

CARACTÉRISATION DES VIRUS AGENTS POTENTIELS DES DIARRHÉES CHEZ L'ADULTE À DJIBOUTI

J. MASLIN, E. KOHLI, N. LEVEQUE, J.J. CHOMEL, E. NICAND, C. FOUET, R. HAUS, J.J. DEPINA, P. MATHECOWITSCH, H. DAMPIERRE

Med Trop 2007 ; 67 : 249-255

RÉSUMÉ • Chez l'adulte, en zone tropicale, la part exacte des virus entériques dans les diarrhées infectieuses aiguës, demeure inconnue faute de moyens diagnostiques. Une étude multicentrique a permis de préciser la prévalence virale, chez des patients présentant des diarrhées aiguës sporadiques à Djibouti. A partir d'un échantillon de 108 sujets, un large panel de virus entériques a été recherché par immunochromatographie, détection antigénique en ELISA immunocapture, RT-PCR, inoculation sur cellules permissives, analyse de séquences, et méthodes indirectes en sérologie. Les rotavirus et adénovirus agents principaux des gastroentérites chez l'enfant représentent respectivement 2 et 5 % des cas. Les astrovirus, 5 % des cas. En revanche, les calicivirus humains (HuCVs) et entérovirus sont retrouvés dans 25 % et 42 % des cas respectivement. Des génotypes inhabituels de HuCVs et des formes recombinantes (jonction pol / cap) ont été mis en évidence, ainsi qu'un nombre relatif élevé de sapovirus (30 %). La participation des entérovirus (échovirus) dans l'étiologie des diarrhées sporadiques de l'adulte mérite d'être approfondie. Aucune souche de poliovirus n'a été mise en évidence. Ces nouvelles données concernant la Corne de l'Afrique renforcent nos connaissances épidémiologiques sur les diarrhées infectieuses aiguës, problème majeur de santé publique, et danger potentiel pour les voyageurs.

MOTS-CLÉS • Afrique - Djibouti - Diarrhées - Epidémiologie - Calicivirus - Entérovirus.

CHARACTERISATION OF VIRAL AGENTS WITH POTENTIAL TO CAUSE DIARRHEA IN DJIBOUTI

ABSTRACT • Due to limited laboratory facilities in the tropics, the exact role of enteric viruses in causing diarrhea among adults in the tropics is unknown. The purpose of this report is to describe a multicenter study undertaken in Djibouti to determine the prevalence of a large panel of enteric viruses using immunochromatography; antigenic detection by ELISA, RT-PCR cellular inoculation, sequence analysis; and indirect serology. Study samples were collected from 108 patients presenting acute and sporadic diarrhea. Although they are well known causes of diarrhea in children, rotavirus and adenovirus were identified in only 2 and 5% of adults respectively. In contrast human caliciviruses (HuCVs) and enterovirus were identified in 25 and 42% of adult cases respectively. Uncommon genotypes of HuCVs and recombinant forms (junction pol/ cap) as well as a significant number of sapovirus (30%) were identified. Further study is needed to clarify the role of enterovirus (echovirus) in the etiology of acute diarrhea in adults. No poliovirus was identified. These new data from the Horn of Africa increase our knowledge about the epidemiology of acute infectious diarrhea that is a major public health problem and potential danger for travelers.

KEY WORDS • Africa - Djibouti - Diarrhea - Epidemiology - Human calicivirus - Enterovirus.

De nombreux agents pathogènes, bactériens, viraux, ou parasitaires, sont à l'origine des diarrhées infectieuses aiguës (DIA) chez l'adulte. Parmi ces agents, les virus sont les moins fréquemment détectés, car bénéficiant de techniques diagnostiques peu consensuelles. Leur mise en évidence fait appel à des techniques souvent coûteuses : culture

de cellules, immunofluorescence, ou biologie moléculaire, seul outil disponible pour les calicivirus humains (HuCVs) (1). Le transport des échantillons nécessite une conservation à une température négative parfois difficile à respecter notamment lors d'envois éloignés, en particulier internationaux. Outre mer, un biais de recrutement important se surajoute à ces difficultés diagnostiques et logistiques, puisqu'on estime que 80 % des DIA ne donnent pas lieu à une consultation ni à un prélèvement.

La part des virus entériques dans les étiologies des DIA est, par conséquent, sous évaluée dans les pays les moins avancés. Ainsi, pour les troupes stationnées outre-mer, leur incidence paraît, de manière trompeuse, moins prépondérante que les étiologies bactériennes (Données de la Surveillance Epidémiologique Hebdomadaire). Une enquête réalisée dans les laboratoires hospitaliers militaires en 1998 (2) a cependant révélé que 6 % des diarrhées aiguës étaient dues aux rotavirus (type A) et adénovirus, en n'utilisant qu'une seule technique d'agglutination-latex, avec une sensibilité de 70 %.

Les infections virales entériques constituent pourtant un risque biologique naturel majeur pour les Forces hors

• Travail du Laboratoire de biologie médicale (J.M., Biologiste du SSA, Chef de Laboratoire), GMC Bouffard-Djibouti, du Laboratoire de Biologie médicale (E.N., Biologiste du SSA, Chef du Laboratoire; C.F., Ingénieur, technicienne de recherche) HIA Val de Grâce, Paris, du Département d'épidémiologie et Département d'épidémiologie et Santé publique Nord (R.H., Médecin), EASSA, Paris, du Laboratoire de Microbiologie Médicale et Moléculaire-UFRs (E.K., Professeur des universités, Praticien Hospitalier), CNR des Calicivirus, Dijon, du Laboratoire de virologie (N.L., Médecin assistant.J.J.C., Maître de conférence des universités, Praticien hospitalier), CNR des entérovirus, Faculté de Médecine, Lyon et du Laboratoire de biologie médicale (J.J.D., Biologiste du SSA; P.M., H.D., Médecins du SSA) Laboratoire de Biologie Médicale de l'HIA Laveran, Marseille.

• Correspondance : J. MASLIN, Laboratoire de Biologie Médicale, GMC Bouffard, SP 85024, 00812 Armées • Fax : 00 253 45 30 35.

• Courriel : maslin_j@yahoo.com •

• Article reçu le 11/11/2006, définitivement accepté le 11/05/2007.

Tableau I - Caractéristiques socio-démographiques des 108 patients inclus (prélèvement + recueil épidémiologique) - N (%).

Sexe	Hommes 86 (81)	Femmes 22 (19)	Sex ratio (H/F) 3,9
Origine	Européens 82 (76)	Djiboutiens 17 (16)	Autres 9 (8)
Age (ans)	Moyenne 29,5	Médiane 29	Extrêmes [15 - 49]
Statut	Militaires 77 (74,4)	Civils 31 (25,6)	

métropole, en particulier en Afrique, où le péril fécal est omniprésent. Ce constat a été à l'origine d'une enquête préliminaire réalisée à Djibouti (Groupement Médico-Chirurgical Bouffard), afin de préciser la prévalence virale parmi les patients adultes présentant une DIA ayant fait l'objet d'un prélèvement.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

De septembre 2002 à décembre 2003, une enquête, dont le centre recruteur a été le Groupement Médico-Chirurgical (GMC) Bouffard à Djibouti et les centres collaborateurs, l'Hôpital d'Instruction des Armées Val de Grâce, à Paris et le Département d'Epidémiologie et Santé Publique-Nord à St Mandé, a permis le recueil de données épidémiologiques et d'échantillons de selles de patients diarrhéiques à Djibouti. Le but était la détermination de la prévalence virale dans les DIA chez l'adulte, l'analyse des principaux virus incriminés, l'étude de leur relation avec les données épidémiologiques et cliniques, et l'étude phylogénétique et/ou des sérotypes des souches dominantes de cette région d'Afrique de l'Est.

Le recrutement concernait des adultes (âge > 15 ans), militaires européens, et un nombre moindre d'employées djiboutiennes, dont la prise en charge est assurée par les Forces Françaises (Tableau I). Tous ces patients présentaient une DIA (définie par un nombre de selles > 3 / j et une durée < 7 j) et consultaient au GMC Bouffard.

A la réception des selles au Laboratoire de Biologie Clinique du GMC Bouffard, un examen bactériologique et parasitaire était systématiquement réalisé selon les techniques de routine (KOP, coproculture).

Les selles dont les résultats bactériologiques et parasitaires étaient négatifs furent envoyées congelées au Laboratoire de Biologie Clinique de l'HIA Val de Grâce où ont été effectuées les analyses suivantes :

Adénovirus et rotavirus

Tests de recherche rapide par méthode immunochromatographique en bandelettes (Diarlex LA[®], Orion Diagnostica et Rapid Strip ROTA-ADENO, Meridian) réa-

lisées en parallèle. Y étaient adjointes des méthodes ELISA : Tests immunoenzymatiques (ELISA - Dako Ltd: IDEIA[™] rotavirus) pour les rotavirus du groupe A - permettant la détection de protéines spécifiques de groupe (dont VP-6) ; et IDEIA[™] adénovirus (tous sérotypes) - permettant la détection de l'antigène hexonique des adénovirus. Pour les adénovirus, inoculation sur cultures cellulaires (Vero, MRC5) et détection en Immuno Fluorescence Indirecte (IFI) par anticorps monoclonaux (AcM).

Astrovirus

Méthode ELISA : Amplified IDEIA[™] astrovirus (tous sérotypes) - permettant la détection d'un antigène spécifique de genre, et détection de portions de génome en biologie moléculaire par réaction de polymérisation en chaîne (PCR), à l'aide de la trousse récemment commercialisée : Calici/Astrovirus consensus / Argene-France. Cette PCR permet l'amplification de la région codante l'ARN polymérase des astrovirus avec l'obtention d'un amplicon de 447 paires de base (pb).

Calicivirus humains

PCR (trousse Calici/Astrovirus consensus / Argene-France, obtention d'un amplicon de 320 pb).

Entérovirus

PCR avec la trousse Enterovirus consensus / Argene-France, permettant l'amplification de la partie 5'NC des génomes des poliovirus et non polio (Coxsackievirus, Echovirus, Enterovirus 68-71). Inoculation sur cultures cellulaires (Vero, MRC5) et détection en IFI.

Envois aux centres nationaux de référence (CNR) et typages

Les produits d'extraction et les prélèvements primaires des échantillons positifs en PCR étaient adressés aux CNR des calicivirus (Dijon) et des entérovirus (Lyon) pour séquençage et/ou sérotypage lorsque les quantités étaient suffisantes. Une analyse phylogénétique a été réalisée à partir du séquençage des souches de HuCVs. Les souches ont été séquençées dans le gène de la polymérase (pol), utilisant les amorces: JV12-JV13 (3) ou les amorces Argène avec une amorce dégénérée anti-sens P110 (4) pour les norovirus, et SR80/p110 (5) pour les sapovirus. Certaines souches de norovirus ont pu être séquençées dans le gène de la capsid (cap) en utilisant les amorces SRI-1/SRI-2 (6) pour le génogroupe I, et G2SKF/G2SKR (7) pour le génogroupe II. Les séquences (région pol et cap) ont d'abord été alignées par le logiciel CLUSTAL-W en format PHYLIP. Les répliques (n=100) ont été générés par bootstrap ; la méthode neighbor-joining a été utilisée pour créer les arbres phylogéniques.

Poliovirus 1,2,3

Chez les patients pour lesquels des tubes de sérum ont pu être prélevés, des sérologies ont été réalisées par réaction de fixation du complément (RFC).

Tableau II - Délai d'apparition, aspect et nombre quotidien de selles par patient.

Délai date d'arrivée / Début des signes (expatriés)			
Moyenne	Médiane	Extrêmes	
1 mois	2 mois	(1 jour - 2 ans)	
Nombre de selles par jour			
Moyenne	Médiane	Extrêmes	
8	8	[3 - 24]	
Aspect des selles (N = 65)			
Liquides	Glaireuses	Sanglantes	Autres*
48 (74%)	4 (6%)	2 (3%)	11 (17%)

* Autres : pâteuses, semi pâteuses.

Les données cliniques et épidémiologiques ont été saisies et exploitées avec l'aide du Département d'Epidémiologie et Santé Publique Nord (Ecole d'Application du Service de santé - Paris). Les données ont été exploitées avec le logiciel Epi info 6.04d®.

RÉSULTATS

Données épidémiocliniques

L'exploitation des fiches épidémiologiques a permis d'établir les caractéristiques socio-démographiques des patients (Tableau I), ainsi que les aspects des DIA (Tableau II). Cent huit patients ont fait l'objet d'un prélèvement.

Au total, 105 selles (sur 108 patients) étaient exploitables, 95 fiches étaient complètes, 68 sérums ont été prélevés.

Les résultats des tests virologiques effectués sont présentés au tableau III.

Parmi les 108 cas analysés, 86 (81 %) étaient de sexe masculin. Les nationalités se répartissaient comme suit : 76 % (82/108) européenne, 16 % (17/108) djiboutienne et 8 % (9/108) de nationalité autre. Les militaires français représentaient 74,4 % des cas (77/108). L'âge moyen des cas était de 29,5 ans (médiane : 29 ans).

Pour ce qui est de la description des diarrhées, elles survenaient surtout en début de séjour (1 à 2 mois). Le

Tableau III - Résultats virologiques

Virus recherché	Nombre de selles analysées	Tests utilisés	Détections positives	%
Adénovirus	105	Tests Rapides	0	0
	105	ELISA Adénovirus	4	3,8
	105	IFI Adénovirus	5	4,8
Rotavirus	105	Tests Rapides	0	0
	103	ELISA Rotavirus	2	1,9
Astrovirus	105	ELISA Astrovirus	5	4,8
	75	PCR Astrovirus	3	4
Calicivirus	75	PCR Calicivirus	19	25,3
Entérovirus	106	PCR Enterovirus	45	42

Tableau IV - Incidence et taux d'incidence des diarrhées déclarées dans le secteur épidémiologique outre mer entre 2002 et 2005.

Diarrhées	2002	2003	2004	2005
Incidence	6492	4442	4140	5333
Effectif	32201	34421	33948	32870
Taux incidence*	201,6	129	121,9	162,2

* : pour 1000 hommes / an

nombre quotidien de selles était en moyenne de 8. L'aspect des selles était connu pour 65 cas. Un aspect liquide était présent pour 74 % (48/65) des cas, c'était l'aspect dominant. Quatre cas (6 %) présentaient des selles glaireuses et deux cas (3 %) des selles sanglantes. Les autres aspects étaient : selles pâteuses ou semi-pâteuses.

En ce qui concerne la prise en charge des patients, 33 cas ont nécessité un traitement médicamenteux (30,5 %). Les médicaments les plus fréquemment prescrits étaient les antisécrétoires (19/33) et les adsorbants (15/33). Seulement 6 patients parmi les 33, ont reçu des antibiotiques.

Données virologiques

Parmi les 108 cas analysés, un maximum de 106 selles a pu être exploré pour un virus donné (certains échantillons n'ont pu être explorés pour un test donné la quantité prélevée étant insuffisante). En considérant les tests à plus forte sensibilité, un total de 76 virus entériques candidats a été retrouvé (Tableau III). Il n'y avait pas de co-infections. Il n'y avait aucune relation statistiquement significative ($p > 0,05$) entre un virus donné, et l'âge, le sexe, l'origine, le statut, ou la prise de traitement. Il n'apparaît pas, non plus, de différence dans les résultats entre expatriés et résident(e)s. Les tests rapides (adénovirus-rotavirus) sont restés strictement négatifs avec les 2 trousses. L'IFI adénovirus sur culture cellulaire confirme les résultats obtenus en ELISA (5 positifs vs 4 positifs) avec un gain de sensibilité attendu.

Le tableau IV montre nettement la présence d'un groupe de patients porteur de calicivirus humains (HuCVs) et d'un autre porteur d'entérovirus. Parmi les 11 souches de HuCVs ayant pu être séquencées (région polymérase et/ou capsid), 8 (73 %) étaient des norovirus (7 génotypes II et 1 génotype I), et 3 (27 %) des sapovirus. La comparaison des analyses de séquence au CNR de Dijon, avec des souches de références, a permis l'établissement d'arbres phylogénétiques sur 8 séquences de norovirus (Fig. 1). Les souches d'entérovirus ayant pu être typées, révèlent plusieurs sérotypes d'échovirus. Les sérologies poliovirus 1,2,3 effectuées sur 68 sérums étaient toutes négatives.

DISCUSSION

Cette étude, dont les résultats doivent être considérés comme préliminaires, compte tenu de l'absence de groupe témoin, permet néanmoins d'établir un état des lieux de la circulation des virus entériques dans cette région d'Afrique de l'Est. L'ensemble des recherches virales déjà effectuées

sur des selles diarrhéiques, telles qu'elles apparaissent dans la littérature, présente plusieurs points redondants. Elles concernent essentiellement des enfants, au sein de collectivités (crèches, écoles), à l'occasion d'épidémies, et dans les pays industrialisés (8, 9). Le plus souvent, une seule famille virale est recherchée. Les études de cas sporadiques, chez l'adulte et dans les pays les moins avancés, restent peu fréquentes. L'originalité de cette étude a été de rechercher les principaux virus entériques associés à des épisodes de DIA, chez l'adulte, présentant des épisodes sporadiques en dehors de tout contexte épidémique, et dans un pays en voie de développement, en zone tropicale (Djibouti-Afrique). Ces données complètent ainsi les caractéristiques épidémiologiques des études antérieures. Leur intérêt est souligné par les résultats déjà publiés, concernant la zone inter tropicale :

- la prévalence des virus entériques est particulièrement élevée dans les pays tropicaux où ils circulent toute l'année. Plus le niveau socio-économique est bas, plus la prévalence est élevée (10);
- certains sérotypes viraux sont endémiques à des régions particulières, notamment les HuCVs (11);
- le réservoir des entérovirus est humain, l'enfant jouant un rôle majeur. Les entérovirus non poliovirus (Echovirus et Coxsackivirus) ont été associés à des épidémies de gastroentérites souvent accompagnées d'autres symptômes non digestifs (notamment respiratoires ou méningés) et pouvant être à l'origine de complications (1, 14);
- la transmission des virus entériques est féco-orale et parfois aérienne, touchant volontiers des communautés. A ce titre, les militaires représentent une population à risque. Les excréta humains constituent une source inépuisable de virus (12).

Pour les troupes stationnées outre mer, les DIA sont, la principale cause de morbidité. L'incidence et le taux d'incidence des diarrhées déclarées dans le secteur épidémique outre-mer entre 2002 et 2005, après avoir diminué de façon régulière durant les années 2003-2004, ont ré-augmenté significativement (Tableau IV). Une enquête réalisée en 1998 auprès de 1348 militaires français répartis dans 3 pays d'Afrique a montré que 65 % ont présenté au moins un épisode de diarrhée au cours de leur mission. L'indisponibilité cumulée a été de 772 jours. Dans de nombreux cas, une étiologie virale pouvait être suspectée devant l'absence de signes d'invasion et une évolution courte (13).

Les virus sont mis en cause dans 30 à 40 % des diarrhées d'origine infectieuse (1, 12, 14). On retrouve (lorsqu'on les cherche), le plus souvent : rotavirus, calicivirus, astrovirus, adénovirus, entérovirus (15, 16) et d'autres : coronavirus, cytomégalovirus en particulier chez l'immunodéprimé. Ils sont le plus souvent responsables de formes épidémiques mais aussi sporadiques, et peuvent avoir, dans les collectivités, une origine commune de contamination (17). Aucune étude concernant les souches circulantes n'avait, à ce jour, été réalisée dans cette région de la Corne de l'Afrique, où stationnent et transitent de nombreux expatriés et militaires Français.

Nos résultats montrent qu'une grande variété de souches de virus entériques circule en dehors de tout contexte épidémique à Djibouti.

Dans la population étudiée, la survenue des DIA se fait essentiellement dans les premiers mois de l'arrivée d'un expatrié. La présence d'*Escherichia coli* entérotoxigène doit être recherchée en priorité, (ELISA, Dot blot ou PCR), mais une origine virale mérite aussi d'être envisagée. Ces résultats incitent au renforcement de la prophylaxie (hygiène alimentaire et lavage des mains) spécialement en début de séjour.

Le nombre moyen de selles par jour est élevé (N = 8). Ce critère ne peut donc pas aider au diagnostic différentiel avec les diarrhées bactériennes ou parasitaires. Par ailleurs, aucun caractère socio-épidémiologique n'est associé de manière significative à un virus; ces données devant être relativisées par la faiblesse de nos effectifs pour les rotavirus, adénovirus et astrovirus. Les autres signes cliniques n'ont pas été décrits ici compte tenu de l'absence de groupe témoin.

La prise en charge de ces DIA d'origine virale sur le territoire, par les médecins d'unités, est excellente et mérite d'être soulignée, puisque moins de 6 % ont reçu des antibiotiques. Ces prescriptions, réalisées dans un souci d'économie de la santé, sont à encourager.

Sur un plan diagnostique, tous les tests rapides (2 trousseaux différents) sont restés négatifs (Tableau III). Les tests rapides immunochromatographiques connus pour leur défaut de sensibilité, ont montré qu'ils n'étaient pas adaptés à ces recherches qui nécessitaient un envoi d'échantillon même congelé dans des conditions acceptables. Ces tests, en l'état, ne semblent pas devoir être retenus pour un diagnostic rétrospectif et devraient être réservés au diagnostic à la paillasse sur selles fraîches, compte tenu d'une valeur prédictive positive correcte. Dans notre pratique courante, les tests rapides adéno-rotavirus réalisés en routine au GMC Bouffard ont une bonne spécificité en cas de positivité. En revanche, un résultat négatif est toujours interprété avec prudence.

Les rotavirus, agents principaux des gastro-entérites de l'enfant (16, 18), semblent plus rarement associés aux diarrhées chez l'adulte en Afrique, comme cette étude le souligne. Si les adénovirus ont été retrouvés chez des enfants africains présentant des diarrhées sporadiques (19), leur circulation semble également limitée chez l'adulte à Djibouti. Il en est de même pour les astrovirus dont l'incidence est semblable (18). La technique par ELISA a permis de dépister 5 souches d'astrovirus, et la PCR seulement 3. Cependant, les effectifs traités étaient différents pour les 2 techniques (105 et 75 selles, respectivement), d'autre part, une interférence par des phénomènes d'inhibition est toujours possible en PCR, ce qui peut expliquer cette différence inattendue (Tableau III).

La PCR a permis de démontrer l'importance des HuCVs associés aux DIA chez l'adulte en zone tropicale. Dans cette étude, 25 % des selles testées en PCR sont positives. La part de ces virus non cultivables dans l'étiologie des DIA, était jusqu'alors sous-estimée (20). Les HuCVs : sapovirus (ex sapporo-like-virus), et norovirus (ex norwalk-like-

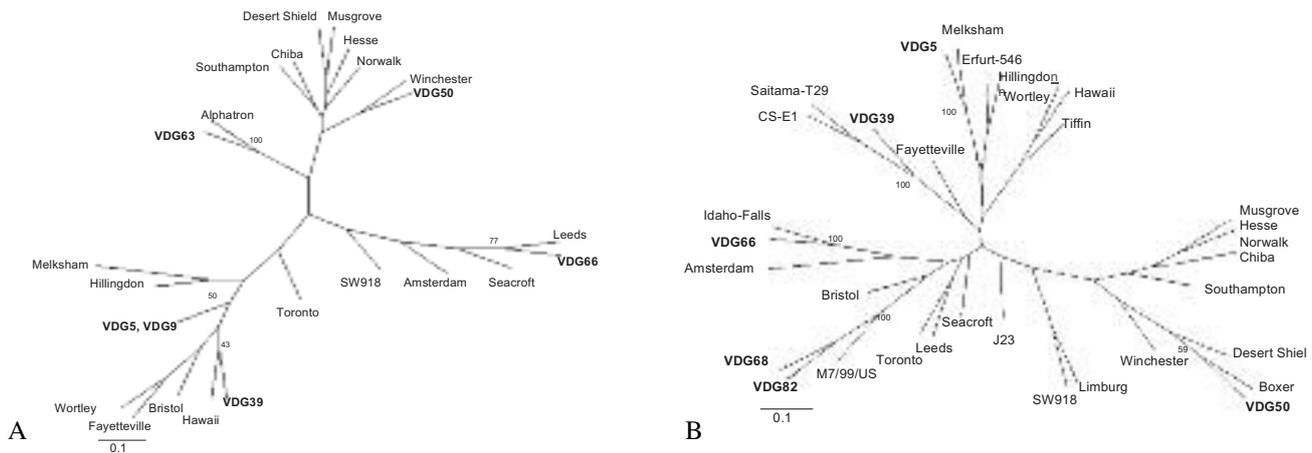


Figure 1 - Relations entre les séquences nucléotidiques (capside : A, et pol : B) de 8 souches de norovirus Isolées parmi les patients présentant des DIA à Djibouti (VDG N°) et des séquences de référence par méthode de neighbour-joining (Phylip version 3.6). L'alignement a été réalisé avec Clustal W version 1.8. La valeur des bootstrap est indiquée aux embranchements appropriés. Les n° d'accension Genbank des souches prototypes sont, dans l'ordre :

Norwalk : M87661 ; Southampton : L07418 ; Desert Shield : U04469 ; Chiba : AB022679 ; Musgrove : AJ277614 ; Hesse : AF093797 ; Winchester : AJ277609 ; Boxer : AF538679 ; Hawaii : U07611 ; Melksham : X81879 ; Toronto : U2030 ; Bristol : X76716 ; Hillingdon : AJ277607 ; Seacroft : AJ277620 ; Leeds : AJ277608 ; Amsterdam : AF195848 ; Idaho-Falls : AY054299 ; Erfurt-546 : AF427118 ; Limburg : AY077644 ; SW918 : AB074893 ; Wortley : AJ277618 ; Fayetteville : AY113106 ; M7 : AY130761 ; J23 : AY130762 ; Tiffin : AY502010 ; CS-E1 : AY502009 ; SaitamaT29 : AB112221 ; Alpatron : AF195847

virus) qui comprend 2 génogroupes principaux infectant l'homme incluant le récent « Desert Shield virus », ainsi que les astrovirus où l'on distingue 8 sérotypes (dont le sérotype 1 est le plus fréquent) ; ont été responsables d'épidémies de diarrhées dans l'armée américaine pendant la 1ère guerre du Golfe (21).

Il n'y avait pas de différence significative entre le nombre quotidien de selles, l'âge ou l'origine des patients porteurs de HuCVs, et les non-porteurs ($p > 0,05$). Contrairement aux entérovirus, les HuCVs sont le plus souvent responsables de diarrhées et le portage sain est rare (16, 22). Il est permis de penser, même en l'absence de groupe témoin, qu'ils soient responsables des DIA présentées par les patients. Une grande diversité de souches a été mise en évidence. Deux sapovirus appartiennent au type Parkville virus (Accession number: U73124, avec 90,8 % et 92 % d'identité nucléotidique respective dans la région 285 nt du gène *pol*) et une souche présente 85,8 % d'identité avec le virus Mexico/339/1991 (23). Parmi les norovirus (Fig. 1), une souche appartient au génogroupe I et est proche du virus Boxer qui a été récemment proposé comme nouveau parmi le génotype I - G1-8 (24), six appartiennent au génogroupe II et une au génogroupe IV (Alpatron). Deux souches sont suspectes d'être des recombinants r-GII-2. En effet, parmi les six souches de génogroupe II, deux possèdent un gène *pol* ne pouvant être relié à aucun génotype connu à ce jour mais déjà décrit: GGIIB (25). L'une, VDG5, porte un gène de capsid appartenant au génotype GII-2 (génotype Melksham), l'autre, VDG9 n'ayant pas pu être séquencée dans cette région. Les autres souches présentent des génotypes nouveaux : deux souches M7/99/US-like (nouveau génotype proposé, GII-14), une souche Idaho Falls-like (nouveau génotype GII-9) et une souche CS-1-like (nouveau

génotype GII-17). Aucune étude antérieure n'ayant été conduite dans les pays voisins de Djibouti, on ne peut conclure quant à l'endémicité (probable cependant) de ces souches.

La PCR a permis également de différencier un groupe de patients (42 % des selles testées en PCR positives) porteurs d'entérovirus. Cette méthode s'est révélée être plus sensible que l'inoculation sur cellules permissives (26). Les typages effectués au CNR de Lyon retrouvent une majorité d'échovirus parmi ces entérovirus : Echovirus 2 (N=1), Echo 4 (N=4), Echo 6 (N=1), Echo 7 (N=2), Echo15 (N=1), Echo 30 (N=1), Echo 33 (N=1).

Parmi les souches analysées, un entérovirus non neutralisé par les méthodes de séroneutralisation classiques a été mis en évidence (27). La comparaison de sa séquence avec les séquences publiées dans les banques de données a montré qu'il s'agissait d'un nouvel entérovirus. Le CDC d'Atlanta ayant réservé jusqu'à 100 sérotypes nouveaux, les travaux pour lui attribuer une nouvelle dénomination sont en cours (EV 95).

Contrairement aux HuCVs, les entérovirus à tropisme entérique, ne sont pas classiquement décrits comme pourvoyeurs de DIA. Cependant, nos résultats suggèrent qu'il serait intéressant de réaliser une enquête cas-témoins dans le prolongement de cette première étude.

Parmi les entérovirus isolés, aucune souche de poliovirus n'a été retrouvée dans la population étudiée. Toutes les sérologies sont également négatives quelle que soit l'origine du patient. Néanmoins ces résultats sont conformes avec le statut vaccinal de la plupart des militaires français. Ces données ont été transmises au bureau de l'OMS (Copenhague-Danemark) responsable du programme d'éradication de la polio dans le monde. Il a été proposé auprès du Ministère

de la Santé de Djibouti, et de la Direction Interarmées du Service de Santé, un projet de convention en association avec le GMC Bouffard et le bureau OMS-prévention de la polio de Djibouti, pour réaliser une enquête sur la circulation du poliovirus. Le but de ce projet est de permettre la surveillance de l'incidence des paralysies flasques aiguës (PFA) et des porteurs de poliovirus dans une région entourée de pays continuant à déclarer des cas de poliomyélite (dont l'Éthiopie et l'Erythrée). La mise en place des trousse de détection des entérovirus par PCR est maintenant réalisable sur place depuis la création du Département de Biologie Moléculaire du Laboratoire de Biologie Médicale du GMC Bouffard.

CONCLUSION

Cette étude a permis de démontrer qu'il existe une grande variété de souches virales entériques circulant dans la Corne de l'Afrique. Il a été montré la non-adaptation des tests rapides en immunochromatographie pour des prélèvements envoyés et analysés après congélation (défaut de sensibilité). En revanche, les techniques de biologie moléculaire maintenant disponibles sous forme de trousse commercialisées, et adaptables sur place, représentent un intérêt majeur pour augmenter le seuil de sensibilité des méthodes directes de culture ou immunoenzymatiques.

La détection des HuCVs et l'absence de co-infection, laisse supposer qu'ils ont un rôle important dans l'étiologie des DIA outre-mer. Des génotypes nouveaux ont été mis en évidence. De même ont été retrouvés un nombre relatif inattendu de sapovirus (30%), ainsi que des génotypes recombinants (jonction *pol/cap*).

L'importance du portage des Entérovirus chez les patients atteints de DIA a été montré. La participation de ces Entérovirus (échévirus essentiellement) dans l'étiologie des DIA mérite d'être discutée et explorée plus avant. Le dogme des entérovirus à tropisme intestinal et neurologique peu ou non pourvoyeurs de diarrhées est peut-être à revoir, et devrait faire l'objet d'une enquête approfondie cas-témoins, qui permettrait de faire la part entre la fréquence des portages asymptomatiques et/ou les diarrhées dues à d'autres virus non détectables.

Les résultats de cette enquête entrent également dans une optique d'économie de la santé, par les conseils d'utilisation d'un traitement curatif adapté, en évitant le recours inutile aux antibiotiques permettant de réduire ainsi le coût de la prise en charge des DIA.

Le dépistage, l'identification, et l'épidémiologie moléculaire des virus entériques circulants dans cette région du monde méritent d'être poursuivis. Les axes principaux d'études à venir pourraient être la recherche de nouveaux sérotypes d'entérovirus, leur part dans l'étiologie des DIA, l'étude de la circulation des poliovirus dans la population générale djiboutienne, la caractérisation des HuCVs endémiques, en particulier des formes recombinantes, et le rôle d'éventuels réservoirs animaux.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - MELNICK M - Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses and newer enteroviruses. In Fields Virology, Fields et al.ed, Lippincott, Raven Publishers, Philadelphia 1996 : 655-712.
- 2 - BUISSON Y - Diarrhées infectieuses aiguës dans les Armées - Rapport technique du Comité Consultatif des Armées, 23 novembre 1998.
- 3 - VINJE J, KOOPMANS MP - Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996; **174** : 610-5.
- 4 - LE GUYADER F, ESTES MK, HARDY ME *et Coll* - Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses. *Arch Virol* 1996; **141** : 2225-35.
- 5 - NOEL JS, LIU BL, HUMPHREY CD *et Coll* - Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J Med Virol* 1997; **52** : 173-8.
- 6 - HAFLIGER D, GILGEN M, LUTHY J, HUBNER P - Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int J Food Microbiol* 1997; **37** : 27-36.
- 7 - KOJIMA S, KAGEYAMA T, FUKUSHI S *et Coll* - Genogroup-specific PCR primers for detection of Norwalk-like viruses. *J Virol Methods* 2002; **100** :107-14.
- 8 - MALEK MA, CURNS AT, HOLMAN RC *et Coll* - Diarrhea and rotavirus-associated hospitalizations among children less than 5 years of age: United States, 1997 and 2000. *Pediatrics* 2006; **117** : 1887-92.
- 9 - PHAN TG, KUROIWA T, KANESHI K *et Coll* - Changing distribution of norovirus genotypes and genetic analysis of recombinant GIIB among infants and children with diarrhea in Japan. *J Med Virol* 2006; **78** : 971-8.
- 10 - TIEMESSEN CT, WEGERHOFF FO, ERASMUS MJ, KIDD AH - Infection by enteric adenoviruses, rotaviruses, and other agents in a rural African environment. *J Med Virol* 1989; **28** : 176-82.
- 11 - OUATTARA-SORO FS, EKAZA E, KACOU-N'DOUBA A *et Coll* - Screening for Calicivirus in children under five years of age, in an Abidjan low-income district. *Med Mal Infect* 2004; **34** : 566-7.
- 12 - KOHLI E, BON F, FROMANTIN C *et Coll* - Gastro-entérites virales. *Spectra Biologie* 1999; **18** : 27-30.
- 13 - MICHEL R, NGUYEN DUC MANH J, BOUTIN JP *et Coll* - Diarrhées aiguës chez les militaires servant en Afrique centrale : aspects épidémiologiques en 1998. *Medecine et Armees* 2001; **29** : 487-92.
- 14 - CHENG AC, McDONALD JR, THIELMAN NM - Infectious diarrhea in developed and developing countries. *J Clin Gastroenterol* 2005; **39** : 757-73.
- 15 - KLEIN EJ, BOSTER DR, STAPP JR *et Coll* - Diarrhea etiology in a Children's Hospital Emergency department : a prospective cohort study. *Clin Infect Dis* 2006; **43** : 807-13.
- 16 - WILHELMI I, ROMAN E, SANCHEZ-FAUQUIER A - Virus causing gastroenteritis. *Clin Microbiol Infect* 2003; **9** : 247-62.
- 17 - MASLIN J, FOUET C, KOECK JL *et Coll* - Viral prevalence in adults from epidemic and sporadic acute diarrhoeas in Djibouti (Horn of Africa). P 549 - XVI International Congress for Tropical Medicine and Malaria. Marseille, France 2005.
- 18 - BASU G, ROSSOUW J, SEBUNYA TK *et Coll* - Prevalence of rotavirus, adenovirus and astrovirus infection in young children with gastroenteritis in Gaborone, Botswana. *East Afr Med J* 2003; **80** : 652-5.
- 19 - AUDU R, YABA C, OMILABU AS, PEENSE I, STEELE DA *et Coll* - Isolation and Identification of adenovirus recovered from the stool of children with diarrhoea in Lagos, Nigeria. *Afr J Health Sci* 2002; **9** : 105-11.

- 20 - BLANTON LH, ADAMS SM, SUZANNE BEARD R *et Coll* - Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *J Infect Dis* 2006; **193** : 413-21.
- 21 - HYAMS KC, BOURGEOIS AL, MERRELL BR *et Coll* - Diarrheal disease during Operation Desert Shield. *NEJM* 1991 ; **325** : 1423-8.
- 22 - KIRKWOOD CD, CLARK R, BOGDANOVIC-SAKRAN N *et Coll* - A 5-year study of the prevalence and genetic diversity of human caliciviruses associated with sporadic cases of acute gastroenteritis in young children admitted to hospital in Melbourne, Australia (1998-2002). *Infect Genet Evol* 2005 ; **3** : 281-90.
- 23 - FARKAS T, ZHONG WM, JING Y *et Coll* - Genetic diversity among sapoviruses. *Arch Virol* 2004; **149** : 1309-23.
- 24 - ZHENG D, ANDO T, GLASS R *et Coll* - Norovirus classification and proposed strain nomenclature. In Second International Calicivirus Conference, Dijon, 6-10 novembre 2004.
- 25 - AMBERT-BALAY K, BON F, LE GUYADER F *et Coll* - Characterization of new recombinant noroviruses. *J Clin Microbiol* 2005; **43** : 5179-86.
- 26 - OBERSTE MS, MAHER K, FLEMINSTER MR - Comparison of classic and molecular approaches for the identification of untypeable enteroviruses. *J Clin Microbiol* 2000; **38** : 1170-4.
- 27 - BARRANGER C, KABACHE N, CRETE N *et Coll* - Enterovirus detection through consensus amplification and microplate hybridization. Poster in European Society Of Clinical Virology, Ghent, Belgium, Janvier 2001.

Fiche d'inscription

XIII^e Actualités du Pharo

6, 7 et 8 septembre 2007
Vaccinologie tropicale

Nom, prénom :

Titre :

Grade (militaire) :

Institution :

Adresse :

Code postal :

Ville :

Pays :

Tél :

Fax :

Courriel :

Date :

Signature :

-Droits d'inscription* à régler par chèque libellé à l'ordre de « Actualités du Pharo »:

Avant le 31 mars 2007 : 75 €

Après le 31 mars 2007 : 90 €

Le jour du congrès : 100 €

Cette fiche d'inscription accompagnée de son règlement doit être adressée :

IMTSSA , XIII^e Actualités du Pharo, BP 46, 13998 Marseille armées

Tél : +33 (0)4 91 15 01 22 (86) • Fax : +33 (0)4 91 15 01 46 • Courriel : com@imtssa.fr

Renseignements pratiques et documents téléchargeables :

<http://www.actu-pharo.com/html/actu2007.html>