

Diagnostic des entérovirus non *Poliovirus* à Abidjan de 1996 à 2004.

S. Akré, C. Akoua-Koffi, E. Sindiane, L. Tieoulou, E. Adjogoua, H. Kadjo & M. Dosso

Unité des virus du système nerveux, Département des virus épidémiques, Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, BP 490 Abidjan 01, Côte d'Ivoire. E-mail : akouamc@yahoo.fr

Manuscrit n° 3214. "Virologie". Reçu le 3 janvier 2008. Accepté le 18 mars 2008.

Summary: *Diagnosis of non Poliovirus enteroviruses in Abidjan from 1996 to 2004.*

Non Poliovirus enteroviruses (NPEV) are infectious agents which can determine various infections. They are more and more isolated within the context of the surveillance of acute flaccid paralysis (AFP) and raise a problem of antigenic identification. In Côte d'Ivoire the serotypes of NPEV circulating are unknown.

In order to determine the epidemiological and virology characteristics of human (NPEV) stemming from virology investigations from 1996 to 2004, enteroviruses strains isolated from stools and from cerebrospinal fluid have been analysed. The biological products have been tested according to the procedures recommended by the World Health Organisation (WHO) within the context of the virology surveillance of acute flaccid paralysis and the antigenic identification by seroneutralization and serotyping has been done. Out of 1,444 isolates obtained from 1,0187 specimens, 637 were Poliovirus strains and 807 NPEV strains (7.9%). Among them 16.3% have been isolated during carrier studies and 83.7% were associated with cases of AFP. Out of the 807 strains of NPEV, 218 strains have been tested by serotyping and the serotype of 77 strains (35.32%) has been determined: Coxsackievirus B (41.6%) and different serotypes of Echovirus (58.4%). The proportion of untypable strains (62.3%) confirms the difficulties to identify NPEV with the conventional available reagents. The molecular diagnosis is becoming necessary in order to establish a list of the serotypes of NPEV circulating and associated with clinical features in the country.

Résumé :

Les entérovirus non poliovirus sont des agents infectieux qui peuvent déterminer des infections variées. Ils sont de plus en plus isolés dans le cadre de la surveillance des paralysies flasques aiguës (PFA) et posent un problème d'identification antigénique. En Côte d'Ivoire, les sérotypes des entérovirus non Poliovirus (EVNP) circulants sont mal connus. Afin de déterminer les caractéristiques épidémiologiques et virologiques des EVNP issus des investigations virologiques de 1996 à 2004, des souches d'entérovirus isolés à partir de selles et de liquide céphalo-rachidien ont été analysées. Les produits biologiques ont été traités suivant les procédures préconisées par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) dans le cadre la surveillance virologique des PFA, et l'identification antigénique a été réalisée par séroneutralisation. Sur 1 444 isolats obtenus à partir de 10 187 échantillons, 637 étaient des Poliovirus et 807 des souches d'EVNP, soit 7,9 %. Parmi elles, 16,3 % ont été isolées au cours des études de portage et 83,7 % associées à des cas de PFA. Des 807 souches d'EVNP, 218 souches ont fait l'objet de sérotypage et le sérotype de 77 souches (35,3 %) a pu être déterminé : Coxsackievirus B (41,6 %) et Echovirus de différents sérotypes (58,4 %). La proportion de souches non-typables (62,3 %) confirme les difficultés d'identification des ENPV avec les réactifs disponibles. Le diagnostic moléculaire devient nécessaire afin de répertorier les sérotypes d'EVNP circulant et associés à des manifestations cliniques dans le pays.

Introduction

Les entérovirus humains (*Poliovirus*, *Coxsackievirus* A et B, *Echovirus* et entérovirus 68 à 71) se répartissent actuellement en 4 espèces : entérovirus humains A (12 sérotypes : 11 *Coxsackievirus* A et entérovirus 71), entérovirus humains B (36 sérotypes : 6 *Coxsackievirus* B, *Coxsackievirus* A9, entérovirus 69), entérovirus humains C (14 sérotypes : *Poliovirus*, 3 sérotypes et 11 *Coxsackievirus* A), entérovirus humains D (2 sérotypes : entérovirus 68 et 70) (19). Cette nouvelle classification a été possible grâce aux critères génomiques basés sur l'analyse de fragments géniques identifiés. Les tests sérologiques impliquant les pools d'immuns sérums anti-entérovirus (10, 21) ont montré leur limite, comme en témoignent le nom-

bre élevé de souches d'entérovirus non *Poliovirus* (ENPV) non-typables qui résultent de cette identification antigénique (7, 11, 19, 20). Cependant ces virus peuvent déterminer des infections asymptomatiques et des manifestations cliniques multifformes et de pronostic variable selon le sérotype en cause (3, 6, 9, 18). Transmis par voie orale, ils déterminent une primo-infection précoce, particulièrement lorsque les conditions d'hygiène sont insuffisantes (6). La surveillance et la disparition des *Poliovirus* dans le cadre du Programme mondial d'éradication de la poliomyélite donnent un regain d'intérêt aux ENPV qui sont de plus en plus isolés. Dans notre laboratoire les ENPV sont régulièrement isolés à partir des prélèvements de selles de cas de paralysie flasque aiguë (PFA) investigués ou lors des enquêtes de portage de *Poliovirus* (8).

**Non Poliovirus Enteroviruses
Serotypes
Untypable enteroviruses
Abidjan
Côte d'Ivoire
Sub Saharan Africa**

**Entérovirus non Poliovirus
Sérotypes
entérovirus non-typables
Abidjan
Côte d'Ivoire
Afrique intertropicale**

Tableau I.

Répartition des isolats suivant l'année. Distribution of isolates according to the year.			
année	nb d'échantillons	Poliovirus +	ENPV +
1996	424	5	17
1997	297	15	34
1998	601	37	07
1999	965	60	07
2000	1335	52	56
2001	1980	164	115
2002	2239	55	285
2003	1111	34	132
2004	1235	215	154
total	10 187	637	807

Afin de déterminer la proportion et les sérotypes des ENPV circulant, nous nous sommes proposé d'analyser les données issues des investigations virologiques dans notre laboratoire au cours de la confirmation de cas suspects de poliomyélite et des études de portage de *Poliovirus* de 1996 à 2004.

Matériel et méthodes

Type d'étude

Il s'agit d'une étude historique des souches d'entérovirus isolées de 1996 à 2004 dans le laboratoire inter pays de référence OMS pour la poliomyélite ou laboratoire polio, à l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire.

Matériel

De 1996 à 2004, 10 187 produits biologiques, dont 10 098 échantillons de selles provenant de sujets atteints de PFA ou des enquêtes de portage de *Poliovirus* chez des enfants de 0 à 15 ans, et 87 échantillons de liquide céphalo-rachidien lymphocytaire recueillis chez des patients des services de neurologie, ont été adressés au laboratoire. Les produits biologiques étaient accompagnés pour chaque cas d'une fiche qui a permis d'obtenir les renseignements démographiques, épidémiologiques et cliniques.

Méthodes

Les échantillons ont été traités et inoculés sur les lignées cellulaires recommandées suivant les procédures préconisées par l'OMS dans le cadre la surveillance virologique des PFA : isolement viral sur lignées cellulaires RD et HEp-2c, puis RD et L20B ; identification des sérotypes des *Poliovirus* et entérovirus non *Poliovirus* (typage polio et d'entérovirus non polio) par le test de séroneutralisation utilisant les pools d'immuns sérums fournis par le *National Institute of Public Health and the Environment* (kit RIVM) (2). Les souches de *Poliovirus* identifiées ont été référées pour différenciation intratypique par méthode moléculaire et méthode antigénique aux laboratoires régionaux de référence OMS pour la poliomyélite à l'Institut Pasteur de Bangui (1996-1999) et au *National Institute for Communicable Diseases de Johannesburg* (2000-2006).

Analyse statistique : l'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel Epi/Info version 2002. Les tests statistiques de comparaison, test χ^2 et test exact de Fisher lorsque les effectifs sont inférieurs, ont été utilisés au seuil alpha 0,05.

Résultats

À partir des 10 187 échantillons traités, 1 444 (14,2 %) souches d'entérovirus ont été isolées, parmi lesquelles 637 (44,1 %) souches de *Poliovirus* et 807 souches d'ENPV (55,9 %) (tableau I). Parmi ces souches d'ENPV, 2,8 % ont été isolées de LCR et 97,2 % de selles, dont 83,7 % des ENPV provenaient des selles de sujets atteints de PFA et 16,3 % de sujets sains. Les ENPV ont été isolés régulièrement à des taux variables suivant l'année et le mois et les différences observées étaient statistiquement significatives ($p < 0,01$) (tableau II et III). La moyenne d'âge des sujets était de 3 ans 6 mois, avec des extrêmes de 1 mois et 15 ans. Plus de 90 % avaient moins de 15 ans, dont 69 % ayant un âge compris entre 1 et 4 ans (tableau III). Ces isolats d'ENPV ont été obtenus sur lignées cellulaires RD (34%), HEp-2c (53,5 %) et sur les deux lignées (12,5 %). Parmi les 807 souches d'ENPV, 218 ont fait l'objet de sérotypage, cependant seules 77 souches (35,3 %) ont pu être identifiées (41,6 % de *Coxsackievirus* B et 58,4 % d'*Echovirus*) contre 141 souches non-typables (64,7 %) comme indiqué dans le tableau II. Ces souches non-typables provenaient de cas de PFA dans 43,3 % des cas, de portage dans 54,6 % des cas et de syndromes méningés dans 2,1 % des cas. Différents sérotypes d'*Echovirus* ont pu être identifiés : E7 (9 souches), E33 (7 souches), E11 (6 souches), E21 (4 souches) majoritairement (tableau III). Les sérotypes des *Coxsackievirus* B sont en cours de détermination par séroneutralisation et par biologie moléculaire.

Au niveau du LCR, les ENPV identifiés étaient des souches d'*Echovirus* 33 et *Coxsackievirus* B.

Discussion

Les entérovirus non *Poliovirus* sont fréquemment isolés lors des investigations de cas de PFA ou d'enquête de portage dans le cadre de la surveillance virologique des *Poliovirus*, dans le contexte d'éradication mondiale de la poliomyélite. Au cours de ces 8 années, le taux global d'isolement était de 8 %, taux statistiquement proche de celui obtenu par GERSHY-DAMET *et al.* lors des études de portage réalisées en Côte d'Ivoire (1, 8). Ces taux pourraient suggérer un niveau de circulation faible, bien que continu tout au long de l'année, mais, depuis 1997, la majorité des échantillons de selles analysés (80 %) provenaient d'autres pays dans le cadre de la surveillance virologique des PFA.

La grande majorité des ENPV a été isolé des cas suspects de PFA (80,8 %), confirmant ainsi l'association ENPV et tableaux paralytiques. Ces ENPV devaient être identifiés pour une meilleure connaissance des sérotypes associés aux PFA.

Tableau II.

Répartition des isolats ENPV en fonction du mois de collecte des selles. Distribution of the NPEV isolates according to the month of the stools collection.										
mois de collecte	année (nb d'échantillons)									
	1996 (n = 424)	1997 (n = 297)	1998 (n = 601)	1999 (n = 965)	2000 (n = 1335)	2001 (n = 1980)	2002 (n = 2239)	2003 (n = 1111)	2004 (n = 1235)	total (n = 10187)
janvier	0	0	0	0	5	16	4	9	8	42
février	0	0	0	0	2	25	9	9	13	58
mars	0	0	0	0	6	14	9	13	12	54
avril	0	0	0	0	1	3	10	18	19	51
mai	4	1	0	0	0	5	41	10	21	82
juin	3	4	0	1	0	3	30	12	13	66
juillet	8	3	0	1	4	3	26	9	17	71
août	2	10	1	0	0	12	44	13	7	89
septembre	0	2	2	0	0	1	20	6	14	45
octobre	0	0	1	0	0	3	42	6	13	65
novembre	0	1	0	4	9	10	31	14	15	84
décembre	0	13	3	1	29	20	20	13	1	100
total	17	34	7	7	56	115	285	132	154	807

Tableau III.

Caractéristiques épidémiologiques et virologiques des souches d'ENPV isolées.
Epidemiological and virological characteristics of the isolated NPEV strains.

	ENPV caractérisés (n = 218)		ENPV non caractérisés (n = 589)
	typables (n = 77)	non-typables (n = 141)	
année			
1996	17	0	0
1997	3	3	28
1998	2	0	5
1999	2	0	5
2000	21	2	33
2001	5	2	108
2002	13	97	175
2003	13	28	91
2004	1	9	144
âge des sujets			
0 – 11 mois	14	11	25
1 – 4 ans	45	97	415
5 – 15 ans	18	17	147
> 15 ans	0	16	2
origine			
PFA	50	61	541
portage	25	77	30
syndrome méningé	2	3	18
produits biologiques			
selles	75	138	571
LCR	2	3	18
lignées cellulaires			
RD	45	40	138
Hep2-c	32	101	373
RD + HEp2-c	0	0	78

Tableau IV.

Répartition des sérotypes identifiés en fonction des signes cliniques.
Distribution of identified serotypes according to clinical features.

sérotypes n = 77	PFA n = 50	portage n = 25	syndrome méningé n = 2
Echovirus (n = 45)			
E 7 (n = 9)	4	5	
E 33 (n = 7)	3	3	1
E 11 (n = 6)	5	1	
E 21 (n = 4)	2	2	
E 29 (n = 3)	1	2	
E 20 (n = 3)	3	0	
E 12 (n = 3)	3	0	
E 3 (n = 3)	0	3	
E 30 (n = 2)	1	1	
E 6 (n = 2)	1	1	
E 25 (n = 1)	1	0	
E 14 (n = 1)	1	0	
E 4 (n = 1)	1	0	
Coxsackievirus B (n=32)	24	7	1

Le taux de portage obtenu (16,4 %) est le reflet de conditions d'hygiène défectueuses, étant donné que les ENPV font partie des agents infectieux liés aux maladies hydriques à transmission féco-orale. D'où l'importance de la surveillance de la circulation des ENPV dans la population, dans un contexte de veille microbiologique comme cela est pratiqué dans certains pays d'Europe, d'Amérique du Nord et d'Asie (4, 13, 17).

Par rapport aux lignées cellulaires, de manière globale 53,5 % des ENPV ont été isolés sur cellules HEp-2c, cellules sur lesquelles ont été obtenues toutes les souches de *Coxsackievirus B* et 63,4% des souches non-typables. Les cellules HEp-2c se sont révélées être un bon support pour l'isolement des ENPV dans notre contexte.

La méthode d'identification conventionnelle, notamment le test de séroneutralisation ou typage d'entérovirus non *Poliovirus* utilisant les pools d'immuns sérums n'a permis d'identifier que 35 % des isolats testés (77/218). Les immuns sérums ne semblent pas prendre en compte les nouveaux entérovirus découverts ces dernières années qui se révèlent non-typables (15). Cela a été illustré par deux nouveaux sérotypes non-typables isolés dans le laboratoire et qui ont pu être caractérisés par OBERSTE *et al.* comme entérovirus 84 (EV84) et entérovirus 101 (EV101) grâce aux techniques moléculaires

(16). Ainsi l'identification des entérovirus constitue un véritable problème diagnostique si l'on ne dispose pas d'un plateau technique offrant des outils de génotypage : RT-PCR suivi de séquençage dans des régions génomiques ciblées comme la région VP1 ou mieux le séquençage complet du génome comme développé par d'autres auteurs comme CARO *et al.*, OBERSTE *et al.* (5, 10, 15). Ces dernières années, grâce aux méthodes moléculaires de nouveaux ENPV ont été identifiés et certains anciens sérotypes ont pu être reclassés, aboutissant au remaniement actuel des entérovirus et même un bouleversement dans la famille des Picornaviridae (3, 18). Il est à envisager d'associer à l'isolement viral la détection du génome viral, soit directement à partir du produit biologique, soit à partir des surnageants de culture après lyse cellulaire.

Au cours de notre étude il a été identifié une grande variété de sérotypes d'*Echovirus* (tableau IV). Certaines souches sont le fait de portage (E3), d'autres ont été isolées de cas de PFA et de portage (E7, E11, E33) ou de PFA uniquement (E4, E12, E20, E25). Il a été rapporté par JUNTILA *et al.* en République démocratique du Congo des cas de PFA, associés à des entérovirus EV-93 et EV-94 qui avaient été identifiés par RT-PCR suivi de séquençage car non-typables par la méthode conventionnelle (10). L'identification moléculaire des ENPV isolés devient indispensable, car il importe de connaître les sérotypes associés aux tableaux cliniques neurologiques (méningites, encéphalites et méningo-encéphalites), et aux éruptions cutanées fébriles de l'enfant qui peuvent être confondues avec la rougeole dans un contexte de contrôle et d'élimination de la rougeole. En effet lors des tests de confirmation de cas suspects de rougeole, les cas non confirmés et non rubéoleux restent sans étiologie et pourraient être rattachés aux entérovirus ENPV, comme rapporté dans la littérature (6).

Mais la surveillance de la circulation des entérovirus ne saurait se limiter à la seule surveillance de la circulation interhumaine et devrait inclure la surveillance des entérovirus de l'environnement (14).

Conclusion

Cette étude a mis en évidence la circulation d'un nombre important d'entérovirus non *Poliovirus* et non-typables. Pour le diagnostic, l'utilisation de techniques moléculaires ciblant certaines régions du génome et l'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques permettront d'identifier de nouveaux sérotypes tout en assurant une caractérisation des souches non-typables. Les tests moléculaires permettront aussi, par la détermination des souches recombinantes, d'expliquer l'évolution génétique des souches d'ENPV isolées en Côte d'Ivoire.

Références bibliographiques

- AKOYA-KOFFI GC, NEKOURESSI G, TIEOULOU L, GUILLOT S, FAYE-KETTE H *et al.* – Circulation de *Poliovirus* en milieu rural, cas du district sanitaire d'Adzopé, Côte d'Ivoire. *Bull Soc Pathol Exot*, 2004, 97, 87-90. [http://www.pathexo.fr/pages/bull-somm/2004-T97/2004-2.html]
- ANONYME – *Polio Laboratory Manual*. Departement of Vaccines and Biologicals, WHO, Geneva, 2001.
- AVELLON A, CASAS I, TRALLERO G, PEREZ C, TENORIO A & PALACIOS G – Molecular analysis of *Echovirus 13* isolates and aseptic meningitis, Spain. *Emerg Infect Dis*, 2003, 9, 934-941.
- BAHRI O, REZIG D, BEN NEJMA-OUESLATI B, BEN YAHIA A, BEN SASSI J *et al.* – Enteroviruses in Tunisia: virological sur-

- veillance over 12 years (1992-2003). *J Med Microbiol*, 2005, **54**, 63-69.
5. CARO V, GUILLOT S, DELPEYROUX F & CRAINIC R – Molecular strategy for serotyping of human enteroviruses. *J of Gen Virology*, 2001, **82**, 79-91.
 6. CRAINIC R & NICOLAS JC – *Infections virales du système nerveux central (SNC)*. Collection biologie médicale – virologie médicale. Ed. EM inter Paris, 1993, 301-316.
 7. DELPEYROUX F, GUILLOT S, ZENDROL S, BALANANT J, CARO V *et al.* – Campagnes intensives de vaccination avec le vaccin polio oral : quelles répercussions sur le monde des entérovirus? Veille microbiologique et émergences : aspects moléculaires, environnementaux et technologiques. *Bull Soc Pathol Exot*, 2000, **93**, 193-193. [<http://www.pathexo.fr/pages/bull-somm/2000-T93/2000-3.html>]
 8. GERSHY-DAMET GM, SANGARE GA, PENALI KL, AFFIAN K & ABLOH A – Prévalence du virus de la poliomyélite dans les communes d'Abidjan. *Med Afr Noire*, 1986, **33**, 873-875.
 9. GRIST NR, BELL EJ & REID D – The epidemiology of enteroviruses. *Scott Med J*, 1975, **20**, 27-31.
 10. JUNTILA N, LEVEQUE N, KABUE JP, CARTET G, MUSHIYA F *et al.* – New enteroviruses, EV-93 and EV-94, associated with acute flaccid paralysis in the Democratic Republic of the Congo. *J Med Virol*, 2007, **79**, 393-400.
 11. KUBO H, IRITANI N & SETO Y – Molecular classification of enteroviruses not identified by neutralization tests. *Emerg Infect Dis*, 2002, **8**, 298-304.
 12. LIM KA & BENYESH-MELNICK M – Typing of viruses by combination of antiserum pools. Application to typing of enteroviruses (Coxsackievirus and EHO). *J Immunol*, 1960, **84**, 309-317.
 13. MANKI A, ODA M & SEINO Y – Neurologic diseases of enterovirus infections: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and enteroviruses type 68-72. *Nippon Rinsho*, 1997, **54**, 849-854.
 14. MANOR Y, HANDSHER R, HALMUT T, NEUMAN M, BOBROV A *et al.* – Detection of *Poliovirus* circulation by environmental surveillance in the absence of clinical cases in Israel and the Palestinian Authority. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 1670-1675.
 15. OBERSTE SM, MAHER K, KENNETT ML, CAMPBELL JJ, CARPENTER MS *et al.* – Molecular epidemiology and genetic diversity of *Echovirus* type 30 (E30): genotypes correlate with temporal dynamics of E30 isolation. *J Clin Microbiol*, 1999, **37**, 3928-3933.
 16. OBERSTE MS, MAHER K, NIX WA, MICHELE SM, UDDIN M *et al.* – Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species human Enterovirus B. *Virus Res*, 2007, **128**, 34-42.
 17. PATTI AM, SANTI AL, FIORE L, VELLUCHI L, DE STEFANO D *et al.* – Enterovirus surveillance of Italian healthy children. *Eur J Epidemiology*, 2000, **16**, 1035-1038.
 18. POZZETTO B & BOURLET T – The latest on enteroviruses in human pathology. *Ann Biol Clin*, 1997, **55**, 183-188.
 19. POYRY T, KINNUNEN L, HYYPIA T, BROWN B, HORSNELL C *et al.* – Genetic and phylogenetic clustering of enteroviruses. *J gen virol*, 1996, **77**, 1699-1717.
 20. RAKOTO-ANDRIANARIVELO M, ROUSSET D, RAZAFINDRATSIMANDRESY R & DELPEYROUX D – Nouvelle méthode de typage moléculaire des *Entérovirus* humains : caractérisation des souches malgaches "non serotypables". *Arch Inst Past Madagascar*, 2002, **68**, 55-58.
 21. RIGONAN AS, MANN L & CHONMAITREE T – Use of monoclonal antibodies to identify serotypes of Enterovirus isolates. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 1877-1881.