



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.

Recherche de virus en microscopie électronique dans les selles d'enfants atteints de gastro-entérite aiguë hivernale *

par F. FERCHAL **, R. COLIMON **, A. ROSETO ***, J.F. DESJEUX ****
et Y. PEROL **

RESUME

Nous avons examiné au microscope électronique après coloration négative au cours de deux hivers successifs 110 selles d'enfants âgés de moins de 3 ans dont 88 étaient hospitalisés pour gastro-entérite infantile. Dans le groupe témoin, constitué de 22 enfants hospitalisés pour des motifs divers pour lesquels la coproculture était pratiquée à titre systématique, aucun virus n'a été mis en évidence tandis que les selles d'enfants atteints de gastro-entérite étaient riches en virions dans 31,8 % des cas. Dans 22,7 % des cas les virions observés étaient des Rotavirus, dans 9,1 % des cas il s'agissait de virus divers : Adénovirus, Astrovirus, Coronavirus.

Mots-clef :

Gastro-entérite infantile - Rotavirus - Astrovirus - Coronavirus - Microscopie électronique.

* Accepté le 20 décembre 1979.

** Laboratoire central de Bactériologie-Virologie, Hôpital Saint-Louis, 2 place du Dr. A. Fournier, 75010 Paris.

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

**** Service de Pédiatrie (Pr Lestradet), Hôpital Saint-Louis.

Le diagnostic direct des infections virales par mise en évidence des virions au microscope électronique dans un produit pathologique (5) a été utilisé pour le diagnostic rapide des infections virales dermatotropes, vésiculeuses ou tumorales, pour mettre en évidence une virémie, ou pour démontrer une virurie. Son application à la recherche de virus dans les fécès (4) (6) (10) (11) (15) est à l'origine de la découverte de virus nouveaux que l'on ne peut encore isoler dans les cellules cultivées *in vitro* et dont le rôle étiologique dans les diarrhées infantiles est à l'étude (23). Nous rapportons notre expérience portant sur 110 selles d'enfants hospitalisés pendant deux hivers consécutifs.

MATERIEL ET METHODES

Les fécès

Ils proviennent d'enfants âgés de 5 jours à trois ans hospitalisés dans les services de l'hôpital Hérold. Du 1er décembre 1977 au 1er mars 1978, nous avons examiné 47 selles diarrhéiques adressées pour recherche de virus avec le diagnostic de gastro-entérite infantile (GEI) et 22 selles non diarrhéiques adressées pour coprocultures à titre systématique ; celles-ci ont servi de groupe témoin. Du 1er décembre 1978 au 1er mars 1979, nous avons examiné 41 selles diarrhéiques adressées pour recherche de virus avec le diagnostic de GEI.

Les selles ont été recueillies au cours de l'un des quatre premiers jours de la diarrhée et conservées congelées à - 30°.

Extrait de selles

Il est préparé comme suit : 1,5 g de selles est mis dans 2,5 ml de tampon phosphate pH 7,2 (PBS) stérile. On y ajoute 1,5 ml de trichlorotrifluoroéthane (Fréon Merck). Après homogénéisation soignée au Vortex, le tube est centrifugé à + 4° pendant une heure à 5000 t/mn. On obtient trois couches : une couche inférieure formée du Fréon qui a solubilisé les substances liposolubles, une couche moyenne ou galette constituée des débris cellulaires et riche en bactéries, une couche supérieure contenant les virus. Celle-ci est recueillie à la pipette et déposée dans un tube stérile. Cet extrait est utilisable pour l'inoculation en cultures cellulaires.

La préparation des grilles porte-objet

Des grilles cuivrées de 300 « mesh », recouvertes d'un côté d'une pellicule de formvar, de l'autre d'une pellicule de carbone, sont posées face formvar sur une goutte de surnageant pendant 4 minutes, puis l'excès de liquide est absorbé avec

du papier filtre. Sans sécher totalement la surface, on pose la grille sur une goutte d'acide phosphotungstique à 2 % tamponné avec de la soude normale à pH 6,2. Après 4 minutes de contact, on sèche complètement la grille. Celles-ci sont conservées à l'abri des poussières jusqu'à l'examen qui peut être différé de plusieurs jours à plusieurs semaines.

L'examen au microscope électronique

Les grilles sont observées avec un microscope Philips EM 301 * sous une tension de 60 KV et à un grossissement direct de 19000 à 34000.

L'acide phosphotungstique, opaque aux électrons, dessine en contraste les particules virales et révèle leur taille et leur structure ce qui permet d'identifier la famille ou le genre auxquels elles appartiennent. Les principaux critères d'identification des virions observés sont précisés dans les légendes de l'iconographie. Quand aucune structure virale n'a été observée après 20 minutes d'observation, l'examen est considéré comme négatif.

RESULTATS

Dans le groupe des 22 selles témoins provenant d'enfants hospitalisés pour des motifs divers, aucune structure virale n'a été mise en évidence.

Le tableau I rend compte des virus présents dans les selles diarrhéiques des enfants atteints de GEI-et les figures 1, 2, 3 et 4 illustrent les structures virales observées.

TABLEAU I

Virions observés en microscopie électronique dans les selles d'enfants âgés de moins de trois ans atteints de gastro-entérite.

* dont deux avec des Rotavirus.

** dont deux avec des Astrovirus.

Nombre de selles Diarrhéiques observées	riches en virus	Adéno	Astro	Corona	Rota
Hiver 77-78	47 18 (38%)	2	1	1	14 (29,9%)
Hiver 78-79	41 10 (24%)	2	4*	0	6** (14,6%)

Dans cinq selles, des Astrovirus ont été observés en grande abondance, deux fois il s'agissait de nourrissons âgés respectivement l'un de 6 jours, l'autre de 21 jours. Dans deux selles, des Rotavirus et des Astrovirus étaient présents conjointement.

* Nous remercions Monsieur le Professeur Flandrin de son hospitalité.

FIGURE 1

Astrovirus. Diam. 28 nm. Particule à contour circulaire sur laquelle superpose une étoile à 5 ou 6 branches à centre dense (ref. 23). GR 170 000. Barre = 100 nm.

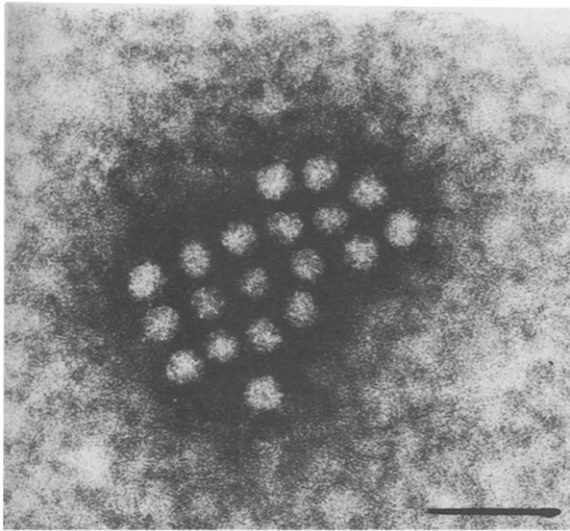


FIGURE 2

Adenovirus. Diam. 70 à 90 nm. Particule icosaédrique vue par une de ses faces. Les capsomères sont au nombre de 6 par arêtes et 6 par face. GR 170 000. Barre = 100 nm.

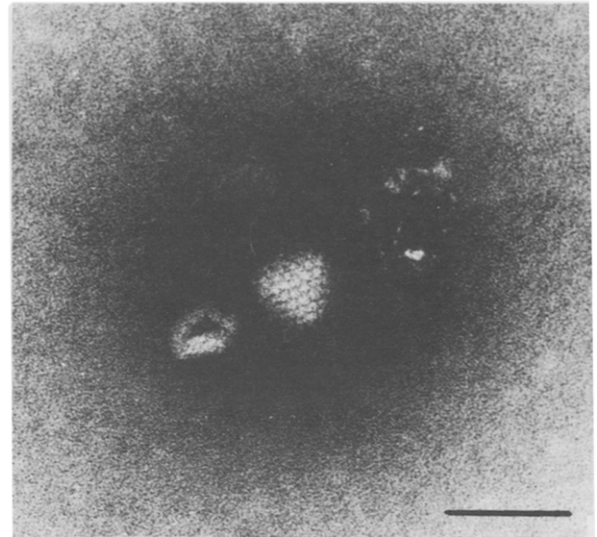


FIGURE 3

Coronavirus. Diam. 60 à 220 nm. Particule pléomorphe entourée d'une couronne de franges en voie de désorganisation. GR 170 000. Barre = 100 nm

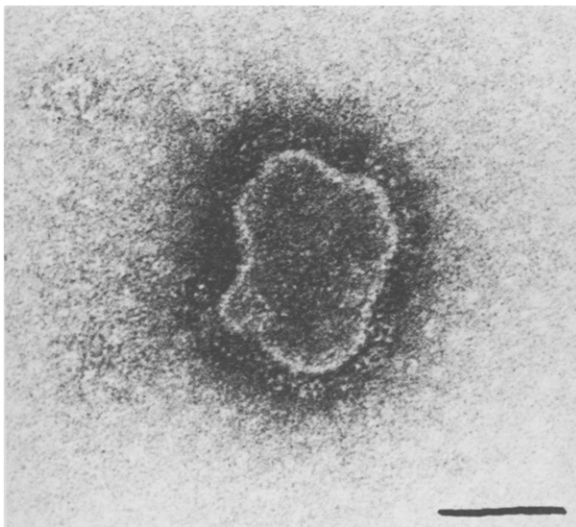
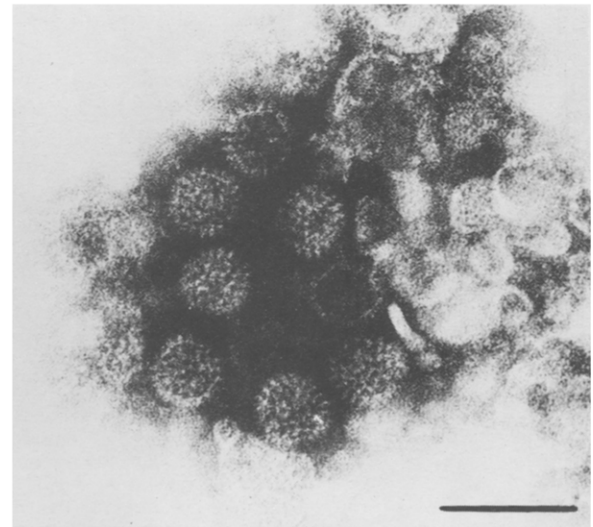


FIGURE 4

Rotavirus. Diam. 70 nm. Particules en forme de roue à moyeu central icosaédrique. La capsid externe lisse est absente ; les bords dentelés répondent à la capsid interne. GR 170 000. Barre = 100 nm.



DISCUSSION

La recherche de virus au microscope électronique est une technique peu sensible car le grossissement utilisé ne permet d'explorer qu'un faible volume : on sait qu'un titre de 1.10^6 virions par ml dans un échantillon est le titre minimum requis pour que l'observateur ait quelque chance de

voir un virion sur la totalité d'une grille porte-objet (7 mm^2). L'observation de nombreux virions sur une grille voire dans un champ microscopique est donc le signe d'une très grande densité virale dans les fécès et la conséquence probable de la multiplication des virions dans les cellules de la muqueuse intestinale. Cette technique simple, jumelée à la recherche des bactéries pathogènes dans les selles, est donc d'un grand intérêt dans le diagnostic des gastro-entérites ai-

guës car la rapidité de ses résultats pourrait contribuer à limiter la prescription d'antibiotiques inutiles voire nocifs par leur action sélective sur la flore intestinale. Cependant sa pratique est conditionnée par un investissement important. Certaines techniques immunoenzymatiques (ELISA) ou radioimmunologiques détectent avec une grande sensibilité la présence des antigènes de Rotavirus dans les selles (3). Elles ont de plus l'avantage d'explorer un grand nombre de selles en une journée. Mais l'examen en microscopie électronique est le seul qui permette la mise en évidence d'autres virus dont l'épidémiologie et le pouvoir pathogène sont encore mal connus. L'agencement en cristaux des parois bactériennes dégradées peut interférer avec la recherche des virions (9).

L'excrétion d'Adénovirus dans les selles est habituellement prouvée par leur isolement en cultures cellulaires mais la découverte, dans des extraits de selles examinés au microscope électronique, de très nombreux adénovirions non cultivables au cours de diarrhées épidémiques montre l'intérêt de cette recherche (10). Ces observations ont permis d'établir le rôle étiologique des adénovirus dans certaines gastro-entérites aiguës (10) (26) (32) et d'évoquer l'existence d'adénovirus appartenant à des sous-groupes jusqu'ici inconnus (14).

Les Astrovirus ont été observés pour la première fois en 1975 (2) (22) dans des selles de nourrissons atteints de gastro-entérite bénigne. Ces virus dont le pouvoir antigène a été démontré (1) (18) (20) semblent responsables d'épidémies de crèches mais ils ont été observés dans les selles de nouveau-nés asymptomatiques (11). La présence simultanée d'Astrovirus et de Rotavirus semble fréquente (18) (28).

Des Coronavirus ont été observés pour la première fois dans les selles de deux malades au cours d'une épidémie de gastro-entérite dans une collectivité d'adolescents (8). Divers auteurs ont confirmé leur présence dans les selles humaines (21) (25) (27) (28) (31) mais avec une égale fréquence qu'il y ait de la diarrhée ou non et malgré le rôle déterminant de Coronavirus dans les gastro-entérites transmissibles animales, leur pouvoir pathogène chez l'homme n'est pas démontré.

Nos observations confirment le rôle étiologique majeur des Rotavirus dans les GEI survenant pendant la période hivernale (7) (12) (13). Cependant le pourcentage de selles riches en Rotavirus est inférieur à celui qu'on rapporté certains auteurs qui, au cours d'épidémies, ont observé jusqu'à 78 % de selles positives (17). Il est possible que l'absence d'ultracentrifugation des extraits de selles tels que nous les préparons rende compte d'un moins grand nombre de résultats positifs. Cependant nos résultats sont comparables à ceux qui ont été obtenus à la même période dans d'autres régions de France (29) (19) sur des préparations ultracentrifugées. L'extraction au fréon (30) a l'avantage d'être simple et rapide et d'éliminer les structures provenant de la dégradation des membranes. L'épidémiologie des Rotavirus est encore mal connue ; on sait cependant que cette infection hivernale varie selon les années (16). Nous avons noté une fréquence plus grande des infections à Rotavirus au cours de l'hiver 77-78 que durant l'hiver 78-79 mais le nombre de cas étudiés est trop faible pour que la différence soit statistiquement significative.

SUMMARY

During two successive winters, faecal extracts from 110 children under 3 years of age were examined by electron microscopy with negative contrast. In a first group of 22 children hospitalised for various medical disorders, no virus particles were detected. In the second group of 88 children with acute gastroenteritis, we found viruses in 31,8 % of the faecal extracts, Rotavirus were detected in 22,7 % of the specimens and various particles (Adenovirus, Astrovirus, Coronavirus) in 9,1 % of the specimens.

Key-words :

Infantile gastroenteritis - Rotavirus - Astrovirus - Coronavirus - Electron microscope.

BIBLIOGRAPHIE

1. ASHLEY C.R., CAUL E.O., PAVER W.K. — Astrovirus associated gastroenteritis in children. *J. Clin. Path.*, 1978, 31, 939-943.
2. APPLETON H., HIGGINS S.G. — Viruses and gastroenteritis in infants. *Lancet*, 1975, 1, 1297.
3. BIRCH C.J., LEHMANN N.I., HAWKER A.J., MARSHALL J.A., GUST I.D. — Comparison of electron microscopy, enzyme-linked immunosorbent assay, solid phase radioimmunoassay and indirect immunofluorescence for detection of human rotavirus antigen in faeces. *J. Clin. Path.* 1979, 32, 700-705.
4. BISHOP R.F., DAVIDSOHN G.P., HOLMES I.H., RUCK B.J. — Detection of a new virus by electron microscopy of faecal extracts from children with acute gastroenteritis. *Lancet*, 1974, 1, 149-151.
5. BRENNER S., HORNE R.W. — A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochem. Biophys. Acta*, 1959, 34, 103-110.
6. BUFFET-JANVRESSE Cl., BARBOTIN J.N, MAGARD H. — L'examen des selles en microscopie électronique. Son intérêt pour le diagnostic de quelques infections virales. *Nouv. Presse Méd.*, 1973, 3, 2797-2800.
7. BUFFET-JANVRESSE Cl., BERNARD E., MAGARD H. — Responsabilité des Rotavirus dans les diarrhées du nourrisson. *Nouv. Presse Méd.*, 1976, 5, 1249-1251.
8. CAUL E.O., PAVER W.K., CLARKE S.K.R. — Coronavirus particles in faeces from patients with gastroenteritis. *Lancet*, 1975, 1, 1192.
9. DALEN A. — The presence in faecal extracts of bacterial cell wall components resembling viral structures. *Acta Path. Microb. Scand. Sect. B*, 1978, 86, 249-251.
10. FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H. — Virus particles in gastroenteritis. *Lancet*, 1973, 2, 1497.
11. FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H. — Diagnostic electron microscopy of faeces I. The viral flora of the faeces as seen by electron microscopy. *J. Clin. Path.*, 1974, 27, 603-608.
12. FLEWETT T.H., DAVIES H., BRYDEN A.S., ROBERTSON M.J. — Diagnostic electron microscopy of faeces II. Acute gastroenteritis associated with reovirus like particles. *J. Clin. Path.*, 1974, 27, 608-614.
13. FLEWETT T.H. — Electron microscopy in the diagnosis of infectious diarrhea. *J. Amer. Veter. Med. Assoc.*, 1978, 173, 538-543.
14. GARY G.W., HIERHOLZER J.C., BLACK R.E. — Characterization of non cultivable adenoviruses associated with diarrhea in infants : a new subgroup of human adenoviruses. *J. Clin. Microb.*, 1979, 10, 96-103.
15. KAPIKIAN A.Z., WYATT R.G., DOLIN R., THORNILL T.S., KALICA A.R., CHANOCK R.M. — Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious non bacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 1972, 10, 1075-1081.
16. KAPIKIAN A.Z., CLINE W.L., MEBUS C.A., WYATT R.G., KALICA A.R., JAMES H.D. Jr., VANKIRK D.H., CHANOCK R.M. — New complement fixation test for the human reovirus like agent of infantile gastroenteritis. Nebraska calf diarrhea virus used as antigen. *Lancet*, 1975, 1, 1056.
17. KAPIKIAN A.Z., KIM H.W., WYATT R.G., CLINE W.L., ARROKIO J.O., BRANDT C.D., RODRIGUEZ W.J., SACK D.A., CHANOCK R.M., PARROT R.H. — Human reovirus-like agent as the major pathogen associated with « winter gastroenteritis » in hospitalised infants and young children. *New Eng. J. Med.*, 1976, 294, 965-972.
18. KURTZ J.B., LEET W., PICKERING D. — Astrovirus associated gastroenteritis in a children's ward. *J. Clin. Path.*, 1977, 30, 948-952.
19. LAVERAN H., BOURGES M., PEIGUE H., MONGHAL M. BEYTOUT D. — Gastro-entérite aiguë infantile à Rotavirus. *Méd. Mal. Inf.*, 1978, 8, 4-8.
20. MAAS G., BAUMEISTER H.G., HERGEMOLLER R., JANSEN P., SCHUMACHER H. — Visualization by electron microscopy of 28 nm virus particles (Astrovirus) in faeces of newborns with acute non bacterial gastroenteritis. *Zbl. Bakt. Hyg. I Abt. Orig.*, 1978, A 242, 423-430.
21. MADELEY C.R., COSGROVE B.P. — Viruses in infantile gastroenteritis (letter). *Lancet*, 1975, 2, 124.
22. MADELEY C.R., COSGROVE B.P. — 28 nm particles in faeces in infantile gastroenteritis. *Lancet*, 1975, 6, 451.
23. MADELEY C.R. — Viruses in the stool. *J. Clin. Path.*, 1979, 32, 1-10.
24. MADELEY C.R. — Comparison of the features of Astroviruses and Caliciviruses seen in samples of faeces by electron microscopy. *J. Inf. Dis.*, 1979, 139, 519-523.
25. MATHAN M., MATHAN V., SWAMINATHAN S.P. — Pleomorphic virus like particles in human faeces. *Lancet*, 1975, 1, 1068.
26. MAVROMICHALIS J., EVANS N., Mc NEISH A.S., BRYDEN A.S., DAVIES H.A., FLEWETT T.H. — Intestinal damage in Rotavirus and Adenovirus gastroenteritis assessed by D xylose malabsorption. *Arch. Dis. Child.*, 1977, 52, 589-591.
27. MOORE B., LEE P., HEWISH M., DIXON B., MUKHERJEE T. — Coronaviruses in training center for intellectually retarded. *Lancet*, 1977, 1, 261.
28. PEIGUE H., BEYTOUT-MONGHAL M., LAVERAN H., BOURGES M. — Coronavirus et « astrovirus » observés dans les selles d'enfants atteints de gastro-entérites. *Ann. Microb. Inst. Pasteur*, 1978, 129, 3, 101-106.
29. POUGET M.M., DE MICCO P., TAMALET J. — Gastro-entérites aiguës infantiles à Rotavirus pendant la saison hivernale de 1978 à Marseille. *Méd. Mal. Inf.*, 1978, 8, 519-521.
30. ROSETO A., GONZALEZ J.P., EDLINGER E. — Rotavirus et gastro-entérite du nouveau-né. Premières observations. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 1977, 284, 2307-2308.
31. SCHNAGL R.D., HOLMES I.H., MACKAY-SCOLLAY E.M. — Coronavirus like particles in aboriginals and non aboriginals in western Australia. *Med. J. of Aust.*, 1978, 25, 307-309.
32. WHITELAW A., DAVIES H., PARRY J. — Electron microscopy of fatal adenovirus gastroenteritis. *Lancet*, 1977, 1, 361.