Humant metapneumovirus – virologiske og diagnostiske aspekter

Sammendrag

Bakgrunn. Humant metapneumovirus (hMPV) er et luftveispatogen som ble beskrevet for første gang i 2001.

Materiale og metode. Basert på litteraturgjennomgang og egne erfaringer presenterer vi virologiske og diagnostiske aspekter ved humant metapneumovirus.

Resultater og fortolkning. Humant metapneumovirus er forholdsvis nært beslektet med respiratorisk syncytialt virus (RSV). Kliniske manifestasjoner av hMPV-infeksjon viser likhetstrekk med respiratorisk syncytialt virus og spenner fra lette luftveissymptomer til pneumoni. Genteknologisk påvisning med polymerasekjedereaksjon er den eneste etablerte rutinemetoden. Viruset kan også dyrkes i cellekultur, men gir sjelden påvisbare celleforandringer. Immunflourescensfarging basert på polyvalente kaninantistoffer brukes i vår avdeling. Fargingen ser ut til å gi gode resultater både på cellekultur og direkte på prøvemateriale. I diagnostisk sammenheng er nasopharynxaspirat å foretrekke hos små barn, dyp neseprøve eller halsprøve hos alle andre. I spesielle tilfeller kan det også være aktuelt å undersøke materiale fra nedre luftveier. Serologisk diagnostikk er ikke tilgjengelig for rutinemessig bruk.

Engelsk sammendrag finnes i artikkelen på *www.tidsskriftet.no*

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

> Se også side 2756

Andreas Radtke
andreas.radtke@stolav.no
Avdeling for medisinsk mikrobiologi

Kari R. Risnes
Henrik Døllner
Avdeling for barn og ungdom

Svein Arne Nordbø
Avdeling for medisinsk mikrobiologi

St. Olavs Hospital HF
7006 Trondheim

Oppdagelsen av virus som forårsaker luftveisinfeksjoner skjedde for det meste i 1950- og 60-årene med celledyrking, elektronmikroskopi og immunologiske metoder. Man har identifisert en lang rekke virus, bl.a. influensavirus, parainfluensavirus, respiratorisk syncytialt virus (RSV), rhinovirus og coronavirus som gir luftveisinfeksjoner fra rhinitt til pneumoni. Ved mange luftveisinfeksjoner med antatt viral årsak har man ikke kunnet påvise det utløsende agens. Man har derfor postulert at ikke alle virus som forårsaker luftveisinfeksjoner, er oppdaget (1). Genteknologiske metoder har vært et viktig redskap ved siden av tradisjonelle virologiske metoder for å oppdage nye virus, som for eksempel hepatitt C-virus (1989) og SARS-coronavirus (2003). Genteknologiske metoder ble også benyttet ved oppdagelsen av humant metapneumovirus (hMPV) (2).

Oppdagelsen og karakteriseringen

Humant metapneumovirus ble oppdaget ved en tilfeldighet. Hoogen og medarbeidere hadde observert cytopatogen effekt i cellekulturer som var blitt stående i 10–14 dager, dvs. betydelig lenger enn vanlig for diagnostiske formål. Man kunne ikke identifisere noe kjent agens. Den observerte cytopatogene effekten liknet mest på respiratorisk syncytialt virus. Man gikk videre med elektronmikroskopiske undersøkelser og fant paramyxovirusliknende partikler. For å bekrefte funnet av et nytt virus, brukte man en polymerasekjedereaksjonsbasert metode med tilfeldige primere og sekvensering av de resulterende genproduktene. Sekvensene passet ikke med noen hittil kjente virus i gensekvensdatabaser.

Hoogen og medarbeidere hadde samlet nærmere 30 virusisolater med stor sekvenslikhet og identifiserte disse som en ny spesies. Nærmeste beslektede art var aviært pneumovirus, som gir luftveisinfeksjoner hos kalkun. Det er den eneste kjente spesies i genuset metapneumovirus utenom humant metapneumovirus. Taksonomisk tilhører humant metapneumovirus familien paramyxoviridae, subfamilie pneumovirinae, genus metapneumovirus. Nærmeste beslektede humanpatogene virus er respiratorisk syncytialt virus som tilhører den samme subfamilien. Alle de nærmeste slektningene til humant metapneumovirus har luftveispatogene egenskaper (fig 1).

Humant metapneumovirus er et kappekledd virus med enkelttrådet RNA med negativ polaritet. Genomet på vel 13 000 baser er fullstendig sekvensert (3). Den genetiske organiseringen av humant metapneumovirus følger det vanlige mønsteret for paramyxovirus. De første publikasjonene beskrev to serotyper, senere artikler omtaler fire hMPV-genotyper (4, 5).

Publiserte data

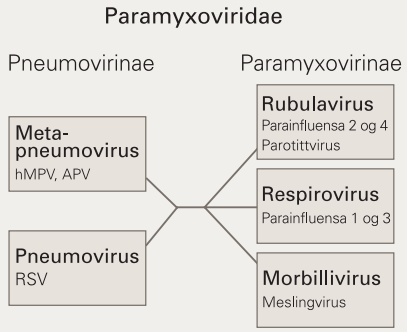
Etter den første rapporten er det kommet en rekke publikasjoner som omhandler humant metapneumovirus. Man vet at viruset forårsaker en luftveisinfeksjon som kan være begrenset til de øvre luftveiene, men som også kan gi bronkiolitt og pneumoni. Cytologi fra materiale fra bronkioalveolær lavage og lungebiopsier fra hMPV-infiserte pasienter viser at viruset affiserer luftveisepitelceller direkte og fører til henfall, nekrose, nøytrofil respons og økt slimproduksjon (6). Man har eksponert makakeaper for humant metapneumovirus og funnet inflammatoriske forandringer i mucosa og submucosa. Virus ble hovedsakelig påvist i ciliaepitelcellene. Apene skilte ut virus fra dag 2 etter eksponeringen, hadde den høyeste utskillelsen dag 4, før denne gradvis avtok mot ca. dag 10 (7).

Humant metapneumovirus rammer en litt eldre gruppe enn respiratorisk syncytialt virus, dvs. 1–2-åringer hyppigere enn ettåringer (8–10). Man mener at ca. 5–7 % av alle luftveisinfeksjoner hos innlagte barn skyldes humant metapneumovirus (11), men andelen kan være mye høyere i en utbruddssituasjon som beskrevet i Trondheim. Infeksjoner forårsaket av humant metapneumovirus fremkaller tilsynelatende en svakere cytokinrespons enn respiratorisk syncytialt virus og influensavirus (12). Personer med svekket immunforsvar har alvorligere forløp også ved reinfeksjon, noe som illustreres ved at de eneste rapporterte dødsfallene med humant metapneumovirus rammet sterkt immunsvekkede pasienter (13, 14). Reinfek-

! Hovedbudskap

- Humant metapneumovirus er et av de viktigste luftveispatogene virus
- Genetisk og klinisk er humant metapneumovirus beslektet med respiratorisk syncytialt virus
- Genteknologisk påvisning på prøvemateriale fra luftveiene er den eneste tilgjengelige diagnostiske metoden

Figur 1



Fylogenetisk slektskap: Familien Paramyxoviridae inndeles i to subfamilier, pneumoviridae og paramyxoviridae. Boksene representerer ulike genus med relevante humanpatogene spesies. Forgreningenes lengde representerer ikke den relative fylogenetiske avstanden

sjoner med humant metapneumovirus hos eldre kan gi betydelige luftveissymptomer, i likhet med respiratorisk syncytialt virus (10, 15).

Diagnostikk

Den eneste rutinediagnostiske metoden for påvisning av humant metapneumovirus på det nåværende tidspunkt er polymerasekjedereaksjon (PCR). Avdelingen vår utviklet en sanntid (real-time)-PCR for hMPV-påvisning høsten 2002. Den baserte seg på de sekvensene som var tilgjenglig på det tidspunktet (16). Primerne og TaqMan-proben er senere blitt forandret for å samsvare med nyere sekvenser i tråd med publiserte data (5). Aktuelt prøvemateriale er nasopharynxaspirat hos små barn. Hos eldre barn og voksne kan dyp neseprøve eller halsprøve benyttes. I spesielle tilfeller kan materiale fra de nedre luftveier være aktuelt. I rutinediagnostikken ved St. Olavs Hospital er humant metapneumovirus en del av «luftveispakken» som benyttes for å screene prøver fra barn innlagt med akutte luftveissymptomer.

van den Hoogen et al. benyttet en tertiær apenyrecellelinje til dyrking av humant metapneumovirus. Denne cellelinjen er ikke tilgjengelig utenfor Nederland. Andre tertiære apenyrecellelinjer er derimot tilgjengelig for diagnostisk bruk, men ser ut til å være dårligere egnet enn den hollandske. Den mest kjente er LLC-MK2 som brukes av de fleste mikrobiologiske laboratorier som dyrker luftveisvirus. Mange publikasjoner som omhandler dyrking av humant metapneumovirus i cellekultur beskriver at de ikke opplever cytopatogen effekt. Man konfirmerer i stedet vekst av viruset med en PCR-analyse utført på cellekulturmateriale.

Indirekte immunflourescens ved hjelp av polyvalente kaninantistoffer som er utviklet ved vår avdeling ser ut til å gi gode resultater på cellekultur (fig 2). Anvendt direkte på prøvemateriale, er sensitiviteten ca. 50 % sammenliknet med resultatene ved polymerasekjedereaksjon. Bruken av metoden direkte på prøvemateriale fra nasopharynx har vært lovende og vil bli validert for klinisk bruk. Viruset lar seg også påvise ved hjelp av elektronmikroskopi fra cellekulturer (fig 3). Sekvensering av stammer isolert i Trondheim viser at utbruddet i 2002–03 ble forårsaket av genotype A1 mens stammer fra vintersesongen 2004–05 tilhører genotype B2. Vi har også observert at B2-stammene av og til gav cytopatogen effekt i noen av våre cellelinjer (syncytiedanning), mens stammer tilhørende genotype A1 ikke gav synlige celleforandringer i det hele tatt.

Serologiske undersøkelser

Serologiske undersøkelser har vist at humant metapneumovirus er et svært vanlig virus. De fleste blir infisert i ung alder. I 6–12-månedersalderen har allerede 25 % av de undersøkte antistoffer mot viruset, og ved femårsalderen er nesten alle seropositive (2, 17, 18). Dette tyder på at en vesentlig del av infeksjonene med humant metapneumovirus forløper subklinisk. Undersøkelser av nedfrosne sera fra 1958 har vist 100 % seroprevalens (alder 8–99 år), hvilket betyr at dette ikke er et nytt virus (2). Viruset etterlater sannsynligvis en ufullstendig immunitet, slik at reinfeksjoner er mulig (19).

Ved vår avdeling er det utviklet en helvirus ELISA-test for påvisning av IgG- antistoffer mot humant metapneumovirus. Undersøkelser gjort på eget materiale våren 2003 tyder på at prevalensen i Norge likner den nederlandske (data ikke vist). Serologiske tester for rutinediagnostikk er foreløpig ikke kommersielt tilgjengelig.

Konklusjon

Humant metapneumovirus er et av de viktigere luftveisvirus etter influensa og respiratorisk syncytialt virus. Påvisning av viruset med polymerasekjedereaksjon er den eneste etablerte rutinemetoden. Aktuelt prøvemateriale er først og fremst nasopharynxaspirat hos små barn og nese- eller halspenselprøver hos alle andre. Serologiske tester er ennå ikke tilgjenglig for rutinediagnostikken. Viruset er vanlig og kan til og med være det dominerende luftveisagens i en utbruddssituasjon (20). Reinfeksjoner forekommer. Påvisning av humant metapneumovirus bør derfor bli en del av rutinerepertoaret til mikrobiologiske avdelinger som betjener barneavdelinger.

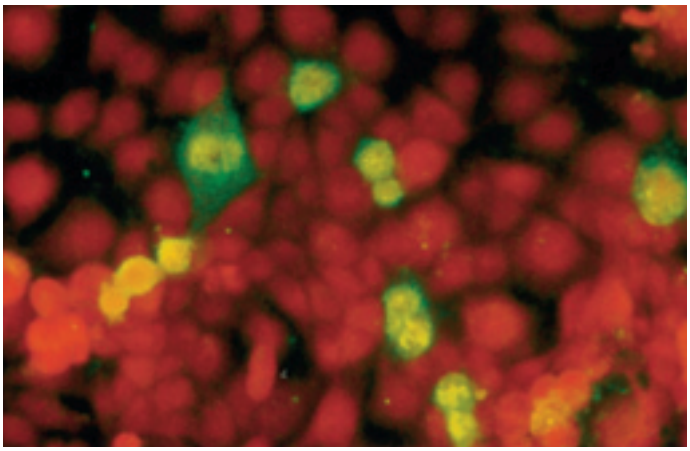
Manuskriptet ble godkjent 5.8. 2005.

Vi ønsker å takke Sidsel Krokstad for utmerket laboratoriearbeid ved sekvensering og fylogenetisk analyse av virusstammene.

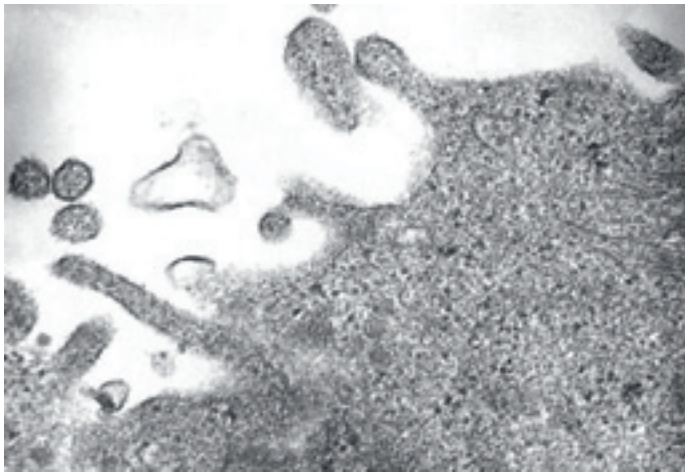
Litteratur

1. Treanor J, Hayden F. Viral infections. I: Murray J, Nadel J, red. Textbook of respiratory medicine. 3. utg. Philadelphia, PA: Saunders, 2000: 929–84.
2. van den Hoogen BG, De Jong JC, Groen J et al. A newly discovered human metapneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. Nat Med 2001; 7: 719–24.

>>>



Figur 2 *LLC-MK2-cellekultur infisert med humant metapneumovirus. Indirekte immunflourescenspåvisning med polyklonalt anti-hMPV-serum fra kanin*



Figur 3 *Elektronmikroskopisk bilde av hMPV-partikler i celledyrking (52 800× forstørret, Are B. Dalen, 2003)*

3. Biacchesi S, Skiadopoulos MH, Boivin G et al. Genetic diversity between human metapneumovirus subgroups. Virology 2003; 315: 1–9.
4. van den Hoogen BG, Herfst S, Sprong L et al. Antigenic and genetic variability of human metapneumoviruses. Emerg Infect Dis 2004; 10: 658–66.
5. Maertzdorf J, Wang CK, Brown JB 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.
6. Vargas SO, Kozakewich HP, Perez-Atayde AR et al. Pathology of human metapneumovirus infection: insights into the pathogenesis of a newly identified respiratory virus. Pediatr Dev Pathol 2004; 7: 478–86.
7. Kuiken T, van den Hoogen BG, van Riel DA. Experimental human metapneumovirus infection of cynomolgus macaques (Macaca fascicularis) results in virus replication in ciliated epithelial cells and pneumocytes with associated lesions throughout the respiratory tract. Am J Pathol 2004; 164: 1893–900.
8. Døllner H, Risnes K, Radtke A et al. Outbreak of human metapneumovirus infection in norwegian children. Pediatr Infect Dis J 2004; 23: 436–40.
9. Peiris JS, Tang WH, Chan KH et al. Children with respiratory disease associated with metapneumovirus in Hong Kong. Emerg Infect Dis 2003; 9: 628–33.
10. van den Hoogen BG, van Doornum GJ, Fockens JC et al. Prevalence and clinical symptoms of human metapneumovirus infection in hospitalized patients. J Infect Dis 2003; 188: 1571–7.
11. van den Hoogen BG, Osterhaus DM, Fouchier RA. Clinical impact and diagnosis of human metapneumovirus infection. Pediatr Infect Dis J 2004; 23 (suppl 1): S25–32.
12. Laham FR, Israele V, Casellas JM et al. Differential production of inflammatory cytokines in primary infection with human metapneumovirus and with other common respiratory viruses of infancy. J Infect Dis 2004; 189: 2047–56.
13. Pelletiere G, Dery P, Abed Y et al. Respiratory tract reinfection by the new human metapneumovirus in an immunocompromised child. Emerg Infect Dis 2002; 8: 976–8.
14. Cane PA, van den Hoogen BG, Chakrabarti S et al. Human metapneumovirus in a haematopoietic stem cell transplant recipient with fatal lower respiratory tract disease. Bone Marrow Transplant 2003; 31: 309–10.
15. Boivin G, Abed Y, Pelletier G 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.
16. Christensen A, Nordbø SA, Jeansson S et al. Lower respiratory tract infection caused by human metapneumovirus in two children: the first report of human metapneumovirus infection in Norway. Scand J Infect Dis 2003; 35: 772–4.
17. Wolf DG, Zakay-Rones Z, Fadeela A et al. High seroprevalence of human metapneumovirus among young children in Israel. J Infect Dis 2003; 188: 1865–7.
18. Ebihara T, Endo R, Kikuta H et al. Seroprevalence of human metapneumovirus in Japan. J Med Virol 2003; 70: 281–3.
19. Stockton J, Stephenson I, Fleming D et al. Human metapneumovirus as a cause of community-acquired respiratory illness. Emerg Infect Dis 2002; 8: 897–901.
20. Risnes KR, Radtke A, Nordbø SA et al. Humant metapneumovirus – forekomst og klinisk betydning. Tidsskr Nor Lægeforen 2005; 125: 2769–72.