



Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information website.

Elsevier hereby grants permission to make all its COVID-19-related research that is available on the COVID-19 resource centre - including this research content - immediately available in PubMed Central and other publicly funded repositories, such as the WHO COVID database with rights for unrestricted research re-use and analyses in any form or by any means with acknowledgement of the original source. These permissions are granted for free by Elsevier for as long as the COVID-19 resource centre remains active.

BRONCHIOLITES DU NOURRISSON
À VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL :
INTÉRÊT ET LIMITES DES TECHNIQUES
D'IMMUNOFLUORESCENCE
POUR LE DIAGNOSTIC RAPIDE, DIRECT ET INDIRECT

par **F. Freymuth** (1), **A. Hardouin** (1), **E. Buthiau** (1), **D. Lehouezec** (2),
P. Boutard (2), **J. Guihard** (2), **P. Charbonneau** (3), **C. Bazin** (3) et **C. Lecacheux** (3)

(1) *Laboratoire de Virologie CHU de Caen (Prof. Agr. F. Freymuth),*
(2) *Services de Pédiatrie, CHU de Caen (Prof. J. Guihard,*
Prof. J. L'Hirondel), et (3) Service des Maladies infectieuses,
CHU de Caen (Prof. C. Bazin)

SUMMARY

EFFICIENCY AND LIMITS OF IMMUNOFLUORESCENT TECHNIQUES
FOR RAPID DIRECT DIAGNOSIS
AND SEROLOGY OF RSV BRONCHIOLITIS

From October, 1980, to March, 1981, the direct fluorescent antibody technique from nasal aspirates and the serology by immunofluorescence (IF) were developed to evaluate their efficiency for the rapid diagnosis of respiratory syncytial virus (RSV) infections. RSV was identified in 208 of the 365 specimens. In Caen, hospitalized infants with bronchiolitis had secretions mostly weakly positive (90/154) than strongly positive (64/154), in spite of specimens taken at an early stage of the disease, without any relation to the severity of bronchiolitis. Paired sera were rarely available for serology (11/154). Increasing IF antibodies are present in 7 cases, and absent with CF test. On 80 acute sera, IF antibodies were absent (21/80) or low (28/80). In the other cases (39/80), IgM activity was also detected two times out of three.

KEY-WORDS: Bronchiolitis, RSV, Immunofluorescence; Comparison, FC.

Au cours de l'hiver 1980-1981, une forte épidémie d'infections à virus respiratoire syncitial (VRS) a sévi en Basse Normandie. Elle est apparue plus précocement que lors de l'hiver précédent, a présenté son acmé en décembre et s'est traduite par un nombre anormalement élevé de bronchiolites graves chez les nourrissons hospitalisés (plus de 1/3 des cas).

A cette occasion, les techniques d'immunofluorescence (IF) ont été utilisées pour le diagnostic direct et indirect ; leurs avantages et limites respectives seront envisagés.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Entre octobre 1980 et mars 1981, 368 aspirations nasales ont été examinées. Elles provenaient d'enfants hospitalisés au CHU de Caen et dans les hôpitaux régionaux.

Selon les techniques classiques, les sécrétions ont été soigneusement lavées en tampon phosphate (PBS). Le surnageant a été inoculé aux cultures cellulaires (HEp2, MRC5) et le culot a permis de préparer des frottis qui, fixés dans l'acétone, ont ensuite été marqués à l'aide d'un sérum fluorescent anti-VRS (sérum Flow, lot n° 45637.006) [3, 5, 11, 12].

2) Le sérodiagnostic est réalisé, avec l'antigène MBA, en fixation du complément (FC) ou par IF. Deux techniques d'IF ont été utilisées.

Dans l'une, technique sur lame (IFI), on prépare — en milieu MEM contenant du sérum de veau nouveau-né (2 %), du tampon HEPES (4,76 mg/ml), du bicarbonate de sodium (0,22 mg/ml), de la pénicilline (150 UI/ml) et de la streptomycine (100 µg/ml) — une suspension à raison de 10^6 cellules/ml de cellules HEp2 infectées par le VRS épidémique et présentant 1 à 2 syncytiums/champ microscopique. Des gouttes de suspension sont déposées sur des lames, qui sont séchées et fixées dans l'acétone à -20°C .

Dans l'autre technique, technique en plaques (IFp), on mélange 90 % de cette suspension à 10 % d'une suspension de HEp2 saines contenant 10^7 cellules/ml ; on inocule 0,1 ml du mélange dans les cupules d'une plaque de microtitrage. Après incubation pendant 5 h à 37°C , on fixe pendant 10 min dans le mélange acétone 80 % + eau 20 %. Le conjugué fluorescent anti-immunoglobulines humaines (Welcome) est employé au 1/40^e, et l'anti-IgM (Hyland) au 1/20^e.

RÉSULTATS

A. — Par IF directe, on observe que 208 des 365 aspirations nasales contiennent des antigènes VRS (plus des 2/3 proviennent du CHU de Caen).

Quantitativement, les lames examinées apparaissent plus souvent faiblement positives (90/154) que très positives — nombreuses cellules infectées/champ — (65/154) ; cela, pour des prélèvements effectués en

FC = fixation du complément.
IF = immunofluorescence.
IFI = IF sur lame.

| IFp = IF sur plaque.
VRS = virus respiratoire syncytial.

TABLEAU I. — Comparaison de la positivité des lames d'inspiration naso-pharyngées marquées (méthode directe) au cours des bronchiolites à VRS.

	Bronchiolites communes	Bronchiolites graves
Très positif	64 (41 %)	11 (39 %)
Faiblement positif	90 (58 %)	17 (60 %)
Totaux	154	28

moyenne avant le 5ème jour du début clinique, et sans rapport avec la gravité de l'atteinte (tableau I).

Dans 27 % des cas (42/154), l'interprétation des images est rendue difficile par la présence de cellules abîmées, groupées en amas, ou par un excès de mucus. Rarement, on observe une réaction faussement positive (3/154). Enfin, l'efficacité de cette méthode diagnostique (208/365) est environ 2 fois supérieure à l'isolement viral, obtenu dans 29 cas sur 105.

B. — La comparaison des techniques d'IF est faite sur 12 paires de sérums d'enfants avec élévation significative d'anticorps FC (fig. 1).

La concordance est bonne et la sensibilité de l'IF 4 fois (IFp) à 6 fois (IFI) supérieure à celle de la FC. Chez les nourrissons, 11 paires de sérum

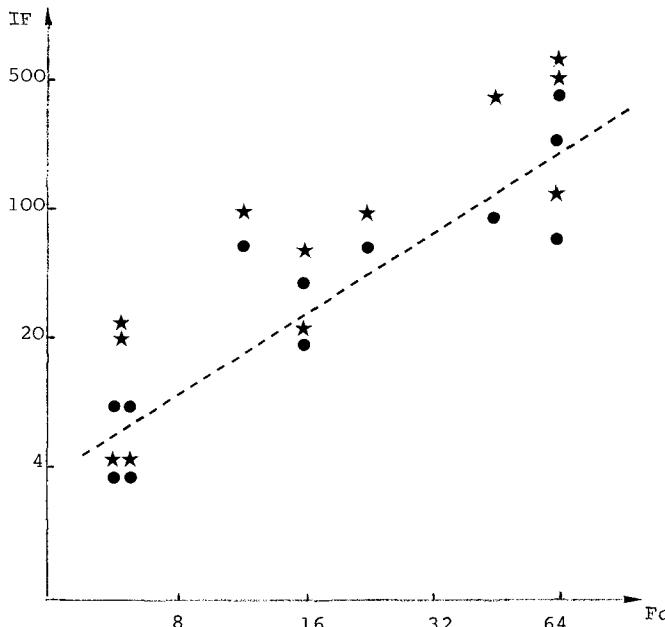


FIG. 1. — Comparaison de la FC et des techniques d'IF en plaques (●) et sur lames (★) dans le séro-diagnostic des infections à VRS.

ont été obtenues. La FC est négative; et en IF on observe 7 séro-conversions, 3 cas avec des taux d'anticorps élevés et stables, et 1 cas avec un taux faible et stable. Pour les 80 sérum précoce recueillis, la FC est négative en IF on note que les anticorps sont souvent absents (21/80) ou présents à des taux très faibles (28/80); lorsqu'ils sont élevés (31/80), la recherche d'IgM est positive 3 fois sur 4.

DISCUSSION

Le diagnostic des bronchiolites à VRS du nourrisson par IF directe est un examen rapide et simple à réaliser. Mais il exige l'utilisation d'excellents réactifs et le recours systématique à la méthode indirecte au moindre doute [2, 5]. La fréquence de résultats faiblement positifs, sans relation avec la gravité de la bronchiolite et l'existence d'images floues à fluorescence homogène et terne, peuvent évoquer une fixation d'anticorps spécifiques sur les cellules infectées [6]. La comparaison avec l'isolement viral est habituellement concordante [1, 3, 9, 13]; le peu de VRS isolés ici tient sûrement à l'absence de précautions prises dans le recueil et le transport des prélèvements, et au fait que le pouvoir infectant disparaît plus rapidement que la structure antigénique [4].

La négativité du séro-diagnostic en FC dans les atteintes à VRS du nourrisson est classique [8]; l'IF est à cet égard une méthode plus intéressante. L'absence en IF d'anticorps dans environ 1/4 des sérum recueillis dans les cas aigus, plaide contre le mécanisme immunopathogénique des bronchiolites [10]; cependant la présence d'anticorps neutralisants semble plus fréquente [7]. La recherche d'anticorps de classe IgM, quand elle est possible — 38 % des cas — est utile pour le diagnostic rapide, car elle apparaît positive 2 fois sur 3.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BATTAGLIA, M. F. & BALDUCCI, L., Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infections by immunofluorescence on cell smears from nasopharyngeal secretions. *Boll. Ist. sieroter. milan*, 1980, **59**, 121-125.
- [2] FREYMUTH, F., DAON, F., DUNCOMBE, C. & JOLY, V., Contribution de l'immuno-fluorescence au diagnostic rapide des bronchopneumopathies à VRS de l'enfant. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 1980, **131 E**, 526.
- [3] FULTON, R. E. & MIDDLETON, P. J., Comparison on immunofluorescence and isolation techniques in the diagnosis of respiratory viral infections of children. *Infect. Immun.*, 1974, **10**, 92-101.
- [4] GARDNER, P. S., McQUILLIN, J. & McGUCKIN, R., The late detection of respiratory syncytial virus, in cells of respiratory tract by immunofluorescence. *J. Hyg. (Camb.)*, 1970, **68**, 575-580.
- [5] GARDNER, P. S. & MCQUILLIN, J., Respiratory syncytial virus, in « *Rapid virus diagnosis, application of immunofluorescence* » (p. 103-117), Butterworths, London, 1974.

- [6] GARDNER, P. S. & MCQUILLIN, J., The coating of respiratory syncytial (RS) virus-infected cells in the respiratory tract by immunoglobulins. *J. med. Virol.*, 1978, **2**, 165-173.
 - [7] HEIJTINK, R. A., BACKX, G., VAN DER HORST, J. M. & MASUREL, N., Complement fixation and neutralization RS antibodies in maternal and neonatal sera. *J. Hyg. (Camb.)*, 1977, **78**, 411-417.
 - [8] JACKSON, G. G. & MULDOON, R. L., Respiratory syncytial viruses and coronaviruses, in « Viruses causing common respiratory infections in man ». (p. 113-141), University of Chicago Press, Chicago, 1975.
 - [9] KAUL, A., SCOTT, R., GALLAGHER, M., SCOTT, M., CLEMENT, J. & OGRA, P. L., Respiratory syncytial virus infection rapid diagnosis in children by use of indirect immunofluorescence. *Amer. J. Dis Child.*, 1978, **132**, 1088-1090.
 - [10] MCINTOSH, K. & FISHAUT, J. M., Immunopathologie mechanisms in lower respiratory tract disease of infants due to respiratory syncytial virus. *Prog. med. Virol.*, 1980, **26**, 94-118.
 - [11] MCQUILLIN, J. & GARDNER, P. S., Rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection by immunofluorescent antibody techniques. *Brit. med. J.*, 1968, **1**, 602-605.
 - [12] NAGAHAMA, H., ELLER, J. J., FULGINITI, V. A. & MARKS, M. I., Direct immunofluorescent studies of infections with respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.*, 1970, **122**, 260-271.
 - [13] RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION: ADMISSIONS TO HOSPITAL IN INDUSTRIAL, URBAN, AND RURAL AREAS., Report to the Medical Research Council Subcommittee on Respiratory Syncytial Virus Vaccines. *Brit. med. J.*, 1978, **2**, 796-798.
-