. No período em que foram realizadas as coletas, ocorreu a pandemia de influenza H1N1 e houve significativo aumento no número de atendimentos decorrentes de infecções respiratórias. Mesmo com a sobrecarga de exames, a taxa de positividade do MPVh não aumentou.

A incidência de MPVh encontrada neste estudo foi de 4%, sendo que 2% das amostras identificadas na IF foram confirmadas na RT-PCR. Essa incidência é menor do que a de 10% a 17% observada em estudo com a mesma metodologia<sup>(4)</sup> e é semelhante a 2,3% a 3,1% identificada em outros estudos<sup>(8, 18)</sup>. Os pacientes positivos para MPVh confirmam o que muitos autores relatam sobre os grupos de risco: uma pessoa idosa (77 anos), um adulto (40 anos) e cinco crianças (0 e 5 anos)<sup>(6, 8, 9)</sup>.

Neste estudo, o RT-PCR foi considerado padrão-ouro para o diagnóstico de MPVh e, quando em comparação com a IF, os resultados da sensibilidade (50%) foram menores do que os observados em outros estudos, que tiveram sensibilidade de 62,5% a 71,8%. A especificidade (100%) foi semelhante para os mesmos estudos (99,2% a 100%)<sup>(3, 11)</sup>.

As desvantagens da IF devem-se a múltiplos fatores, como kits comerciais, potencial de variabilidade na leitura técnica e qualidade da amostra. Vários estudos têm demonstrado o diagnóstico molecular como o melhor método para a detecção de vírus respiratórios. Isso pode ser verificado pelos resultados obtidos neste estudo. Considerando o número pequeno de amostras, o RT-PCR foi o método mais sensível, com detecção de 50% mais positivo que a IF<sup>(12, 16)</sup>.

## Conclusão

Mesmo com a porcentagem baixa de amostras positivas para MPVh, a pesquisa desse vírus não pode ser desconsiderada, devido ao impacto que tem sobre populações de risco e transmissões nosocomiais. O diagnóstico por IF mostrou-se de baixa sensibilidade, indicando que o melhor método para diagnóstico de MPVh é o molecular.

## Referências

1. ABARA, S. Metapneumovirus humano: un nuevo agente en IRA alta y baja. *Neumol Pediatr*, v. 1, n. 1, p. 11-3, 2006.
2. ALBUQUERQUE, M. C. M. *et al.* Novel respiratory virus infections in children, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v. 15, n. 5, 2009.
3. ASLANZADEH, J. *et al.* Prospective evaluation of rapid antigen tests for diagnosis of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus infections. *J Clin Microbiol*, v. 46, n. 5, p. 1682-5, 2008.
4. BANERJEE, S. *et al.* Human metapneumovirus infections among children with acute respiratory infections seen in a large referral hospital in India. *J Clin Virol*, v. 38, n. 1, p.70-2, 2007.
5. BASTIEN, N. *et al.* Human metapneumovirus infections in the Canadian population. *J Clin Microbiol*, v. 42, p. 3532-7, 2004.
6. BROOR, S. *et al.* Human metapneumovirus: a new respiratory pathogen. *J Biosci*, v. 33, n. 4, p. 483-93, 2008.
7. CARRARO, E. *Aplicação de recursos laboratoriais no diagnóstico de infecções respiratórias de etiologia viral*. São Paulo, 2007. Tese (Doutoramento) – Departamento de Medicina, Disciplina de Doenças Infecciosas e Parasitárias, Escola Paulista de Medicina.
8. DARE, R. *et al.* Diagnosis of human metapneumovirus infection in immunosuppressed lung transplant recipients and children evaluated for pertussis. *J Clin Microbiol*, v. 45, n. 2, p. 548-52, 2007.
9. FALSEY, A. R. *et al.* Human metapneumovirus infections in young and elderly adults. *J Infect Dis*, v. 187, n. 5, p. 785-90, 2003.
10. FENWICK, F. *et al.* Diagnosis of human metapneumovirus by immunofluorescence staining with monoclonal antibodies in the North-East of England. *J Clin Virol*, v. 40, n. 3, p. 193-6, 2007.
11. GERNA, G. *et al.* Prospective study of human metapneumovirus infection: diagnosis, typing and virus quantification in nasopharyngeal secretions from pediatric patients. *J Clin Virol*, v. 40, n. 3, p. 236-40, 2007.
12. INGRAM, R. M. *et al.* 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*, v. 78, p. 1223-31, 2003.

13. LANDRY, M. L. *et al.* Prospective study of human metapneumovirus detection in clinical samples by use of light diagnostics direct immunofluorescence reagent and real-time PCR. *J. Clin Microbiol*, v. 46, p. 1098-100, 2000.
14. MULLINS, J. A. *et al.* Human metapneumovirus infection among children hospitalized with acute respiratory illness. *Emerg Infect Dis*, v. 10, p. 700-5, 2004.
15. OLIVEIRA, D. B. *et al.* Epidemiology and genetic variability of human metapneumovirus during a 4-year-long study in Southeastern Brazil. *J Med Virol*, v. 81, n. 5, p. 915-21, 2009.
16. PABBAJU, K. *et al.* Diagnosis and epidemiological studies of human metapneumovirus using real-time PCR. *J Clin Virol*, v. 40, n. 3, p. 186-92, 2007.
17. RAFF, T. *et al.* Design and testing of beta-actin primers for RT-PCR that do not co-amplify processed pseudogenes. *Biotechniques*, v. 23, n. 3, p. 456-60, 1997.
18. THOMAZELLI, L. M. *et al.* Surveillance of eight respiratory viruses in clinical samples of pediatric patients in southeast Brazil. *J Pediatr (Rio J)*, v. 83, n. 5, p. 422-8, 2007.
19. VAN DEN HOOGEN, B. G. *et al.* A newly discovered human pneumo-virus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*, v. 7, p. 719-24, 2001.

---

**Endereço para correspondência**

Sheila Negrini Parmezan  
Rua Albert Einstein, 627  
Laboratório Clínico, 4º andar, Bloco D – Morumbi  
CEP: 05652-000 – São Paulo-SP