

# Evaluatie van het gebruik van mengsels van monoclonalen voor detectie van respiratoire virussen

## Evaluation of the use made of monoclonal mixture for detection of respiratory viruses

door

Ieven M<sup>1</sup>, Provinciael D, Goossens H.

---

### Abstract

*During the winter of 1996-1997, current techniques for detection of respiratory viruses and monoclonal mixtures of two different companies were used on a limited number of nasopharyngeal aspiration samples (N = 311). The conclusions of the study are:*

- 1. monoclonal mixtures can be recommended for detection of RSV and influenza A and B;*
- 2. there weren't any significant differences between the reactives of both companies;*
- 3. reduction of working time rose in relation to a decreasing percentage of positive samples;*

---

<sup>1</sup> Universitair Ziekenhuis Antwerpen, Departement Klinische Biologie, Wilrijkstraat 10, B-2650 Edegem, Belgium.

4. *studying a larger sample increased the number of positive samples by detecting an additional number of poorly positive samples;*
5. *in this study, the number of samples positive for the parainfluenza virus, adenovirus and rhinovirus, was too small to allow any conclusions. These fragmentary results confirm previous results showing the low sensitivity of immunofluorescence on the samples, most likely due to samples and viruses rather than to sera.*

## Key-words

Respiratory viruses, diagnostics, monoclonal antibodies.

## Inleiding

De diagnostiek van respiratoire virussen is geëvolueerd van klassieke trage isolatietechnieken op celculturen en detectie door C.P.E. of haemadsorptie naar sneldiagnostiek door het gebruik van enerzijds, gecentrifugeerde beënte cellen, gevolgd door detectie van virussen door immunofluorescentie (I.F.) en anderzijds, door detectie van virussen in de klinische monsters door I.F. (1, 2, 4, 5, 6, 7). Deze I.F.-detecties werden mogelijk door het beschikbaar stellen van monoclonale antistoffen.

Snelle diagnostiek van respiratoire infecties bij kinderen is klinisch belangrijk (8, 9). Er zijn verschillende pogingen ondernomen om de kweekresultaten binnen de 24 uur te bekomen (7) en de resultaten van I.F. op de monsters te optimaliseren (5).

Voor de detectie van respiratoire virussen in nasofaryngeale aspiraten werden in ons laboratorium tot nog toe gebruikt:

- voor R.S.V.: immunofluorescentie met monoclonalen op uitstrijkjes van gewassen - gecentrifugeerde naso-pharyngeale aspiraten;
- voor influenza A en B: I.F. met een mengsel van monoclonalen op de monsters en op 48 uur voordien beënte en gecentrifugeerde M.D.C.K. cellen;
- voor parainfluenza (P.F.L.) en adenovirussen (A.D.E.): alleen I.F. op beënte en gecentrifugeerde Verocellen (voor P.F.L. wordt een mengsel van monoclonalen tegen de 3 serotypes gebruikt) (1).

Dit betekent voor elk negatief monster 5 I.F. microscopische onderzoeken. De laatste jaren zijn reeds verschillende studies gepubliceerd (2, 3, 4, 6) over het gebruik van mengsels van monoclonale antistoffen. Ook in ons laboratorium worden sedert jaren mengsels gebruikt van enerzijds, influenza A en B en anderzijds, parainfluenza 1, 2 en 3.

Recent werden monoclonale mengsels, gericht tegen meerdere respiratoire virussen, op de markt gebracht. Ze bevatten antistoffen tegen 7 verschillende antigenen: R.S.V., I.F.L. A en B, P.F.L. 1, 2 en 3 en A.D.E.

### **Materiaal en methodiek**

Tijdens de winterperiode 1996-1997 hebben we twee dergelijke mengsels geëvalueerd. Objectieven van deze evaluatie waren:

- of deze mengsels gevoelig en specifiek genoeg waren;
- of ze werktijd konden besparen.

De evaluatie gebeurde op een gedeelte van in deze periode ingestuurde respiratoire monsters. Het gaat dus om een laboratorium-technische en niet om een prospectieve epidemiologische studie.

De monsters werden behandeld volgens de gangbare methode en op 6 plaatsen van draagglasjes aangebracht. Ze werden vervolgens "gekleurd" met:

- A. monoonaal mengsel 1 (7 antigenen) (Firma Biognost)
- B. monoonaal mengsel 2 (7 antigenen) (Firma Dako)
- C. het gebruikelijke R.S.V.-monoonaal
- D. de gebruikelijke I.F.L. A + B monoclonalen
- E. de gebruikelijke P.F.L. 1, 2, 3 monoclonalen
- F. het gebruikelijke A.D.E. monoonaal.

De plaatjes werden blindelings microscopisch onderzocht, eerst alle A's, dan alle B's enz. De resultaten bekomen met de monoclonale mengsels werden vergeleken met de resultaten bekomen met de standaardprodedure (1, 3).

## Resultaten en bespreking

De Tabellen 1 en 2 tonen de vergelijkingen van de resultaten die werden bekomen met de routinemethode, I.F. op monsters en I.F. na kweek, met die bekomen door I.F. op de monsters met de twee merken mengsels van monoclonalen. De gevoeligheidsberekening van elke methode gebeurde ten opzichte van het totaal aantal positieven, ongeacht de diagnosemethode. Het totaal aantal positieven, bekomen met de mengsels toegepast op de monsters, verschilt niet significant van die bekomen met de monospecifieke monoclonale sera gebruikt in de routinemethode. Er is evenmin een verschil tussen de mengsels van beide firma's.

TABEL 1

Aantal positieve I.F. resultaten bekomen met de monospecifieke MoAbs en met de MoAbs mengsel 1 voor opsporing van respiratoire virussen (aantal monsters: 311)

Opgespoorde virussen	Monospecifieke MoAbs op monster	Monospecifieke MoAbs op celculturen	MoAbs mengsel 1 op monster
I.F.L.	33 —	NU 12 —	32 14
Gevoeligheid** (%)	45/59 (76,3)		46/59 (78) $p = 0,8$
R.S.V.	53 —	NU 1 —	47 7
Gevoeligheid** (%)	54/61 (88,5)		54/60* (90) $p = 0,8$

NU: niet uitgevoerd. MoAbs: monoclonale antistoffen.

\* 2 monsters niet getest met MoAbs mengsel 1.

\*\* Noemer is totaal aantal gediagnosticeerde virussen door welke methode ook (Tabel 3).

Voor elke toepassing zijn een aantal monsters positief na I.F. met de mengsels van monoclonalen die niet door de routinemethode worden gediagnosticeerd. Zoals blijkt uit Tabel 3 gebeurt ook het omgekeerde. Deze tabel toont het aantal monsters, positief voor I.F.L. en R.S.V., met de verschillende monoclonalencombinaties. Naast de monsters die positief waren, zowel in de routinemethode, als met de monoclonale mengsels, zijn er een evengroot aantal positief in de routinemethode, maar negatief met de mengsels en omgekeerd.

TABEL 2

Aantal positieve I.F. resultaten bekomen met de monospecifieke MoAbs en met de MoAbs mengsel 2 voor opsporing van respiratoire virussen (aantal monsters: 186)

Opgespoorde virussen	Monospecifieke MoAbs op monster	Monospecifieke MoAbs op kweek	MoAbs mengsel 2 op monster
I.F.L.	27 —	NU 8 —	23 8
Gevoeligheid* (%)	35/43 (81,4)		31/43 (72,1) $p = 0,3$
R.S.V.	45 —	NU 1 —	38 4
Gevoeligheid* (%)	46/50 (92)		42/50 (84) $p = 0,2$

MoAbs: monoclonale antistoffen. NU: niet uitgevoerd.

\* Noemer is totaal aantal gediagnosticeerde virussen, ongeacht de methode (Tabel 3).

De verklaring ligt in het feit dat naast het routineonderzoek een bijkomende hoeveelheid materiaal met de mengsels werd onderzocht. Daardoor verhoogt de kans op detectie van zwak positieve monsters, waarvan de positiviteit rond de detectiegrens ligt. Anderzijds, werden zwak positieve monsters die in de routine werden gedetecteerd, niet steeds opnieuw positief bevonden bij onderzoek van bijkomend fractiemateriaal. Zoals uit Tabel 3 blijkt, zijn deze monsters gelijkmatig verdeeld over de twee mogelijkheden.

TABEL 3

Aantal monsters positief met de verschillende MoAbs

Virus	Monospecif. pos. Mengsel 1 pos.	Monospecif. pos. Mengsel 1 neg.	Monospecif. neg. Mengsel 1 pos.	Totaal aantal positieven
I.F.L.	32	13	14	59
R.S.V.	47	7	7	61
	Monospecif. pos. Mengsel 2 pos.	Monospecif. pos. Mengsel 2 neg.	Monospecif. neg. Mengsel 2 pos.	Totaal aantal positieven
I.F.L.	23	12	8	43
R.S.V.	38	8	4	50

MoAbs: monoclonale antistoffen.

Een tweede argument ten voordele van deze redenering blijkt uit de vergelijking van de resultaten van een vroeger onderzoek (8). Op het eerste gezicht is in de huidige studie de gevoeligheid van de routinemethode significant lager dan in de vorige. Dit is echter ook volledig toe te schrijven aan het onderzoek van een bijkomende hoeveelheid materiaal met mengsels van monoclonalen, waardoor het totaal aantal positieven, waarop de gevoeligheid berekend wordt, toeneemt. Wordt de gevoeligheid berekend zoals in de vorige studie, dan is er geen significant verschil met de huidige resultaten.

Voor R.S.V. en I.F.L. worden negatieve monsters met monospecifieke monoclonalen twee maal onderzocht, bij gebruik van mengsels is dat slechts bij de positieven het geval.

Analyse van de werklust (Tabel 4) toont aan dat voor de gegeven periode 31% minder onderzoeken dienden te gebeuren bij gebruik van een mengsel. Deze besparing is des te kleiner naarmate het percentage positieven stijgt. In geval van een epidemie kan men de test dan ook meteen uitvoeren met een monospecifiek antilichaam.

Een beperkt aantal monsters, in totaal 22, werden met de klassieke technieken positief bevonden voor adeno- en parainfluenzavirussen. Slechts de helft van de positieven werd toegepast op de monsters die werden opgespoord door de MoAbs pools.

TABEL 4

*Aantal uit te voeren testen voor detectie van R.S.V. en I.F.L. bij gebruik van monospecifieke en mengsels van MoAbs (N = 311)*

Aantal uit te voeren testen	
Monospecifieke MoAbs 311 × 2 = 622 testen	Mengsels van MoAbs 311 + 120 met specifieke MoAbs = 431 testen
Verschil: 191 testen = 31%	

MoAbs: monoclonale antistoffen.

## Besluit

Als algemeen besluit kunnen we stellen:

1. het gebruik van een mengsel van monoclonalen voor detectie van R.S.V. en I.F.L. kan worden aanbevolen;

2. de werktijdbesparing is des te groter naarmate het percentage positieven daalt;
3. het verschil tussen de reagentia van beide firma's was niet significant;
4. het onderzoek van een grotere fractie van de monsters detecteert een bijkomend aantal zwak positieven;
5. het aantal monsters, positief voor P.F.L., A.D.E. en Rhino, was in deze studie te gering om een uitspraak toe te laten. De fragmentaire resultaten gaan in de richting van vroegere resultaten, namelijk dat deze virussen niet gemakkelijk door I.F. op monsters kunnen worden opgespoord. Dit probleem is eigen aan de monsters en virussen, niet aan de gebruikte sera.

## Résumé

Au cours de l'hiver 1996-1997, les techniques courantes pour la détection des virus respiratoires, ainsi que des mélanges de monoclonaux provenant de deux firmes différentes ont été utilisés sur un nombre limité d'échantillons d'aspirations nasopharyngiennes (N = 311).

Les conclusions de cette étude sont :

1. les mélanges de monoclonaux peuvent être recommandés pour la détection de V.R.S. et d'influenza A et B;
2. il n'y avait pas de différence significative entre les réactifs des deux firmes;
3. la réduction du temps de travail est d'autant plus grande que le pourcentage d'échantillons positifs diminue;
4. la recherche sur une quantité plus grande de matériel augmente le nombre d'échantillons positifs par la détection d'un nombre additionnel d'échantillons faiblement positifs;
5. dans le cadre de cette étude, le nombre d'échantillons positifs pour les virus parainfluenza, adénovirus et rhinovirus était trop petit pour en tirer des conclusions. Par contre, les résultats fragmentaires vont tout-à-fait dans le même sens que les précédents, à savoir que l'immunofluorescence sur les échantillons est trop peu sensible pour ce groupe; ceci pourrait être dû aux échantillons et aux virus, plutôt qu'aux sérums.

## Mots-clés

Virus respiratoires, diagnostic, anticorps monoclonaux.

## Samenvatting

Gedurende de winterperiode 1996-1997 werden op een beperkt aantal nasofaryngeale aspiraats monsters (N=311) zowel de gangbare technieken voor opsporing van respiratoire virussen toegepast als mengsels van monoclonalen van twee verschillende firma's.

De besluiten van de studie zijn:

1. de mengsels van monoclonalen op de monsters kunnen aanbevoien worden voor detectie van R.S.V. en influenza A en B;
2. het verschil tussen de reagentia van beide firma's was niet significant;
3. de werktijdverkorting is des te groter naarmate het percentage positieven daalt;
4. het onderzoek van een grotere hoeveelheid materiaal verhoogt het aantal positieven door detectie van een bijkomend aantal zwak positieve monsters;
5. het aantal monsters, positief voor parainfluenza-, adeno- en rhinovirussen, was in deze studie te gering om een uitspraak toe te laten. De fragmentarische resultaten gaan echter in de richting van vroegere resultaten, namelijk dat immunofluorescentie op de monsters te ongevoelig is voor deze groep, wat waarschijnlijk veeleer aan de monsters en de virussen te wijten is, dan aan de sera.

## Sleutelwoorden

Respiratoire virussen, diagnostiek, monoclonale antilichamen.

## Referenties

1. PATTYN S R, PROVINCIAEL D, LAMBRECHTS R, CEUPPENS P. Rapid diagnosis of viral respiratory infections. Comparison between immunofluorescence on clinical samples and immunofluorescence on centrifuged cultures. *Acta Clin Belg* 1991; 46: 7-12.
2. SCHIRM J, LUYT D S, PASTOOR C H, MANDEMA J M, SCHRODER F P. Rapid detection of respiratory viruses using mixtures of monoclonal antibodies on shell vial cultures. *J Med Virol* 1992; 38: 147-151.
3. RABALAIS G, STOUT G, LADD K, COST K. Rapid diagnosis of respiratory viral infections by using a shell vial assay and monoclonal antibody pool. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 1505-1568.
4. MATTHEY S, NICHOLSON D, RUHS S, ALDEN B, KNOCK M, SCHULTZ K, SCHMUECKER A. Rapid detection of respiratory viruses by shell vial culture and direct staining by using pooled and individual monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 540-544.
5. HIRE S A, HUANG Y T. Microwave-accelerated direct immunofluorescent staining for respiratory syncytial virus and influenza virus. *J Clin Microbiol* 1996; 31: 1819-1820.



6. MURPHY P, ROBERTS Z M, WANER J L. Differential diagnosis of influenza A virus, influenza B virus, and respiratory syncytial virus infection by direct immunofluorescence using mixtures of monoclonal antibodies of different isotypes. *J Clin Microbiol* 1996; 34: 1798-1800.
7. ENGLER H D, PREUSS J. Laboratory diagnosis of respiratory virus infections in 24 hours by utilizing shell vial cultures. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 2165-2167.
8. WOO P C Y, CHIN S S, SETO W H, PEIRIS M. Cost effectiveness of rapid diagnosis of virus respiratory tract infections in pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 1579-1581.
9. BEECKMANN S E, ENGLER H D, COLLINS A S, CANOSA J, HENDERSON D K, FREIFEILD A. Rapid identification of respiratory viruses: impact on isolation practices and transmission among immunocompromised pediatric patients. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1996; 17: 581-586.