

Circulation des poliovirus dans les zones d'endémie chez les enfants vaccinés par le vaccin polio oral.

I. Gouandjika (1), M. Rakoto Andrianarivelo (2), C. Akoua-Koffi (3),
H. Zeller° (2), A. Ehouman (3) & J.-M. Morvan (4)

(1) Centre régional OMS de référence pour la poliomyélite en Afrique, Institut Pasteur de Bangui.

(2) Institut Pasteur de Madagascar

(3) Institut Pasteur de Côte d'Ivoire

(4) Directeur de l'Institut Pasteur de Bangui, BP 923, Bangui, République centrafricaine.

° actuellement : CNR Arbovirus, Institut Pasteur, 28 rue du Docteur Roux, 75724 Paris cedex 15, France.

Manuscrit n° 2155/RIP8. 3e colloque du réseau international des Instituts Pasteur et instituts associés. 14-15 octobre 1999, Institut Pasteur de Paris.

Summary: Poliovirus circulation in oral polio-vaccine (OPV) vaccinated children living in endemic areas.

Strategies aiming to eradicate the poliovirus and poliomyelitis seek primarily to eliminate wild strains associated with the disease, by means of world wide vaccination campaigns using the oral attenuated vaccine (OPV). OPV contains attenuated viral strains which retain their replicating capacity in the digestive tract and thus induce the development of an antiviral local intestinal immunity and limit the circulation of the virus. In such a context, poliomyelitis surveillance laboratories should study above all cases of acute flaccid paralysis (AFP), highlighting the circulation of wild strains, identifying regional reservoirs and guiding vaccination strategies. Alongside circulation, there appear to be important genetic and phenotypic shifts in vaccinating strains, since the OPV is capable of preserving a reservoir of pathogenic strains and thereby impairing vaccination efficacy and the eradication of the virus. Furthermore, non-polio enteroviruses should be considered as a source of emerging pathogenic strains. These questions are being studied by the Pasteur Institute with the objective of determining the effects of OPV campaigns on the circulation of the poliovirus. We have studied the poliovirus vaccine and the circulation of wild strains in urban and peripheral urban areas in African countries known to be endemic for poliomyelitis (Central African Republic, Madagascar, Côte d'Ivoire). The study population consisted of children who had already been vaccinated and new-borns in the course of vaccination. We also evaluated the diffusion of the vaccine strains in their immediate environment. Genetic interchanges were taken into account. For children who received the 3-4 OPV doses, asymptomatic virus excretion was insignificant (0.4 – 2.4%). The rate of virus excretion in the surrounding environment of children in the course of being vaccinated was relatively low (1.76 – 5.3%). Our study also detected variant and recombinant strains.

Résumé:

La stratégie mise en œuvre pour aboutir à la disparition de la poliomyélite et du poliovirus consiste en premier lieu à éliminer la maladie due au virus sauvage par la mise en place de campagnes massives de vaccination utilisant le vaccin atténué oral (VPO). Dans ce cadre-là, les laboratoires de surveillance pour la poliomyélite ont la tâche d'étudier tous les cas de paralysie flasque aiguë (PFA), de mettre en évidence la circulation des souches sauvages et de délimiter les réservoirs régionaux. La circulation et la dérive génétique et phénotypique des souches vaccinales sont également des sujets d'étude. La diffusion des souches vaccinales dans l'entourage immédiat des enfants en cours de vaccination a été évaluée. Les échanges génétiques entre souches vaccinales et sauvages dans les populations étudiées ont été également considérés. Chez les enfants ayant reçu 3 ou 4 doses de VPO, les résultats indiquent un taux d'excréteurs asymptomatiques de poliovirus sauvage et vaccinal de 0,4 % et 2,4 % respectivement. Dans les deux types d'étude, la présence de souches vaccinales variantes et recombinantes a été détectée.

vaccination
poliovirus
eradication
acute flaccid paralysis
endemic
Antananarivo
Madagascar
Bangui
Central Africa
Abidjan
Ivory Coast (Côte d'Ivoire)
Indian Ocean
Sub-Saharan Africa

vaccination
poliovirus
eradication
paralysie flasque aiguë
endémie
Antananarivo
Madagascar
Bangui
Centrafrique
Abidjan
Côte d'Ivoire
Océan Indien
Afrique intertropicale

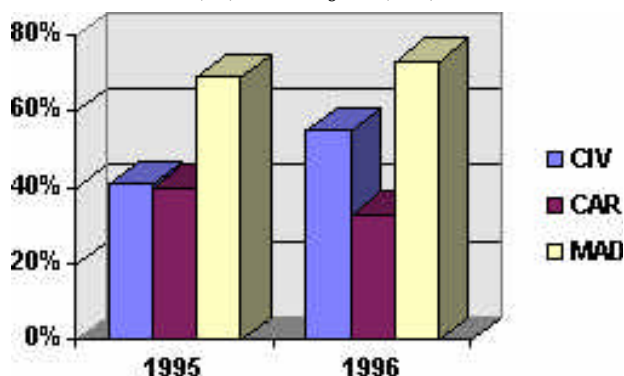
Introduction

Malgré les stratégies d'éradication de la poliomyélite mises en œuvre depuis 1995, la région africaine demeure l'un des principaux réservoirs mondiaux en ce qui concerne la transmission du virus poliomyélitique sauvage, le nombre de cas de paralysie flasque aiguë (PFA) déclarés en Afrique étant

de 2192 en 1995 et 1898 en 1996 (2). Dans certaines régions, on a également observé des échecs de la vaccination et des épidémies récentes au sein de populations bien vaccinées, comme les épidémies de poliomyélite en Namibie de 1993 à 1995 (4). Le taux de couverture vaccinale (VPO3) était de 58 % en 1995, pour le continent africain, par rapport à la moyenne mondiale de 83 % (1). Dans la sous-région de

Figure 1.

Evolution de la couverture vaccinale en République Centrafricaine (RCA), Côte d'Ivoire (CIV) et Madagascar (MAD), de 1995 à 1996.
Evolution of vaccine coverage in the Central African Republic (CAR), Cote d'Ivoire (CIV), and Madagascar (MAD), 1995-1996.



l'Afrique centrale, ce taux était de 42 %, allant de 18 % au Tchad à 64 % en Guinée équatoriale (12). Une enquête de terrain à Madagascar, en 1996, a révélé une couverture vaccinale de 55 % au lieu des 73 % rapportés par les sources officielles (13). L'évolution de la couverture vaccinale pour Madagascar, la Côte d'Ivoire et la RCA, en 1995 et 1996, est représentée dans la figure 1 (sources ministérielles).

Les stratégies mises en œuvre pour aboutir à la disparition du virus comportent: l'amélioration des activités des centres de vaccination de routine de façon à ce que 90 % des enfants âgés de moins d'un an reçoivent trois doses de vaccin polio oral (VPO); l'organisation des journées nationales de vaccination (JNV) visant à vacciner tous les enfants de moins de 5 ans sans considérer leur statut immunitaire; l'organisation de campagnes de vaccination dites "porte à porte" pour éliminer les derniers réservoirs; la surveillance active de tous les cas de paralysie flasque aiguë (PFA) (7).

Le laboratoire occupe une place importante dans la surveillance de la circulation des poliovirus, soit par la confirmation virologique des cas de PFA, soit par le biais d'enquêtes menées dans différents groupes de population d'enfants. Les données recueillies permettent de délimiter des réservoirs régionaux ou locaux et d'orienter les stratégies vaccinales. En outre, au fur et à mesure des progrès de l'éradication, il sera essentiel de surveiller l'apparition des cas importés ou la survenue des paralysies postvaccinales (8).

L'utilisation massive du VPO rend difficile la détection du virus sauvage dans la masse du virus vaccinal. Les souches recombinantes et révertantes peuvent être à l'origine de cas de paralysie post-vaccinale (PPAV) et, de ce fait, doivent être surveillées (6). La disparition progressive des souches sauvages laisse une niche vide, pour un grand nombre d'entérovirus non-polio circulant qui peuvent l'occuper. L'évaluation de ces problèmes est au centre de notre étude.

Matériel et méthodes

Populations

Pour déterminer la prévalence du portage intestinal asymptomatique, 3474 enfants de 6 mois à 5 ans, n'ayant pas reçu de VPO depuis plus de 30 jours, ont été recrutés à Antananarivo, de juillet 1995 à juillet 1996 (âge moyen : 22,8 mois, sex-ratio : 0,78), ainsi que 252 à Bangui, de janvier à avril 1996 (âge moyen : 14 mois, sex-ratio : 1,19). À Bangui, les recrutements ont été arrêtés en avril 1996, à cause des événements socio-politiques qu'a connus le pays. Les enfants ont été inclus dans l'étude selon la technique "à jour donné": les 100 pre-

miers enfants d'un centre de PMI répondant aux critères et se présentant les 1er, 2ème ou 3ème jours ouvrables. Le nombre moyen de doses VPO reçu était de 4 pour les deux sites.

Pour déterminer la présence des souches vaccinales variantes, leur fréquence de circulation et de diffusion dans l'entourage immédiat des enfants vaccinés, les sites de Bangui et Abidjan ont suivi des groupes de nouveau-nés en zone urbaine ou périurbaine. Les critères d'inclusion étaient l'accouchement à la maternité, le suivi au centre PMI et la sédentarisation de la famille. Une enquête d'environnement a complété l'étude (3 à 5 personnes par famille). Cent quarante-cinq nouveau-nés et 252 contacts ont été inclus dans l'étude à Abidjan, de janvier à mars 1996 (sex-ratio : 0,80). Soixante-deux nouveau-nés et 17 contacts l'ont été à Bangui, de décembre 1995 à avril 1996 (sex-ratio : 1). En Côte d'Ivoire, le VPO n'est pas pratiqué, la répartition des enfants selon les doses de VPO reçues était à Abidjan: aucun enfant pour VPO à J0, 121 pour VP1, 121 pour VP2 et 100 pour VP3. À Bangui, 44 enfants avaient reçu VPO à J0, 31 avaient reçu VP1, 14 avaient reçu VP2 et 4 enfants avaient reçu VP3.

Échantillons

Dans le groupe des enfants de 6 mois à 5 ans, les prélèvements ont été réalisés chaque mois pendant un an au niveau des centres de santé ou de PMI. Environ 63 selles ont été prélevées chaque mois à Bangui, pendant 4 mois. À Antananarivo, 200 enfants environ ont été prélevés chaque mois.

Dans le groupe des nouveau-nés, un prélèvement de selles a été effectué avant la première dose de VPO et 7 jours après chaque dose de VPO reçue. Dans l'entourage familial, les échantillons de selles ont été recueillis à l'occasion des 2ème et 3ème prélèvements. À Bangui, 93 prélèvements ont été effectués chez les nouveau-nés et 17 chez des contacts; à Abidjan, 453 chez les nouveau-nés et 468 chez des contacts. L'intervalle moyen de collecte des prélèvements de selles après chaque dose était de 8 jours à Abidjan et 9 jours à Bangui. La répartition du nombre d'échantillons de selles recueillis après chaque dose de VPO a été pour Abidjan de 129 avant VP1, 121 après VP1, 103 après VP2, 100 après VP3. En outre, 465 échantillons ont été prélevés dans l'entourage à Bangui.

Isolement et identification du virus

L'isolement viral a été pratiqué selon les recommandations de l'OMS: traitement des selles au chloroforme et inoculation du surnageant sur 2 lignées cellulaires Hep2 et RD à Bangui. À Antananarivo, seule la lignée cellulaire Hep-2 a été utilisée. L'identification du virus a été faite par la méthode de séro-neutralisation en microplaques de cultures cellulaires en présence des mélanges de sérums spécifiques.

Pour la différenciation intratypique, deux méthodes ont été utilisées: une antigénique et une génomique.

Méthode antigénique: détermination de l'index de neutralisation en présence d'anticorps monoclonaux anti-Sabin (14).
Méthode génomique: détermination des profils de restriction enzymatique des souches dans deux régions du génome permettant la mise en évidence des recombinants intertypiques ou intratypiques (3).

Le séquençage d'ADN double brin, tel que l'a décrit Olen KEW en 1995, a été utilisé pour la confirmation des souches sauvages (9).

Résultats

Enfants âgés de 6 mois à 5 ans

Site d'Antananarivo

Sur l'ensemble, 3185 prélèvements de selles ont été traités de juillet 1995 à juillet 1996 ; 192 isolats ont été obtenus (6 %) dont 9 poliovirus (0,3 %) et 183 (5,7 %) entérovirus non-polio (ENP). Parmi les poliovirus, cinq étaient de type 1, un de type 2 et trois de type 3 (13).

L'ELISA a permis d'identifier trois poliovirus sauvages de type 1, un poliovirus Sabin 1 et un poliovirus Sabin 3. Dans 4 cas, les anticorps monoclonaux n'ont pas permis de faire la différenciation intratypique.

Les profils RFLP des 9 souches de poliovirus ont permis de distinguer 4 poliovirus sauvages, 3 poliovirus vaccinaux et 2 poliovirus vaccinaux de type 1 variants (voir tableau I).

Tableau I.

Résultats de la RFLP, site d'Antananarivo.
Results of the RFLP, Antananarivo site.

n° labo	date d'isolement	âge (mois)	sexe	nb doses VPO reçues	intervalle (mois)	type de poliovirus
95/6433	27/09/95	19	F	4	2	P1 variant
95/6636	05/10/95	16	F	3	10	P1 variant
96/18803	29/05/96	11	M	3	6	P1 NSL
96/18960	08/05/96	18	F	4	13	P1 NSL
96/19656	19/07/96	43	F	5	27	P1 NSL
95/6449	21/09/95	6	F	4	18	P2 SL
95/9251	14/12/95	14	F	4	11	P3 SL
96/19049	1/06/96	19	F	5	2	P3 SL
95/6391	22/09/95	26	M	4	6	P3 NSL

NSL = non Sabin-like ; SL = Sabin-like

Site de Bangui

Au total, 252 prélèvements de selles ont été traités du 10 janvier au 15 avril 1996 ; 138 (54,8 %) isolats ont été obtenus dont 6 poliovirus (2,4 %) et 132 (52,4 %) entérovirus non-polio (ENP) (voir tableau II).

L'analyse antigénique a permis d'identifier deux poliovirus de type 3 sauvage, deux poliovirus type 3 Sabin, un poliovirus type 2 Sabin. Une souche de type 3 est restée indéterminée.

L'analyse RFLP des 6 souches a confirmé leur caractère Sabin ou sauvage et a mis en évidence une souche recombinante S3/S2 (voir tableau II).

Tableau II.

Résultats de la RFLP, site de Bangui.
Results of the RFLP, Bangui site.

n° labo	date d'isolement	âge (mois)	sexe	nb doses VPO reçues	intervalle (mois)	type de poliovirus
960191	24/01/1996	42	F	4	17,9	P2 SL
960103	11/01/1996	19	F	3	1,5	P3 NSL
960129	15/01/1996	11	M	3	5	P3 SL
960130	15/01/1996	15	M	3	8,5	P3 SL
960372	21/03.1996	30	M	1	43	S3/S2
960149	15/01/1996	6	F	3	1	P3 NSL

NLS = non Sabin-like ; SL = Sabin-like

Enfants nouveau-nés

À partir des 918 prélèvements de selles traités à Abidjan, 171 isolats (18,6 %) ont été obtenus, dont 128 poliovirus (74,8 %) et 43 ENP (25,2 %). L'analyse des profils RFLP des souches de poliovirus a permis de mettre en évidence 17 recombinants intertypique et d'un recombinant intratypique (à confirmer par séquençage). Le tableau III indique des souches isolées par site et par prélèvements. Trois poliovirus de type 3 sauvage et un poliovirus de type 2 sauvage ont été isolées dans l'entourage des nouveau-nés.

Tableau III.

Souches isolées par site et par prélèvement.
Isolated strains according to site and to culture.

site/virus isolés	E		P0		P1		P2		P3		P4	
	polio	ENP	polio	ENP	polio	ENP	polio	ENP	polio	ENP	polio	ENP
Abidjan	25	21	0	0	13	10	59	0	15	3	16	9
Bangui	3	3	0	1	28	1	13	5	1	5	1	1

E : prélèvement de selles dans l'entourage ;
P0 : prélèvement de selles avant la première dose ;
P1 : prélèvement de selles après VPO ;
P2 : prélèvement de selles après VP1 ;
P3 : prélèvement de selles après VP2 ;
P4 : prélèvement de selles après VP3

À Bangui sur les 93 prélèvements de selles, 62 isolats (66%) ont été obtenus dont 46 poliovirus (74 %) et 13 ENP (20,9 %). L'analyse des profils RFLP des souches de poliovirus isolées a mis en évidence 4 recombinants intertypiques et un poliovirus de type 2 variant. Le tableau IV montre le nombre de poliovirus isolés par site, ainsi que les conclusions de l'analyse des profils RFLP.

Tableau IV.

Résultats de l'analyse des profils RFLP par site.
Results of the RFLP profile analysis by site.

site	Sabin-Like	non Sabin-Like	recombinants	variants
Abidjan	24 polio 1	3 polio 3	3 S2/S1	0
	51 polio 2	1 polio 2	3 S3/S1	
	31 polio 3		11 S3/S2 1 P3 NSL/S3	
Bangui	10 polio 1	0	1 S2/S1	1 S2
	25 polio 2		3 S3/S2	
	7 polio 3			

S1 : poliovirus de type 1 vaccinal ;
S2 : poliovirus de type 2 vaccinal ;
S3 : poliovirus de type 3 vaccinal

Discussion

Enfants de 6 mois à 5 ans

La persistance de la transmission du virus sauvage a été mise en évidence sur les sites d'Antananarivo et de Bangui. À Antananarivo, les poliovirus de type 1 et 3 circulaient chez des enfants ayant reçu au moins 3 doses de VPO. Deux génotypes de poliovirus de type 1 ont été trouvés. A Bangui, seul le poliovirus de type 3 sauvage circulait chez des enfants ayant reçu au moins 3 doses de VPO. Le même génotype circulait en même temps chez les enfants paralysés, mais le poliovirus de type 1 a été isolé, en 1996, chez un contact présentant une PFA (données non publiées).

La présence de poliovirus de type 3 sauvage indique que la couverture vaccinale n'est pas suffisante pour interrompre les chaînes de transmission du virus.

Des épidémies récentes dues au poliovirus sauvage de type 1 en Namibie (4) et Zambie (11), pays qui ont un taux de couverture vaccinale très haut, ont démontré que même des couvertures vaccinales très élevées ne sont pas suffisantes pour protéger contre les épidémies de poliomyélite paralytique. Ce fait confirme la nécessité d'organiser des JNV pendant plusieurs années de suite, ainsi que des JNV dans plusieurs pays voisins à la fois.

Dans trois cas à Antananarivo et dans un cas à Bangui, l'utilisation des anticorps monoclonaux n'a pas permis de déterminer le caractère Sabin ou sauvage des souches. L'analyse par la RFLP a mis en évidence une souche sauvage et deux souches de type 1 variantes à Antananarivo et un recombinant S3/S2 à Bangui. La variation du génome du poliovirus étant estimée à 1 % par an, les souches Sabin 1 variantes devaient

circuler depuis au moins un an (10). Le séquençage de la région VP1 entière est nécessaire pour déterminer exactement la durée exacte de la circulation.

La souche recombinante de Bangui a été isolée chez un enfant âgé de 30 mois, ayant reçu sa dernière dose de VPO depuis 43 mois, ce qui suggère une contamination récente, car nous savons que les souches recombinantes sont excrétées très tôt après la vaccination (5).

Nouveau-nés

Sur le site d'Abidjan, les poliovirus de type 3 et 2 sauvages ont été isolés dans l'entourage des nouveau-nés en cours de vaccination, ce qui témoigne d'une transmission intense du virus. Le poliovirus de type 2 sauvage a le même profil RFLP qu'une souche isolée chez un paralysé d'origine béninoise, ce qui suggère une importation du virus du Bénin vers la Côte d'Ivoire.

À Bangui, aucun poliovirus sauvage n'a été isolé, mais le nombre de prélèvements est inférieur à celui de Côte d'Ivoire.

Des recombinants intertypiques ont été isolés sur les deux sites. Un recombinant intratypique a été mis en évidence par la RFLP à Abidjan, mais une confirmation par séquençage est nécessaire. Le taux d'excréteurs de souches vaccinales dans l'entourage des nouveau-nés en cours de vaccination (17,6 à 5,3 % d'excréteurs) paraît relativement réduit mais semble cependant en faveur d'une transmission vaccinés-contacts effective (0,2 à 1,1 % d'excréteurs chez les enfants déjà vaccinés).

Conclusion ?

Dans les pays ayant un taux de couverture vaccinale de routine inférieure à 50 %, le poliovirus sauvage continue à circuler dans la population d'enfants vaccinés.

L'organisation de Journées nationales de vaccination, pendant au moins trois années successives, s'impose pour interrompre la chaîne de transmission de poliovirus sauvage.

Références bibliographiques

1. ANONYME - *Expanded Programme on Immunization; Progress in Polio Eradication*. Rel épidémiol hebdo, N° 25, 1996
2. ANONYME - *Expanded Programme on Immunization; Progress in Polio Eradication*. Rel épidémiol hebdo, N° 28, 1997
3. BALANANT J, GUILLOT S, CANDREA A, DELPEYROUX F & CRAINIC R - The Natural Genomic variability of Poliovirus Analyzed by a Restriction Fragment Length Polymorphism Assay. *Virology*, 1991, **184**, 645-654.
4. BIELLIK R, ALLIES T, WOODFILL CJI & LOBANOV A - Polio outbreaks in Namibia 1993-1995: Lessons Learned. *J Infect Dis*, 1997, **175**, S30-S36.
5. CAMMACK N, PHILLIPS A, DUNN G, PATEL V & MINOR PD - Intertypic Genomic Rearrangements of Poliovirus Strains in Vaccines. *Virology*, 1988, **167**, 507-514.
6. FURIONE M, GUILLOT S, OTELEA D, BALANANT J, CANDREA A & CRAINIC R - Poliovirus with natural recombinant genomes isolated from vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *Virology*, 1993, **196**, 199-208.
7. HULL HF, BIRMINGHAM ME, MELGARD B & LEE JW - Progress towards Global Polio Eradication. *J Infect Dis*, 1997, **175**, S4-S9.
8. HULL BP & DOWDLE WR - Poliovirus Surveillance: Building the Global Polio Laboratory Network. *J Infect Dis*, **175**, S113-S116.
9. KEW OM, MULDER MN, LIPSKAYA G YU, DA SILVA EE & PALANSCH AA - Molecular epidemiology of polioviruses. *Virology*, 1995, **6**, 401-414.
10. MINOR PD - The molecular biology of polioviruses. *J Gen Virol*, 1992, **73**, 3065-3077.
11. MPABALWANI E, MONZE M, SAJO M, TE RUNUMA H & LUO N - Poliomyelitis outbreak in Zambia. *Lancet*, 1996, **347**, 1633.
12. OKWO-BELE JM, LOBANOV A, BIELLIK RJ, BIRMINGHAM ME, PIERRE L *et al.* - Overview of Poliomyelitis in the African Region and Current Regional Plan of Action. *J Infect Dis*, 1997, **175**, S10-S15.
13. RAKOTO ANDRIANARIVELO M, RABARIJOANA L, BOISIER P, CHEZZI C & ZELLER H - Wild poliovirus among healthy children immunized with oral polio vaccine in Antananarivo, Madagascar. *Trop Med Intern Health*, 1997, **4**, 50-57.
14. VAN DER AVOORT H, HULL B, HOVI T *et al.* - Comparative study of five methods for intratypic differentiation of polioviruses. *J Clin Microb*, 1995, **33**, 2562-2566.