



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.

Etude épidémiologique de gastroentérites infantiles d'origine virale dans la région amiennoise*

par F. LEMA**, A. ROSETO**,
G. DUVERLIE**, J. PERIES***
et Ph. DANIEL**

RESUME

L'étude systématique des selles de 130 enfants de la région amiennoise atteints de gastroentérite aiguë a été entreprise par microscopie électronique, immunoenzymologie (ELISA) et immunoelectrodifusion. Cette enquête a permis de détecter au microscope électronique des Rotavirus (40 cas), des Coronavirus (3 cas), des Astrovirus (2 cas), des Adénovirus (2 cas) et des Small Round Virus (1 cas).

Les examens sérologiques effectués sur 86 sérums (fixation du complément, test ELISA et test d'Immunoélectrodifusion) ont montré une assez bonne concordance avec les résultats de la microscopie électronique.

Mots-clef :

Gastroentérite - Rotavirus - Coronavirus - Small Round Virus - Epidémiologie.

Les gastroentérites aiguës sont encore un grave problème de morbidité et mortalité infantiles dans le monde (6). Mais seulement 30 % des cas sont expliqués par une infection bactérienne (9) (*Salmonella*, *Shigella*, *Escherichia Coli*, choléra, *Yersinia enterocolitica*). Plus récemment, le Rotavirus a été démontré comme l'agent étiologique le plus important de gastroentérites infantiles dans les études faites dans plusieurs pays (3) (4) (7). D'autres agents viraux, de physiopathologie inconnue, coronavirus, adénovirus non cultivables, astrovirus, calicivirus et « small round virus » (SRV) ont été retrouvés aussi associés aux gastroentérites infantiles (9). Dans cet article, nous présentons les résultats obtenus dans notre laboratoire en étudiant par diverses méthodes de détection virale directe et de diagnostic sérologique, les cas de gastroentérites aiguës infantiles hospitalisés dans le Service de Pédiatrie (Pr. Piussan) du Centre Hospitalier Universitaire d'Amiens pendant la période allant de Janvier 1979 à Mars 1980.

* Reçu le 27.11.1980. Acceptation définitive le 5.5.1981.

** Service de Virologie, Centre Hospitalier Universitaire, 80 000 Amiens.

*** Unité 107 INSERM, Hôpital Saint-Louis, 75010 Paris.

MATERIEL ET TECHNIQUE

Malades

La population étudiée était composée de 130 enfants (63 garçons et 67 filles) hospitalisés de Janvier 1979 à Mars 1980 pour gastroentérite aiguë dans le service de Pédiatrie II (Pr. Piussan) du CHU d'Amiens. Leur âge s'étalait de 10 jours à 21 mois. Les symptômes dominants étaient les vomissements et la diarrhée, accompagnés dans la majorité des patients d'une légère montée de la température. La plupart des cas se sont présentés pendant la période d'hiver avec une fréquence accrue pendant les mois de Janvier et Février. L'évolution a été toujours favorable et, en général, les symptômes ont regressé après 2 ou 4 jours suivant la prescription d'un régime hydrique.

Détection directe des virus

Les selles ont été recueillies dans un flacon stérile en polystyrène. Elles ont été mises dans 10 ml de tampon phosphate pH 7 (PBS) contenant 10 % de 1.1.2 Trichlorofluorethane (Genetron 113).

Après homogénéisation du mélange par agitation, celui-ci a été centrifugé à 3 000 g pendant 30 minutes à 4° C. Des trois phases obtenues, le liquide surnageant a été prélevé et observé en microscopie électronique, par la technique immunoenzymologique en phase solide (ELISA) et des essais de détection ont été effectués par électroimmunodiffusion (I.E.D.). Dans ce dernier cas, les selles étaient ultrasonnées pendant 30 minutes avec une puissance de 200 watts (C.I.T. — Alcatel).

— *Microscopie électronique*

Le liquide surnageant des selles a été utilisé pour la préparation des grilles de 300 mesh recouvertes d'un film de formvar et de carbone. Une coloration négative a été alors réalisée à l'aide d'une goutte d'acide phosphotungstique à 0,5 % et à pH 7,2 pendant 3 minutes. La lecture a été faite avec un microscopie électronique Philips M 301.

— *Immunologie en phase solide (ELISA)*

La détection directe de l'antigène à partir des selles a été effectuée selon la technique de Scherrer et collaborateurs (13).

— *Immunoélectrodiffusion*

Les extraits des selles étaient soniqués pendant une minute avec une puissance de 25 watts. La migration des extraits de selles a été effectuée sous une tension de 7 volts par centimètre et une densité de 20 milli-ampères pendant 1 heure 30 dans un milieu gélosé à 1 % dans un tampon Tris 0,076 M, acide citrique 0,005 M, pH 8,4. (10).

L'immunosérum employé était d'abord un sérum de lapin anti Rotavirus (Hoechst-Behring) et ensuite un sérum de porcelet de un mois, infecté par voie buccale avec un Rotavirus humain. Le sérum obtenu avait, un mois après l'infection, un titre fixant le complément de 1/16.

Diagnostic immunologique

Il a été effectué par immunoélectrodiffusion, fixation du complément et immunoenzymologie (ELISA).

— *Immunoélectrodiffusion*

L'antigène utilisé a été un Rotavirus bovin (souche U.K.) cultivé sur cellules rénales de singe cynocéphale (Institut Pasteur) ou de Cercopithecus aethiops (Institut Mérieux) dans un milieu dépourvu de sérum et en présence de trypsine.

Les cultures étaient congelées à - 77° C, puis le liquide surnageant centrifugé à 4° C pendant 30 minutes, était concentré 100 fois par dialyse contre

du Polyéthylénglycol 20 000. La qualité du produit concentré était ensuite testée à l'aide d'un immunosérum spécifique de lapin anti-Rotavirus (Hoechst-Behring). Les conditions de migration en I.E.D. étaient les mêmes que celles décrites au paragraphe précédent.

— *Fixation du complément*

Les réactions ont été pratiquées à l'aide de l'antigène Hoechst-Behring selon la technique de Sever (14).

— *Immunoenzymologie (ELISA)*

Cette technique a été pratiquée à l'aide de Rotavirus bovin (souche U.K.), d'immunoglobuline spécifique et d'antiglobuline marquée à la peroxydase selon la technique de Engvall et al. (3).

RESULTATS

DETECTION DIRECTE DES VIRUS A PARTIR DES SELLES

Détection au microscope électronique

Des 130 prélèvements étudiés par cette technique, 40 contenaient des Rotavirus, 3 des Coronavirus, 2 des Astrovirus, 2 des Adénovirus et 1 des « Small Round Virus » (SRV).

Dans 4 prélèvements, deux agents viraux étaient associés (Tableau I).

TABLEAU I

Détection par microscopie électronique d'agents viraux dans des selles de gastroentérites aiguës.

| VIRUS | NOMBRE D'ÉCHANTILLONS POSITIFS | FRÉQUENCE (%) DANS LE TOTAL DES ÉCHANTILLONS ÉTUDIÉS | PRÉVALENCE (%) DANS LES CAS AVEC DÉTECTION VIRALE POSITIVE |
|--------------------|--------------------------------|--|--|
| ROTAVIRUS | 37 | 28,6 | 80,4 |
| CORONAVIRUS | 2 | 1,5 | 4,3 |
| ASTROVIRUS | 2 | 1,5 | 4,3 |
| ROTA + ADÉNOVIRUS | 2 | 1,5 | 4,3 |
| ROTA + CORONAVIRUS | 1 | 0,7 | 2,1 |
| SMALL ROUND VIRUS | 1 | 0,7 | 2,1 |

Détection des Rotavirus par la technique ELISA

L'antigène Rotavirus a été détecté dans 49 des 130 extraits de selles déjà étudiés au microscope électronique soit dans 37,5 % des cas de gastroentérites aiguës.

Détection des Rotavirus par électroimmunodiffusion (I.E.D.)

Cette technique a été appliquée à l'étude de 49 selles dont 19 furent positives. Parmi celles-ci, 3 négatives devinrent positives après traitement aux ultrasons. La concordance obtenue entre les résultats de la microscopie électronique et de l'immunoélectrodifffusion est montrée dans le tableau II.

TABLEAU II

Concordance entre les résultats obtenus par I.E.D. et M.E.

| I.E.D. | M.E. POSITIVES | M.E. NÉGATIVES |
|-----------|----------------|----------------|
| POSITIVES | 14 | 5 |
| NÉGATIVES | 13 | 17 |

Les surnageants des selles positives en I.E.D. étaient neutralisés par des immunosérums de lapin anti-Rotavirus et non par le sérum du même lapin avant immunisation.

Diagnostic sérologique

— Immunoélectrodifffusion

Cette réaction a été réalisée avec du Rotavirus bovin comme antigène. Des anticorps ont été détectés dans 21 sérums sur les 48 étudiés par cette technique.

— Réaction de fixation du complément

Celle-ci a été appliquée à 86 sérums mais seulement 12 paires d'entre eux ont pu être obtenus d'enfants positifs aux Rotavirus en microscopie électronique. Parmi ces 12 paires, 2 sérums précoces contenaient des anticorps dont le titre était respectivement de 1/2 ou de 1/4. Les sérums tardifs possédaient tous des anticorps, mais à des taux faibles. Un seul sérum avait un titre de 1/16 tandis que 6 autres étaient positifs à la dilution de 1/4.

— Technique ELISA

Les mêmes sérums (86) testés par la méthode ELISA contenaient des anticorps dans 50 % des cas.

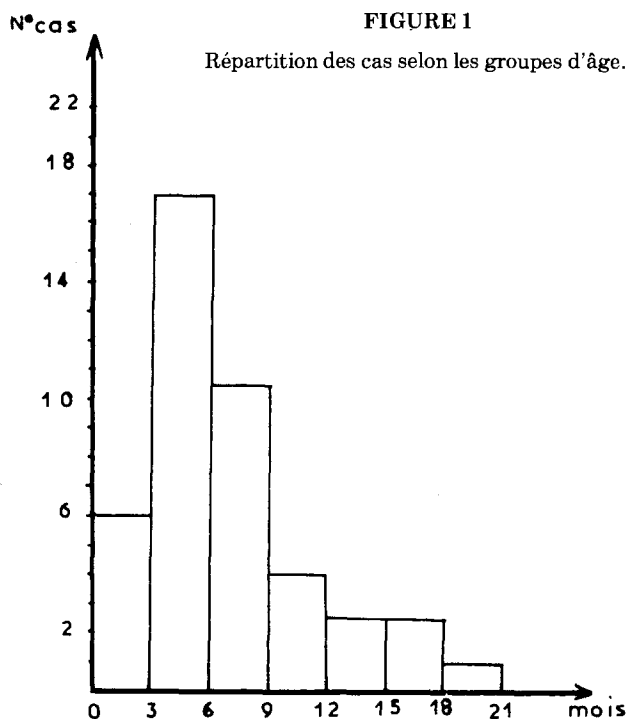
Epidémiologie

— Fréquence des infections selon l'âge.

Dans 46 cas de gastroentérites virales aiguës diagnostiqués au microscope électronique, 80 % des enfants avaient moins de 1 an et 20 % étaient âgés de 1 à 2 ans (figure 1).

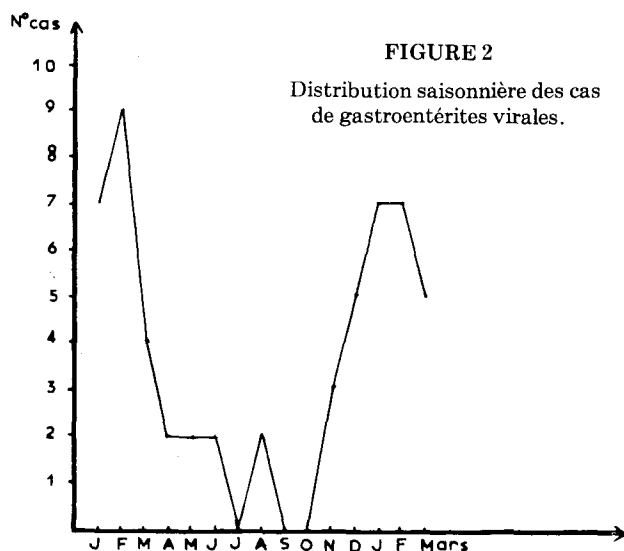
— Répartition selon la saison

La prédominance des infections pendant les mois froids surtout janvier et février (figure 2) est manifeste et est en accord avec les études précédentes (10).



— Répartition selon les sexes

Les garçons ont été atteints par les virus plus fréquemment que les filles dans le rapport de 27 à 18, tandis que la population étudiée était composée de 63 garçons et 67 filles.



DISCUSSION

Les conclusions de cette étude épidémiologique concernant les gastroentérites à rotavirus sont en accord avec les résultats précédemment publiés. En effet, on constate que les Rotavirus sont présents dans 30,8 % des cas de gastroentérites aiguës, que la maladie se manifeste préférentiellement dans les mêmes « tranches d'âge » (entre 0 et 24 mois, avec un pic entre 3 et 6 mois), en hiver (7), avec une incidence très proche chez les garçons et les filles et une même réponse immunitaire.

L'étude comparative entre la sérologie et la microscopie électronique nous permet de dire que dans la majorité des cas où sont détectés des Rotavirus, il s'agit d'une primo-infection. La présence d'anticorps anti-Rotavirus dans quelques cas au début de la maladie, chez les enfants âgés de moins de 3 mois renforce l'idée que les anticorps circulants, d'origine maternelle probable ne protègent pas ou mal contre l'infection intestinale (2). Cependant, il n'en serait pas de même pour les inhibiteurs de Rotavirus, probablement des anticorps, contenus dans le lait maternel. Le titre de ceux-ci baisse rapidement en 4 à 5 jours, mais sont encore détectables dans le lait non dilué pendant plus longtemps (15).

Cette étude confirme aussi la valeur générale de la microscopie électronique pour la mise en

évidence des divers agents, autres que le rotavirus d'être aussi la cause de gastroentérites virales. C'est en effet à l'aide de cette technique que le rotavirus a été découvert par Bishop et al. en 1973 (1). Depuis, les rotavirus ont été décrits par différents auteurs dans le monde (5) (11). C'est aussi avec le microscope électronique que d'autres virus (Astrovirus, Calicivirus, Coronavirus et Small Round Virus (SRV)) ont été observés chez l'homme et plusieurs espèces animales (6) (12). Dans notre étude, nous avons constaté la présence de coronavirus (1,5 % des cas), de Astrovirus (1,5 % des cas) et « Small Round Virus » (0,7 % des cas), et associés entre eux dans 2,2 % des cas. Néanmoins tous les laboratoires de virologie ne sont pas équipés de microscope électronique et des moyens moins coûteux peuvent d'ores et déjà être utilisés. Dans le cas des Rotavirus, la technique immuno-enzymologique en phase solide (ELISA) semble, d'après nos résultats, être au moins aussi sensible que la microscopie électronique lorsque les anticorps dirigés contre les rotavirus humains sont utilisés.

En conclusion, nous pouvons affirmer que les techniques employées sont douées d'un grand intérêt pour le diagnostic des gastroentérites aiguës dans un milieu hospitalier, car la rapidité d'obtention des résultats peut contribuer à limiter la prescription d'antibiotiques inutiles, voire nocifs par leur action sur la flore intestinale.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier M. Hubert Dobremel, Mme Agnès Gaudéfroy, Mlle Nicole Midy pour leur excellente collaboration ainsi que les membres du personnel du service de Pédiatrie II (Professeur Piussan) et plus particulièrement Mme le Docteur Lenaerts qui nous ont grandement facilité cette enquête.

SUMMARY

A systematic survey was carried on stools from 130 children suffering of acute gastroenteritis. Electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and counter electrophoresis were employed. This survey allowed to the detection by electron microscopy of Rotavirus (40 cases), Coronaviruses (3 cases), Astroviruses (2 cases), Adenoviruses (2 cases) and Small Round Viruses (1 case). Serological tests (complement fixation, ELISA and counter electrophoresis) done with 86 sera showed a good correlation with results obtained with electron microscopy.

Key-words :

Gastroenteritis - Rotavirus - Coronavirus - Small Round Virus - Epidemiology.

BIBLIOGRAPHIE

1. BISHOP R.F., DAVISSON G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J. — Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 1973, 2, 1281-1283.
2. CUKOR G., BLACKO W., CAPOZZA F., PANJANVI Z., BEDNARCK F. — Secretory IgA antibody to Rotavirus in human milk 6-9 months post partures. *Lancet*, 1978, 2, 8090, 631-632.
3. ENGVALLE E., PERLMANN P. — Enzyme linked immunosorbent assay, Elisa III quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. of Immunol.*, 1972, 109, 129-135.
4. ESPEJO R.F., CALDERON E., GONZALEZ N. — Distinct reolike agents associated with acute infantile gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.*, 1977, 6, 502-506.
5. FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H. — Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 1973, 2, 1497.
6. HOLMES I. — Viral gastroenteritis. « *Progress in Medical Virologie* », Volume 25, p. 1-36, Kleber Editor, Basel (1979).
7. KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., DOLIN R., THORNHIA R.G., CLINE W.L., ARROBI J.L., BRANDT G.D., RODRIGUEZ W.J., SACK D.A., CHANOCK R.M., PARROT R.H. — Human reovirus like agent associated with « winter » gastroenteritis. *New Engl. J. Med.*, 1976, 294, 965-972.
8. KONNO T., SUZUKI H., IMAI A., ISUIDA N. — Reovirus like agent in acute epidemic gastroenteritis in japanese infants : Fecal shedding and serological response. *J. Infect. Dis.*, 1977, 135, 259-266.
9. MADELEY C.R. — Viruses in the stools. *J. Clin. Path.*, 1979, 32, 1-10.
10. MIDDLETON P.J., PETRIC M., HEWITT C.H., SZYMANSKI M.T., TAM J.S. — Counter immunoelectrophoresis for the detection of infantile gastroenteritis virus (Orbivirus Group) antigen and antibody. *J. Clin. Path.*, 1976, 29, 3, 191-197.
11. ROSETO A., GONZALES J.P., EDLINGER E. — Rotavirus et gastroentérites du nouveau-né. Premières observations. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1977, 284, 2307-2308.
12. ROSETO A., LEMA F., CAVALIERI F., DIANOUX L., SITBON M., FERCHAL F., LASNERET J., PERIES J. — Electron microscopy detection and characterization of viral particles in dog stools. *Arch. Virol.* 1980, 66, 89-93.
13. SCHERRER R., BERNARD S. — Application d'une technique immunoenzymologique (ELISA) à la détection du rotavirus bovin et des anticorps dirigés contre lui. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)* 1977, 128 A, 499-510.
14. SEVER J.L. — Applications of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* 1962, 88, 320-329.
15. THOULESS M.E., BRYDEN A.S., FLEWETT T.H. — Rotavirus neutralisation by human milk. *Br. Med. J.* 1977, 2, 6099, 1390.

