



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.

LE DIAGNOSTIC RAPIDE DES INFECTIONS
À VIRUS RESPIRATOIRE SYNCYTIAL (RS)
PAR LE TITRAGE DES IgM SÉRIQUES
(IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE)

par J. J. Chomel ⁽¹⁾, M. Aymard ⁽¹⁾ ⁽²⁾, J. P. Allard ⁽²⁾ et C. Bouvet ⁽¹⁾

⁽¹⁾ *Laboratoire de Virologie du Centre Hospitalier Universitaire,
Université Claude-Bernard, Lyon I, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 2, et*

⁽²⁾ *Laboratoire d'Études des Maladies Virales,
Laboratoire National de la Santé, 8, avenue Rockefeller, 69373 Lyon Cedex 2*

SUMMARY

RAPID DIAGNOSIS OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS INFECTION
BY SPECIFIC IgM ESTIMATION

In January 1981, during an outbreak of respiratory diseases in babies aged between 1 and 3 months, 9 patients with severe bronchiolitis were hospitalized in a Pediatric ward and 11 cases occurred as nosocomial infections.

For direct rapid diagnosis, pharyngeal swabs and nasal aspirations were obtained from 10 out of 11 patients at a late stage of the disease. The rapid detection of respiratory syncytial (RS) antigen was positive in only 2 cases and the virus isolation unsuccessful.

For serological diagnosis, in 9 out of 16 cases, the « first » serum was collected 5 days or more after the onset of the disease. The indirect immunofluorescence (IF) test allowed us to make the diagnosis in 13/16 cases, while the complement fixation (CF) test remained negative.

From November 1980 to January 1981, sera were collected from 32 children aged 2 to 14 years and 13 adults hospitalized for acute respiratory disease (bronchitis, bronchopneumopathis) and 35 adults (kidney grafted) submitted to a systematic survey. The indirect IF test was not found to be more sensitive than the CF test but it enabled us:

- 1) to differentiate the primary infections from the reinfections;
- 2) to show detectable IgM in 11/17 cases of reinfections;
- 3) to make a rapid diagnosis of RS infection in 60 % of the cases on a

single serum while the CF test gave either a negative result (1 case) or only presumptive results (10 cases).

KEY-WORDS: Respiratory syncytial virus, IgM; Rapid diagnosis, Indirect immunofluorescence, Complement fixation test, Human.

INTRODUCTION

Les complications graves des infections respiratoires de l'enfant font l'objet d'une hospitalisation dans des délais variant de 24 h à 15 jours après le début clinique de l'infection virale. Dans ces conditions, la recherche de virus et d'antigène viral ne peut être fructueuse ; l'on ne dispose alors que du sérodiagnostic ; or, la fixation du complément (FC) n'est pas toujours sensible [7] et ne permet pas la caractérisation des IgM qui apparaissent normalement 6 à 7 jours après le début de l'infection et disparaissent en 4 à 6 semaines [2]. La réaction d'immunofluorescence (IF) indirecte [10] appliquée à la détection des IgM a été utilisée pour diagnostiquer des pneumopathies sévères au cours d'une épidémie dans un service de pédiatrie.

Entre le 15 janvier et la mi-février 1981, 9 nourrissons âgés de 1 à 3 mois, atteints de bronchiolites avec pause respiratoire et signes radiologiques, ont été hospitalisés dans un service de pédiatrie lyonnais ; 11 autres ont présenté une infection analogue alors qu'ils étaient hospitalisés dans le même service pour des causes diverses (hypotrophie, diarrhées, problèmes chirurgicaux...).

Chez ces nourrissons, on a pu comparer l'efficacité des méthodes de diagnostic : le diagnostic rapide direct par détection de l'antigène viral [4, 5, 11], la mise en culture pour isolement et identification du virus, le sérodiagnostic classique par FC [10, 14] et la détection des IgM par IF indirecte.

Chez 32 enfants âgés de 2 à 14 ans, hospitalisés dans d'autres services de la ville pour infections respiratoires sévères, chez 13 adultes hospitalisés dans un service de pneumologie et chez 35 hospitalisés dans un service de transplantation rénale soumis à une surveillance virologique systématique, on a comparé l'efficacité des diagnostics sérologiques faits par FC et par IF.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Par la technique d'IF indirecte décrite par Gardner [4, 5] on a recherché la présence d'antigène viral (respiratoire syncytial ou RS, *Myxovirus influenza A* et B, *Myxovirus parainfluenza* 1, 2 et 3, adénovirus) dans les cellules de l'épithélium

FC = fixation du complément.

FR = facteur rhumatoïde.

IF = immunofluorescence.

cilié des fosses nasales, prélevées par aspiration [4, 5, 11]. On a utilisé, selon les virus, les sérums des laboratoires « Wellcome » (distribués par l'OMS) et « Flow », et les sérums préparés au laboratoire.

Des prélèvements de gorge ont été inoculés à des cellules de rein de singe primaire, MRC-5 et KB et à des œufs de poule embryonnés, selon les techniques classiques [10, 14].

Le diagnostic sérologique a été effectué par la réaction de FC selon la technique de Kolmer adaptée à la microméthode en plaques [10]. Les antigènes sont préparés au laboratoire.

Les IgG et IgM anti-RS sont titrés par IF indirecte [10]. On utilise pour cela des cellules BGM (lignée de rein de singe vervet) cultivées en microplaques, infectées par le virus RS et fixées, lorsque l'effet syncytial est d'environ 75 %, par de l'acétone refroidie diluée avec 15 % d'eau distillée. La réaction se fait ensuite directement dans les cupules après réhydratation en tampon PBS, pH 7,2. On a contrôlé au préalable les conjugués anti-IgG (Behring) et -IgM (Mérieux) pour vérifier leur spécificité et déterminer la dilution optimale d'utilisation. On ne tient compte, à la lecture, que des fluorescences spécifiques de l'inclusion virale [11].

Les sérums IgM⁺ ont été traités par adsorption sur des particules de latex sensibilisées (Arthritest, Mérieux). Après traitement, on n'a observé aucune modification du titre des IgM et des IgG anti-virus RS. Le facteur rhumatoïde (FR) n'est pas, dans ce test, responsable de fausses réactions positives.

RÉSULTATS

Résultats comparés des diagnostics directs et indirects au cours de l'épidémie survenue chez 20 nourrissons

Dans le tableau I, on notera que le diagnostic direct n'a pu être réalisé que dans 11 cas sur 20 et le diagnostic indirect dans 16 cas ; au total, 16 enfants sur 20 ont subi des prélèvements. Onze prélèvements pharyngés et aspirations nasales ont été effectués dont un seul 24 heures après les premiers signes cliniques et 10 prélèvements après 5 jours. Seulement 9 prélèvements de sang ont été pratiqués avant 1 semaine.

TABLEAU I. — Délai des prélèvements (en nombre de jours après le début de la maladie) dans l'étude d'une épidémie d'infections respiratoires sévères chez des nourrissons hospitalisés (20 cas, janvier-février 1981).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	>10
Prélèvements rhinopharyngés (11)	1	—	—	—	2	—	2	1	1	1	3
Prélèvements de sang (16)	3	1	3	—	1	—	1	—	—	—	7

Le diagnostic direct rapide n'a été positif que dans 2 cas. Aucun virus n'a pu être isolé, ni sur cellules ni sur œuf. La réaction de FC est restée négative dans tous les cas, alors que la mise en évidence d'IgM spécifiques du virus RS sur le sérum précoce a été positive dans 13 cas sur 16 (tableau II).

TABLEAU II. — Diagnostic sérologique rapide
des infections à virus respiratoire syncytial : corrélation entre FC et IF.

	FC+ IF+	FC+ IF-	FC- IF+	FC- IF-
<i>Nourrissons</i> (< 2 ans) = 16 (épidémie)	—	—	13	3
<i>Enfants</i> = 2-14 ans = 32 (bronchopneumopathies sporadiques)	13	4	1	14
<i>Adultes</i> :				
— Service de pneumologie = 13 (bronchopneumopathies sporadiques)	3	1	—	9
— Service de transplantation = 35 (surveillance, pas d'atteinte respiratoire)	3	—	—	32

FC+ : séroconversion ou titre significatif (≥ 64) ; IF+ : séroconversion IgG ou IgM+.

Dans 3 cas, un diagnostic d'infection à virus RS n'a pas été posé :

- l'un s'est avéré être une infection herpétique ;
- dans le second cas, le premier sérum était prélevé tardivement par rapport au début clinique (au jour 42) ;
- pour le dernier cas, il ne s'agit probablement pas d'une infection à virus RS : les IgM titrées sur 2 sérums prélevés aux jours 3 et 15 sont restées négatives et le titre des IgG n'a pas varié.

*Résultats du diagnostic sérologique
chez les enfants de 2 à 14 ans et chez les adultes (tableau II)*

Sur les 32 cas d'infections respiratoires sévères sporadiques observés chez les enfants de 2 à 14 ans, 13 ont été diagnostiqués comme infections à virus RS par FC (soit séroconversion, soit titres considérés comme significatifs d'une infection récente dans les conditions techniques du laboratoire) et par IF (soit séroconversion IgG, soit présence d'IgM spécifiques).

Parmi les 13 cas positifs en IF, on note 11 cas pour lesquels on a pu mettre en évidence des IgM spécifiques (dont 2 séroconversions IgM) et 2 cas avec séroconversion IgG sans apparition d'IgM.

Dans 14 cas, les réactions d'IF et de FC sont restées négatives. La concordance entre ces 2 techniques est de l'ordre de 85 % (27/32).

Dans 4 cas où la réaction de FC est positive (hauts titres significatifs), la mise en évidence d'IgM spécifiques en IF est restée négative malgré les titres élevés en IgG (≥ 256).

Dans 1 cas (enfant d'environ 2 ans), la réaction de FC reste négative, mais l'on détecte des IgM dans le sérum précoce.

Au cours de la même période, 13 cas d'infections sporadiques respiratoires d'étiologie RS probable, survenues chez des adultes, ont été soumis à un diagnostic virologique : 3 ont été positifs en FC et en IF, 9 sont restés

négatifs par les 2 techniques, et 1 n'a été positif qu'en FC. Au cours d'une enquête portant sur 35 malades hospitalisés dans un service de transplantation rénale faisant l'objet d'une surveillance virologique continue, 3 infections à virus RS (dont 2 asymptomatiques) ont été diagnostiquées en FC et en IF (1 séroconversion IgG sans IgM et 2 IgM+), 32 cas étaient négatifs en IF et FC. La concordance chez l'adulte entre les 2 techniques est de l'ordre de 97 % (47/48).

Dans 11 cas où l'on ne possédait qu'un seul sérum (enfants et adultes), la présence d'IgM en IF a prouvé avec certitude l'infection récente à virus RS alors que la FC restait négative (1 cas) ou ne permettait qu'un diagnostic présomptif (10 cas).

Dans 5 cas où l'on possédait plusieurs sérums, on détectait déjà des IgM dans le sérum précoce encore négatif en FC.

Parmi les 25 cas positifs (tableau III) (enfants et adultes), 17 cas ont pu être considérés comme des réinfections dont 13 s'accompagnaient d'un rappel sur les IgM. Un cas était une infection primaire indiscutable (séroconversion FC et IF). Dans 7 cas l'on n'a pu préciser la nature de l'infection.

TABLEAU III. — Nature des infections à virus respiratoire syncytial.

	Infections primaires	Réinfections probables		Indéterminé
		IgM+	IgM-	
<i>Enfants</i> (2-14 ans) = 18, dont 10 réinfections probables	1	8	2	7
<i>Adultes</i> :				
— Service de pneumologie = 4	—	3	1	—
— Service de transplantation = 3	—	2	1	—

Une évaluation portant sur 5 cas a montré que la persistance des IgM au cours des réinfections était comprise entre 4 et 6 semaines.

DISCUSSION

Étant donné les délais entre les premiers cas apparus et l'établissement d'une épidémie, d'une part, et d'autre part entre l'observation de la maladie clinique sévère et la réalisation des prélèvements, le diagnostic direct n'a que peu de chances d'être positif. Il en est de même de l'isolement du virus.

L'existence de ces délais augmente au contraire les chances de détecter des IgM en IF dans le premier prélèvement de sang.

L'IF a apporté une aide précieuse au diagnostic puisqu'elle a permis de faire la preuve de l'infection à virus RS chez 13 nourrissons sur 20 hospi-

talisés. L'absence d'anticorps décelables en FC est conforme à ce que l'on sait déjà [7] du peu de sensibilité de cette réaction chez les nourrissons. Le titrage des IgM spécifiques antivirales dans les sérums de nourrissons serait gêné par la présence de FR d'après Fraser et coll. [3]. Le risque d'interférence du FR est minime chez les tout jeunes enfants en raison du faible pourcentage ($< 3\%$) de nourrissons positifs en FR. En outre, les essais d'adsorption du FR sur des particules de latex sensibilisées n'ont en rien modifié les titres d'IgM anti-RS.

Chez les jeunes enfants de plus de 2 ans et chez les adultes, il existe une bonne corrélation entre les résultats de la FC et de l'IF : 85 et 97 % respectivement.

Dans ces cas, la FC reste une excellente technique fiable et moins onéreuse que l'IF.

L'âge des malades et le titre élevé des IgG en IF dans les sérums précoces (> 256) sont la preuve que dans 68 % des cas il s'agit de réinfections. Celles-ci ont déjà été signalées par d'autres auteurs [1, 8, 9] dans des proportions équivalentes. Les réinfections expliquent en partie la bonne sensibilité de la réaction de FC. Plus de 75 % de ces réinfections prouvées sérologiquement ont des IgM dont la durée d'évolution est de 4 à 6 semaines [2]. La présence d'IgM au cours des réinfections n'a pas été décrite pour le virus RS, mais elle est connue pour d'autres virus tels celui de la rubéole [15], le cytomégalovirus [6, 12] et le poliovirus [13] : la persistance des IgM a été évaluée pour ces virus à 4 à 6 semaines lorsqu'elles sont détectées par des méthodes de sensibilité identique (soit fractionnement sur gradient de saccharose suivi d'un titrage par inhibition d'hémagglutination ou neutralisation, soit IF).

L'on a pu noter une discordance entre la FC et l'IF (FC⁺, IF⁻) qui pourrait s'expliquer par des réinfections sans présence d'IgM.

Il n'a pas été possible d'établir de corrélation entre la gravité clinique des signes respiratoires et la présence ou non d'IgM au cours des réinfections.

CONCLUSIONS

L'IF indirecte pour le titrage des IgM nous est apparue comme un élément indispensable du diagnostic des infections respiratoires à virus RS chez les nourrissons. Cette méthode est aussi rapide, moins laborieuse et moins coûteuse que le diagnostic rapide par détection de l'antigène viral dans les prélèvements. Elle permet précisément de porter un diagnostic lorsque l'antigène n'est plus détectable dans le produit d'aspiration nasale.

L'IF ne remplace pas la réaction de FC, qui reste une technique excellente pour le diagnostic des infections de l'enfant après 2 ans et de l'adulte, mais elle permet dans près de 60 % des cas examinés un diagnostic rapide par détection d'IgM dans le sérum prélevé précocement.

RÉSUMÉ

En janvier 1981, au cours d'une épidémie d'infections respiratoires survenue chez des enfants âgés de 1 à 3 mois, 9 sujets atteints de bronchiolites sévères ont été hospitalisés dans un service de pédiatrie et 11 cas sont survenus dans le service.

Pour le diagnostic rapide direct, les prélèvements pharyngés et/ou des aspirations nasales effectués chez 10/11 malades étaient tardifs par rapport à l'apparition des symptômes. Le diagnostic direct n'a été positif que dans 2 cas, et l'isolement d'un virus a toujours été négatif.

Pour le diagnostic sérologique, dans 9 cas/16, le premier sérum a été prélevé après 5 jours d'évolution. La réaction d'immunofluorescence (IF) a permis de faire le diagnostic d'une infection à virus respiratoire syncytial dans 13 cas. La réaction de fixation du complément (FC) est restée négative dans tous les cas.

Pendant la période de novembre 1980 à janvier 1981, on a prélevé les sérums de 32 enfants et 13 adultes hospitalisés pour des infections respiratoires aiguës (bronchites et bronchopneumopathies) et les sérums de 35 adultes hospitalisés dans un service de transplantation rénale. La réaction d'IF indirecte n'a pas été plus sensible que la FC, mais elle a permis :

- 1) de différencier les infections primaires des réinfections ;
- 2) de prouver que dans la majorité de ces réinfections (13 cas/17), on pouvait détecter des IgM ;
- 3) de porter un diagnostic de certitude rapide sur un seul sérum dans environ 60 % des cas, alors que la FC était négative (1 cas) ou ne permettait qu'un diagnostic présomptif (10 cas).

MOTS-CLÉS : Virus respiratoire syncytial, IgM ; Diagnostic rapide, Immunofluorescence indirecte, Fixation du complément, Homme.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient de leur collaboration les Pr Bethenod et Hermier des Services de Néonatalogie et Médecine Infantile de l'Hôpital Debrousse, les Pr François et Monnet des Services de Médecine Infantile et le Pr Traeger du Service de Transplantation Rénale de l'Hôpital Édouard-Herriot, et le Pr Kalb du Service de Pneumophysiologie de l'Hôpital de la Croix-Rousse.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEEM, M. O., Repeated infections with respiratory syncytial virus. *J. Immunol.*, 1966, **98**, 1115-1122.
- [2] COWAN, K. M., Antibody response to viral antigens. *Advanc. Immunol.*, 1973, **17**, 195-253.

- [3] FRASER, K. B., SHIRODARIA, P. V. & STANFORD, C. F., Fluorescent staining and human IgM. *Brit. med. J.*, 1971, **3**, 707-714.
- [4] GARDNER, P. S. & McQUILLIN, J., Application of immunofluorescent antibody technique in rapid diagnosis of respiratory syncytial virus infection. *Brit. med. J.*, 1968, **3**, 340-343.
- [5] GARDNER, P. S., McQUILLING, J. & MCGUCKIN, R., The late detection of respiratory syncytial virus in cells of respiratory tract by immunofluorescence. *J. Hyg. (Camb.)*, 1970, **68**, 575-580.
- [6] GIBERT, R., AYMARD, M. & LANGLOIS, M., Infections à cytomégalovirus chez les nouveau-nés et les bébés. Valeur de l'immunofluorescence indirecte comparée à la fixation du complément et à l'isolement du virus. *Bull. Org. mond. Santé* (publication en cours).
- [7] JACKSON, G. G. & MULDOON, R. L., Virus causing common respiratory infections in man. — III. Respiratory syncytial viruses and coronaviruses. *J. inf. Dis.*, 1973, **128**, 674-702.
- [8] JOHNSON, K. M., CHANOCK, R. M., RIFKIND, D., KRAVETZ, H. M. & KNIGHT, V., Respiratory syncytial virus. — IV. Correlation on virus shedding, serologic response and illness in adult volunteers. *J. Amer. med. Ass.*, 1961, **176**, 663-667.
- [9] KIM, H. W., ARROBIO, J. O., BRANDT, C. D., JEFFRIES, B. C., PYLES, G., REID, J. L., CHANOCK, R. M. & PARROTT, R. H., Epidemiology of respiratory syncytial virus infection in Washington, D. C. — I. Importance of the virus in different respiratory tract disease syndromes and temporal distribution of infections. *Amer. J. Epidemiol.*, 1973, **98**, 216-225.
- [10] LENNETTE, E. H. & SCHMIDT, N. J., Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections (5th ed.). American Public Health Association, Washington, 1979.
- [11] MINNICH, L. & RAY, C. G., Comparison of direct immunofluorescent staining of clinical specimens for respiratory virus antigens with conventional isolation techniques. *J. clin. Microbiol.*, 1980, **12**, 391-394.
- [12] NAGINGTON, J., Cytomegalovirus antibody production in renal transplant patients. *J. Hyg. (Camb.)*, 1971, **69**, 645-660.
- [13] OGRA, P. L., KARZON, D. T., RIGHTHAND, F. & MCGILLIVRAY, M., Immunoglobulin response in serum and secretions, after immunization with live and inactivated Poliovaccine and natural infection. *New Engl. J. Med.*, 1968, **279**, 893-900.
- [14] SOHIER, R., Diagnostic des maladies à virus. Éditions Flammarion, Paris, 1964.
- [15] STRANNEGARD, O., HOLM, S. E., HERMODSSON, S., NORRBY, R. & LYCKE, E., Case of apparent reinfection with rubella. *Lancet*, 1970, **I**, 240-241.