



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.

Détection des rotavirus humains dans les selles : Comparaison de cinq techniques.*

par E. BAILLARGEAU**, S. RANGER**, G. AGIUS**, A. SAMB*** et M. CASTETS**
avec la collaboration technique de B. REKAS**

RESUME

Les auteurs évaluent sur 118 selles les performances de plusieurs techniques permettant la détection des rotavirus humains : microscopie électronique, agglutination au latex (Slidex Rota-kit : Bio-Mérieux, Rotalex : Orion Diagnostica) et ELISA (Enzygnost : Behring, Bio-EnzaBead : Bionetics). La reproductibilité et la spécificité se sont montrées satisfaisantes pour l'ensemble des techniques. Les deux tests au latex ont donné des sensibilités proches de celle obtenue par Enzygnost : 89 %. L'ELISA Bio-EnzaBead fournit une sensibilité de 56 %, inférieure à celle de la microscopie électronique. Les techniques d'agglutination au latex nous semblent adaptées grâce à leur simplicité, leur rapidité d'exécution et leur faible coût à la détection des rotavirus pour de grandes séries.

Mots-Clés :

Rotavirus — Selles — Microscopie électronique — Agglutination au latex — E.L.I.S.A.

Le rotavirus humain représente le principal agent étiologique des gastro-entérites virales infantiles. Ce virus n'est pas isolé en pratique courante. Le diagnostic biologique repose donc soit sur la visualisation du virus : microscopie électronique (ME) et immunomicroscopie électronique (IME), soit sur la détection des antigènes viraux. Parmi ces dernières méthodes, des tests immunoenzymatiques et d'agglutination au latex ont récemment été commercialisés ; certains sont utilisés en routine.

Cette étude se propose de comparer les performances de deux techniques immunoenzymatiques : Enzygnost (Institut Behring), Bio-EnzaBead (Bionetics) et deux tests au latex : Rotalex (Orion Diagnostica), Slidex Rota-Kit (Bio-Mérieux) pour la recherche de rotavirus dans les selles.

MATERIEL ET METHODES

Matériel

Cent-dix-huit selles ont été recueillies chez des enfants âgés de 2 jours à 12 ans admis au C.H.U. de Poitiers : 80 patients et au C.H.U. de Dakar : 33 patients. Deux selles successives ont été prélevées pour 3 enfants et pour un autre 3 selles ont été testées. Tous ces malades présentaient des tableaux cliniques de gastro-entérites. Les échantil-

lons ont été conservés à -30°C et décongelés une seule fois.

Méthodes

— *Microscopie électronique* : une grille Cu/Rh 400 mesh recouverte d'un film de formvar puis carbonée, reçoit l'extrait de selles. Celui-ci subit ensuite une coloration négative à l'aide d'une solution de phosphotungstate de sodium à 2 % pH 6,5 avant d'être observé à l'aide d'un microscope JEOL 100 C.

— *Immunomicroscopie électronique* : l'antisérum utilisé est le sérum de contrôle positif pour la fixation du complément (Institut Behring). Les grilles sont sensibilisées par contact avec une dilution au 1/32 de cet antisérum 30 minutes à 25°C puis lavées en P.B.S. Elles subissent ensuite le même traitement que pour la ME.

— *Techniques au latex* :

• Slidex Rota-Kit : les selles sont diluées au 1/10 avec le tampon fourni puis homogénéisées, et laissées au repos 10 minutes avant d'être centrifugées 10 minutes à 500 g. Deux gouttes de 50 μl de surnageant sont déposées

* Reçu le 5.9.1985. Acceptation définitive le 17.10.1985

** Laboratoire de Microbiologie B, Centre Hospitalier Universitaire, BP 577, F 86021 Poitiers Cédex

*** Laboratoire de Bactériologie-Virologie, Centre Hospitalier Universitaire, Dakar, Sénégal

séparément sur une lame. L'une est mélangée à une goutte de latex réactif et l'autre à une goutte de contrôle. La réaction est positive si une agglutination nette est observée uniquement avec le latex réactif ; elle est ininterprétable si une agglutination est également observée avec le réactif contrôle. Un témoin positif est inclus dans chaque manipulation.

- Rotalex : les échantillons sont dilués au 1/10 en tampon tris pH 7,4 et homogénéisés. Après 30 minutes les suspensions sont centrifugées à 1200 g pendant 20 minutes. Le protocole technique et la lecture de la réaction sont ensuite identiques à ceux du Slidex Rota-Kit.

— *Techniques ELISA* : elles ont été pratiquées selon les protocoles opératoires préconisés par les fabricants. Dans les deux cas, il s'agit d'une méthode sandwich avec utilisation d'un antisérum de lapin anti-SA 11 (rotavirus du singe). Cet anticorps est fixé sur le fond d'une microplaque en polystyrène pour Enzygnost et sur des billes métalliques pour Bio-EnzaBead. Les enzymes utilisées sont la phosphatase alcaline pour Enzygnost et la peroxydase de raifort pour Bio-EnzaBead. Les densités optiques sont déterminées avec un lecteur Multiskan Titertek (Flow).

RESULTATS

L'ensemble des résultats est présenté dans le tableau I. Toute détermination douteuse a été recommencée. La con-

cordance porte sur 70 selles (59 %) toutes techniques confondues.

La sensibilité relative de chaque méthode a été calculée par rapport au nombre de selles positives par au moins une technique : 89 % pour Enzygnost, 84 % pour Slidex Rota-Kit, 72 % pour Rotalex, 60 % pour la ME et 56 % pour Bio-EnzaBead. Un seul échantillon s'est montré négatif par Enzygnost, ME et IME étant positives. Les deux tests au latex ont donné des résultats ininterprétables dans 9 % des cas pour Rotalex et 10 % pour Slidex Rota-Kit. Parmi ces selles, 26 % étaient positives en ME. Les tests d'agglutination ont fourni 5 positivités non confirmées par les autres techniques.

DISCUSSION

La ME est une technique très spécifique mais peu sensible (6,8) ; dans notre série parmi les 80 selles négatives en ME, 20 étaient positives par Enzygnost et 16 par au moins une autre technique. Cependant elle permet de visualiser d'autres virus responsables de gastro-entérites aiguës. L'IME nous a apporté un argument supplémentaire dans les cas discordants car elle améliore la sensibilité de la ME (6).

Parmi les tests immunoenzymatiques, Enzygnost et Rotazyme (Abbott) ont été les plus étudiés (8, 9, 12) et se

TABEAU I
Résultats obtenus par cinq techniques pour la détection des rotavirus humains dans les selles

Nombre d'échantillons	Microscopie électronique	Enzygnost	Bio-EnzaBead	Rotalex	Slidex Rota-kit	Immunomicroscopie électronique	
						+	-
23	+	+	+	+	+		
3	+	+	+	i*	+		
1	+	+	+	+	-		
1	+	+	+	-	+		
6	+	+	-	+	+		
1	+	+	-	+	-		
1	+	+	-	+	i*		
1	+	+	-	-	i*		
1	+	-	-	+	i*	1	
47	-	-	-	-	-		
5	-	+	+	+	+	3	2
2	-	+	+	-	+		2
1	-	+	+	-	-		1
3	-	+	-	+	+	2	1
4	-	+	-	-	+		3
1	-	+	-	i*	+		1
2	-	+	-	-	i*		1
2	-	+	-	-	-		1
5	-	-	-	+	+		
1	-	-	-	i*	+		
1	-	-	-	-	i*		
6	-	-	-	i*	i*		

* Résultats ininterprétable (agglutination avec le réactif contrôle).

sont révélés très sensibles et spécifiques. Nous rapportons pour Enzygnost une sensibilité de 89 %, proche de celle fournie par plusieurs auteurs (6, 9). Les performances du test Bio-EnzaBead sont très inférieures à celles attendues pour un ELISA ; la sensibilité est de l'ordre de celle de la ME. En effet, 6 selles positives par toutes les autres techniques se sont révélées négatives avec Bio-EnzaBead. Vingt-trois échantillons étaient positifs avec Enzygnost et négatifs avec Bio-EnzaBead. Nous avons observé plusieurs fois au cours des manipulations une certaine friabilité des billes métalliques, pouvant expliquer un déficit quantitatif en anticorps anti-rotavirus à la surface de la bille. Cependant, dans un seul cas, ces tests sont restés négatifs alors que ME et IME étaient positives. Des faits similaires ont déjà été observés et plusieurs hypothèses émises (4, 6, 11) : rotavirus recouverts d'anticorps, protéases inhibant la réaction immunoenzymatique et agents rotavirus-like morphologiquement indistinguables des rotavirus mais antigéniquement différents (7). La spécificité du test Bio-EnzaBead est bonne puisque les 8 échantillons de selles négatifs en ME et positifs par Bio-EnzaBead étaient positifs par au moins une autre méthode.

Récemment, plusieurs tests au latex ont été commercialisés à la suite des travaux de Sanekata (10) et Haikala (2). Les avantages de telles techniques notamment l'accès à cette détermination par des laboratoires non spécialisés, ont déjà été décrits (1, 3, 6, 9). Les tests Rotalex et Slidex Rota-kit ont une sensibilité intermédiaire entre la ME et les tests immunoenzymatiques (6, 9) Slidex Rota-kit est légèrement plus sensible que Rotalex (84 % contre 72 %),

fait déjà mentionné (5, 9). L'existence de réactions ininterprétables, agglutination apparaissant à la fois avec le latex réactif et le latex contrôle, représente le problème essentiel d'interprétation de ces tests. Dans ce travail, les deux tests ont été affectés avec la même fréquence par ce phénomène alors que d'autres auteurs donnent un avantage au Slidex Rota-kit (5, 9). Dans notre série, 5 selles ont donné des réactions positives par les techniques au latex et négatives par les autres techniques. De tels cas de figures, déjà rapportés pour Rotalex (1, 9) sont possibles avec Slidex-Rota kit.

Pour 22 selles, les cultures cellulaires et la ME ont mis en évidence des adénovirus (8 selles), des poliovirus (2 selles), des ECHOvirus (6 selles), des coxsackievirus A (2 selles) et B (2 selles) et des coronavirus (2 selles). Les méthodes immunoenzymatiques et les tests au latex sont restés négatifs pour ces échantillons.

La reproductibilité pour toutes les techniques s'est montrée satisfaisante.

En conclusion, le test Enzygnost s'est révélé le plus sensible, le test Bio-EnzaBead étant assez décevant pour un test immunoenzymatique. Pour l'ensemble des techniques la spécificité est bonne. Toutefois, les agglutinations au latex ont montré des positivités non retrouvées par les autres techniques. Néanmoins, la rapidité, la facilité d'exécution et le faible coût de ces tests au latex permettent en première intention un dépistage accessible aux laboratoires non spécialisés.

SUMMARY

Detection of human rotaviruses in faeces : comparison of five methods

The authors have tested 118 stools by five techniques used for the detection of rotaviruses in human faeces : electron microscopy, latex agglutination (Slidex Rota-kit ; BioMérieux ; Rotalex : Orion Diagnostica) and ELISA (Enzygnost : Behring ; Bio-Enza-Bead : Bionetics). Reproducibility and specificity for all techniques were satisfactory. Comparison of the methods showed Enzygnost to be the most sensitive (89 %), followed by the two agglutination tests, then electron microscopy and least sensitive the Bio-Enza-Bead (56 %). For large - scale screening of faeces, it appeared that the latex agglutination test were preferable for reasons of simplicity, speed and cost.

Key-words :

Rotavirus - Faeces - Electron microscopy - Latex agglutination - ELISA

BIBLIOGRAPHIE

1. AGIUS G., BAILLARGEAU E., CASTETS M., SAMB A. — Détection rapide des rotavirus dans les selles : intérêt d'un test au latex. *Pathol. Biol.*, 1984, 32, 56-58
2. HAIKALA O.J., KOKKONEN J.O., LEINONEN M.K., NURMI T., MANTYJARVI R., SARKKINEN H.K. — Rapid detection of rotavirus in stool by latex agglutination : comparison with radioimmunoassay and electron microscopy and clinical evaluation of the test. *J. Med. Virol.*, 1983, 11, 91-97
3. HAMMOND G.W., AHLUWALIA G.S., BARKER F.G., HORSMAN G., HAZELTON P.R. — Comparison of direct and indirect enzyme immunoassays with direct ultracentrifugation before electron microscopy for detection of rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 16, 53-59
4. HOVI T., VAISANEN V., UKKONEN P., VON BONSDORFF C.H. — Solid-phase enzyme immunoassay for rotavirus antigen: faecal protease activity as a reason for false - negative results. *J. Virol. Meth.*, 1982, 5, 45-53
5. LUKOWICZ G., MOUNIER M., LEBOUTET M.J., DENIS F., GOUDEAU A. — Evaluation d'un nouveau test au latex pour détecter les rotavirus humains dans les selles. *Pathol. Biol.*, 1985, 33, 681-683

6. MORINET F., FERCHAL F., COLIMON R., PEROL Y. — Comparison of six methods for detecting human rotavirus in stools. *Eur. J. Clin. Microbiol.*, 1984, 3, 136-140
7. RODGER S.M., BISHOP R.F., HOLMES I.H. — Detection of a rotavirus - like agent associated with diarrhea in an infant. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 16, 724-726
8. RUBENSTEIN A.S., MILLER M.F. — Comparison of an enzyme immunoassay with electron microscopy procedures for detecting rotavirus. *J. Clin. Microbiol.*, 1982, 15, 938-944
9. SAMBOURG M., GOUDEAU A., COURANT C., PINON G., DENIS F. — Direct appraisal of latex agglutination testing, a convenient alternative to enzyme immunoassay for the detection of rotavirus in childhood gastroenteritis, by comparison of two enzyme immunoassays and two latex tests. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, 21, 622-625
10. SANEKATA R., YOSHIDA Y., OKADA H. — Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination. *J. Immunol. Meth.*, 1981, 41, 377-385
11. WATANABE H., HOMES I.H. — Filter paper solid-phase radioimmunoassay for human rotavirus surface immunoglobulins. *J. Clin. Microbiol.*, 1977, 6, 319-324
12. YOLKEN R.H., LEISTER F.J. — Evaluation of enzyme immunoassays for the detection of human rotavirus. *J. Infect. Dis.*, 1981, 144, 379

☆☆☆☆
☆☆
☆