

Comparison of methods for laboratory diagnosis of respiratory syncytial virus

Maria Cristina Arcangeletti, Silvia Preti, Maria del Pilar Esteban, Emanuel Merep Djouvou, Valeria Albonetti, Giuseppe Dettori, Carlo Chezzi

Sezione di Microbiologia, Dipartimento di Patologia e Medicina di Laboratorio, Università degli Studi di Parma

Key words: RSV; Laboratory diagnosis, Immunochromatographic assay

Diagnosi di laboratorio delle infezioni da virus respiratorio sinciziale: metodi a confronto

SUMMARY

Respiratory syncytial virus (RSV) still remains the main agent of lower respiratory tract infections in infants and young children, causing bronchiolitis and/or pneumonia leading to hospitalization and even to death in high-risk patients, such as premature babies. Its great impact on human health supports the need for rapid diagnostic methods in order to control and prevent the infection spread.

In this study 63 samples from the respiratory tract were subjected to virological investigations usually applied in diagnostic *routine*: the research of RSV antigens in cells derived from the biological samples by immunofluorescence (IFD), as well as the rapid and the traditional cell culture methods (MR and MT, respectively). A third rapid test, the immunochromatographic assay TRU RSV™ (Meridian), for the research of RSV specific proteins, was applied retrospectively to the same samples stored at -80°C.

Among the above considered *routine* methods, the most reliable for rapid diagnosis of RSV infection in our hands was IFD, which was able to reveal the greatest number of positive samples (54/63) and was therefore considered as the reference technique. The immunochromatographic assay TRU RSV™ identified 39/54 positive samples (72.2%), the bulk of which superposed with those also resulted positive with MR and/or MT (i.e. samples with high viral load). On the other hand, the immunochromatographic test was unable to detect RSV antigens in the majority of samples positive only with IFD (i.e. samples with low viral load).

INTRODUZIONE

Il virus respiratorio sinciziale (RSV), appartenente alla famiglia *Paramyxoviridae*, rappresenta il principale agente eziologico di malattie acute del tratto respiratorio superiore ed inferiore nell'infanzia (1, 3, 4, 9); oltre che di casi sporadici, esso può anche rendersi responsabile dell'insorgenza di episodi epidemici ad andamento stagionale, con maggiore incidenza nei mesi invernali (5). È stato osservato, in particolare, che nell'ambito delle bronchioliti ad eziologia virale, oltre il 70% degli episodi è imputabile ad infezione da virus respiratorio sinciziale. I neonati prematuri, i bambini con patologie polmonari o malattie cardiache congenite ed i bambini immunodepressi sono considerati come gruppi a rischio per quanto riguarda l'insorgenza di gravi complicanze respiratorie conseguenti ad infezione da RSV, nonostante queste possano svilupparsi anche in pazienti che non presentano patologie di rilievo. In bambini di età inferiore a 6-8 mesi, in particolare, il virus respiratorio sinciziale può diffondere a bronchi, bronchioli e parenchima polmonare, con quadri clinici che variano da laringo-tracheo-bronchite, a bronchite, bronchiolite e broncopolmonite e che richiedono, di frequente, il ricovero ospedaliero.

La frequenza delle ospedalizzazioni conseguenti ad infezione da virus respiratorio sinciziale sembra essere in significativo aumento, soprattutto per quanto riguarda i reparti di neonatologia, che risultano tra i più esposti ad infezioni nosocomiali sostenute da RSV, di frequente correlabili con un elevato tasso di mortalità (1, 3, 4, 8, 9). Poiché nell'ambito delle infezioni virali dell'apparato respiratorio è difficile, se non impossibile, condurre una diagnosi eziologica precisa sulla base dei soli rilievi clinici, molto spesso sovrapponibili per le infezioni causate da numerosi virus respiratori, il ruolo del laboratorio di virologia appare di spicco nel rilevamento puntuale e precoce di RSV attraverso metodi diagnostici rapidi ed affidabili (7, 10, 11), al fine di fornire un supporto efficace sia nel controllo, sia nella prevenzione delle infezioni sostenute da tale agente.

MATERIALI E METODI

Sessantatre campioni costituiti da secrezioni respiratorie prelevate attraverso aspirato naso-faringeo, tampone faringeo o

tampone nasale durante il periodo dicembre 2008-marzo 2009 da altrettanti soggetti in età pediatrica (età compresa tra 1 settimana e 1 anno di vita) ricoverati presso reparti dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma con diagnosi compatibile con infezione da RSV, erano stati sottoposti ad indagini virologiche utilizzate in *routine* diagnostica. Queste comprendono la ricerca di antigeni di RSV direttamente in cellule presenti nel campione biologico mediante immunofluorescenza (IFD; anticorpi monoclonali diretti verso le sottounità F0 di 70 kDa e F1 di 48 kDa della proteina di fusione virale), l'esame colturale con metodo rapido (MR; linea cellulare di ileo embrionale umano Int 407) e quello con metodo tradizionale (MT), con tempi di refertazione più lunghi. Quest'ultimo è basato sulla messa in evidenza dell'effetto citopatico virus-indotto attraverso osservazione giornaliera al microscopio ottico di monostrati cellulari idonei (tra cui Int 407 e cellule tumorali umane Hep-2, per quel che riguarda RSV) inoculati con i campioni biologici. Oltre a IFD e MR, un terzo metodo rapido è stato applicato retrospettivamente agli stessi campioni mantenuti congelati a -80°C ed è rappresentato dal saggio immunocromatografico TRU RSV™ della ditta Meridian (Figura I), composto da due anticorpi monoclonali coniugati a oro colloidale diretti contro la proteina di fusione e la nucleoproteina di RSV.

Nell'ambito dei soggetti in età pediatrica considerati nello studio e risultati positivi per RSV attraverso i metodi di *routine* diagnostica sopra menzionati, 27 presentavano bronchiolite, 6 broncopolmonite, 4 bronchite, 3 faringite, 6 mostravano un quadro di dispnea grave, 5 avevano febbre e tosse. Per 3 di essi non appariva alcun tipo di sospetto diagnostico sulla prescrizione medica.

RISULTATI

Nell'ambito dei 63 campioni considerati, 54/63 erano risultati positivi per RSV con almeno uno dei tre metodi applicati in *routine* diagnostica, 4/63 positivi per altri virus e 5/63 negativi. In particolare, la totalità dei campioni positivi (54) era risultata tale mediante IFD, che si è dimostrato il metodo più sensibile (Tabella 1) ed è stato pertanto considerato come metodo di riferimento in questo studio. MR aveva rivelato positività in 29/54 campioni, pari al 53.7% (Tabella 3), con

Corresponding author: Maria Cristina Arcangeletti

Microbiology Section, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Parma
Viale A. Gramsci, 14 - 43100 Parma, Italy - Tel. +39 0521 988885, Fax. +39 0521 993620
E-mail: mariacristina.arcangeletti@unipr.it

specificità analitica del 100% e concordanza/accuratezza del 60.3% in base ai calcoli statistici effettuati mediante tabella 2X2. D'altra parte, MT aveva rivelato positività in 22/54 campioni, pari al 40.7% (Tabella 4), con specificità analitica del 100% e concordanza/accuratezza del 49.2%. Il saggio immunocromatografico TRU RSV™ della ditta Meridian ha rivelato la presenza di antigeni di RSV in campioni che erano risultati positivi con almeno uno dei tre metodi sopra citati, secondo la distribuzione riportata in Tabella 2; in particolare, esso è risultato positivo in 39/54 campioni, pari al 72.2%, con specificità analitica del 100% e concordanza/accuratezza del 76.2% (Tabella 5).

DISCUSSIONE

Il campione di popolazione infantile considerato mostra come, nell'ambito delle possibili patologie conseguenti all'infezione da RSV, molte sono potenzialmente gravi, con interessamento di bronchi e bronchioli e colpiscono soprattutto la popolazione neonatale, per la quale più elevati sono i rischi di evoluzione infausta.

In tale contesto, la diagnosi rapida di laboratorio costituisce un supporto utile ed imprescindibile per stabilire la corretta eziologia dell'infezione e per attuare le conseguenti misure terapeutiche e profilattiche.

I risultati di questo studio mostrano come la ricerca di antigeni di RSV direttamente in cellule derivate dal campione biologico mediante immunofluorescenza (IFD) rappresenti il metodo più affidabile, nell'ambito di quelli considerati, per la diagnosi rapida di infezione da RSV.

Tuttavia, è interessante notare come il saggio immunocromatografico TRU RSV™ della ditta Meridian sia molto efficace nel rivelare cariche virali infettanti verosimilmente elevate (positività in MT e/o MR) con sensibilità vicina al 100% (Tabella 2), mentre la sua performance si abbassa in assenza di virus infettante dimostrabile con i mezzi diagnostici utilizzati (positività solo in IFD).

Infine, è anche importante sottolineare come RSV possa causare infezioni abortive e/o persistere per lunghi periodi nel tratto respiratorio inferiore dell'ospite, come evidenziato da studi recenti in modelli sperimentali (2, 6). In tali situazioni, le tecniche tradizionali non sono più in grado di dimostrare la presenza del virus, che risulta svelabile solo attraverso l'utilizzo di metodi molecolari, in particolare RT-PCR (2, 6).

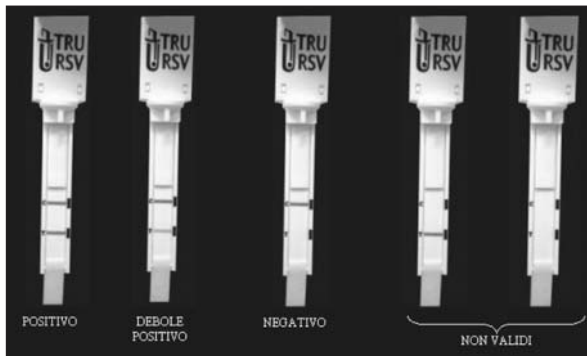


Figura 1. Interpretazione dei risultati mediante il saggio immunocromatografico TRU-RSV™ della ditta Meridian.

Tabella 1. Esito delle indagini di routine sui 54 campioni risultati positivi per RSV.

N°	IFD	MR	MT
20	+	+	+
2	+		+
9	+	+	
23	+		

Tabella 2. Confronto tra i risultati ottenuti mediante indagini di routine e quelli ricavati con il saggio TRU-RSV™ sui 54 campioni positivi per RSV.

N°	IFD	MR	MT	TRU-RSV™
20	+	+	+	20+
2	+		+	2+
9	+	+		8+
23	+			9+

Tabella 3. Analisi statistica dei risultati ottenuti mediante metodo colturale rapido (MR) a confronto con l'immunofluorescenza eseguita direttamente sul campione (IFD).

Sensibilità analitica: 53.7%; Specificità analitica: 100%; Concordanza/accuratezza: 60.3%.

METODO RAPIDO (MR)	Immunofluorescenza diretta (IFD)		
	P	N	TOT
P	29	0	29
N	25	9	34
TOT	54	9	63

Interpretazione dei risultati
P= positivo; N= negativo

Tabella 4. Analisi statistica dei risultati ottenuti mediante metodo colturale tradizionale (MT) a confronto con l'immunofluorescenza eseguita direttamente sul campione (IFD).

Sensibilità analitica: 40.7%; Specificità analitica: 100%; Concordanza/accuratezza: 49.2%.

METODO TRADIZIONALE (MT)	Immunofluorescenza diretta (IFD)		
	P	N	TOT
P	22	0	22
N	32	9	41
TOT	54	9	63

Interpretazione dei risultati
P= positivo; N= negativo

Tabella 5. Analisi statistica dei risultati ottenuti mediante test TRU RSV™ a confronto con l'immunofluorescenza eseguita direttamente sul campione (IFD).

Sensibilità analitica: 72.2%; Specificità analitica: 100%; Concordanza/accuratezza: 76.2%.

TRU-RSV™	Immunofluorescenza diretta (IFD)		
	P	N	TOT
P	39	0	39
N	15	9	24
TOT	54	9	63

Interpretazione dei risultati
P= positivo; N= negativo

BIBLIOGRAFIA

1. Anak S, Atay D, Unuvar A, et al. Respiratory syncytial virus infection outbreak among pediatric patients with oncologic diseases and/or BMT. *Pediatric Pulmonology*, 2010; 45: 307-11.
2. Boukhvalova MS, Yim KC, Prince GA, Bianco JC. Methods for monitoring dynamics of pulmonary RSV replication by viral culture and by real-time reverse transcription PCR *in vivo*: detection of abortive viral replication. *Current Protocols in Cell Biology*, 2010; 26: U26.6.
3. Carbonell-Estrany X, Bont L, Doering G, Gouyon JB, Lanari M. Clinical relevance of prevention of respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in preterm infants born between 33 and 35 weeks gestational age. *Eur Jour of Clin Microb and Inf Dis*, 2008; 27: 891-9.
4. Forbes ML, Hall CB, Jackson A, Masaquel AS, Mahadevia PJ. Comparative costs of hospitalisation among infants at high risk for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection during the first year of life. *Jour of Med Econ*, 2010; 13: 136-41.
5. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *The New Eng Jour of Med*, 2001; 344: 1917-28.
6. Mejias A, Chavez-Bueno S, Gomez AM, et al. Respiratory syncytial virus persistence. Evidence in the mouse model. *The Ped Inf Dis Jour*, 2008; 27: 60-62.
7. Paton AW, Paton JC, Lawrence AJ, Goldwater PN, Harris RJ. Rapid detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates by reverse transcription and polymerase chain reaction amplification. *Jour of Clin Microb*, 1992; 30: 901-4.
8. Simon A, Khurana K, Wilkesmann A, et al. Nosocomial respiratory syncytial virus infection: Impact of prospective surveillance and targeted infection control. *Intern Jour of Hyg Environ Health*, 2006; 209: 317-24.
9. Wilkesmann A, Ammann RA, Schildgen O, et al. Hospitalized children with respiratory syncytial virus infection and neuromuscular impairment face an increased risk of a complicated course. *Ped Inf Dis Jour*, 2007; 26: 485-91.
10. Zheng X, Quianzon S, Mu Y, Katz BZ. Comparison of two new rapid antigen detection assays for respiratory syncytial virus with another assay and shell vial culture. *Jour of Clin Virol*, 2004; 31: 130-3.
11. Zielinska E, Liu D, Wu HY, Quiroz J, Rappaport R, Yang DP. Development of an improved microneutralization assay for respiratory syncytial virus by automated plaque counting using imaging analysis. *Virol Jour*, 2005; 2: 84.