

Comparison of indirect and direct immunofluorescence for the detection of Respiratory Syncytial Virus

Stefano Gambarino, Massimiliano Bergallo, Maria Elena Terlizzi, Sara Astegiano, Antonio Curtoni, Francesca Sidoti, Samantha Mantovani, Rossana Cavallo, Cristina Costa

SCDU Virologia, AOU San Giovanni Battista di Torino (Molinette), Torino, Italia.

Key Words: Respiratory Syncytial Virus, Immunofluorescence

Confronto tra immunofluorescenza diretta e indiretta per l'identificazione del Virus Respiratorio Sinciziale

SUMMARY

The respiratory syncytial virus (RSV) is the major cause of respiratory infection in children, with bronchopneumonia and bronchiolitis. In the adult the clinical manifestation is lighter than in infant, however, in the case of immunocompromised patients (transplant recipients or patients in immunosuppressive treatment) infection can lead to death. Immunofluorescence is a diagnostic procedure which can detect RSV infection and the presence of viable virus in the biological sample of the patient. In this study, indirect and direct immunofluorescence techniques using monoclonal antibodies directed to RSV have been compared.

For the comparison HEP2 shell vials, that are susceptible to RSV, were used. These cells were infected with different virus titres, ranging from 10^2 to 10^{-3} TCID₅₀. Subsequently, different primary or Fluorescein isothiocyanate antibody dilutions were tested (1:40, 1:80, 1:160), for indirect and direct immunofluorescence evaluation, respectively, at three incubation periods after infection (48h, 72h, 96h).

Indirect immunofluorescence showed a sensitivity of 10^1 TCID₅₀, with a cells positive detection even at lower dilutions up to 10^{-1} TCID₅₀ at 72 hours. For direct immunofluorescence, the same sensitivity was observed with 1:40 antibody dilution at 72h, with a detection limit of 10^{-1} TCID₅₀.

Indirect immunofluorescence showed optimal RSV detection at 72h after infection with 1:80 primary antibody dilution, with a sensitivity of 10^1 TCID₅₀. An equivalent sensitivity has been observed with direct immunofluorescence at 72h, 1:40 antibody dilution, thus representing an advantage in terms of time.

Il virus respiratorio sinciziale (RSV) è la principale causa di infezione dell'apparato respiratorio nella popolazione infantile (3), che si manifesta con broncopneumoniti e bronchioliti. Nel soggetto adulto la manifestazione clinica è più lieve rispetto a quella del bambino, manifestandosi prevalentemente con infezione a carico delle vie aeree superiori e determinando sintomi tipici del raffreddore, quali rinorrea e starnuti. Tuttavia, nel caso di pazienti immunocompromessi (pazienti trapiantati o in terapia immunosoppressiva) l'infezione può causare complicanze a carico delle vie aeree inferiori da richiedere l'ospedalizzazione ed in alcuni casi condurre al decesso (2). L'immunofluorescenza rappresenta una delle procedure diagnostiche d'elezione per il rilevamento del virus respiratorio sinciziale (1), andando a ricercare la presenza di virus vitale nel campione biologico del paziente tramite anticorpi fluorescenti. Le tecniche di immunofluorescenza si possono dividere in indirette o dirette. Le prime impiegano un anticorpo primario non marcato diretto contro il virus, che viene a sua volta riconosciuto da un anticorpo secondario fluorescente che evidenzia la presenza del virus nel campione. Le tecniche di immunofluorescenza diretta, invece, impiegano un anticorpo primario già marcato e non necessitano, quindi, di una seconda incubazione con l'anticorpo secondario, rendendo la metodica più rapida. In questo lavoro si è effettuata una comparazione tra la metodica di immunofluorescenza indiretta e diretta utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro l'RSV, commercializzati dalla ditta Argene, valutando i parametri ottimali per la rilevazione con entrambe le metodiche.

Il virus RSV impiegato per lo studio è stato acquistato dalla ATCC (codice prodotto ATCC-VR-1580). Per il confronto è stata eseguita una titolazione in TCID₅₀ del virus su cellule Hep2, suscettibili all'infezione da RSV. Una volta titolato il virus, molteplici diluizioni di titolo virale, da 10^2 a 10^{-3} TCID₅₀/200µl, sono state utilizzate per infettare shell vials contenenti cellule Hep2. Per adiuvarne l'adsorbimento del virus alla cellula durante l'infezione, le shell vials sono state sottoposte ad una fase di centrifugazione a 1800 rpm

per 45 minuti. Dopo aver aggiunto 1 ml di EMEM 2% FCS, sono state incubate in termostato a 37°C e 5% CO₂. Per determinare il tempo minimo necessario per rilevare la positività all'immunofluorescenza, sono stati valutati 3 diversi tempi di incubazione: 48, 72 e 96 h. Al termine di ogni scadenza temporale sono state prelevate le shell vials e fissate le cellule su vetrino tramite l'inoculo di 1 ml di una soluzione fissativa costituita da acetone metanolo 2:1. Successivamente, per evidenziare allo stesso tempo la sensibilità della stessa metodica di immunofluorescenza diretta od indiretta, sono state impiegate 3 diluizioni diverse (1:40, 1:80, 1:160) di anticorpo, primario per la metodica indiretta e coniugato alla fluoresceina isotiocianato per quella diretta. Sono stati dispensati 30 µl di anticorpo anti RSV sul vetrino e sono state effettuate una o due fasi di incubazione di 15 minuti, rispettivamente per l'immunofluorescenza diretta e per quella indiretta, seguite ciascuna da 3 lavaggi con PBS 1X. La lettura è avvenuta al microscopio a fluorescenza.

La metodica indiretta ha mostrato una sensibilità pari a 10^1 TCID₅₀ con una diluizione di anticorpo primario di 1:80, ed una rilevazione di cellule positive nel 100% dei casi. La rilevazione di cellule positive è stata riscontrata anche a diluizioni inferiori, fino a 10^{-1} TCID₅₀. A 72h di incubazione si è osservata una maggiore sensibilità rispetto agli altri due periodi di incubazione (48 e 96 h), con una maggiore percentuale di prove positive all'immunofluorescenza (20%). Per la metodica diretta si è osservata una medesima sensibilità, pari a 10^1 TCID₅₀ a 72 h di incubazione. Tuttavia, rispetto all'immunofluorescenza indiretta, la sensibilità massima è stata raggiunta con l'impiego di diluizioni di anticorpo primario marcato 1:40. La positività alla metodica si è osservata fino a 10^{-1} TCID₅₀, con un 13% di rilevazione.

La metodica di immunofluorescenza indiretta per la rilevazione dell'RSV ha evidenziato una fluorescenza ottimale a 72h dall'infezione con una diluizione di anticorpo primario 1:80 e con una sensibilità pari a 10^1 TCID₅₀. Una sensibilità equivalente si è osservata con la metodica diretta a

Corresponding author: Cristina Costa

Via Santena 9 - 10126 Torino (Italy) - Tel. 0116705630 - Fax 0116705648

E-mail: cristina.costa@unito.it

72h con diluizione di anticorpo 1:40, ma con il vantaggio di una maggiore rapidità di esecuzione rispetto a quella indiretta.

BIBLIOGRAFIA

1. Collins PL, Crowe JE. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus. In: Fields Virology, Knipe DM, Howley PM Eds, Fifth Edition. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, 2007; 1601-46
2. Ebbert JO, Limper AH. Respiratory syncytial virus pneumonitis in immunocompromised adults: clinical features and outcome. *Respiration* 2005; 72(3):263-9
3. Simoes EA, Carbonell-Estrany X. Impact of severe disease caused by respiratory syncytial virus in children living in developed countries. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22:S13-20