

3^{ème} congrès International et 13^{ème} journée de la Société Algérienne de Microbiologie Clinique
24 et 25 mai 2024, hôtel Marriott, Alger

S. CHIKHAOUI , A. BENYAHIA, A. LOUZRI, S. SELLAMI, D-L. ANES-BOULAHBAL
Laboratoire des Entérovirus, Laboratoire National de Référence OMS pour la Surveillance de la Poliomyélite.
Département de Virologie. Institut Pasteur d'Algérie

Introduction

Nous avons reçu en novembre 2023 les selles d'un enfant âgé de 5 ans, présentant un déficit immunitaire primaire (DIP) de type HLA-DR ayant reçu le vaccin Polio oral vivant à la naissance (VPO) et une première dose à deux mois selon le calendrier vaccinal en vigueur. Nous avons identifié dans les selles de l'enfant un Poliovirus (PV) vaccinal de type 1 discordant ou Sabin Like 1 (SL1) discordant. Le séquençage des isolats selon la méthode de Sanger a été effectué et l'analyse des chromatogrammes montre plusieurs double pics, indiquant la présence d'un mélange homotypique probable (figure 1). Après séparation du mélange, un variant du poliovirus vaccinal de type 1 (VDPV1) a été confirmé. Depuis nous recevons 2 prélèvements à fréquence mensuelle dans le cadre du suivi de cette excrétion selon les recommandations de l'OMS.

Matériel et méthode

1- Isolement viral et génotypage des poliovirus

L'isolement du poliovirus se fait sur culture de cellules RD, L20B selon l'algorithme de l'OMS, les cultures présentant un effet cytopathogène (figure 2) sont génotypés par RT-qPCR (DIT, VDPV) et la présence d'un PV1 vaccinal discordant est objectivée (figure 3 et 4).

2-Séparation par clonage par plages de lyse sous agarose

Des zones de lyse cellulaire localisées appelées plages (figure 5) apparaissent au sein d'une culture de cellules en monocouche HEP2 infectées par l'isolat viral dilué et recouvertes d'une fine couche de milieu gélosé (agarose). 10 plages (clones virales) sont prélevées, inoculés sur une culture de cellules RD.

3- Séquençage de la région VP1 par la technique de Sanger

Les clones sont amplifiés par RT-PCR one step (figure 6) et séquencés par la technique de Sanger. Le séquençage a été réalisée avec du BigDye Terminator v 3.1 en utilisant des amorces génériques et spécifiques du poliovirus de type 1. Les chromatogrammes obtenus sur le séquenceur SeqStudio Genetic Analyzer(Applied Biosystems) ont été analysés avec le logiciel Sequencher 5.2.4

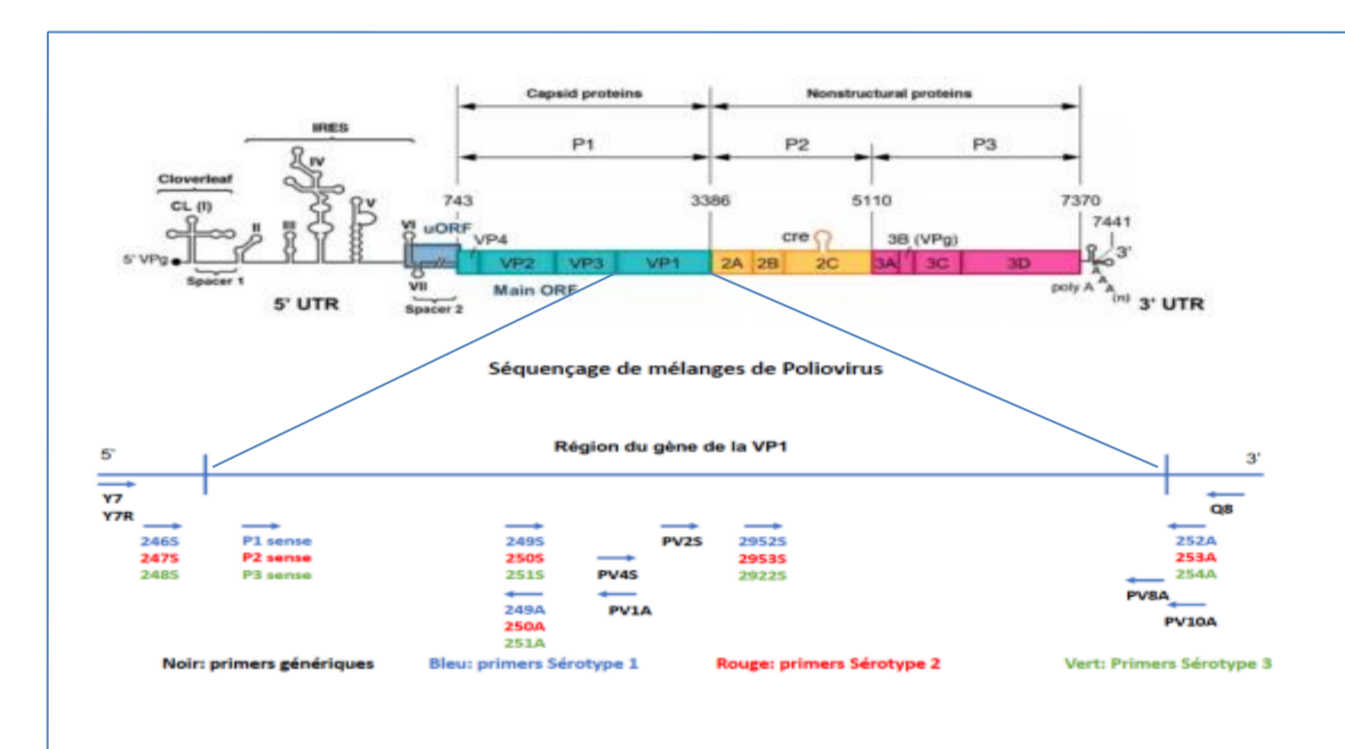


Figure 2: ECP sur RD

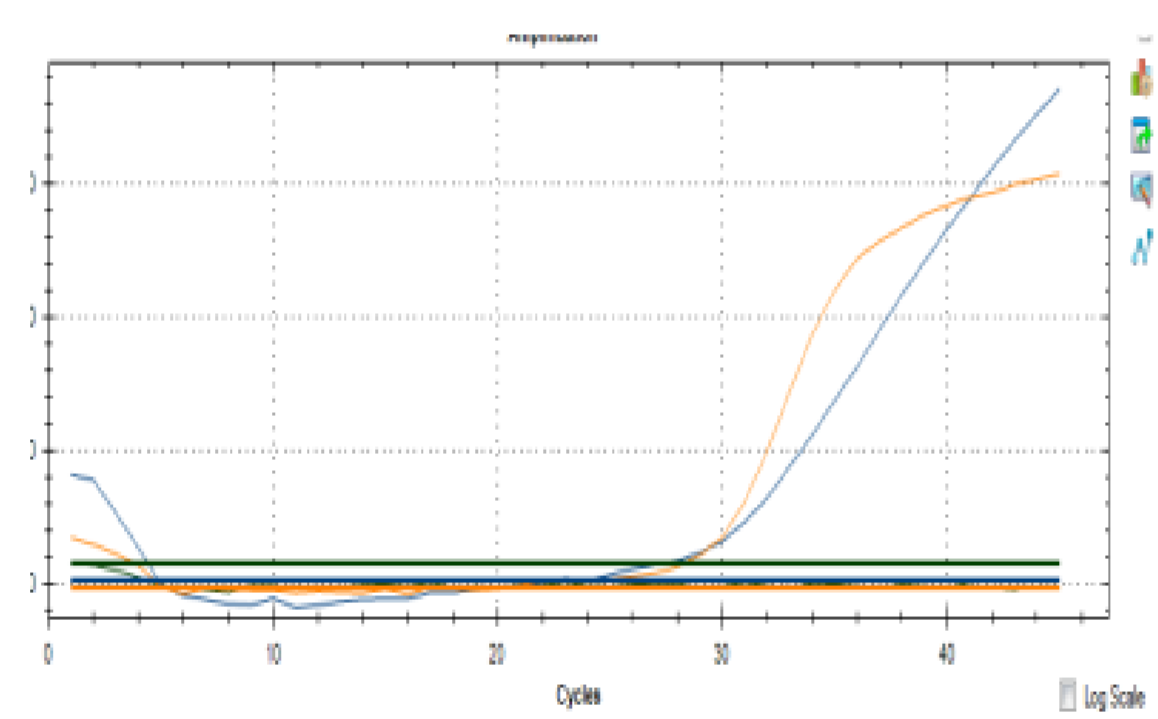


Figure 3: DIT de l'isolat SL1

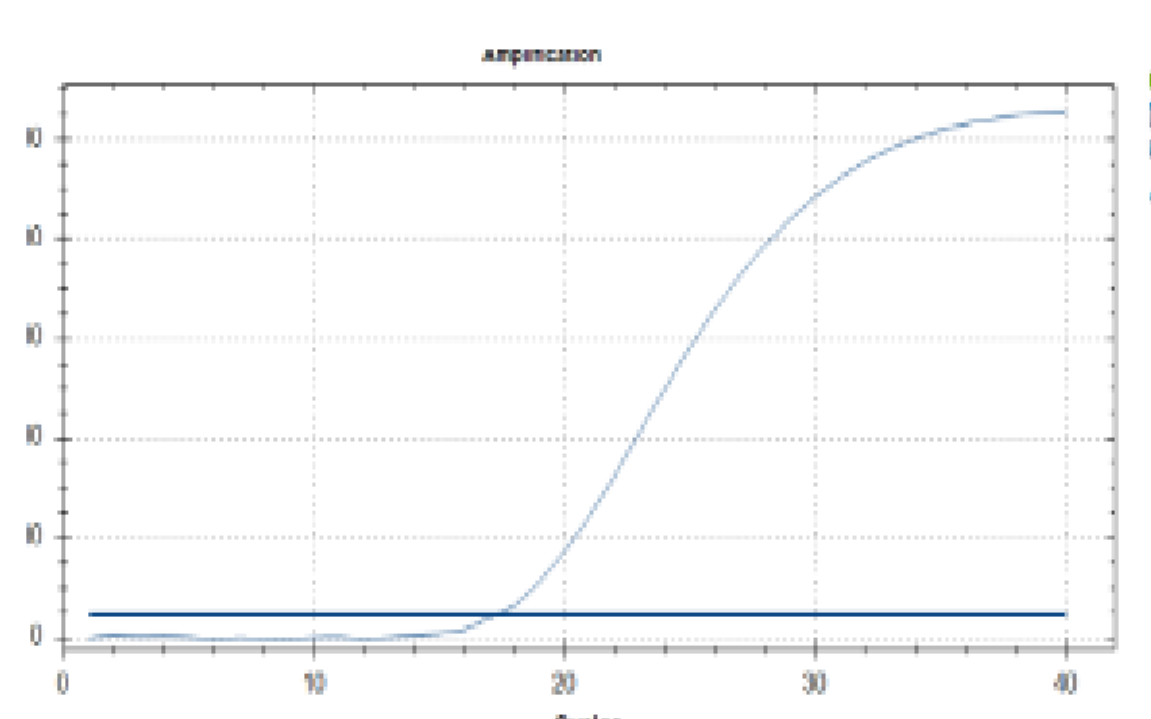


Figure 4: screening VDPV SL1 discordant

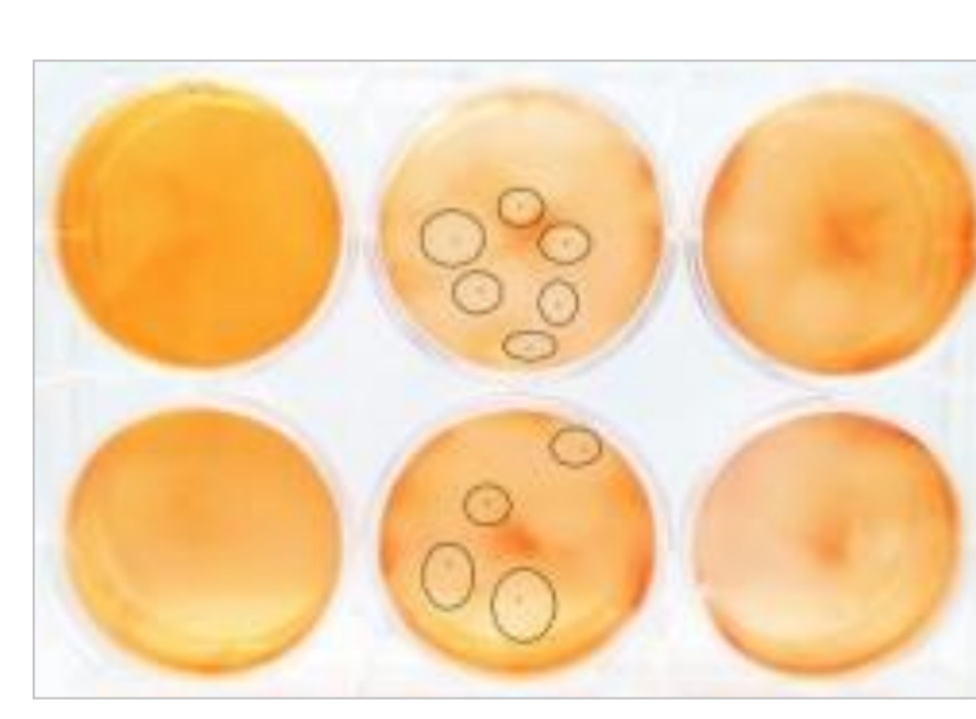


Figure 5: Plages de lyse colorées au rouge neutre

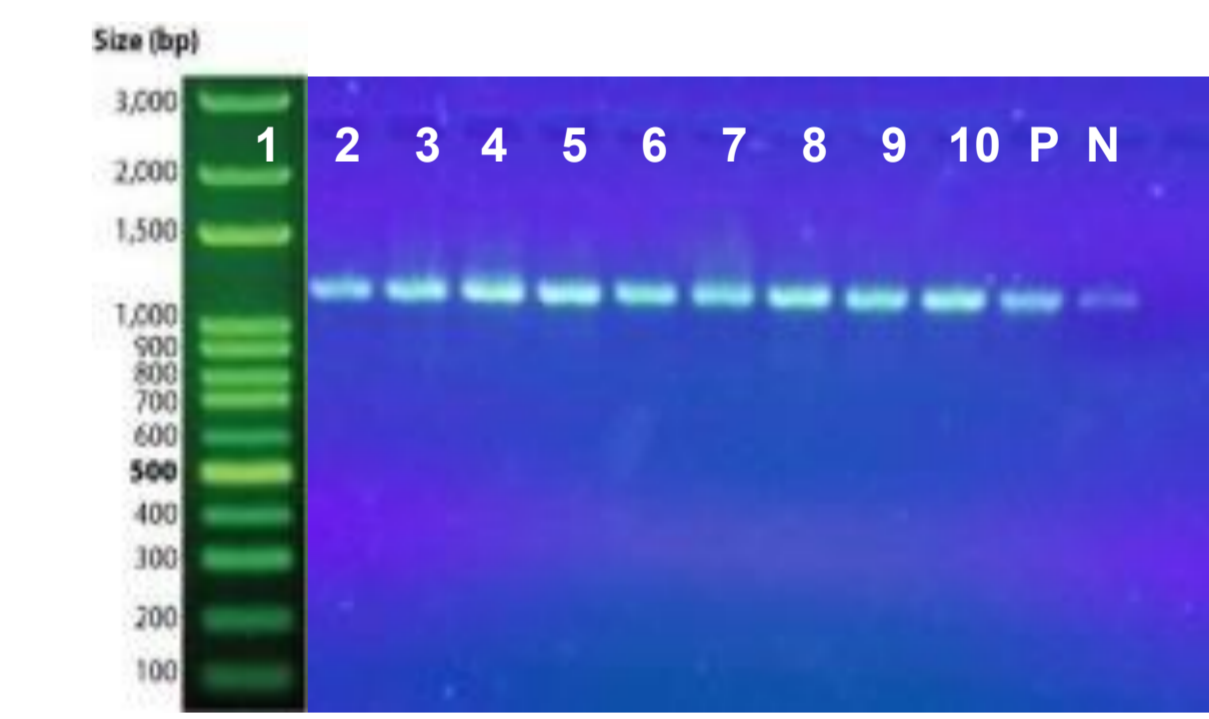


Figure 6: Gel de RT-PCR classique one- step des 10 clones

Résultats et discussions

La technique de clonage par plage de lyse nous a permis d'avoir des séquences avec des chromatogrammes à pics bien définis uniques sans bruit de fond (figure 7) ce qui a rendu leur analyse possible. Le mélange virale comprend 8 lignées du variant VDPV1. Chaque clone était différent en termes de nombre de mutations nucléotidiques qui dépassait les 10% dans la région VP1 du génome (selon la définition du VDPV). La présence d'un mélange homotypique a été de ce fait confirmée.

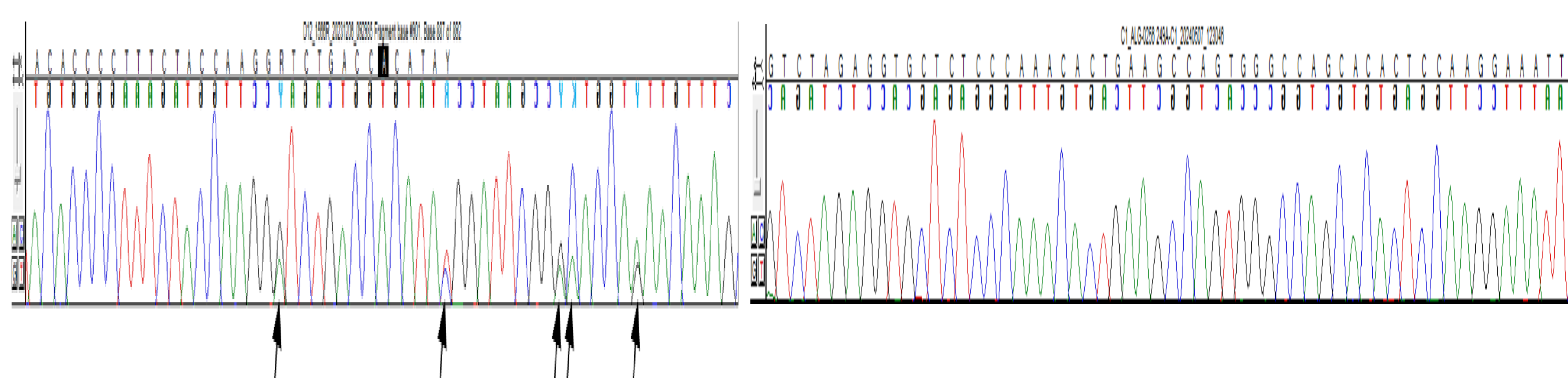


Figure1: Chromatogramme avec double pics avant séparation du mélange

Figure 7:Chromatogramme après séparation

Conclusion

La séparation des virus par la technique de clonage par plage de lyse est une technique de référence des virus cultivables. La présence de plusieurs lignées du même variant de PV1 (mélange homotypique) confirme le portage prolongé chez ce patient immunodéprimé. Conformément aux recommandations de l'OMS, il est important d'identifier les populations de DIP excrétrices de ces poliovirus à long terme. Les informations collectées sont essentielles pour identifier le risque de circulation du VDPV et élaborer des politiques de vaccination efficaces en vue d'éradiquer la poliomyélite.

Références bibliographiques

1. Polio laboratory Manual, 4th edition 2004,WHO,Geneva, Switzerland
2. Updates on ITD molecular assays and testing algorithm , version 1, Guidance paper 2, Global Polio Laboratory Network
3. Cours de virologie systematique, Manuel de TP, 2008 . Institut Pasteur, Francis Delperoux
4. Changes in Population Dynamics during Long-Term Evolution of Sabin Type 1 Poliovirus in an Immunodeficient Patient, JOURNAL OF VIROLOGY,
5. Rapid Group-, Serotype-, and Vaccine Strain-Specific Identification of Poliovirus Isolates by Real-Time Reverse Transcription-PCR Using Degenerate Primers and Probes Containing Deoxyinosine Residues. David R. Kilpatrick,Chen-Fu Yang,† Karen Ching, Annelet Vincent, Jane Iber, Ray Campagnoli,Mark Mandelbaum, Lina De, Su-Ju Yang, Allan Nix, and Olen M. Kew. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, June 2009
6. Classification and reporting of vaccine-derived polioviruses (VDPV) GPEI guidelines