

COURTE NOTE

**ENQUÊTE SÉROLOGIQUE
PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE,
SUR LES INFECTIONS À CORONAVIRUS OC₄₃**

par **M. Chambon** ⁽¹⁾, **H. Laveran** ⁽²⁾, **R. L'Haridon** ⁽³⁾,
H. Peigue-Lafeuille ⁽⁴⁾, **M. Trimolet** ⁽⁴⁾ et **D. Beytout** ⁽²⁾

⁽¹⁾ *Service de Microbiologie, UER Pharmacie (Pr Joly),
Clermont-Ferrand,*

⁽²⁾ *Service d'Hygiène Hospitalière (Pr Beytout),
Clermont-Ferrand,*

⁽³⁾ *Service de Recherches de Virologie et d'Immunologie,
INRA, Thiverval-Grignon et*

⁽⁴⁾ *Service de Bactériologie Virologie (Pr Cluzel),
Faculté de Médecine, Clermont-Ferrand (France)*

SUMMARY

**SEROEPIDEMIOLOGIC SURVEY OF CORONAVIRUS (STRAIN OC₄₃) INFECTIONS
BY INDIRECT IMMUNOFLUORESCENCE**

Four-hundred seventy-two sera were examined by the indirect immunofluorescence test against coronavirus strain OC₄₃ adapted to the HRT₁₈ cell culture. Sera were from children and adults hospitalized over a 4-year period, from 1979 to 1982, at the CHRU of Clermont-Ferrand (France) for different clinical reasons. Of the 446 sera tested, 61 % showed antibodies against OC₄₃; 90 % of adult sera were positive. Coronavirus infections are very common in France. Immunity appears early in life, and infection is frequent in children from 12-36 months of age.

KEY-WORDS: Coronavirus, Immunofluorescence; Diagnosis, Sero-epidemiology.

INTRODUCTION

Les coronavirus constituent une famille de virus reconnus responsables d'affections respiratoires bénignes. Les premières études cliniques et épidémiologiques des années 60-70 ont été peu nombreuses en raison des difficultés de culture de ces virus. Depuis, l'adaptation de certaines souches à la culture cellulaire a permis d'avancer de façon considérable dans l'étude de leur structure fine, de leur biochimie et de leur pouvoir pathogène. Des coronavirus entéropathogènes ont été décrits chez l'animal [10] puis chez l'enfant [13, 14, 17] à l'occasion d'épidémies d'entérocolites.

La culture de ces virus sur des lignées cellulaires devenant possible, nous avons pu mettre au point une réaction immunologique reproductible: immunofluorescence indirecte (IFI) applicable au diagnostic sérologique des infections à coronavirus OC₄₃. Ce qui nous a permis de conduire la première enquête sur la fréquence de ces infections en France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) **Virus.** — Cette étude a porté sur une des souches de coronavirus respiratoires humaines: OC₄₃. Cette souche originaire des USA (n° V-360-001-022 du National Institute of Allergy and Infectious Diseases) adaptée sur cellules HRT18 dans notre laboratoire selon la technique de Laporte et coll. [6] et L'Haridon et coll. [7], a été utilisée au 25^e passage sur cellules.

2) **Sérums.** — Dans notre enquête, nous avons testé 472 sérums de notre sérothèque, choisis sur une période de 4 années, de 1979 à 1982; 443 sérums provenaient d'enfants hospitalisés dans les différents services de pédiatrie du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Clermont-Ferrand. Pour chaque année, 7 tranches d'âge ont été étudiées: 0-6 mois, 6-18 mois, 18 mois-3 ans, 3-4 ans, 4-6 ans, 6-10 ans et 10-15 ans. Nous avons complété l'enquête par une série de 29 sérums d'adultes hospitalisés au CHRU durant la même période. Dans le choix aléatoire des sérums, nous avons tenu compte uniquement de l'âge, et non du motif clinique d'hospitalisation, en n'ayant ni éliminé ni sélectionné les maladies respiratoires.

3) **Réaction d'IFI.** — Elle a été réalisée sur des plaques à 96 cupules à fond plat (Falcon), préparées avec une suspension de cellules HRT18 ajustée à 300.000 cellules/ml. Inoculées par la souche OC₄₃ en milieu RPMI à 2 % de sérum de foetus de veau, les cellules ont été fixées après 3 jours d'incubation. L'étalonnage est effectué à l'aide d'un sérum de lapin hyperimmun anti-OC₄₃; la révélation est obtenue à l'aide des conjugués fluorescents anti-IgG de lapin et anti IgG-humaines (Institut Pasteur Production). Pour chaque sérum humain, ont été testées 3 dilutions en tampon PBS: 1/20, 1/40 et 1/80. Le seuil de positivité a été fixé à 1/20 après étude de plusieurs séries de sérums humains. Les sérums positifs à 1/80 ont été repris pour la détermination de leur titre exact.

RÉSULTATS

Sur les 472 sérums testés, 288 présentent des anticorps anti-OC₄₃ en IFI, soit 61 %.

Le tableau I représente l'état immunitaire de la population en fonction de l'âge. Nous constatons que le pourcentage de sérums positifs augmente régulièrement avec l'âge, jusqu'à 90 % chez l'adulte. Les titres les plus élevés en anticorps sont retrouvés plus particulièrement chez les enfants de 18 mois à 3 ans, et chez les sujets adultes.

La distribution des résultats globaux pour chaque année est rapportée dans le tableau II. Nous remarquons de légères variations du pourcentage de positivité selon les années.

TABLEAU I. — Etat immunitaire de la population en fonction de l'âge.

| | Nb de cas testés | Total des cas positifs | | Total des cas positifs de titre \geq 1/80 | |
|---------------|------------------|------------------------|----|---|----|
| | | Nb | % | Nb | % |
| 0-6 mois | 56 | 29 | 52 | 8 | 14 |
| 6-18 mois | 114 | 46 | 40 | 9 | 8 |
| 18 mois-3 ans | 107 | 65 | 61 | 27 | 25 |
| 3-4 ans | 40 | 26 | 65 | 4 | 10 |
| 4-6 ans | 52 | 39 | 75 | 11 | 21 |
| 6-10 ans | 48 | 36 | 75 | 11 | 23 |
| 10-15 ans | 26 | 21 | 81 | 8 | 31 |
| Adultes | 29 | 26 | 90 | 17 | 59 |
| Total | 472 | 288 | 61 | 95 | 20 |

TABLEAU II. — Distribution des cas positifs selon l'année.

| | Nb de cas testés | Nb de cas positifs | % de cas positifs |
|------|------------------|--------------------|-------------------|
| 1979 | 115 | 73 | 63,4 |
| 1980 | 92 | 47 | 51 |
| 1981 | 109 | 71 | 65,1 |
| 1982 | 127 | 71 | 55,9 |

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les études épidémiologiques sur les infections respiratoires humaines à coronavirus OC₄₃ et 229E ont été réalisées pour la plupart aux USA dans les années 70. Toutes ces enquêtes montrent la grande fréquence de ces infections dans la population. Les profils épidémiologiques des deux souches OC₄₃ et 229E sont superposables, bien qu'il n'y ait pas de réactions croisées entre les deux virus [9]. De symptomatologie clinique voisine (rhumes, toux, pharyngites) ces infections surviennent avec une incidence saisonnière plus élevée en hiver et au début du printemps, bien qu'il y ait de petites épidémies, en particulier l'été [16].

Fréquence des infections. — Parmi les sérums testés, 61 % possèdent des anticorps décelables en IFI. Ce pourcentage élevé montre que les infections à OC₄₃ sont également très communes en France, avec 90 % des sujets adultes positifs. Ces pourcentages sont en accord avec ceux trouvés en Finlande [15], aux USA [2, 5] ainsi qu'en Grande-Bretagne [1]. Par contre, certains auteurs obtiennent des résultats plus faibles. Ces différences apparaissent liées à la sensibilité de la technique utilisée : inhibition de l'hémagglutination [3], ELISA [15] ou IFI [11].

Evolution de l'immunisation en fonction de l'âge. — Les résultats montrent que les anticorps apparaissent très tôt dans la vie : 52 % des nouveau-nés de 0 à 6 mois possèdent des anticorps anti-OC₄₃, ce qui correspond probablement aux anticorps maternels transmis puisque ce pourcentage diminue après 6 mois. Après cette légère chute, le nombre de cas positifs augmente régulièrement avec l'âge. On peut donc supposer que les réinfections sont nombreuses, entraînant des phénomènes de rappel. L'activité du virus apparaît importante chez les enfants de 18 mois à 3 ans. Ce que confirme les nombres de sérums de titre 1/80 dans ces tranches d'âge (avec des sérums positifs à 1/1280). Il serait bon de confirmer ces hypothèses avec des séries de sérums des mêmes individus suivis plusieurs années, comme l'ont fait certaines équipes [2, 3, 11].

Distribution des cas positifs selon l'année (tableau II). — Nous pouvons remarquer, bien que la durée étudiée soit courte, une apparente recrudescence cyclique. La différence observée n'est pas significative ($\chi^2 = 5,547$ et $0,20 < \alpha < 0,10$). Toutefois si on regroupe les années paires et les années impaires, on trouve une différence nettement significative : $\chi^2 = 4,96$ et $\alpha 0,05$, ce qui est en faveur d'une recrudescence bisannuelle des infections à OC₄₃. Nous pouvons supposer que les nombreuses infections de la première année maintiennent une immunité de masse, suffisante pour que le taux d'infections de l'année suivante soit plus bas. Les études épidémiologiques faites aux USA, en Grande-Bretagne, montrent également une recrudescence apparente de l'activité des coronavirus pendant certaines années : pics d'infections à 229E et OC₄₃ en 1966 [11] et en 1968 [1, 11], et à 229E en 1970 [2]. L'équipe de Kaye et Dowdle [5] a remarqué aussi une fréquence cyclique des infections à 229E et OC₄₃ parmi la même population, entre 1960 et 1968.

En conclusion, et comme toutes les autres enquêtes épidémiologiques sur les coronavirus respiratoires, notre étude montre que le virus OC₄₃ est un virus hyperendémique qui atteint les enfants en bas âge. Notre but est de poursuivre cette enquête en particulier chez les enfants de 12 à 36 mois, pour rechercher les séroconversions et étudier la clinique correspondante; cela permettrait de mieux cerner le pouvoir pathogène réel de ces virus, leur participation éventuelle à des pathologies respiratoires basses sévères chez le jeune enfant [8] et leur rôle en pathologie digestive que suggère la découverte des particules dites «corona-like» dans les selles d'enfants diarrhéiques [10, 13, 14]. La mise au point d'une technique sérologique plus maniable en routine que l'IFI, comme par exemple une méthode immunoenzymatique, ainsi que la mise au point d'une technique de recherche des IgM, pourraient nous permettre d'atteindre nos objectifs.

MOTS-CLÉS: Coronavirus, Immunofluorescence; Diagnostic, Séro-épidémiologie.

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de l'aide financière de l'INSERM (contrat n° 801.005).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRADBURNE, A.F. & SOMERSET, B.A., Coronavirus antibody titres in sera of healthy adults and experimentally infected volunteers. *J. Hyg. (Camb.)*, 1972, **70**, 235-245.
- [2] HENDLEY, J.O., FISHBURNE, H.B. & GWALTNEY, J.M., Coronavirus infections in working adults: eight-year study with 229E and OC₄₃. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 1972, **105**, 805-811.
- [3] KAYE, H.S., MARSH, H.B. & DOWDLE, W.R., Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain OC₄₃) related infections in a children's population. *Amer. J. Epidemiol.*, 1971, **94**, 43-49.
- [4] KAYE, H.S. & DOWDLE, W.R., Seroepidemiologic survey of coronavirus (strain 229E) infections in a population of children. *Amer. J. Epidemiol.*, 1975, **101**, 238-244.
- [5] KAYE, H.S., YARBROUGH, W.B., REED, C.J. & HARRISON, A.K., Antigenic relationship between human coronavirus strain OC₄₃ and hemagglutinating encephalomyelitis virus strain 67N of swine: antibody responses in human and animal sera. *J. infect. Dis.*, 1977, **135**, 201-209.
- [6] LAPORTE, J., BOBULESCO, P. & ROSSI, F., Une lignée cellulaire particulièrement sensible à la réplication du coronavirus entérique bovin: les cellules HRT18. *C.R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1980, **290**, 869-872.
- [7] L'HARIDON, R., SCHERRER, R., VAUTHEROT, J.F., LA BONNARDIÈRE, C., LAPORTE, J. & COHEN, J., Adaptation d'un isolement de coronavirus entérique bovin à la culture cellulaire et caractérisation de la souche obtenue. *Ann. Rech. Vet.*, 1981, **12**, 243-251.
- [8] McINTOSH, K., KAPIKIAN, A.Z., TURNER, H.C., HARTLEY, J.W., PARROTT, R.H. & CHANOCK, R.M., Seroepidemiologic studies of coronavirus infection in adults and children. *Amer. J. Epidemiol.*, 1970, **91**, 585-592.

- [9] McNAUGHTON, M.R., MADGE, M.H. & REED, S.E., Two antigenic group of human coronaviruses detected by using enzyme-linked immunosorbent assay. *Infect. Immun.*, 1981, **33**, 734-737.
- [10] MEBUS, C.A., STAIR, E.L., RHODES, M.B. & TWIEHAUS, M.J., Neonatal calf diarrhea propagation, attenuation and characteristics of a coronavirus-like agent. *Amer. J. vet. Res.*, 1973, **34**, 145-150.
- [11] MONTO, A.S. & LIM, S.K., The Tecumseh study of respiratory illness. — VI. Frequency of an relationship between outbreak of coronavirus infection. *J. infect. Dis.*, 1974, **129**, 271-276.
- [12] MONTO, A.S. & RHODES, L.M., Detection of coronavirus infection of man by immunofluorescence. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, 1977, **155**, 143-148.
- [13] MOSCOVICI, O., CHANY, C., LEBON, P., ROUSSET, S. & LAPORTE, J., Association d'infection à coronavirus avec l'entérite hémorragique du nouveau-né. *C.R. Acad. Sci. (Paris) (Sér. D)*, 1980, **290**, 869-872.
- [14] PEIGUE, H., BEYTOUT-MONGHAL, M., LAVERAN, H. & BOURGES, M., Coronavirus et astrovirus observés dans les selles d'enfants atteints de gastroentérites. *Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur)*, 1978, **129 B**, 101-106.
- [15] RISKI, H. & ESTOLA, T., Occurrence of antibodies to human coronavirus OC₄₃ in Finland. *Scand. J. infect. Dis.*, 1974, **6**, 325-327.
- [16] SHMIDT, O.W., ALLAN, I.D., COONEY, M.K., FOY, H.M. & FOX, J.P., Rises in titers of antibody to human coronaviruses OC₄₃ and 229E in Seattle families during 1975-1979. *Amer. J. Epidemiol.*, 1986, **123**, 862-868.
- [17] VAUCHER, Y.E., RAY, C.G., MINNICH, L.L., PAYNE, C.M., BECK, D. & LOWE, P., Pleomorphic, envelopped, virus-like particles associated with gastrointestinal illness in neonates. *J. infect. Dis.*, 1982, **45**, 27-36.