

THESE

En vue de l'obtention du : **DOCTORAT**

Centre de Recherche : Centre de Génomique des Pathologies Humaines

Structure de Recherche : Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines

Discipline : Biologie

Spécialité : Virologie / Épidémiologie moléculaire

Présentée et soutenue le 29/12/2023 par :

Abderrahman BIMOUHEN

Étiologie virale des infections respiratoires et épidémiologie moléculaire du virus respiratoire syncytial au Maroc : une perspective dans le cadre du programme national de surveillance de la grippe.

JURY

| | | |
|----------------------------|--|-----------------------|
| Nadia DAKKA | PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat | Président/ Rapporteur |
| Rabii AMEZIANE EL HASSANI | PH, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat | Rapporteur/ Examineur |
| Moulay Abdelaziz EL ALAOUI | PH, Université Ibn Tofail, Ecole Supérieure de Technologie - Kénitra | Rapporteur/ Examineur |
| Bouchra BELKADI | PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat | Examineur |
| Hicham OUMZIL | PA, Université Mohammed V, Faculté de médecine et de pharmacie - Rabat | Co-directeur de Thèse |
| Youssef BAKRI | PES, Université Mohammed V, Faculté des Sciences - Rabat | Directeur de Thèse |

Année Universitaire : 2023/2024



DEDICACES

À mes parents

En témoignage de mon affection et de ma reconnaissance

*À ma petite famille
Khadija, Yahya et Fatima Ezzahrae*

*À mes chères Sœurs
Mina et Mariem*

*À mes chers frères
Faisal et Zakaria*

À tous ceux qui me sont chers.

REMERCIEMENTS

Au cours de mes études doctorales, j'ai eu l'occasion de travailler aux côtés de chercheurs éminents et de collaborer avec plusieurs laboratoires de virologie, me permettant ainsi de me familiariser avec les toutes dernières techniques de recherche dans ce domaine. Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à toutes les personnes que j'ai rencontrées au fil de ce parcours.

*Je tiens à exprimer ma gratitude envers mon Directeur de thèse, Monsieur **Youssef BAKRI**, Professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences de Rabat, qui a eu la gentillesse de superviser et de corriger mon travail. Je le remercie pour ses remarques pertinentes, aussi bien sur le fond que sur la forme de ce manuscrit.*

*J'exprime ma profonde gratitude envers Monsieur **Hicham OUMZIL**, Professeur Assistant à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat. Son assistance précieuse et son intérêt constant pour mon travail ont été d'une valeur inestimable. Son dynamisme et ses encouragements ont été des facteurs déterminants qui m'ont permis de persévérer. Ses compétences et sa disponibilité ont grandement contribué à la réussite de ce travail. Je lui adresse toute ma gratitude.*

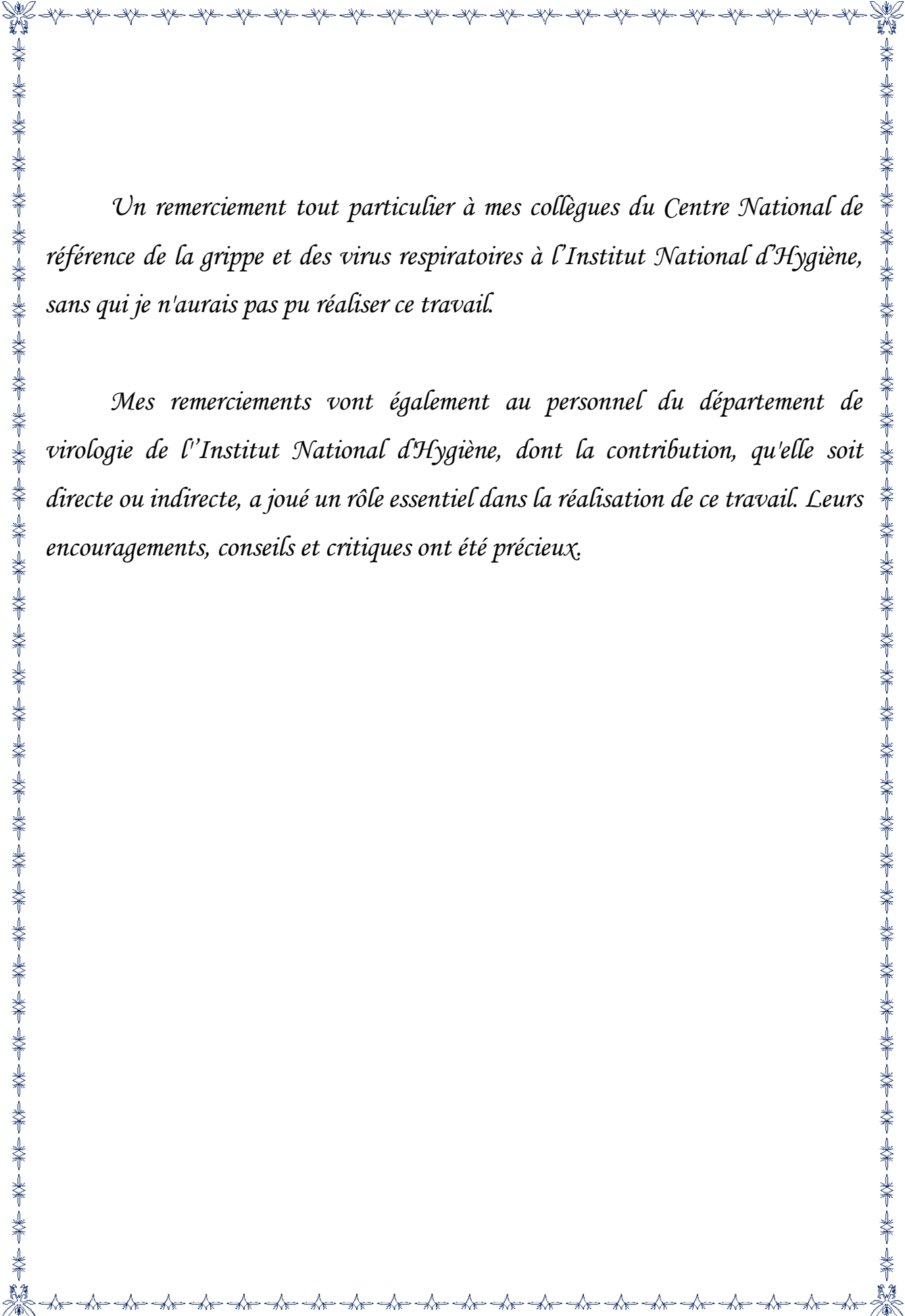
Je tiens également à remercier tous les membres de jury qui ont accepté d'évaluer mon projet de thèse.

*Je présente mes remerciements les plus sincères à Madame **Nadia DAKKA**, Professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences de Rabat et responsable du Laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines, qui m'a fait l'honneur d'accepter de présider mon jury de thèse. Je lui exprime ma profonde gratitude*

*Mes remerciements s'adressent aussi à Monsieur **Rabii AMEZIANE EL HASSANI**, Professeur Habilité à la faculté des sciences de Rabat, pour l'honneur qu'il me fait en prenant la charge de rapporteur et en siégeant à ce jury.*

*Je tiens à remercier également Monsieur **Moulay Abdelaziz EL ALAOUI**, professeur Habilité à l'école Supérieure de Technologie, Université Ibn Tofail, Kénitra, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et pour la rapidité avec laquelle il a lu mon manuscrit. Ses remarques pertinentes ont considérablement amélioré la qualité de ce manuscrit.*

*Je suis extrêmement reconnaissant à Madame **Bouchra BELKADI**, Professeur d'enseignement supérieur à la faculté des sciences de Rabat, d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse.*



Un remerciement tout particulier à mes collègues du Centre National de référence de la grippe et des virus respiratoires à l'Institut National d'Hygiène, sans qui je n'aurais pas pu réaliser ce travail.

Mes remerciements vont également au personnel du département de virologie de l'Institut National d'Hygiène, dont la contribution, qu'elle soit directe ou indirecte, a joué un rôle essentiel dans la réalisation de ce travail. Leurs encouragements, conseils et critiques ont été précieux.

Avant-propos

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés dans le cadre d'une collaboration entre le laboratoire de Biologie des Pathologies Humaines de la Faculté des Sciences de Rabat sous la direction du professeur Youssef BAKRI et le laboratoire de Virologie de l'Institut National d'Hygiène sous la direction du professeur Hicham OUMZIL, avec le soutien financier du Ministère de la Santé, de l'Organisation Mondiale de la Santé et du Centre de Contrôle des Maladies Infectieuses (CDC), Atlanta, USA (Grant numéro : 5U51CI000469).

Ce travail de thèse a permis de valoriser les résultats scientifiques obtenus lors d'une décennie de surveillance sentinelle des Infections Respiratoires Aigües à l'échelle nationale, ce qui lui a valu d'être publié dans des journaux à comité de lecture et présenté dans des congrès internationaux.



Productions scientifiques

Publications scientifiques dans des revues internationales à comité de lecture :

- **Bimouhen A**, Regragui Z, El Falaki F, Ihazmade H, Benkerroum S, Barakat A, Rguig A, Benamar T, Triki S, Bakri Y, Oumzil H. Circulation patterns and molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus over five consecutive seasons in Morocco. *Influenza Other Respir Viruses*. **2023** Oct 17;17(10):e13203. doi: 10.1111/irv.13203. PMID: 37859975; PMCID: PMC10582604.

- Zakia Regragui, **Abderrahman Bimouhen**, Fatima El Falaki, Hassan Ihazmade, Rokaya Ait-lhaj Mhand, Chaimae Remz, Abdelkarim Filali-Maltouf, Leila Medraoui, Hicham Oumzil. Respiratory pathogens circulation among non-reactive sars-cov2 patients during the covid-19 pandemic in morocco. **2023**. *Journal of medical pharmaceutical and allied sciences*, V 12 - I 6, Pages - 6209 – 6214. Doi: 10.55522/jmpas.V12I6.5666.

- EL Falaki F., **BIMOUHEN A**, REGRAGUI Z, IHAZMAD H, BAKRI Y AND OUMZIL H. GENOMIC VARIABILITY AND NEURAMINIDASE INHIBITOR DRUG SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF INFLUENZA A/H1N1PDM09 STRAINS CIRCULATING IN MOROCCO DURING THE 2015-2016 SEASON. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. **2023** Oct 01;12(10): <https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2023/12.10.7518>.

- Ezzine H, Regragui Z, Cherkaoui I, Naciri M, Filali-Maltouf A, Rguig A, Triki S, Elkholy A, **Bimouhen A**, Falaki F, Ihazmad H, Benamar T, Oumzil H, Youbi M. Factors associated with hospitalization for seasonal influenza in Morocco. *East Mediterr Health J*. **2023** Jun 27;29(6):442-450. doi: 10.26719/emhj.23.072. PMID: 37551756.

- Regragui Z, **Bimouhen A**, El Falaki F, Ihazmad H, Benkerroum S, Triki S, Cherkaoui I, Mahraoui C, Filali-Maltouf A, Medraoui L, Oumzil H. Influenza-associated severe acute respiratory infections among children under five years old in Morocco, September 2017 to March 2019. *Infez Med*. **2022** Sep 1;30(3):446-453. doi: 10.53854/liim-3003-14. PMID: 36148170; PMCID: PMC9448308.

- **Bimouhen A**, Regragui Z, El Falaki F, Ihazmade H, Benkerroum S, Cherkaoui I, Rguig A, Ezzine H, Benamar T, Triki S, Bakri Y, Oumzil H. Viral aetiology of influenza-like illnesses and severe acute respiratory illnesses in Morocco, September 2014 to December 2016. *J Glob Health*. **2022** Jul 23;12:04062. doi: 10.7189/jogh.12.04062. PMID: 35866188; PMCID: PMC9304922.

- Rguig A, Cherkaoui I, McCarron M, Oumzil H, Triki S, Elmbarki H, **Bimouhen A**, El Falaki F, Regragui Z, Ihazmad H, Nejari C, Youbi M. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in

Morocco. BMC Public Health. **2020** Jun 29;20(1):1029. doi: 10.1186/s12889-020-09145-y. PMID: 32600376; PMCID: PMC7323370.

- Ezzine H, Cherkaoui I, Rguig A, Oumzil H, Mrabet M, **Bimouhen A**, Falaki FE, Regragui Z, Tarhda Z, Youbi M, Naciri M. Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. Pan Afr Med J. **2020** Jul 7;36:159. doi: 10.11604/pamj.2020.36.159.21239. PMID: 32874423; PMCID: PMC7436631.

- **Bimouhen A**, El Falaki F, Ihazmad H, Regragui Z, Benkerroum S, Barakat A. Circulation of Respiratory Syncytial Virus in Morocco during 2014-2016: Findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza. East Mediterr Health J. **2016** Oct 2;22(7):483-490. PMID: 27714743.

- Elfalki F, Ihazmad H, **Bimouhen A**, Regragui Z, Benkaroum S, Bakri Y, Barakat A. Detection of influenza B viruses with reduced sensitivity to neuraminidase inhibitor in Morocco during 2014/15 season. East Mediterr Health J. **2016** Oct 2;22(7):453-459. PMID: 27714739.

Publications scientifiques dans des revus nationales à comité de lecture :

- Etude comparative de méthodes statistiques pour la détermination des seuils d'activité grippale au Maroc, 2004-2017. Rguig Ahmed, Cherkaoui Imad, Oumzil Hicham, Elmbarki Houria, **Bimouhen Abderrahman**, El Falaki Fatima, Soumia Triki, Tarhda Zineb, Chakib Nijjar, Maaroufi Abderrahmane. (Bulletin d'Epidémiologie et de Santé Publique / Volume 50 /N° 75/ ISSN08518238/ Février **2018**)

- Epidémiologie de la grippe et facteurs de risque d'Infection Respiratoire Aigue Sévère au Maroc, saisons 2016/2017 et 2017/2018. Ezzine Hind, Cherkaoui Imad, Oumzil Hicham, Mrabet Mouad, Rguig Ahmed, Soumia Triki, **Bimouhen Abderrahman**, El Falaki Fatima, Zakia Regragui, Naciri Mariam et Maaroufi Abderrahmane. (Bulletin d'Epidémiologie et de Santé Publique / Volume 50 /N° 76/ ISSN08518238/ Juillet **2018**)

Communications Orales :

- Fatima EL FALAKI, Zakia REGRAGUI, **Abderrahman BIMOUHEN**, Hassan IHAZMAD, Youssef BAKRI, Hicham OUMZIL. Molecular Evolution of Neuraminidase Gene (NA) of Seasonal Influenza A and B Virus in Morocco during 2009-2018. Congrès international: « The First International Congress of the Moroccan Society of Genomic and Human Genetics and the third edition of the School of Immunogenetics ». du 19-21 Décembre, **2019**, Agadir, Maroc.

- Hicham OUMZIL, Zakia REGRAGUI, **Abderrahman BIMOUHEN**, Hassan IHAZMAD, Samira BENKERROUM, Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Soumia TRIKI, Imad CHERKAOUI, Fatima El FALAKI, Detection and characterization of influenza virus from influenza-like illness cases in the private and public sentinel networks during the 2016-2019 influenza seasons in Morocco. Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network» du 12-15 Novembre **2019**, Casablanca, Maroc.

- Hassan IHAZMADE, Zakia REGRAGUI, **Abderrahman BIMOUHEN**, Samira BENKERROUM Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Fatima El FALAKI, Hicham OUMZIL. Assessment of the compliance of the national influenza center (MOROCCO) to the biorisk management standards of the CWA 15793:2011 Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network» du 12-15 Novembre **2019**, Casablanca, Maroc.

Communications affichées:

- **Bimouhen A**, F. El Falaki, H. Ihazmade, Z. Regragui, S. Benkerroum and A. Barakat Respiratory viruses associated with severe acute respiratory infection (SARI) among children under five years old in Morocco, during two seasons 2014-16. Congrès international. «International Conference on Epidemiology and Infectious Diseases (ICEID)» du 26 -29 Aout **2018**, Atlanta, USA.

- El Falaki Fatima, Ihazmade Hassan, **Bimouhen Abderrahman**, Regragui Zakia, Benkerroum Samira, Bakri Youssef, Barakat Amal and Oumzil Hicham. Genomic Variability and Neuraminidase Inhibitor Drug Susceptibility Profile of Influenza A/H1N1pdm09 Strains Circulating in Morocco during 2015-2016 Season. Congrès international. «International Conference on Epidemiology and Infectious Diseases (ICEID)» du 26 -29 Aout **2018**, Atlanta, USA.

- Zakia REGRAGUI, **Abderrahman BIMOUHEN**, Hassan IHAZMADE, Samira BENKERROUM, Abdelkarim FILALI-MALTOUF, Soumia TRIKI, Imad CHERKAOUI, Fatima El FALAKI, Hicham OUMZIL. Influenza-associated severe acute respiratory infections among children under five years old in Morocco from September 2017 to March 2019. Congrès international: «2nd Scientific Conference on Acute Respiratory Infection in the Eastern Mediterranean Region and the 5th Meeting of the Eastern Mediterranean Acute Respiratory Infection Surveillance (EMARIS) Network » du 12-15 novembre **2019**, Casablanca, Maroc.

Résumé

Les infections aiguës des voies respiratoires (IRAs) représentent une préoccupation majeure pour la santé publique, entraînant un taux de morbidité et de mortalité élevé au niveau mondiale. Au Maroc, les données concernant l'étiologie virale des IRAs demeurent rarissimes.

Dans le cadre du réseau national de surveillance de la grippe, des prélèvements respiratoires ont été collectés sur les sites sentinelles auprès de patients de tous âges présentant un syndrome grippal (SG) ou une infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) durant 3 saisons grippales (Septembre 2014 à Décembre 2016). Ces échantillons ont été investigués moyennant la réaction de polymérisation en chaîne pour détecter 16 virus respiratoires les plus courants. La détection virale et le sous-typage du virus respiratoire syncytial (HRSV) ont été étendus sur 5 années épidémiques (Septembre 2012 à Aout 2017), et la saisonnalité du HRSV dans le pays a été examinée. Un échantillonnage représentatif des prélèvements positifs pour le HRSV a été séquencé grâce aux techniques de séquençage nouvelle génération (NGS). L'analyse phylogénétique a été réalisée sur la deuxième partie hypervariable du gène G (HVR-2), et les génotypes ont été confirmés.

De septembre 2014 à décembre 2016, un total de 2009 échantillons ont été collectés. Un virus respiratoire au moins a été détecté dans 1423 (70,8%) de ces échantillons. Le virus de la grippe était le plus fréquemment détecté dans 612 (30,4%) des échantillons positifs, suivi du virus respiratoire syncytial (HRSV) dans 359 (17,9%), des rhinovirus (HRV) dans 263 (13,1%), et de l'adénovirus (HAdV) dans 124 (6,2%) échantillons. Le virus influenza prédominait chez les adultes 15-49 ans, avec une prévalence de 43,3%. En revanche, chez les enfants <5 ans, le HRSV était le virus le plus prévalent (37,6%). Le virus influenza, le HRSV et le métapneumovirus humain (HMPV) circulaient essentiellement pendant la saison froide, tandis que les autres virus étaient détectables tout au long de l'année. L'étude des 3679 échantillons collectés durant la période 2012/2017 confirme la prévalence du HRSV parmi les enfants marocains hospitalisés. La proportion d'infections respiratoires attribuables au HRSV parmi les nourrissons âgés de 0 à 6 mois était de 53% (303/572). La tendance saisonnière du HRSV a également été confirmée. En analysant phylogénétiquement les séquences, les génotypes HRSVA-ON1 et HRSVB-BA ont été les seuls détectés.

La présente étude suggère qu'environ 79% des infections respiratoires aiguës enregistrées chez des enfants < 5 ans au Maroc étaient dues à des infections virales, dont le HRSV représentait la part la plus importante, notamment chez les nourrissons. Cette étude constitue également le premier rapport sur la variabilité génétique du HRSV au Maroc basée sur une analyse partielle du gène G. Les résultats de ce travail permettront une meilleure compréhension de l'évolution des génotypes du HRSV et de leur circulation globale.

Mots clés : virus respiratoires, Infections respiratoires aiguës, variabilité génétique, épidémiologie moléculaire, virus respiratoire syncytial, gène G, Maroc.

Abstract

Acute respiratory tract infections (ARIs) represent a major public health concern, leading to high morbidity and mortality rates globally. In Morocco, data concerning the viral etiology of ARIs remains extremely rare.

As part of the national influenza surveillance network, respiratory samples were collected at sentinel sites from patients of all ages presenting with influenza-like illness (ILI) or severe acute respiratory infection (SARI) during 3 influenza seasons (September 2014 to December 2016). These samples were investigated using polymerase chain reaction to detect 16 most common respiratory viruses. Viral detection and subtyping of the Human respiratory syncytial virus (HRSV) were extended over 5 epidemic years (September 2012 to August 2017), and the seasonality of HRSV in the country was examined. A representative sampling of HRSV-positive samples was sequenced using next generation sequencing (NGS) techniques. Phylogenetic analysis was carried out on the second hypervariable part of the G gene, and the genotypes were confirmed.

From September 2014 to December 2016, a total of 2009 samples were collected. At least one respiratory virus was detected in 1423 (70.8%) of these samples. Influenza virus was most frequently detected in 612 (30.4%) of the positive samples, followed by (HRSV) in 359 (17.9%), rhinovirus (HRV) in 263 (13.1%), and Human adenovirus (HAdV) in 124 (6.2%) samples. The influenza virus predominated among adults 15-49 years old, with a prevalence of 43.3%. On the other hand, in children <5 years old, HRSV was the most prevalent virus (37.6%). The influenza virus, HRSV and Human metapneumovirus (HMPV) circulated mainly during the cold season, while the other viruses were detectable throughout the year. The study of 3679 samples collected during the period 2012/2017 confirms the prevalence of HRSV among hospitalized Moroccan children. The proportion of respiratory infections attributable to HRSV in infants aged 0 to 6 months was 53% (303/572). The seasonal trend of HRSV was also confirmed. By phylogenetically analyzing the sequences, the HRSVA-ON1 and HRSVB-BA genotypes were the only ones detected.

The present study suggests that approximately 79% of acute respiratory infections recorded in children < 5 years in Morocco were due to viral infections, of which HRSV represented the largest share, particularly in infants. This study also constitutes the first report on the genetic variability of HRSV in Morocco based on a partial analysis of the G gene. The results of this work will allow a better understanding of the evolution of HRSV genotypes and their overall circulation.

Key words: respiratory viruses, acute respiratory infections, genetic variability, molecular epidemiology, respiratory syncytial virus, G gene, Morocco.

ملخص

تمثل التهابات الجهاز التنفسي الحادة (ARIs) مصدر قلق كبير على الصحة العامة، بحيث تؤدي إلى ارتفاع معدلات الإصابة بالأمراض والوفيات على مستوى العالم. في المغرب، لا تزال البيانات المتعلقة بالمسببات الفيروسية لالتهابات الجهاز التنفسي الحادة نادرة للغاية.

كجزء من الشبكة الوطنية لرصد الأنفلونزا، تم جمع عينات الجهاز التنفسي في المواقع الخافرة من المرضى من جميع الأعمار الذين يعانون من أمراض شبيهة بالأنفلونزا أو عدوى الجهاز التنفسي الحادة الوخيمة خلال ثلاثة مواسم للأنفلونزا (سبتمبر 2014 إلى ديسمبر 2016). تم فحص هذه العينات باستخدام تفاعل البوليميراز المتسلسل للكشف عن 16 من فيروسات الجهاز التنفسي الأكثر شيوعاً. تم تمديد الكشف الفيروسي والتصنيف الفرعي للفيروس المخلوي التنفسي (HRSV) على مدى 5 سنوات وبائية (سبتمبر 2012 إلى أغسطس 2017)، وتم فحص موسمية HRSV على الصعيد الوطني. كما تمت دراسة تسلسل عينة تمثيلية من العينات الإيجابية لـ HRSV باستخدام تقنيات تسلسل الجيل التالي (NGS). تم إجراء تحليل التطور الوراثي على الجزء الثاني شديد التغير من الجين G ، وتم تأكيد الأنماط الجينية السائدة.

وفي الفترة من سبتمبر 2014 إلى ديسمبر 2016، تم جمع ما مجموعه 2009 عينة. وتم اكتشاف فيروس تنفسي واحد على الأقل في 1423 (70.8%) من هذه العينات. تم اكتشاف فيروس الأنفلونزا في أغلب الأحيان في 612 (30.4%) من العينات الإيجابية، يليه الفيروس المخلوي التنفسي (HRSV) في 359 (17.9%)، والفيروس الأنفي (HRV) في 263 (13.1%) والفيروس الغدي (HAdV) في 124 عينة (6.2%). ساد فيروس الأنفلونزا بين البالغين الذين تتراوح أعمارهم بين 15 و 49 عامًا، حيث بلغ معدل انتشاره 43.3%. من ناحية أخرى، كان فيروس HRSV هو الفيروس الأكثر انتشارًا عند الأطفال أقل من 5 سنوات (37.6%). ينتشر فيروس الأنفلونزا و HRSV وفيروس الميتانيمو البشري (HMPV) بشكل رئيسي خلال موسم البرد، بينما يمكن اكتشاف الفيروسات الأخرى على مدار العام. تؤكد دراسة 3679 عينة تم جمعها خلال الفترة 2017/2012 مدى انتشار فيروس HRSV بين الأطفال المغاربة المقيمين بالمستشفيات. كانت نسبة التهابات الجهاز التنفسي التي تعزى إلى فيروس HRSV عند الرضع الذين تتراوح أعمارهم بين 0 إلى 6 أشهر 53%. (572/303). كما تم تأكيد الاتجاه الموسمي لـ HRSV. من خلال تحليل شجرة تطور سلالات الفيروسات، كانت الأنماط الجينية HRSVA-ON1 و HRSVB-BA هي الوحيدة التي تم اكتشافها.

تشير الدراسة الحالية إلى أن ما يقارب 79% من التهابات الجهاز التنفسي الحادة المسجلة لدى الأطفال أقل من 5 سنوات في المغرب كانت بسبب العدوى الفيروسية، والتي يمثل فيروس HRSV الحصة الأكبر منها، خاصة عند الرضع. تشكل هذه الدراسة أيضًا التقرير الأول عن التباين الوراثي لفيروس HRSV في المغرب بناءً على تحليل جزئي للجين G. ستسمح نتائج هذا العمل بفهم أفضل لتطور الأنماط الجينية لـ HRSV وتداولها بشكل عام.

الكلمات المفتاحية: فيروسات الجهاز التنفسي، التهابات الجهاز التنفسي الحادة، التباين الوراثي، الوبائيات الجزيئية، الفيروس المخلوي التنفسي، الجين G ، المغرب.

ABRÉVIATIONS

| | |
|----------|--|
| VTM | : Virus de la mosaïque de tabac |
| ADN | : Acide désoxyribonucléique |
| ARN | : Acide ribonucléique |
| CDC | : Centers for Disease Control and Prevention |
| CMV | : Cytomégalovirus |
| DNTP | : Désoxyribonucléotide triphosphate |
| ECP | : Effet cytopathogène |
| FDA | : Food and Drug Administration (US) |
| GIP | : Global Influenza Program |
| GISRS | : Global Influenza Surveillance and Response System |
| HA | : Hémagglutinine |
| HAdV | : L'adénovirus humain |
| HBoV | : Bocavirus humain |
| HCoV | : Coronavirus humain |
| HMPV | : Le métapneumovirus humain |
| HPIV | : Les parainfluenza virus |
| HRSV | : Virus respiratoire syncytial |
| HRV | : Rhinovirus humain |
| HSV | : Herpès simplex virus |
| HVR-2 | : Région hypervariable2 |
| IF | : Immuno fluorescence |
| INH | : Institut Nationale d'Hygiène |
| IRA | : Infection respiratoire aigue |
| IRAS | : Infection respiratoire aiguë sévère |
| LRTI | : Infection respiratoire des voies respiratoires inferieures |
| MERS-CoV | : Coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient |
| NA | : Neuraminidase |
| NGS | : Séquençage nouvelle génération |
| NIC | : National Influenza Center |
| NP | : Nucléoprotéine |
| OMA | : Otite moyenne aigue |
| OMS | : Organisation Mondiale de la Santé |
| qRT-PCR | : Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR |
| SARS-CoV | : severe acute respiratory syndrome coronavirus |
| SG | : Syndrome grippal |
| TAANs | : Tests d'amplification des acides nucléiques |
| TDR | : Test de diagnostic rapide |
| URTI | : Infection respiratoire aigüe des voies respiratoires supérieures |

Codes et abréviations des Acides Aminés

| Nom complet de l'acide aminé | Code à une lettre | Code à trois lettres |
|--------------------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Alanine | A | Ala |
| Arginine | R | Arg |
| Asparagine | N | Asn |
| Aspartate ou acide aspartique | D | Asp |
| Cystéine | C | cys |
| Glutamine | Q | Gln |
| Glycine | G | Gly |
| Histidine | H | His |
| Isoleucine | I | Ile |
| Leucine | L | Leu |
| Lysine | K | Lys |
| Méthionine | M | Met |
| Phénylalanine | F | Phe |
| Proline | P | Pro |
| Sérine | S | Ser |
| Thréonine | T | Thr |
| Tryptophane | W | Trp |
| Tyrosine | Y | Tyr |
| Valine | V | Val |

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1 : Illustration schématique de la structure d'un virus icosaédrique non enveloppé (A) et d'un virus hélicoïdal enveloppé (B) | 7 |
| Figure 2 : Schéma général de réplication virale. | 10 |
| Figure 3 : Les principaux modes de transmission des virus respiratoires. | 11 |
| Figure 4 : schéma anatomique des principales composantes du système respiratoire supérieur et inférieur..... | 12 |
| Figure 5 : Un diagramme schématique de la structure de l'Adénovirus..... | 22 |
| Figure 6 : Schéma de la structure de la particule du virus de la grippe A. | 26 |
| Figure 7 : Schéma général du cycle de réplication du virus de la grippe | 29 |
| Figure 8 : Famille des Paramyxoviridae..... | 33 |
| Figure 9 : A image d'un virion HRSV en microscopie électronique ;B : Schéma général du virion d'un Paramyxovirus | 34 |
| Figure 10 : Représentation schématique du gène codant la glycoprotéine G. | 36 |
| Figure 11 : schéma général de du cycle de réplication du HRSV..... | 38 |
| Figure 12 : schéma d'un virus Parainfluenza humain..... | 46 |
| Figure 13 : schéma d'un virion du Rhinovirus humain | 49 |
| Figure 14 : schéma d'un virion de Coronavirus humain..... | 54 |
| Figure 15 : La cinétique de la réaction PCR | 62 |
| Figure 16 : Hydrolyse de sondes TaqMan | 64 |
| Figure 17 : Diagramme schématique représentant les étapes de base du (NGS). | 65 |
| Figure 18 : Répartition géographique des sites sentinelles de la surveillance des cas de SG et IRAS au Maroc | 72 |
| Figure 19 : Flux de travail adopté au cours de cette étude..... | 73 |
| Figure 20 : (A) : Instrument de purification des acides nucléiques iPrep® ; (B) : le kit « iPrep™ PureLink virus Kit » | 75 |
| Figure 21 : Schéma des étapes de purification des acides nucléiques avec la méthode des billes « Dynabeads® MyOne™ SILANE » | 75 |
| Figure 22 : Le thermocycleur Prism SDS 7500 FAST ABI..... | 76 |
| Figure 23 : Algorithme de détection et d'identification des virus grippaux par qRT-PCR..... | 77 |
| Figure 24 : Schéma de plaque PCR pour le typage des virus grippaux A/B par qRT-PCR..... | 78 |
| Figure 25 : Aspect des courbes obtenues par qRT-PCR d'un contrôle négatif et un contrôle positif pour chacun des sous-types du coronavirus humain | 79 |
| Figure 26 : Taux de positivité et fréquences de détection des virus respiratoires, 2014-2016 | 85 |
| Figure 27 : prévalence des virus respiratoires prédominants détectés au Maroc, 2014-2016. | 90 |
| Figure 28 : les cas positifs du HRSV détectés, détaillés par tranches d'âge et syndrome IRAS/SG, Maroc. 2012-2017 | 97 |
| Figure 29 : Circulation des sous-types HRSV-A et HRSV-B au Maroc. 2012-2017..... | 98 |
| Figure 30 : Circulation du HRSV et du virus grippal entre 2012 et 2017 au Maroc..... | 99 |
| Figure 31 : Arbre phylogénétique de la région HVR-2 du G gène de 56 accessions HRSV type A. | 104 |
| Figure 32 : Arbre phylogénétique de la HVR-2 du G gène de 71 accessions HRSV type B..... | 105 |
| Figure 33 : Alignement des séquences d'acides aminés déduites de la région HVR-2 des souches marocaines de HRSV..... | 108 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Caractéristiques des principales Familles de virus infectant l'Homme. | 08 |
| Tableau 2 : Espèces et sérotypes/types reconnus de l'Adénovirus humain. | 23 |
| Tableau 3 : Les segments génomiques du virus de la grippe A et leurs protéines codées | 28 |
| Tableau 4 : Historique des pandémies grippales chez l'homme | 30 |
| Tableau 5 : Description des protéines virales du HRSV et de leurs fonctions..... | 37 |
| Tableau 6 : Les lignées Cellulaires pour l'isolement des virus respiratoires | 57 |
| Tableau 7 : Les Principaux caractères des différentes techniques de diagnostic direct des infections virales respiratoires | 60 |
| Tableau 8 : Différentes variantes de PCR disponibles pour le diagnostic viral | 61 |
| Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel. | 77 |
| Tableau 10 : Critères d'interprétation d'un test de typage/sous typage du virus de la grippe par qRT-PCR..... | 78 |
| Tableau 11 : Liste des Virus respiratoires non grippaux investigués par qRT-PCR monoplex | 79 |
| Tableau 12 : Séquences oligonucléotidiques des amorces et sondes soutypage HRSV | 80 |
| Tableau 13 : Caractéristiques démographiques des patients ayant un syndrome grippal et infection respiratoire aiguë sévère, Maroc, 2014-16. | 85 |
| Tableau 14 : Fréquences de détection des virus respiratoires par tranche d'âge durant 2014-16. | 86 |
| Tableau 15 : Prévalence des virus respiratoires les plus fréquents par tranche d'âge et syndrome Maroc, 2014 -16 | 87 |
| Tableau 16 : Répartition des codétectons des virus respiratoires. Maroc, 2014 -16..... | 88 |
| Tableau 17 : Nombre et taux d'échantillons positifs par virus et symptôme clinique, Maroc, septembre 2014 – décembre 2016 | 89 |
| Tableau 18 : Corrélation des facteurs Age, sexe, et syndrome avec les détections positives des virus respiratoires les plus dominants. Maroc, septembre 2014 – décembre 2016 | 89 |
| Tableau 19 : Caractéristiques démographiques et cliniques des cas (SG) et (IRAS) par statut d'infection au HRSV, Maroc, 2012-2017 | 96 |

Table des matières

| | |
|--|------|
| DEDICACES | I |
| REMERCIEMENTS | II |
| AVANT-PROPOS | V |
| PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES | VI |
| RÉSUMÉ | IX |
| ABSTRACT | X |
| ملخص..... | XI |
| ABRÉVIATIONS | XII |
| CODES ET ABRÉVIATIONS DES ACIDES AMINÉS | XIII |
| LISTE DES FIGURES..... | XIV |
| LISTE DES TABLEAUX | XV |
| TABLE DES MATIÈRES | XVI |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| OBJECTIF GÉNÉRAL :..... | 3 |
| OBJECTIFS SPÉCIFIQUES : | 3 |
| CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE | 4 |
| I. GÉNÉRALITÉS :..... | 5 |
| 1. <i>Historique</i> : | 5 |
| 2. <i>Structure et classification virale</i> :..... | 5 |
| 3. <i>Cycle de réplication viral</i> :..... | 8 |
| II. LES VIRUS RESPIRATOIRES :..... | 11 |
| 1. <i>Les modes de transmission des virus respiratoires</i> : | 11 |
| 2. <i>Les infections virales des voies respiratoires</i> :..... | 12 |
| 2.1 Les infections des voies respiratoires supérieures (URTIs) :..... | 13 |
| 2.1.1. La rhinite infectieuse (rhume) : | 13 |
| 2.1.2. La pharyngite aiguë : | 13 |
| 2.1.3. La Laryngotrachéite : | 14 |
| 2.1.4. L'otite : | 14 |
| 2.1.5. La sinusite : | 15 |
| 2.2 Infections des voies respiratoires inférieures (LRTIs) : | 15 |
| 2.2.1. La bronchite et bronchiolite : | 15 |
| 2.2.2. La pneumonie : | 16 |
| 2.3 Les symptômes extra-respiratoires d'une infection respiratoire virale : | 17 |
| 2.3.1. Les convulsions : | 17 |
| 2.3.2. L'encéphalite : | 17 |
| 2.3.3. Troubles gastriques : | 18 |
| 2.3.4. La myosite : | 18 |
| 2.3.5. La myocardite : | 18 |
| 3. <i>Facteurs de risques d'une infection respiratoire virale</i> :..... | 19 |
| 3.1 L'âge, la prématurité et faible poids à la naissance : | 19 |

| | | |
|--------|--|----|
| 3.2 | Le sexe masculin : | 19 |
| 3.3 | La promiscuité : | 20 |
| 3.4 | Les facteurs socio-économiques et environnementaux : | 20 |
| 3.5 | Les troubles neurologiques : | 20 |
| 3.6 | Les troubles cardiopulmonaires : | 21 |
| 3.7 | Les troubles immuno-hématologiques : | 21 |
| 3.8 | Autres facteurs de risques : | 21 |
| 4. | <i>Les principaux virus respiratoires</i> : | 21 |
| 4.1 | Adénovirus : | 22 |
| 4.1.1. | Taxonomie et structure virale : | 22 |
| 4.1.2. | Cycle de réplication : | 23 |
| 4.1.3. | Transmission et épidémiologie : | 24 |
| 4.1.4. | Manifestations cliniques : | 24 |
| 4.1.5. | Prophylaxie et traitement : | 25 |
| 4.2 | Le virus de la grippe : | 25 |
| 4.2.1. | Taxonomie et structure virale : | 26 |
| 4.2.2. | Cycle de réplication : | 28 |
| 4.2.3. | Transmission et épidémiologie : | 30 |
| 4.2.4. | Manifestations cliniques : | 31 |
| 4.2.5. | Prophylaxie et traitement : | 32 |
| 4.3 | Le virus respiratoire syncytial (HRSV) : | 33 |
| 4.3.1. | Taxonomie et structure virale : | 33 |
| 4.3.2. | Cycle de réplication : | 37 |
| 4.3.3. | Transmission et épidémiologie : | 38 |
| 4.3.4. | Manifestations cliniques : | 40 |
| 4.3.5. | Prophylaxie et traitement : | 41 |
| 4.4 | Le métapneumovirus humain (HMPV) : | 43 |
| 4.4.1. | Taxonomie et structure virale : | 43 |
| 4.4.2. | Cycle de réplication : | 44 |
| 4.4.3. | Transmission et épidémiologie : | 44 |
| 4.4.4. | Manifestations cliniques : | 44 |
| 4.4.5. | Prophylaxie et traitement : | 45 |
| 4.5 | Les Parainfluenza virus (HPIVs) : | 45 |
| 4.5.1. | Taxonomie et structure virale : | 45 |
| 4.5.2. | Cycle de réplication : | 46 |
| 4.5.3. | Transmission et épidémiologie : | 46 |
| 4.5.4. | Manifestations cliniques : | 47 |
| 4.5.5. | Prophylaxie et traitement : | 48 |
| 4.6 | Les Rhinovirus humains : | 48 |
| 4.6.1. | Taxonomie et structure virale : | 49 |
| 4.6.2. | Cycle de réplication : | 49 |
| 4.6.3. | Transmission et épidémiologie : | 50 |
| 4.6.4. | Manifestations cliniques : | 50 |
| 4.6.5. | Prophylaxie et traitement : | 51 |
| 4.7 | Le Bocavirus humain (HBoV) : | 51 |
| 4.7.1. | Taxonomie et structure virale : | 51 |
| 4.7.2. | Cycle de réplication : | 52 |
| 4.7.3. | Transmission et épidémiologie : | 52 |
| 4.7.4. | Manifestations cliniques : | 52 |
| 4.7.5. | Prophylaxie et traitement : | 53 |
| 4.8 | Les Coronavirus humains : | 53 |
| 4.8.1. | Taxonomie et structure virale : | 53 |
| 4.8.2. | Cycle de réplication : | 54 |
| 4.8.3. | Transmission et épidémiologie : | 54 |
| 4.8.4. | Manifestations cliniques : | 55 |

| | |
|---|-----------|
| 4.8.5. Prophylaxie et traitement : | 55 |
| 5. <i>Les méthodes de diagnostic</i> : | 56 |
| 5.1 La culture virale : | 57 |
| 5.2 Tests de diagnostic rapide (TDR) : | 58 |
| 5.3 Immunofluorescence directe : | 58 |
| 5.4 La biologie moléculaire : | 59 |
| 5.4.1. La PCR ou RT-PCR : | 60 |
| 5.4.2. La qPCR ou qRT-PCR : | 62 |
| 5.4.3. Le séquençage génomique : | 64 |
| III. PROGRAMME DE SURVEILLANCE DES VIRUS RESPIRATOIRES : | 66 |
| 1. <i>A l'échelle mondiale</i> : | 67 |
| 2. <i>Au Maroc</i> : | 68 |
| CHAPITRE II : MATÉRIEL ET MÉTHODES | 70 |
| I. POPULATION DE L'ÉTUDE : | 71 |
| 1. <i>Définitions de cas</i> : | 71 |
| 2. <i>Conception de l'étude</i> : | 71 |
| 3. <i>Nature des échantillons</i> : | 72 |
| 4. <i>Approche générale</i> : | 73 |
| 4.1 Recueil et traitement des données : | 74 |
| 4.2 Considérations éthiques : | 74 |
| II. PROCÉDURES DE LABORATOIRE : | 74 |
| 1. <i>Extraction des acides nucléiques</i> : | 74 |
| 2. <i>Détection des virus respiratoires</i> : | 76 |
| 2.1 Panel qRT-PCR pour la détection de la grippe A/B : | 76 |
| 2.2 Panel qRT-PCR pour le soutypage du HRSV : | 80 |
| 3. <i>Amplification et Séquençage du génome du HRSV</i> : | 80 |
| 3.1 Sélection des échantillons : | 80 |
| 3.2 Règles de nomenclature des séquences : | 81 |
| 3.3 Disponibilité des données | 81 |
| 4. <i>Analyse phylogénétique</i> : | 81 |
| CHAPITRE III : RÉSULTATS ET DISCUSSION | 83 |
| I. ETIOLOGIE VIRALE DES INFECTIONS RESPIRATOIRES AU MAROC DURANT 2014-2016 : | 84 |
| 1. <i>Résultats</i> : | 84 |
| • <i>Données démographiques</i> : | 84 |
| • <i>Détection virale</i> : | 84 |
| • <i>Présentation clinique</i> : | 88 |
| • <i>Facteurs de risque</i> : | 89 |
| • <i>Saisonnalité</i> : | 90 |
| 2. <i>Discussion</i> : | 91 |
| II. EPIDÉMIOLOGIE DES INFECTIONS À HRSV AU MAROC DE 2012 À 2017 : | 95 |
| 1. <i>Résultats</i> : | 95 |
| • <i>Données démographiques</i> : | 95 |
| • <i>Détection virale</i> : | 97 |
| • <i>Présentation clinique</i> : | 98 |
| • <i>Facteurs de risque</i> : | 99 |
| • <i>Saisonnalité</i> : | 99 |
| 2. <i>Discussion</i> : | 100 |
| III. PHYLOGÉNIE DU HRSV ET LES GÉNOTYPES CIRCULANTS AU MAROC DE 2012 À 2017 : | 103 |
| 1. <i>Résultats</i> : | 103 |

| | | |
|--|---|------------|
| • | <i>Arbre phylogénétique</i> : | 103 |
| • | <i>Polymorphisme nucléotidique et protéique</i> : | 106 |
| • | <i>Analyse mutationnelle</i> : | 106 |
| • | <i>Profils N-glycosylation</i> : | 107 |
| • | <i>Profils O-glycosylation</i> : | 109 |
| 2. | <i>Discussion</i> : | 109 |
| CHAPITRE IV : CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES | | 113 |
| I. | CONCLUSION GÉNÉRALE : | 114 |
| II. | PERSPECTIVES DE L'ÉTUDE : | 117 |
| PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES | | 119 |
| RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES | | 202 |
| ANNEXES | | 225 |

Introduction

Les infections aiguës des voies respiratoires (IRAs) sont l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde et constituent une cible importante pour les interventions de santé publique.

Les IRAs sont classées selon leur symptomatologie et leur localisation anatomique (Baron, 1996). Alors que les infections des voies respiratoires supérieures (URTIs) sont généralement bénignes et spontanément résolutive, les infections des voies respiratoires inférieures (LRTIs) peuvent être redoutables, voire mortelles, chez les enfants de bas âge et les adultes âgées souffrant d'affections sous-jacentes. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), les infections des voies respiratoires inférieures restent la maladie transmissible la plus mortelle au monde en 2019, classée au quatrième rang des causes de décès avec 2,6 millions de cas (OMS, 2020).

Quoiqu'une infection respiratoire puisse être causée par des bactéries ou des champignons, l'étiologie virale est la prédominante (Leruez-Ville, 2007). Les virus les plus fréquemment associés aux IRAs comprennent le virus Influenza, le virus respiratoire syncytial, les rhinovirus, les virus parainfluenza, le métapneumovirus, les adénovirus (HAdVs), les coronavirus, et les bocavirus humains (Leung, 2021). À côté de ces virus courants s'ajoutent des virus émergents issus des réservoirs animaux. Ces zoonoses peuvent causer des émergences de maladies graves chez l'homme, avec des conséquences sanitaires et économiques majeures. Des exemples incluent le SARS-CoV-1, le MERS-CoV et le récemment apparu SARS-CoV-2 (Guarner, 2020).

Bien que l'épidémiologie de la grippe et d'autres virus respiratoires soit bien caractérisée dans de nombreuses régions du monde, les données disponibles dans la région du Moyen-Orient et de l'Afrique du Nord (MENA) sont limitées (Soudani et *al.*, 2022). La collecte de données précises sur la prévalence et la distribution épidémiologique des virus respiratoires via un système de surveillance est déterminante pour la santé publique en général et a des implications importantes pour la prévention et le contrôle des maladies (Manuguerra et Hannoun, 1999).

Ces études de surveillance virale sont également cruciales pour orienter les stratégies de prophylaxie virale. Par exemple, la surveillance des pics du virus respiratoire syncytial est essentielle pour suivre la saisonnalité de ce virus et planifier la période optimale d'administration de la prophylaxie chez les enfants vulnérables (Fox, 2007). En ce qui concerne la grippe, la surveillance revêt d'une importance particulière pour la conception de vaccins adaptés, la planification des campagnes vaccinales et la détection de virus émergents. La stratégie de surveillance des affections virales des voies respiratoires a le potentiel de réduire à la fois les coûts de santé et la morbidité ainsi que la mortalité liée à ces infections (OMS, 2019a).

Alors que les efforts de surveillance virale au Maroc se sont intensifiés ces dernières années, la plupart se sont concentrées sur la surveillance de la grippe, cela a permis la collecte de données épidémiologiques et virologiques nécessaires pour assurer un meilleur contrôle de la maladie due au virus grippal (Barakat et *al.*, 2011). Cependant, peu de données existe concernant l'épidémiologie des virus respiratoires non grippaux et à potentiel épidémique.

Parmi tous les virus non grippaux, le virus respiratoire syncytial (HRSV) occupe une place prépondérante en tant que principale cause de LRTIs chez les enfants (Hall et *al.*, 2009). En 2019, ce virus a été responsable de près de 33 millions d'infections sévères chez les enfants de moins de cinq ans, entraînant environ 3,2 millions d'hospitalisations et causant environ 118 200 décès chez cette tranche d'âge à l'échelle mondiale (OMS, 2020). Le HRSV ne ménage pas non plus la population âgée, comme en témoigne une étude menée aux États-Unis qui a estimé à 177 000 le nombre annuel d'hospitalisations dues au HRSV au sein de la population âgée de plus de 65 ans (Thompson et *al.*, 2003).

Malgré l'importance du HRSV en tant qu'agent pathogène, les premiers vaccins contre ce virus, tels qu'Abrysvo™ et Arexvy™, viennent seulement d'être mis sur le marché. Leur diffusion à grande échelle est encore en cours pour démontrer leur efficacité saison après saison et tester leur innocuité à une échelle plus vaste. La réussite de cette future stratégie vaccinale nécessitera une compréhension approfondie des tendances de circulation du virus, de sa saisonnalité, des groupes à risque, ainsi qu'une analyse approfondie de l'évolution génétique des souches de HRSV. D'où la nécessité de mener des études de prévalence et d'épidémiologie moléculaires du virus.

Les efforts de l'Organisation mondiale de la santé se concentrent sur l'intégration du HRSV à la plateforme de surveillance de la grippe existante, le Système mondial de

surveillance et de réponse à la grippe (GISRS) de l'(OMS). Cette intégration vise à obtenir une meilleure compréhension du fardeau de la maladie liée au HRSV au sein de différentes populations, sans perturber le fonctionnement du réseau de surveillance de la grippe actuel.

Le pouvoir pathogène significatif du HRSV, associé aux limites des options pharmaceutiques actuelles pour traiter les formes sévères de l'infection, souligne l'importance de mettre en place un système de surveillance du HRSV. Les informations ainsi obtenues sont cruciales pour orienter les décisions relatives aux recommandations thérapeutiques, aux stratégies de prophylaxie et à la gestion des épidémies virales.

- **Objectif général :**

Il s'agit de la première étude à l'échelle nationale, réalisée dans le cadre du programme national de veille contre le virus de la grippe, et dont l'objectif principal était de décrire la prévalence et les tendances de circulation des virus respiratoires responsables d'IRAS et de SG au sein de la population globale, pendant une période de trois saisons grippales. Parallèlement, elle vise à examiner la saisonnalité et l'épidémiologie moléculaire du virus respiratoire syncytial au cours de cinq saisons consécutives.

- **Objectifs spécifiques :**

Cette étude a été réalisée dans le but d'atteindre trois objectifs spécifiques :

1. Décrire l'étiologie virale des infections respiratoires au Maroc durant 2014-2016.
2. Etudier l'épidémiologie des infections à virus respiratoire syncytial au Maroc de 2012 à 2017.
3. Etudier la phylogénie du virus respiratoire syncytial et les géotypes circulants au Maroc de 2012 à 2017.



*Chapitre I : Revue
bibliographique*



I. Généralités :

1. Historique :

La première découverte des virus comme entité distincte des bactéries et autres agents infectieux cellulaires date de la fin du 19^{ème} siècle. En effet, le chercheur Dimitri Iwanowski avait montré en 1892 le caractère filtrable de l'agent de la mosaïque de tabac par passage au travers d'une bougie de porcelaine (filtre de Chamberland), tout en concluant à tort qu'il s'agissait d'une bactérie de petite taille (Dimmock et *al.*, 2008; Lansing M. Prescott, 2002).

Les résultats d'autres recherches approfondies sur la mosaïque du tabac menée indépendamment de celle d'Iwanowski entre 1898 et 1900 ont permis à Martinus W. Beijerinck de conclure que la maladie était causée par une entité différente des bactéries : Un virus filtrable (Agut, 2022; Lansing M. Prescott, 2002). Il a observé que le virus ne se multipliait que dans les cellules végétales vivantes, mais pouvait survivre pendant de longues périodes à l'état séché. A l'issue des travaux de Beijerinck, le terme latin de virus, anciennement utilisé pour qualifier les toxines ou poisons et que Pasteur avait assimilé aux bactéries, prenait son sens moderne « molécule infectieuse transmissible » (Semal, 1996). Ainsi la première définition de ces nouveaux agents, les virus, a été présentée entièrement en termes négatifs : on ne pouvait pas les observer au microscope optique, on ne pouvait pas les cultiver en l'absence de cellules et, surtout, ils n'étaient pas retenus par les filtres antibactériens (Dimmock et *al.*, 2008; Foulongne, 2015).

En 1935, Wendell M. Stanley a découvert que le virus de la mosaïque du tabac (TMV) était constitué principalement de protéines, établissant ainsi la nature chimique des virus. Peu de temps après, Frederick C. Bawden et Norman W. Pirie ont pu séparer le (TMV) en protéines et en acides nucléiques (Lansing M. Prescott, 2002).

2. Structure et classification virale :

De façon générale, Les virus sont des pathogènes subcellulaires qui ne peuvent pas se reproduire qu'à l'intérieur d'une cellule vivante et sont ainsi des parasites intracellulaires obligatoires. Les virus ne possèdent pas de métabolisme propre et nécessitent les mécanismes d'assemblage des protéines et du génome de la cellule hôte vivante pour se propager.

La particule virale extracellulaire mature est appelée *virion*. Celui-ci contient un génome qui est constitué d'un acide désoxyribonucléique (ADN) ou acide ribonucléotidique (ARN) entourée d'une enveloppe protéique appelée *capside* ou *nucléocapside*. La *capside* virale est composée d'une série répétitive de sous-unités protéiques structurellement similaires (*capsomères*), dont chacune à son tour est composée de seulement quelques protéines différentes. A l'encontre des virus « nus », les virus dits « enveloppés » possèdent une *enveloppe* lipidique (*péplos*) entourant la *nucléocapside* ; elle est acquise lors du bourgeonnement des particules virales à partir de la membrane réticulaire cytoplasmique, nucléaire ou endoplasmique de la cellule hôte (Figure 1). Des protéines codées par le virus (par exemple : les protéines d'hémagglutinine [HA] et de neuraminidase [NA] du virus de la grippe) sont insérées dans cette double couche lipidique, et sont exposées à la surface de la particule virale. Certains virus possèdent des *protéines de matrice* permettant la liaison de la *nucléocapside* à l'*enveloppe* virale. La *capside* et l'*enveloppe* virale jouent un rôle de protection et stabilisation de l'acide nucléique viral contre le milieu extracellulaire et facilitent l'attachement et la pénétration du virus au contact avec de nouvelles cellules hôtes (Riedel et *al.*, 2019).

Les premières classifications des virus en tant que groupe distinct des autres micro-organismes étaient basées sur la taille (agents filtrables), les propriétés pathologiques telles que le tropisme d'organes spécifiques (par exemple, les virus de l'hépatite), ou les caractéristiques épidémiologiques communes telles que la transmission par des vecteurs arthropodes (par exemple, les arbovirus) (Lwoff et *al.*, 1962). Actuellement, la classification des virus est basée essentiellement sur le type et le mode d'expression du génome viral (Baltimore, 1971; Riedel et *al.*, 2019).

Le génome viral se présente sous plusieurs formes et tailles. Chaque virus contient un type unique d'acide nucléique : soit un ARN ou ADN, qui code les informations génétiques nécessaires à la réplication virale. Le génome viral peut être simple (ss) ou double brins (ds), les génomes simple brin peuvent être construits dans le sens message (+) ou complémentaires au sens message (-). De plus, le génome du virus peut avoir une forme linéaire, circulaire ou divisé en segments.

La taille du virome humain peut varier de 3 kb dans les petits virus tels que les hépadnavirus à plus 300 kb, codant pour plusieurs centaines de protéines dans les grands virus tels que les poxvirus. Les principaux virus à ADN ont des génomes non segmentés et une configuration linéaire ou circulaire. Les virus à ARN sont composés soit d'une seule molécule d'acide nucléique ou de plusieurs segments, dont le nombre est variable suivant les familles virales (Tableau 1).

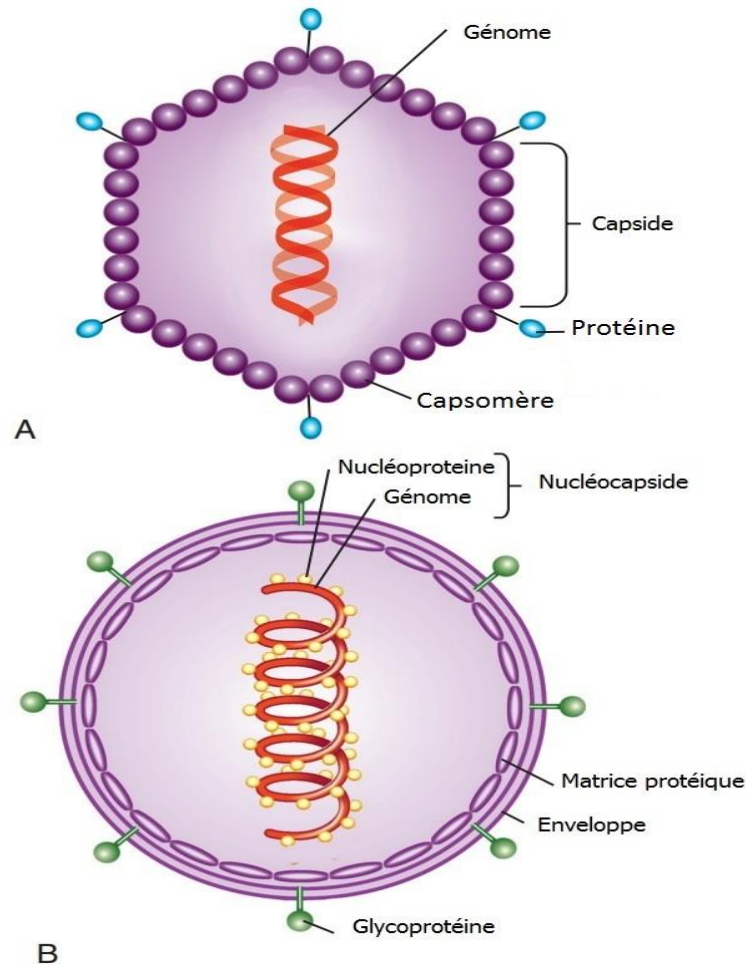


Figure 1 : Illustration schématique de la structure d'un virus icosaoédrique non enveloppé (A) et d'un virus hélicoïdal enveloppé (B). (Chappell et Dermody, 2015)

Tous les virus, sauf les plus complexes, présentent une symétrie de la capsid hélicoïdale, icosaoédrique, ou sphérique. Les virus animaux connus à symétrie hélicoïdale ont exclusivement un génome à ARN.

Tableau 1 : Caractéristiques des principales Familles de virus infectant l'Homme. (Fauquet et al., 2005)

| | | | | |
|---|---------|-------|-------------------------|---------------------------------|
| ADN double brin (DS DNA) | 130-375 | 1 | <i>Poxviridae</i> | Vaccinia virus |
| | 120-220 | 1 | <i>Herpesviridae</i> | Cytomégalovirus |
| | 28-48 | 1 | <i>Adenoviridae</i> | Adénovirus humain |
| | 5 | 1 | <i>Polyomaviridae</i> | Merkel Cell Polyomavirus |
| | 6.8-8.4 | 1 | <i>Papillomaviridae</i> | β et γ papillomavirus |
| ADN simple brin (SS DNA) | 4-6 | 1 | <i>Parvoviridae</i> | Bocavirus humain |
| ARN double brin (DS RNA) | 20-30 | 10-12 | <i>Reoviridae</i> | Rotavirus |
| ARN simple brin polarité positive (SS (+) RNA) | 28-33 | 1 | <i>Coronaviridae</i> | Coronavirus NL63 |
| | 10-13 | 1 | <i>Togaviridae</i> | Virus du chikungunya |
| | 10-12 | 1 | <i>Flaviviridae</i> | Zika virus |
| | 7-8.5 | 1 | <i>Picornaviridae</i> | Entérovirus |
| | 7-8 | 1 | <i>Astroviridae</i> | Astrovirus humain |
| | 8 | 1 | <i>Caliciviridae</i> | Norovirus |
| | 7.2 | 1 | <i>Hepeviridae</i> | Virus de l'hépatite E |
| ARN simple brin polarité négative (SS (-) RNA) | 15-16 | 1 | <i>Paramyxoviridae</i> | Virus respiratoire syncytial |
| | 19 | 1 | <i>Filoviridae</i> | Virus Ebola |
| | 10-15 | 8 | <i>Orthomyxoviridae</i> | Virus de la grippe |
| | 11 | 2 | <i>Arenaviridae</i> | Virus de Lassa |
| Rétrovirus à ARN simple brin (SS RNA RT) | 7-10 | Dimer | <i>Retroviridae</i> | Virus HIV |
| Rétrovirus à ADN double brin (DS DNA RT) | 3 | 1 | <i>Hepadnaviridae</i> | Virus de l'hépatite B |

3. Cycle de réplication viral :

Les virus se propagent par interactions avec un hôte cellulaire vivant dans un processus impliquant l'attachement, la pénétration, la décapsidation, la réplique du matériel génétique, l'assemblage et la libération des nouveaux virus (Roizman, 1996) (Figure 2).

La première étape de la propagation virale est l'adsorption du virion à la cellule hôte. L'attachement se produit alors par des protéines de la capsid pour les virus nus ou des glycoprotéines du péplos pour les virus enveloppés qui se lient à des récepteurs spécifiques de la cellule hôte. Le tropisme d'un virus, c'est-à-dire sa capacité à infecter et à

se répliquer dans un tissu ou lignée cellulaire spécifique, est généralement défini par le processus d'attachement (Chappell et Dermody, 2015). La pénétration virale peut avoir lieu chez les virus enveloppés par fusion entre le péplos et la membrane cytoplasmique, soit à la surface cellulaire, ou au niveau des vésicules intracellulaires (Kubo et *al.*, 2012). Certains virus non enveloppés semblent capables d'accomplir le processus de pénétration grâce aux protéines de la capsid (peptides lytiques) qui peuvent former des pores dans la membrane cellulaire (Bajaj et *al.*, 2016).

La décapsidation est souvent liée au mécanisme de pénétration virale, ce phénomène actif est essentiellement assuré par la cellule hôte moyennant des décapsidasses cellulaires qui vont dégrader la capsid pour libérer le génome viral (Jankowski, 2020).

La voie de répllication des virus et d'expression des protéines est déterminée par le type de génome viral. La transcription et répllication des virus à ADN se fait au niveau du noyau cellulaire en utilisent les mécanismes propres de la cellule. Tandis que pour les virus à ARN, le processus de répllication virale se déroule généralement dans le cytoplasme et nécessite pour les virus à ARNss(-) une enzyme virale exogène à la cellule hôte (ARN polymérase ARN-dépendante) pour synthétiser un intermédiaire ARNss(+) afin d'initier la synthèse des protéines virales (Chappell et Dermody, 2015; Strauss et Strauss, 2008).

L'auto-assemblage des nouveaux virus est en partie liée à une affinité physico-chimique entre les différents composants de la nucléocapsid, associée à un transport organisé par le réseau de microtubules cellulaires vers les sites d'assemblage des virions (Chappell et Dermody, 2015; Jankowski, 2020). Au cours du processus de libération virale, les virus enveloppés conservent une partie de la membrane cellulaire et sont libérés par bourgeonnement, tandis que les virus nus sont libérés par lyse de la cellule infectée (Jankowski, 2020).

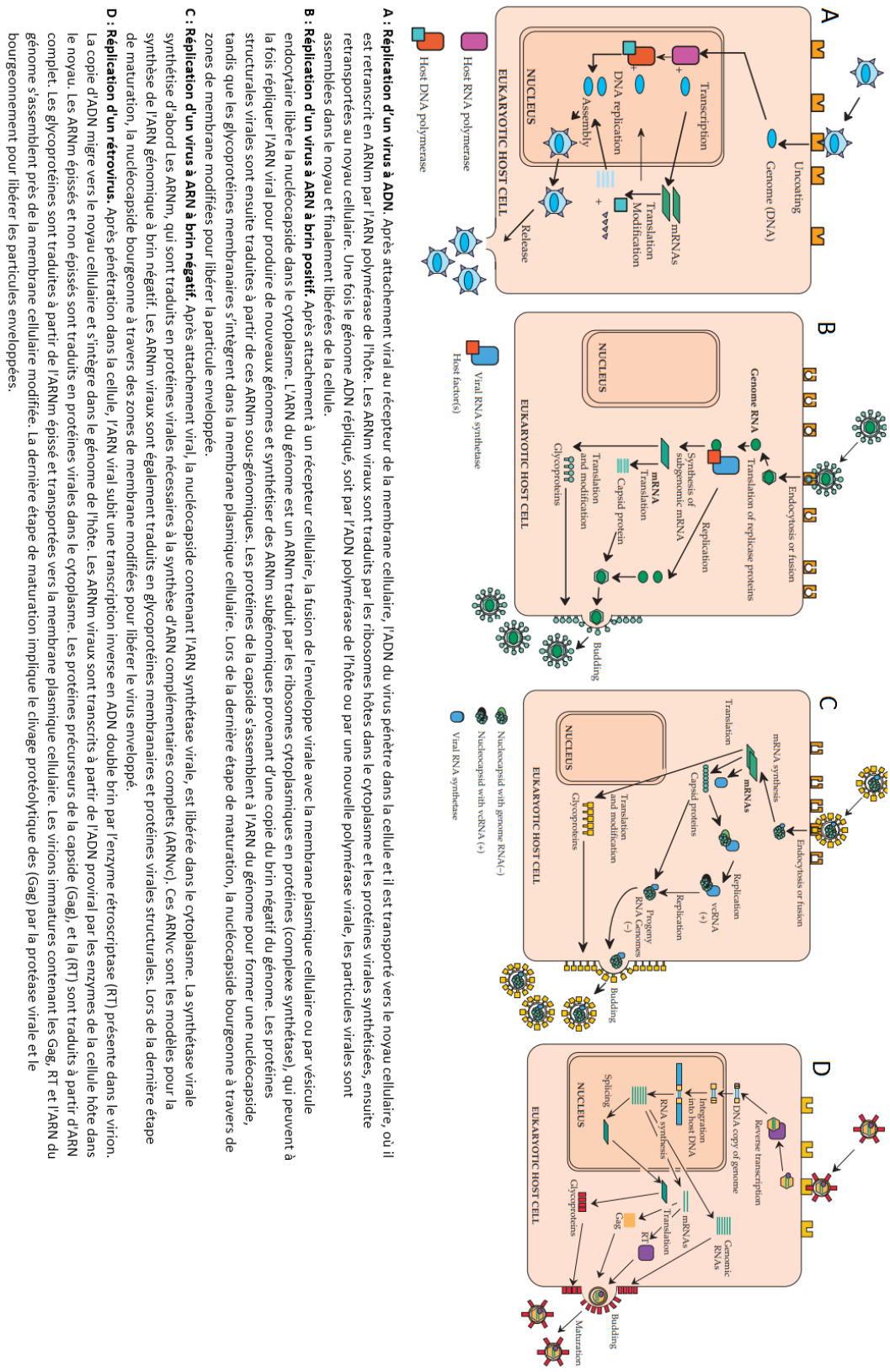


Figure 2 : Schéma général de réplication virale. (Strauss et Strauss, 2008)

II. Les virus respiratoires :

1. Les modes de transmission des virus respiratoires :

Les virus respiratoires peuvent être transmis d'une personne infectée à une personne sensible via quatre modes de transmission principaux : le contact direct (physique), le contact indirect (fomites), les gouttelettes et les petits aérosols (Figure 3) (Leung, 2021).

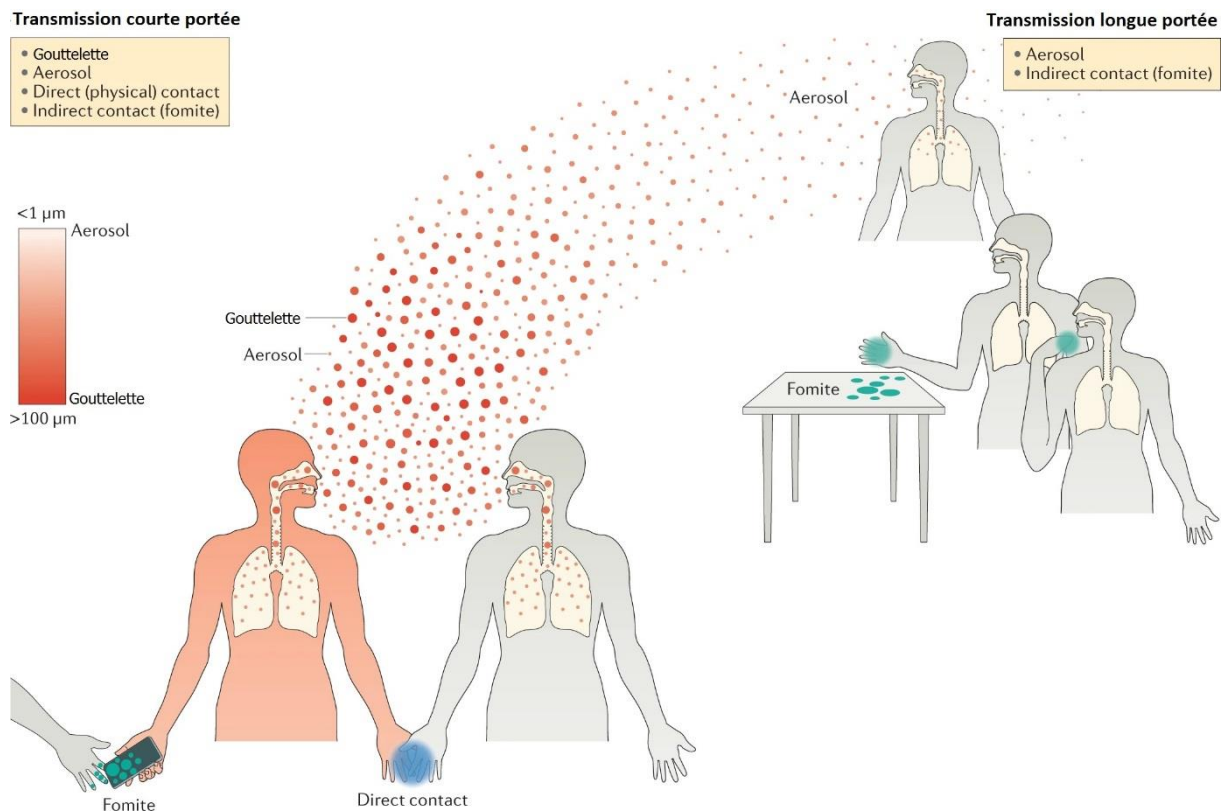


Figure 3 : Les principaux modes de transmission des virus respiratoires. (Leung, 2021)

La transmission par contact fait référence au contact direct avec le virus véhiculé par une personne infectée ou indirectement sur une surface contaminée (également appelée vecteur passif). Les gouttelettes générées lors de la toux, des éternuements ou de la parole sont des particules plus grosses, généralement définies comme $> 5 \mu\text{m}$, et qui se déplacent rarement à plus d'un mètre dans l'air avant de se déposer sur la muqueuse des contacts étroits ou des surfaces environnantes. Les aérosols sont des particules plus fines,

< 5 μm , capables de rester en suspension dans l'air plus longtemps et donc de parcourir de plus grandes distances. Les transmissions par contact et par gouttelettes infectent les voies respiratoires supérieures, tandis que les aérosols peuvent également atteindre les voies respiratoires inférieures (Kutter et *al.*, 2018; Leung, 2021).

2. Les infections virales des voies respiratoires :

L'exposition des voies respiratoires au virus par inoculation directe ou par inhalation constitue une majeure porte d'entrée des virus dans le corps humain (Dasaraju et Liu, 1996). De nombreuses présentations cliniques sont communes aux différentes infections virales respiratoires, ce qui rend difficile la distinction entre les agents étiologiques. Ainsi, les infections respiratoires sont généralement définies en fonction de la localisation infectieuse (Njouom et *al.*, 2012; Ma et *al.*, 2018; Puzelli et *al.*, 2009). Une autre caractéristique des infections respiratoires virales est le manque de traitements spécifiques et la thérapeutique est donc principalement symptomatique (Brouard et *al.*, 2018).

On distingue les infections des voies respiratoires supérieures, qui désignent les infections du nasopharynx, du larynx, des amygdales, des sinus et des oreilles, des infections des voies respiratoires inférieures, qui désignent les infections de la trachée, des bronches pulmonaires et des alvéoles (Figure 4) (Carroll et Adams, 2016; Chappell et Dermody, 2015; Jain et *al.*, 2001).

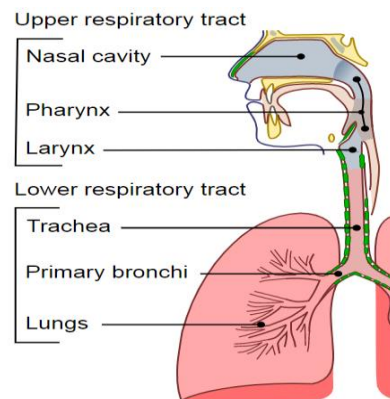


Figure 4 : schéma anatomique des principales composantes du système respiratoire supérieur et inférieur. Adapté : Wikimedia Public Commons, (Lord Akryl & Jmarchn,2010)

2.1 Les infections des voies respiratoires supérieures (URTIs) :

Les URTIs peuvent être caractérisées par un groupe de troubles comprenant la rhinite, la pharyngite, la laryngotrachéite, l'otite et la sinusite, qui surviennent de manière significative dans les voies respiratoires supérieures.

2.1.1. La rhinite infectieuse (rhume) :

La rhinite infectieuse ou coryza est une infection virale des muqueuses de la cavité nasale. Elle est habituellement le résultat d'un rhume banal. Les symptômes courants sont une rhinorrhée et une congestion nasale, souvent associés à un mal de gorge, de la toux, des éternuements, des malaises, des maux de tête et parfois de la fièvre. Les symptômes disparaissent généralement dans la semaine suivant leur apparition. Les traitements symptomatiques sont les décongestionnants nasaux, les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens et les antipyrétiques (Bennett *et al.*, 2015).

2.1.2. La pharyngite aiguë :

La pharyngite aiguë se caractérise généralement par un mal de gorge et une inflammation pharyngée. Selon l'agent pathogène, la fièvre et des manifestations systémiques telles qu'un malaise, une myalgie ou des maux de tête peuvent être présentes. Un exsudat inflammatoire, des vésicules ou des ulcères peuvent également être observés sur les parois pharyngées (Dasaraju et Liu, 1996).

Plus que la moitié des cas de pharyngites aiguës sont d'origine bactérienne et même parmi les causes virales, des virus non respiratoires à l'instar du virus d'Epstein-Barr, le virus de l'herpès simplex (HSV), et le cytomégalovirus humain sont susceptibles de provoquer une pharyngite. Les symptômes d'une pharyngite virale peuvent durer jusqu'à deux semaines chez des sujets immunocompétents, et seul un traitement symptomatique est généralement recommandé, à l'exception de l'infection due au virus de l'herpès (HSV), qui donne lieu au traitement avec de l'acyclovir® chez les cas graves ou les patients immunodéprimés. La déshydratation et la malnutrition dues au mal de gorge et à la perte d'appétit nécessitent parfois un traitement avec des liquides intragastriques ou intraveineux chez les nourrissons et les enfants de bas âge (Bennett *et al.*, 2015; Dasaraju et Liu, 1996; Jain *et al.*, 2001).

2.1.3. La Laryngotrachéite :

La laryngotrachéite virale aiguë (faux croup) désigne un œdème et une inflammation sous-glottique. Les symptômes caractéristiques sont une toux « aboyante », une voix enrouée, un stridor et un tirage costal avec ou sans fièvre (Bennett et *al.*, 2015).

L'incidence des laryngotrachéites virales culmine à l'âge de deux ans et sont rarement observées chez les enfants de plus de six ans, encore plus chez les adultes. Les études ont systématiquement mis en évidence une association élevée de la maladie avec les virus parainfluenza, qui ont été détectés dans environ 80 % des cas (Branche et Falsey, 2016; Freymuth, 2004; Tg et Jc, 2014). Les symptômes d'une laryngotrachéite virale durent généralement moins d'une semaine. Il n'existe pas de traitements spécifiques pour la maladie, cependant la prise de corticostéroïdes associée à une respiration d'air froid constitue un traitement de support visant une vasoconstriction des muqueuses respiratoires, et apportant un soulagement temporaire à l'enfant (Ottolini et *al.*, 2002; Tg et Jc, 2014).

2.1.4. L'otite :

L'otite moyenne aiguë (OMA) survient le plus souvent chez les jeunes enfants. Suite à l'infection, une inflammation de la muqueuse de l'oreille moyenne survient avec un écoulement séro-sanguin ou purulent, provoquant un mal d'oreille sévère et persistant accompagné de la fièvre et de vomissements (Dasaraju et Liu, 1996). L'étiologie peut être virale, bactérienne ou mixte. Comme toutes les infections des voies respiratoires supérieures, L'OMA est plus fréquente durant la saison froide. Son incidence dépend de l'âge, culminant pendant les 3 premières années de la vie (Bennett et *al.*, 2015; Klein, 2015).

En raison de l'importance des virus respiratoires dans la pathogenèse de l'OMA, certains vaccins viraux (vaccin contre le virus de la grippe) et immunoprophylaxies (immunoglobuline HRSV) pourraient avoir un effet protecteur pour diminuer l'incidence de l'OMA liée à ces virus spécifiques (Clements et *al.*, 1995; Heikkinen et *al.*, 1991; Simoes et *al.*, 1996). La prédominance des étiologies virales plaide en faveur d'un traitement symptomatique par antipyrétiques et analgésiques pour soulager de la douleur chez les enfants de plus de deux ans présentant un tableau clinique léger. Le recours aux

agents antimicrobiens pour traiter les otorrhées liées à l'existence d'une OMA est souvent envisageable. En l'absence de complications, les symptômes cliniques disparaissent généralement au bout d'une semaine (Bennett et *al.*, 2015; Géhanno, 2004).

2.1.5. La sinusite :

La sinusite aiguë ou rhinosinusite est le résultat d'une complication du rhume qui est généralement d'étiologie virale, où il survient une inflammation et congestion de la muqueuse nasale et des sinus (Cherry et Newman, 1998). On estime que cette atteinte des sinus paranasaux peut toucher 6-13 % des enfants atteints d'infections virales des voies respiratoires supérieures (Bennett et *al.*, 2015). Généralement, les signes et symptômes de la sinusite sont une sensibilité des sinus paranasaux, des douleurs dentaires, des maux de tête et de la fièvre. Dans la majorité des cas, les rhinosinusites se résolvent spontanément. Un recours aux traitements symptomatiques avec des analgésiques, de la chaleur humide sur la douleur des sinus affectés et des décongestionnants pour favoriser le drainage des sinus est suffisant (Bennett et *al.*, 2015; Giebink, 1994; Jain et *al.*, 2001).

2.2 Infections des voies respiratoires inférieures (LRTIs) :

Les infections des voies respiratoires inférieures comprennent la bronchite, la bronchiolite et la pneumonie. Ces syndromes, notamment la pneumonie, constituent une cause majeure de décès chez les enfants et les personnes âgées (Mahowald et *al.*, 2019). Les étiologies virales sont responsables de la majeure partie des LRTIs, particulièrement les paramyxovirus (HRSV, métapneumovirus et les parainfluenza virus), le virus Influenza et l'adénovirus (Pavia, 2011).

2.2.1. La bronchite et bronchiolite :

La bronchite aiguë et la bronchiolite sont le résultat d'une inflammation des bronches et des bronchioles accompagnée d'une obstruction des voies respiratoires inférieures (Walsh, 2015). La distinction entre la bronchiolite et la bronchite aiguë est controversée, et certains auteurs font simplement la distinction en fonction de l'âge auquel un enfant présente les symptômes obstructifs pour la première fois. Une bronchiolite désigne la première LRTI, survenue durant la période épidémique des virus respiratoires chez un nourrisson âgé entre un mois à moins de deux ans, alors qu'une bronchite survient

chez les jeunes âgés de plus de deux ans ou s'observe lors des épisodes ultérieures chez les enfants moins de deux ans (Bellon, 2001).

On estime que les infections par les virus sont la cause d'environ 90 % de tous les cas de bronchites aiguës et se présentent souvent initialement sous la forme d'une infection respiratoire haute (Walsh, 2015).

Les symptômes d'une (URTI) accompagnés de toux précèdent généralement l'apparition de la bronchiolite chez l'enfant. Une tachypnée et une agitation s'ensuivent. Des crachats mucopurulents peuvent être présents accompagnés d'élévations modérées de la température. Une respiration sifflante (wheezing), une détresse respiratoire et une déshydratation peuvent également s'accroître dans les cas plus graves. En règle générale, la production de mucus est plus prononcée en cas de bronchiolite (Bower et McBride, 2015; Walsh, 2015).

La thérapeutique de la bronchite aiguë est essentiellement symptomatique, visant le soulagement des symptômes gênants tel que la toux ou la respiration sifflante, incluant des antitussifs narcotiques, des expectorants, des antihistaminiques, et des décongestionnants (Smith et *al.*, 2008). Les infections dues au HRSV chez les nourrissons peuvent être traitées par la ribavirine. L'amantadine et la rimantadine sont disponibles pour la chimioprophylaxie ou le traitement d'affection dues aux virus Influenza type A. Plusieurs études ont démontré qu'une antibiothérapie empirique lors d'une bronchite aiguë sans tenir compte de la spécificité de l'agent pathogène n'est pas efficace dans la majorité des cas (Dasaraju et Liu, 1996).

2.2.2. La pneumonie :

La pneumonie infectieuse aiguë résulte d'une réponse inflammatoire à une infection des alvéoles avec divers degrés d'implication interstitielle. Elle représente un problème de santé publique majeure, car c'est une des principales causes de morbidité et de mortalité aussi bien chez les enfants que chez les adultes âgés (Ellison et Donowitz, 2015; Ruuskanen et *al.*, 2011). Les symptômes associés à la pneumonie chez l'adulte sont la fièvre, la toux avec ou sans expectoration, une dyspnée ou tachypnée, des douleurs thoraciques, et des sibilances respiratoires. Alors que chez le nourrisson et le jeune enfant, les signes peuvent être non spécifiques : incluant la fièvre, une rhinorrhée, une toux, une

tachypnée, une plainte expiratoire (wheezing) ou un gémissement (Ellison et Donowitz, 2015).

Avant la vaccination contre *Haemophilus influenzae* type B et *Streptococcus pneumoniae*, on estimait que les bactéries représentaient environ la moitié des pneumonies chez les enfants (le Roux et Zar, 2017). Au Maroc, la vaccination contre *H. influenzae* type B et *S. pneumoniae* a été introduite en 2007 et 2010 respectivement. Lors des études de suivi menées dans différents pays après l'introduction de ces programmes de vaccination, 73 à 87 % des pneumonies sévères chez les enfants < 5 ans ont été attribuées à des virus, ce constat est de plus visible avec utilisation croissante des Tests d'amplification des acides nucléiques (TAANs) très sensibles pour diagnostiquer les viroses respiratoires (Chikhaoui et al., 2022; Eriksson et al., 2017; Jain et al., 2015; Jroundi et al., 2014; Ruuskanen et al., 2011; Zar et al., 2016).

Même lorsqu'une étiologie virale est suspectée, des antibiotiques peuvent être administrés en traitement empirique en présence de comorbidité pour prévenir et éventuellement traiter une surinfection bactérienne. Un traitement symptomatique est privilégié chez l'enfant pour éviter une déshydratation et compenser l'insuffisance respiratoire (Ellison et Donowitz, 2015).

2.3 Les symptômes extra-respiratoires d'une infection respiratoire virale :

2.3.1. Les convulsions :

Les convulsions fébriles sont un trouble épileptique courant et bénin qui peut survenir chez des patients de bas âge - entre 3 mois et 5 ans - suite à une infection des voies respiratoires (Doiron, 1983). Durant de leurs premières cinq années de vie, environ 3 % des enfants auraient connu une crise fébrile (Schuman et Miller, 1966; Van der Berg et Yerushalmy, 1969). selon diverses études antérieures, au moins 40 % des enfants atteints de convulsions fébriles présentaient une infection virale respiratoire (Lewis et al., 1979; Rantala et al., 1990; Wallace et Zealley, 1970).

2.3.2. L'encéphalite :

L'encéphalite est une maladie inflammatoire aiguë et diffuse du cerveau, caractérisée cliniquement par de la fièvre, des maux de tête, des convulsions, des déficits

neurologiques focaux et une altération de la conscience (Cavallieri et *al.*, 2022). Le diagnostic d'une encéphalite infectieuse repose essentiellement sur la mise en évidence du virus responsable dans le liquide céphalo-rachidien. Une récente étude multicentrique en Australie qui a porté sur des enfants âgés de moins de 14 ans, a révélé que, sur une période de 2 ans, ils ont pu identifier 287 cas d'encéphalite. Parmi ceux-ci, 10% ont été attribués respectivement aux Entérovirus et aux Paréchovirus, 6% au virus de l'Influenza, 1% au HRSV et à l'adénovirus humain (Britton et *al.*, 2020).

2.3.3. Troubles gastriques :

Les symptômes gastro-intestinaux, tels que la diarrhée, les vomissements, les douleurs abdominales et les nausées, ne sont pas des manifestations rares d'une infection respiratoire aiguë. Ils ont été rapportés chez 30 à 50 % des enfants hospitalisés, même pour les virus qui ne se reproduisent principalement pas dans le tractus gastro-intestinal chez l'homme. Ces troubles peuvent être associés aux coronavirus, au virus Influenza et au HRSV. Comme ils peuvent être dû à certaines interférences comme le stress ou les diarrhées post-antibiotiques (Giannelli, 2017; Minodier et *al.*, 2017).

2.3.4. La myosite :

Les myosites virales sont de rares infections musculaires responsables d'une variété de symptômes, allant de simples myalgies à la rhabdomyolyse. Ces infections sont souvent associées à un syndrome pseudo-grippal ou à des troubles gastriques. Plusieurs études ont soulevé la prédominance masculine de l'infection. De nombreux virus peuvent être mis en cause, tel que le virus influenza, l'adénovirus humain et les entérovirus (Molina et *al.*, 2020).

2.3.5. La myocardite :

La myocardite est un processus inflammatoire du myocarde due à diverses causes infectieuses et non infectieuses, dont l'étiologie virale est la plus courante (Yajima et Knowlton, 2009). De nombreux virus ont été impliqués comme causes de myocardite, ils comprennent entre autres les HAdVs, les entérovirus (le virus Coxsackie), et le parvovirus B19. En général, une myocardite est précédée d'un syndrome grippal (fièvre, malaise, myalgie, vomissements et diarrhée). Les symptômes d'une myocardite chez un adulte sont

généralement une dyspnée, des douleurs thoraciques et des arythmies ; tandis que Les nourrissons présenteront souvent un syndrome fulminant, de la fièvre, et une hypoxie avec cyanose (Kang et *al.*, 2023; Yajima et Knowlton, 2009).

3. Facteurs de risques d'une infection respiratoire virale :

3.1 L'âge, la prématurité et faible poids à la naissance :

Les prématurés (< 37 semaines révolues de gestation), les nourrissons âgés de trois mois ou moins et les adultes dont l'âge est supérieur à soixante-cinq ans sont à risque plus accru d'hospitalisation avec pour une détresse respiratoire aiguë (Edwards et *al.*, 2013). Vue la taille petite des voies respiratoires chez l'enfant, les obstructions pulmonaires dues aux LRTIs deviennent importantes. De plus, le système immunitaire des nourrissons en phase d'adaptation à la vie extra utero, est plus sensibles aux infections virales. Ces facteurs se combinés au faible poids de naissance, font des nourrissons prématurés des sujets à risque d'IRA graves (Bates et *al.*, 2014; Lüsebrink et *al.*, 2010; Panayiotou et *al.*, 2014; Reiche et Schweiger, 2009; Sentilhes et *al.*, 2013; Tabatabai et *al.*, 2014; Zhang et *al.*, 2013). Les personnes âgées sont également plus disposées d'avoir des infections respiratoires graves. Cela est dû à plusieurs raisons. Le vieillissement provoque des modifications anatomiques et physiologiques de l'appareil respiratoire (perte d'élasticité des tissus et des réflexes expiratoires), ce qui entraîne une toux faible et des crachats plus fréquents, ainsi qu'une respiration moins profonde (Drieux, 2010).

3.2 Le sexe masculin :

Des études ont suggéré que les enfants du sexe masculin sont susceptibles de développer des infections respiratoires basses plus graves, notamment chez les nourrissons. Un apport des cotes (*OR*) de 1,25 pour les nourrissons de sexe masculin atteints de LRTIs a été observé dans plusieurs de ces méta-analyses (Larsen et *al.*, 2020; Shi et *al.*, 2015; Orimadegun et *al.*, 2020). Il a été suggéré que l'équilibre entre immunotolérance et immunoréactivité penche différemment selon le sexe, les femmes ayant plus d'immunoréactivité, ce qui se traduit par des mécanismes meilleurs de défense contre les maladies infectieuses au détriment d'un plus grand nombre de maladies auto-immunes (Muenchhoff et Goulder, 2014).

3.3 La promiscuité :

Etant donné que le jeune âge constitue un facteur de risque important, les ménages surpeuplés et les Fratries nombreuses ont un impact sur la rapidité et l'ampleur de l'exposition d'un nourrisson aux infections virales des voies respiratoires (Haerskjold et *al.*, 2016; Moe et *al.*, 2017; Nicolai et *al.*, 2017; Shi et *al.*, 2015). Selon une étude, les nourrissons -souvent prématurés- issus de grossesses multiples (jumeaux ou triplés), pourraient être plus susceptibles de développer une infection à HRSV plus grave que les prématures uniques (Dotan et *al.*, 2013). La fréquentation de la garderie en collectivité a le même effet après la petite enfance.

3.4 Les facteurs socio-économiques et environnementaux :

Il a été démontré que le tabagisme maternel affecte le développement pulmonaire in utero et augmente le risque d'infections respiratoires et d'asthme chez le nourrisson. Aussi de nombreux chercheurs ont démontré que tabagisme passif augmente le risque lié aux infections respiratoires chez les enfants (McEvoy et Spindel, 2017; Ohea, 1992; Peat et *al.*, 2001).

Le jeune âge de la mère, le faible niveau d'instruction des parents, et la pollution atmosphérique urbaine et domestique de l'air ambiant, a également été systématiquement associée à un risque accru de LRTIs chez la population infantile (Geberetsadik et *al.*, 2015; Nhung et *al.*, 2017; Romieu et *al.*, 2002).

3.5 Les troubles neurologiques :

Les enfants atteints de troubles neuromusculaires courent un risque de LRTIs graves et d'autres complications associées aux infections virales. La diminution du tonus et force musculaire accouplée à une altération de la coordination des mouvements, entraîne une diminution de la capacité à mobiliser le mucus respiratoire. Il en résulte une stagnation muqueuse suivie d'une obstruction des voies respiratoires qui entrave l'élimination du virus, aggrave la réponse inflammatoire et augmente la susceptibilité aux co-infections bactériennes (Keren et *al.*, 2005; Simon et *al.*, 2011; Panitch, 2017). D'un point de vue neurologique, les infections virales peuvent en elles-mêmes provoquer des

convulsions ou exacerber un trouble épileptique préexistant (Carman et *al.*, 2019; Solís-García et *al.*, 2020).

3.6 Les troubles cardiopulmonaires :

Les maladies pulmonaires chroniques et les malformations cardiaques ont été identifiées comme des risques d'infections respiratoires graves chez la population pédiatrique âgée de moins de 2 ans (Gill & *al.*, 2015; Groothuis & *al.*, 2011; Shi & *al.*, 2015). Les patients présentant un historique d'asthme, d'une maladie pulmonaire obstructive chronique (BPCO), une insuffisance cardiaque congestive (ICC), une maladie cardiaque congénitale, ou de bronchopneumonie chronique obstructive courent un risque accru pour le développement de manifestations graves lors d'une infection respiratoire virale (Dawood et *al.*, 2010; Edwards et *al.*, 2013; Gill et *al.*, 2015; McLean et *al.*, 2020).

3.7 Les troubles immuno-hématologiques :

Les personnes atteintes de maladies oncologiques (leucémies et tumeurs malignes hématologiques), de déficits immunitaires primitifs ou secondaires sont plus prédisposés à développer une maladie grave lors des infections respiratoires virales (Englund et *al.*, 2006; Williams et *al.*, 2005).

3.8 Autres facteurs de risques :

Les maladies métaboliques tel que le diabète et l'insuffisance rénale augmentent le risque de survenue d'infections respiratoires graves chez les patients souffrant de ces conditions sous-jacentes. Ce phénomène étant attribué à une perturbation des métabolismes de l'organisme qui soit à l'origine d'une altération des réponses immunitaires (Gill et *al.*, 2015; Su et *al.*, 2020).

4. Les principaux virus respiratoires :

Les principaux virus respiratoires sont classés dans les familles de virus suivantes : *Coronaviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Adenoviridae* et *Parvoviridae*.

D'autres virus respiratoires ne seront pas détaillés tel que le cytomégalovirus (CMV) et le virus de l'herpès simplex, Les entérovirus, les morbillivirus et le virus

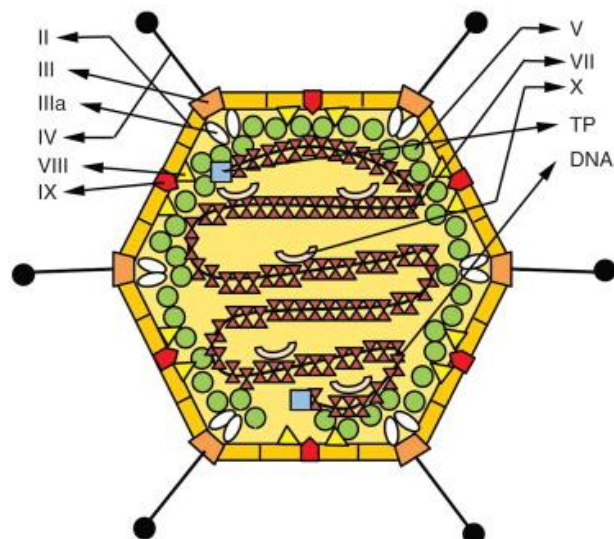
varicelle-zona. Ces virus causent le plus souvent des infections respiratoires chez les patients immunodéprimés, ils sont impliqués dans des infections systémiques engageant les voies respiratoires, ou sont liés à des syndromes de fièvres éruptives.

4.1 Adénovirus :

Les adénovirus (HAdV) ont été isolés pour la première fois en 1953 dans des cultures de cellules adénoïdes humaines. Rowe *et al.* l'ont décrit le comme "agent de dégénérescence adénoïde", car le virus induit la dégénérescence des cellules adénoïdes chez les enfants (Rowe *et al.*, 1953). Un an plus tard, ce même agent a été décrit par d'autres chercheurs dans des échantillons soufflés obtenus à partir de recrues militaires (Hilleman et Werner, 1954). Depuis lors, plusieurs sérotypes de ce virus ont été décrits, isolés chez l'homme et les animaux.

4.1.1. Taxonomie et structure virale :

L'Adénovirus (HAdV) est un virus nu, à capsidie icosaédrique et ADN bicaténaire linéaire. Le diamètre du virion est 70 à 100 nanomètres (nm). La taille de génome allant de 34 à plus de 37 kb et portant une quarantaine de gènes.



La capsidie virale icosaédrique non enveloppée contient un génome d'ADN double brin. Les principales protéines de la capsidie sont l'hexon (II), la base penton (III) et la fibre penton (IV), qui se projette à partir de chaque sommet et se lie au récepteur cellulaire. En plus de celles-ci, d'autres protéines de capsidie sont représentées (IIIa, VIII et IX). Le noyau viral contient le génome et les protéines V, VII, X et TP (protéine terminale).

Figure 5 : Un diagramme schématisique de la structure de l'Adénovirus. (Boncristiani *et al.*, 2009)

Les HAdVs font partie du genre *Mastadenovirus* de la famille des *Adenoviridae*. Historiquement, ils étaient classés en 51 sérotypes distincts distribués en sept espèces (HAdV-A au HAdV-G) basé sur les tests de neutralisation avec sérums de lapins, alors qu’actuellement avec l’avènement du séquençage et des techniques bio-informatiques, les nouveaux virus découverts sont nommés types (Tableau 2) et désignés par des numéros consécutifs de 52 à 70 (Lynch et Kajon, 2016; Lynch et *al.*, 2011). Les critères de désignation de nouveaux types font actuellement l’objet de controverses et de discussions (Aoki et *al.*, 2011). Seul un tiers des types d’HAdVs connus ont été associés à des maladies chez l’Homme. Les sérotypes les plus courants provoquant des maladies respiratoires sont les sérotypes 1 à 4, 7, 14 et 21 (Louie et *al.*, 2008).

La capside virale est constituée de 252 sous-unités (capsomères), dont 240 sont des hexons et 12 sont des pentons ou des complexes pentamères. Chaque complexe pentamérique contient une base et une projection de fibres dont la longueur varie selon les différents sérotypes. Les hexons ont des sites antigéniques communs à tous les adénovirus humains, tandis que les fibres possèdent des déterminants antigéniques spécifiques (Lynch III et *al.*, 2014).

Tableau 2 : Espèces et sérotypes/types reconnus de l’Adénovirus humain. (Lion, 2014)

| Adenovirus Species | Types |
|--------------------|---|
| A | 12, 18, 31, 61 |
| B | 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55, 66 |
| C | 1, 2, 5, 6, 57 |
| D | 8–10, 13, 15, 17, 19, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51, 53, 54, 56, 58–60, 63–67 |
| E | 4 |
| F | 40, 41 |
| G | 52 |

Some information for the recently described adenovirus types is not yet available.

4.1.2. Cycle de réplication :

La plupart des types d’adénovirus se lient au récepteur d’adénovirus classique (Coxsackie virus-adénovirus-récepteur), alors que certains utilisent le cofacteur membranaire CD46 et/ou la protéine d’adhésion cellulaire desmogléine 2 comme

récepteur d'attachement. Suite à la liaison fibre/récepteur, l'interaction de la base penton avec les intégrines de surface cellulaire déclenche l'endocytose et l'exposition du virus au cytosol, l'ADN viral est transporté par les microtubules jusqu'au noyau cellulaire. Ensuite, les ARNm sont transcrits et leurs produits comprennent des protéines structurales virales. L'assemblage du virus a lieu dans le noyau et le cycle infectieux est complété par le relargage des nouveaux virus lors de la destruction de la cellule hôte (Lynch III et *al.*, 2014).

4.1.3. **Transmission et épidémiologie :**

Les HAdVs peuvent être transmis par une grande variété de voies : notamment les gouttelettes, les vecteurs passifs ou fomites (y compris le matériel médical mal stérilisé et les solutions ophtalmiques contaminée), par voie fécale-orale et auto inoculation. Les maladies respiratoires comptent parmi les manifestations les plus fréquentes des infections par les adénovirus, notamment chez les jeunes < 5 ans. Infections respiratoires par les adénovirus occurrent dans le monde entier et sans apparente saisonnalité. Des épidémies peuvent survenir, notamment en cas de conditions de surpeuplement, comme les logements militaires les casernes, les garderies et les maisons de retraite (Chen et *al.*, 2015).

4.1.4. **Manifestations cliniques :**

Les HAdVs ont un large spectre de manifestations cliniques, notamment en raison de la grande variabilité des sérotypes. Ceci est dû au fait que les différents sérotypes présentent des tropismes tissulaires différents corrélés aux manifestations cliniques présentées par l'hôte (Kajon et *al.*, 2010; Robinson et Echavarria, 2007).

Les infections respiratoires causées par ces virus se démarquent, elles sont plus fréquentes chez les enfants, avec une période d'incubation de 2 à 14 jours, présentant généralement des symptômes tels que : congestion nasale, fièvre, rhinite, toux, pharyngite, adénopathies cervicales, accompagnées ou non d'otite moyenne. Ces symptômes sont généralement légers et spontanément résolutifs. Les LRTIs dues aux HAdVs (comme la bronchiolite, la pneumonie) peuvent être graves, en particulier chez les jeunes < 2 ans (Berciaud et *al.*, 2012; Lynch et *al.*, 2011).

Les HAdVs sont rarement responsables d'infections respiratoires chez les adultes immunocompétents, cependant, une infection disséminée par le virus peut être fatale chez les patients immunocompétents et immunodéprimés (Ison, 2006).

4.1.5. Prophylaxie et traitement :

Un vaccin contre les adénovirus de types 4 et 7 a été utilisé avec succès dans l'armée américaine, mais dont la fabrication a cessé en 1990. Aucun nouveau vaccin contre l'adénovirus n'a été introduit dans l'armée américaine (Sivan *et al.*, 2007).

Au moins deux médicaments antiviraux ayant une activité *in vitro* contre l'adénovirus ont été utilisés chez l'homme, la ribavirine et le cidofovir. Le traitement adénoviral est envisagé chez les patients immunodéprimés présentant un risque élevé de mortalité liée à l'adénovirus. Jusqu'à présent, le traitement par la ribavirine a été décevant. Le cidofovir semble être plus actif chez les patients que la ribavirine, mais il a des effets secondaires toxiques sur la fonction rénale. Aucun de ces agents n'est couramment utilisé comme traitement des maladies causées par les HAdVs (Nichols *et al.*, 2008).

4.2 Le virus de la grippe :

Le virus grippal (virus Influenza) était probablement l'agent étiologique de la maladie décrite par Hippocrate en l'an 412 av. J.-C. Par conséquent, ce virus a circulé parmi la population humaine pendant une longue période (Lamb et Krug, 1996). Le virus grippal humain "type A" a été isolé par des chercheurs au "National Institute for Medical Research" – Londres, pour la première fois en 1933. Ensuite deux autres types de virus antigéniquement distinct ont été caractérisés : le virus de la grippe B en 1940, et celui de la grippe C en 1947 (Wright et Webster, 2001).

Les épidémies mondiales de grippe peuvent être très coûteuses en termes de vies humaines, avec plus de 20 millions de vies perdues lors de la pandémie de « grippe espagnole » de 1918 (Crosby, 1976). En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé a relaté 3 à 5 millions de cas graves et de 250 000 à 500 000 décès par an dans le monde dues aux épidémies de grippe saisonnière annuelles (Gasparini *et al.*, 2012).

4.2.1. Taxonomie et structure virale :

Le virus grippal possède un génome à ARN simple brin à sens négatif, segmenté et enveloppé par une bicouche lipidique d'origine membranaire. Les particules virales se présentent sous forme sphériques de 100 nm de diamètre ou filamenteuses dépassant souvent 300 nm (Figure 6) (Bouvier et Palese, 2008; Harris et *al.*, 2006).

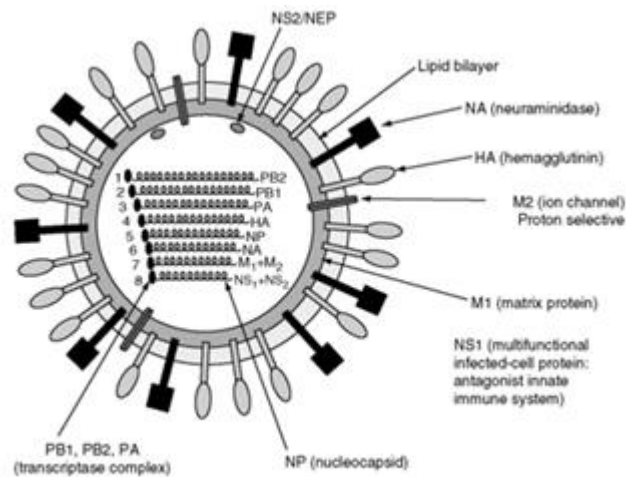


Figure 6 : Schéma de la structure de la particule du virus de la grippe A. (Lamb et Krug, 1996)

Le virus Influenza relève de la famille des *Orthomyxoviridae*, genre *Influenza* (Wright et Webster, 2001). Sur la base de l'antigénicité de la nucléoprotéine (NP), ce genre est subdivisé en quatre types sérologiques distincts A, B, C et D (Asha et Kumar, 2019). Les virus de la grippe B sont divisés en deux lignées antigéniquement distinctes (Yamagata et Victoria) qui co-circulent fréquemment avec les virus de la grippe A pendant les saisons grippales épidémiques. Bien que les types A et B ont un impact important en santé humaine, le type A reste quant à lui le plus virulent (Wright et Webster, 2001).

Le virus Influenza type A sont de plus classés en plusieurs sous-types suivant les caractéristiques de ses deux principales glycoprotéines de surface : la neuraminidase (NA) et l'hémagglutinine (HA) (Duwe, 2017). Aujourd'hui, 18 Hémagglutinines et 11 Neuraminidases différentes ont été répertoriées (Hamilton et *al.*, 2012). Parmi les divers sous-types du virus Influenza A, les sous-types A(H1N1) pdm09, A(H3N2), A(H5N1) et A(H7N9) sont ceux qui circulent communément chez l'Homme (Raj et *al.*, 2014). Les

virus influenza sont responsables chaque année d'épidémies, parfois même de pandémies (Wright et Webster, 2001).

La désignation officielle des souches a été adoptée par l'OMS en octobre 1971. C'est une formule qui décrit l'identité de la souche, à savoir le type antigénique (A, B, C), l'origine animale (si rien n'est précisé, le virus a été isolé chez l'homme), le lieu d'origine du virus (1er isolement), le numéro d'ordre de l'isolement du virus, les deux derniers chiffres de l'année d'isolement du virus et enfin la formule antigénique entre parenthèse avec H pour l'hémagglutinine et N pour la neuraminidase. Chaque mention est séparée d'une barre oblique. A titre d'exemple A/Rabat/130/16(H3N2) est un virus A(H3N2) isolé à Rabat sous le numéro 130 en 2016. Pour les virus isolés à partir de prélèvements vétérinaires, l'espèce d'origine précède le lieu. Par exemple A/CK/Cambodia/07/04(H5N1) est un virus A(H5N1) isolée à partir d'un poulet (CK = Chicken) au Cambodge en 2004 (Bouvier et Palese, 2008).

La variabilité génétique du virus de la grippe se manifeste de deux manières : La première concerne une variation virale par accumulation de mutations ponctuelles, la dérive génétique ou glissement antigénique (shift). Pour cause, un éloignement progressif de la souche d'origine à l'intérieur du même sotype viral, ce qui fait apparaître des nouveaux variants. Cette dérive génétique est la cause des épidémies saisonnières grippales annuelles ou biennales, où les nouveaux variants remplacent ceux qui circulaient lors des précédentes années (Huraux et *al.*, 2003). La deuxième concerne la cassure (drift) ou réassortiment génétique, où il se produit un échange des segments du génome viral entre différentes souches présentes dans le même hôte. Ce changement majeur et brusque survient uniquement dans les virus grippaux type A, il est considérablement amplifié par le fait que certains animaux, comme les oiseaux et les mammifères, peuvent fonctionner pleinement comme réservoirs de segments du génome viral différents de ceux qui circulent parmi la population humaine. Alors que d'autres animaux, principalement les porcs, sont considérés comme des réservoirs intermédiaires de réassortiment. En effet, les cellules du tractus respiratoire supérieur du porc sont tapissées de récepteurs "acides sialiques α 2,3 et α 2,6" qui présentent une affinité assez élevée respectivement pour les virus aviaires et les virus grippaux humains (Schradler et Süß, 2004). La cassure antigénique permet ainsi le surgissement de nouveaux sous-types Grippe A, qui peuvent

parvenir à traverser la barrière des espèces et causer une pandémie grippale (Huraux *et al.*, 2003).

Le génome du virus de la grippe A se compose de huit segments d'ARN (Tableau 3), qui totalisent environ 13,5 kb et dont la longueur varie d'environ 890 à 2 341 nucléotides (Bouvier et Palese, 2008; Wright et Webster, 2001). Ces huit segments codent pour un total de onze protéines, dont neuf sont structurels et intégrés dans le virion mature, et deux sont exprimés dans des cellules infectées mais non incorporés. Les virus de la grippe B et C ont une organisation protéique similaire, mais pas identique (Gíria *et al.*, 2012).

Tableau 3: Les segments génomiques du virus de la grippe A et leurs protéines codées (Wright and Webster, 2001)

| Segment | length in nucleotides | Encoded Protein(s) | Protein length in amino acids | Protein function |
|---------|-----------------------|--------------------|-------------------------------|--|
| 1 | 2341 | PB2 | 759 | Polymerase subunit; mRNA cap recognition |
| 2 | 2341 | PB1 | 757 | Polymerase subunit; RNA elongation, endonuclease activity |
| | | PB1-F2 | 87 | Pro-apoptotic activity |
| 3 | 2233 | PA | 716 | Polymerase subunit; protease activity |
| 4 | 1778 | HA | 550 | Surface glycoprotein; major antigen, receptor binding and fusion activities |
| 5 | 1565 | NP | 498 | RNA binding protein; nuclear import regulation |
| 6 | 1413 | NA | 454 | Surface glycoprotein; sialidase activity, virus release |
| 7 | 1027 | M1 | 252 | Matrix protein; vRNP interaction, RNA nuclear export regulation, viral budding |
| | | M2 | 97 | Ion channel; virus uncoating and assembly |
| 8 | 890 | NS1 | 230 | Interferon antagonist protein; regulation of host gene expression |
| | | NEP/NS2 | 121 | Nuclear export of RNA |

4.2.2. Cycle de réplication :

Le virus de la grippe a pour cible les cellules épithéliales du système respiratoire. D'une manière générale le cycle débute par une phase d'attachement au cours de laquelle l'Hémagglutinine virale se fixe à des récepteurs (glycoprotéines, glycolipides) de la membrane de la cellule hôte (Chen *et al.*, 2001; Edinger *et al.*, 2014). La fixation du virus sur la membrane cellulaire est suivie par son endocytose. Un pH faible du compartiment endosomal, par action du canal à protons M2 est cruciale pour déclencher un changement conformationnelle déstabilisant l'enveloppe virale et permettant ainsi la fusion entre la membrane endosomale cellulaire et la bicouche lipidique virale, ensuite les

nucléocapsides se dissocient de la couche de protéines M1 matricielles et permettent la délivrance de l'ARN viral dans le cytoplasme cellulaire (Rossman *et al.*, 2010).

A la différence des autres virus à ARN négatif, les étapes de transcription et de réplication ont lieu à l'intérieur du noyau cellulaire, après le transport actif des ARNs à travers les ports nucléaires (Cheung et Poon, 2007). Les complexes d'ARN polymérase formés par les polymérases acides et basiques (PA, PB1 et PB2) assurent la transcription d'ARN de polarité négatif en ARN de polarité positif à partir d'une amorce (fragment d'ARN de 10 à 13 nucléotides) empruntées aux ARNm cellulaires. Les segments complémentaires (ARN positif) seront utilisés d'une part, comme matrice pour la production des génomes viraux au sein du noyau et d'autre part, pour l'assemblage des protéines virales par les ribosomes cellulaires (Cheung et Poon, 2007).

Les nouvelles protéines virales synthétisées vont se fixer à la membrane cytoplasmique cellulaire et ainsi remplacer les protéines normales de la cellule hôte. Puis les nouvelles nucléocapsides se placent sous la membrane et provoquent un bourgeonnement. Les virions se détachent progressivement grâce à l'activité sialidase de la NA qui détruit les acides sialiques présent à la surface de la cellule infectée. Ainsi, les virions néoformés sont disséminés dans l'épithélium respiratoire (Figure 7) (Fontana *et al.*, 2014).

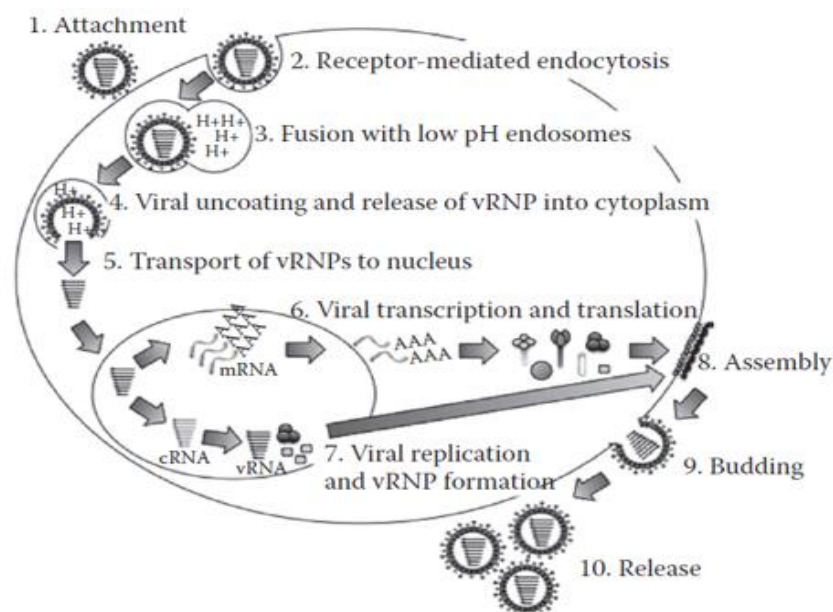


Figure 7: Schéma général du cycle de réplication du virus de la grippe (Fontana *et al.*, 2014)

4.2.3. Transmission et épidémiologie :

Le virus de la grippe se propage par des gouttelettes produites par la parole, la toux ou l'éternuement. Une autre voie possible de transmission du virus est le contact direct ou indirect (fomites) avec des sécrétions ou des aérosols contaminés. Le plus souvent, les souches d'origine zoonotique se propagent par contact direct avec l'animal infecté (Beigel *et al.*, 2005; Bridges *et al.*, 2003).

Habituellement, la grippe provoque des épidémies annuelles pendant les mois d'hiver dans les climats tempérés et mois pluvieux dans les climats tropicaux, marquant une saisonnalité claire du virus. Ces épidémies saisonnières annuelles sont caractérisées par une augmentation soudaine des cas de maladies respiratoires fébriles conduisant à l'absentéisme dans les écoles et les lieux de travail dans la communauté (Murray *et al.*, 2012; Cowling *et al.*, 2008; Shaman *et al.*, 2011).

Les épidémies peuvent être dues à une circulation exclusive ou prédominante d'un seul type ou sous-type viral A(H1N1) pdm09 ou A(H3N2), soit à une circulation concomitante de ces deux sous-types. Parfois, on peut observer la circulation de deux types de virus grippaux A et B (Smith *et al.*, 2008).

A la différence des gripes saisonnières qui surviennent chaque année, les gripes pandémiques arrivent à des intervalles beaucoup moins fréquents (tous les 30ans) et sont issues de cassures antigéniques ; elles sont caractérisées par un taux d'attaque et une mortalité élevée (Huraux *et al.*, 2003). Après 2 à 3 vagues d'infections massives, la grippe pandémique devient une grippe habituelle à évolution saisonnière (El Ramahi and Freifeld, 2019; Iuliano *et al.*, 2018). Quatre pandémies ont eu lieu au cours du siècle dernier en 1918, en 1957, en 1968 et en 2009 (Tableau 4).

Tableau 4 : Historique des pandémies grippales chez l'homme. (Iuliano *et al.*, 2018)

| Saison grippale | Pandémie correspondante |
|-----------------|--|
| 1918-1919 | Grippe espagnole(H1N1) 30 millions de décès |
| 1957-1958 | Grippe asiatique (H2N2) «asian-flu» 1million de décès |
| 1968-1969 | Grippe de Hong-Kong A(H3N2) 0,8 million de décès |
| 2009-2010 | Grippe mexicaine A(H1N1) pdm09 280 000 morts |

En règle générale, la grippe affecte toutes les catégories d'âge dans une population, toutefois la plus grande prévalence est enregistrée parmi les enfants en âge de scolarité (Taubenberger et Morens, 2008).

4.2.4. **Manifestations cliniques :**

L'infection par le virus Influenza peut se manifester par une variété de présentations cliniques, allant d'un syndrome grippal (SG) relativement bénin jusqu'au complications graves, surtout chez les groupes à haut risque. La gravité de l'infection se manifeste le plus souvent par une infection respiratoire aigüe sévère (IRAS). ces complications graves de la grippe sont plus fréquentes chez les personnes âgées, les enfants, les femmes enceintes et les personnes atteintes de comorbidités (Mohn et *al.*, 2018).

L'infection par les virus de la grippe A et B provoque généralement une maladie respiratoire fébrile aigüe caractérisée par la fièvre, la toux et des symptômes des voies respiratoires supérieures (écoulement nasal, éternuements, congestion nasale et mal de gorge) et symptômes systémiques (céphalées, myalgies et malaises) (Baron, 1996). Il est souvent difficile de distinguer l'infection grippale du rhume ou d'autres infections respiratoires, en particulier dans les cas bénins de grippe, bien que de fortes fièvres et une fatigue soudaine soient plus caractéristiques de la grippe (Bennett et *al.*, 2015). Les symptômes apparaissent après 1 à 5 jours d'incubation et peuvent durer 3 à 5 jours. La grippe est généralement une maladie spontanément résolutive. Cependant, la toux et l'asthénie peuvent persister pendant quelques semaines (Treanor et *al.*, 2000).

Bien que les complications de la grippe soient rares elles sont le plus souvent fatales. Elles sont liées essentiellement à la virulence du virus et à la fragilité du sujet infecté (nourrissons, personnes âgées, personnes souffrant de comorbidités, femmes enceintes...). La grippe peut se compliquer chez certaines personnes et donner lieu à des surinfection bactériennes (bronchites, pneumonies...), ou aggraver l'état d'une maladie chronique préexistante (El Ramahi et Freifeld, 2019).

4.2.5. Prophylaxie et traitement :

La vaccination annuelle est la principale mesure de prophylaxie contre la grippe « saisonnière ». En effet, l'immunité protectrice induite par les vaccins se traduit par la production d'anticorps neutralisant les protéines de surface, en particulier l'hémagglutinine et la neuraminidase du virus. Du fait de la dérive antigénique rapide des protéines de surface des virus grippaux, la composition vaccinale est revue annuellement en se référant aux recommandations émises par l'OMS pour chacun des deux hémisphères du globe (Sridhar *et al.*, 2015).

Deux vaccins (vaccin inactivé et vaccin atténué) ont montré jusqu'à aujourd'hui une bonne efficacité et une innocuité acceptable et ce, grâce à leur renouvellement périodique afin d'inclure les souches virales susceptibles de circuler dans la population. Ces vaccins sont soit trivalents contenant les deux sous-types des virus A(H1N1) pdm09 et A(H3N2), et un des virus de la lignée B (Victoria ou Yamagata), soit quadrivalent contenant les deux sous-types des virus A et les deux lignées du virus type B. Dans l'hémisphère nord, la sélection des souches vaccinales a lieu en janvier et février pour que la vaccination puisse avoir lieu en septembre. La production du vaccin étant relativement lente nécessitant 3 à 6 mois. L'OMS considère comme population à haut risque : les femmes enceintes, les enfants de moins de 5 ans, les sujets âgés, les porteurs de maladies chroniques et les professionnels de santé. Les contre-indications de la vaccination antigrippale se limitent aux allergies aux constituants du vaccin comme les protéines de l'œuf notamment l'ovalbumine (Sridhar *et al.*, 2015). Afin de pallier au temps de production du vaccin et à l'allergie aux œufs, des chercheurs estiment qu'il est plus pertinent de produire le vaccin inactivé sur les lignées cellulaires Madin-Darby Canine Kidney (MDCKs) (Perdue *et al.*, 2011).

À ce jour, deux majeures catégories d'antiviraux sont largement utilisés pour le traitement de la grippe : la classe des Adamantanes qui comportent l'amantadine (Symetrel®) et rimantadine (Flumadine®) qui sont des bloqueurs des canaux ioniques M2 ; et le zanamivir (Relenza®) et l'oseltamivir (Tamiflu®), qui sont des inhibiteurs de la neuraminidase (Barik, 2012). Cliniquement, une augmentation de la résistance a été observée avec l'utilisation d'antiviraux à base d'amantadine et rimantadine, ce qui a rendu cette classe d'antiviraux obsolète (Samson *et al.*, 2013; Bright *et al.*, 2006).

4.3 Le virus respiratoire syncytial (HRSV) :

Le virus respiratoire syncytial (HRSV) a été identifié pour la première fois en 1956 par Morris et *al.* chez les chimpanzés atteints de coryza et fut nommé *Chimpanzee Coryza Agent* (Morris et *al.*, 1956). Peu de temps après, le même virus a été récupéré dans les sécrétions des nourrissons atteints de maladies respiratoires (Chanock et *al.*, 1957). Le virus pouvait induire la formation de syncytia (une formation de cellules géantes multinucléées) dans les cellules épithéliales. Ces formations se produisent à la fois en culture cellulaire et *in vivo*. Cette caractéristique virale est à l'origine de son nom, bien qu'elle peut être produite par d'autres virus (Mammas et *al.*, 2020).

4.3.1. Taxonomie et structure virale :

Le HRSV est le seul virus pathogène humain connu du genre *Pneumovirus*, sous-famille des *Pneumovirinae*, famille des *Paramyxoviridae* (Figure 8). Les virions du HRSV sont hétérogènes en taille et en forme. Le génome consiste en un ARN linéaire de 15 220 pb, monocaténaire à polarité négative, et enveloppé par une bicouche lipidique d'origine membranaire (Figure 9) (Collins et Karron, 2013).

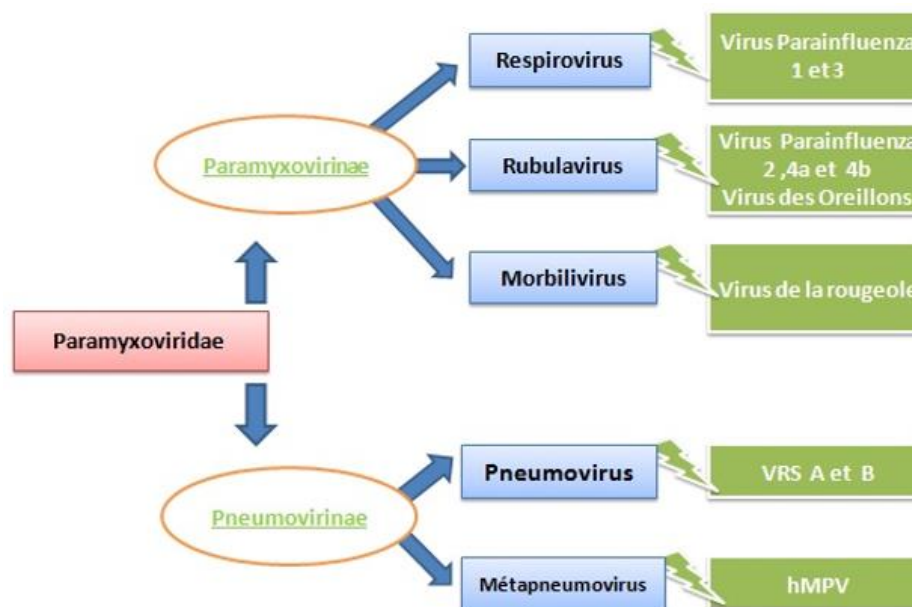


Figure 8: Famille des Paramyxoviridae. D'après(Freymuth, 2004)

Deux sous-types HRSVA et HRSVB, ont été initialement distingués basé sur les différences antigéniques dans la glycoprotéine d'attachement G. Plus tard, cette séparation

a été confirmé dans d'autres gènes et analyse phylogénétique des séquences du gène G ont permis une division ultérieure des sous-groupes en génotypes HRSV.

La particule virale est entourée d'une bicouche lipidique contenant quatre protéines : les glycoprotéines G (liaison aux récepteurs), les protéines F (membrane fusion), la protéine matricielle (M), et la petite protéine hydrophobe (SH). Les virions aussi contiennent une ARN polymérase (L) ARN-dépendante, une phosphoprotéine (P) et une protéine 22K (M2-1) (Tableau 5). De plus, trois protéines non structurales (NS1, NS2 et M2-2) sont produites dans des cellules infectées. L'attachement du HRSV à la cellule hôte est principalement médié par la protéine G. La protéine F permet la fusion de l'enveloppe virale avec la cellule hôte infectée et sa fusion ultérieure avec les cellules voisines, ce qui donne lieu au syncytia caractéristique (Chanock et *al.*, 1957). Les protéines de surface sont aussi les médiateurs dans la production d'anticorps neutralisants par l'hôte infecté.

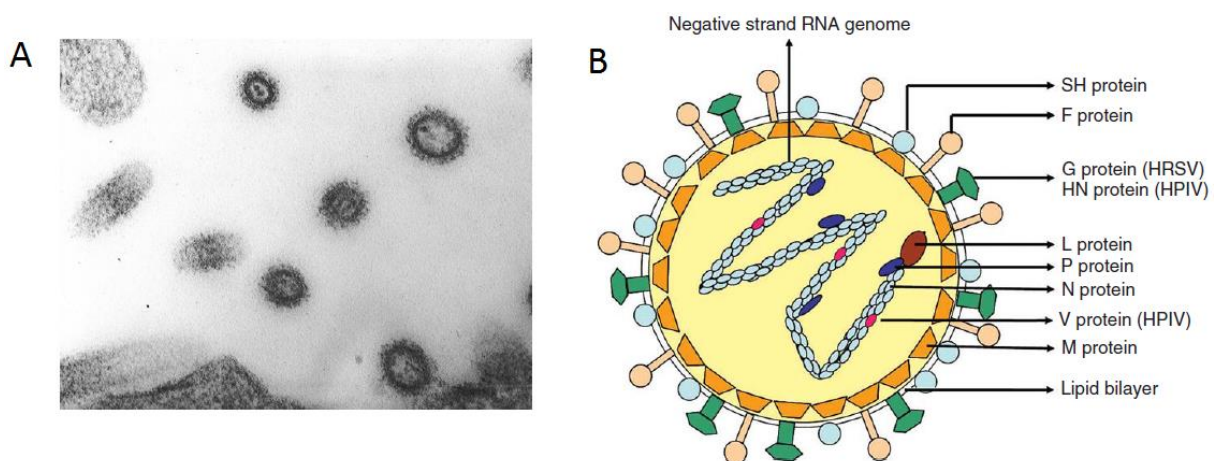


Figure 9 : A image d'un virion HRSV en microscopie électronique ; B : Schéma général du virion d'un Paramyxovirus. (Boncristiani et al., 2009)

Les glycoprotéines F et G du HRSV, de par leur position dans l'enveloppe virale, sont les protéines les plus importantes impliquées dans une réponse immunitaire protectrice, et les anticorps dirigés contre elles présentent une forte activité de neutralisation *in vitro* (Beeler et van Wyke Coelingh, 1989; P R Johnson et *al.*, 1987).

La protéine G est une glycoprotéine membranaire de type II qui contient de 289 à 342 acides aminés. Le gène G est composé de 918 à 1062 pb (sous-groupe A) ou 921 à 981 pb (sous-groupe B). La glycoprotéine G présente un intérêt particulier car c'est la

protéine présentant la plus grande variabilité parmi les protéines du virus respiratoire syncytial (Anderson et *al.*, 1985; Gimenez et *al.*, 1986; P. R. Johnson et *al.*, 1987) et peut supporter de grandes délétions ou de multiples substitutions d'acides aminés sans perte de fonction, cette variabilité entre les souches du HRSV est une caractéristique qui peut modifier la pathogénicité et l'adaptation du virus et contribuer à sa capacité de provoquer des infections et des épidémies répétées en échappant au système immunitaire (Shobugawa et *al.*, 2009; Eshaghi et *al.*, 2012).

La protéine G est exprimée sous deux formes : sécrétées et ancrées dans la membrane, appelées respectivement Gs et Gm. Gs est lié à l'inhibition de la neutralisation, tandis que Gm est lié à l'attachement viral. Cette fixation membranaire hôte-virus est médiée par l'interaction du récepteur des protéoglycanes du sulfate d'héparine. La protéine G du HRSV se compose de trois domaines principaux (Figure 10), à savoir le domaine cytoplasmique (résidus 1 à 37), le domaine transmembranaire (résidus 38 à 66) et l'ectodomaine (résidus 67 à 298). La région C-terminale de la protéine ectodomaine G, dite « mucine-like » car elle est très riche en résidus proline, thréonine et sérine qui caractérisent les mucines, contient deux segments hypervariables : HVR-1 et HVR-2, séparés par un domaine hautement conservé (CX3C domaine) de 13 acides aminés (résidus 164 à 176).

Le changement dans la composition des domaines variables en acides aminés peut altérer les propriétés antigéniques du virus, ces variations antigéniques du domaine mucine de la protéine G permettent au virus d'améliorer ces mécanismes d'échappement immunitaire (Melero et *al.*, 2017). Une autre caractéristique inclut une région centrale conservée (motif CX3C) qui est responsable de la liaison au récepteur cellulaire 'CX3CR1' pour diminuer la libération de cytokines inflammatoires (Chirkova et *al.*, 2015). Bien que la protéine G soit la cible d'anticorps neutralisants, sa forte variabilité antigénique rend difficile le développement de vaccins ciblant cette protéine (Taleb et *al.*, 2018). En revanche, la protéine de fusion F est fortement conservée et contient plus d'épitopes cibles des anticorps neutralisants que la glycoprotéine G, de plus, compte tenu de sa fonction de fusion virus/cellules, la protéine F a été la cible principale des futurs vaccins contre le HRSV (Beeler et van Wyke Coelingh, 1989; Ngwuta et *al.*, 2015; Magro et *al.*, 2012).

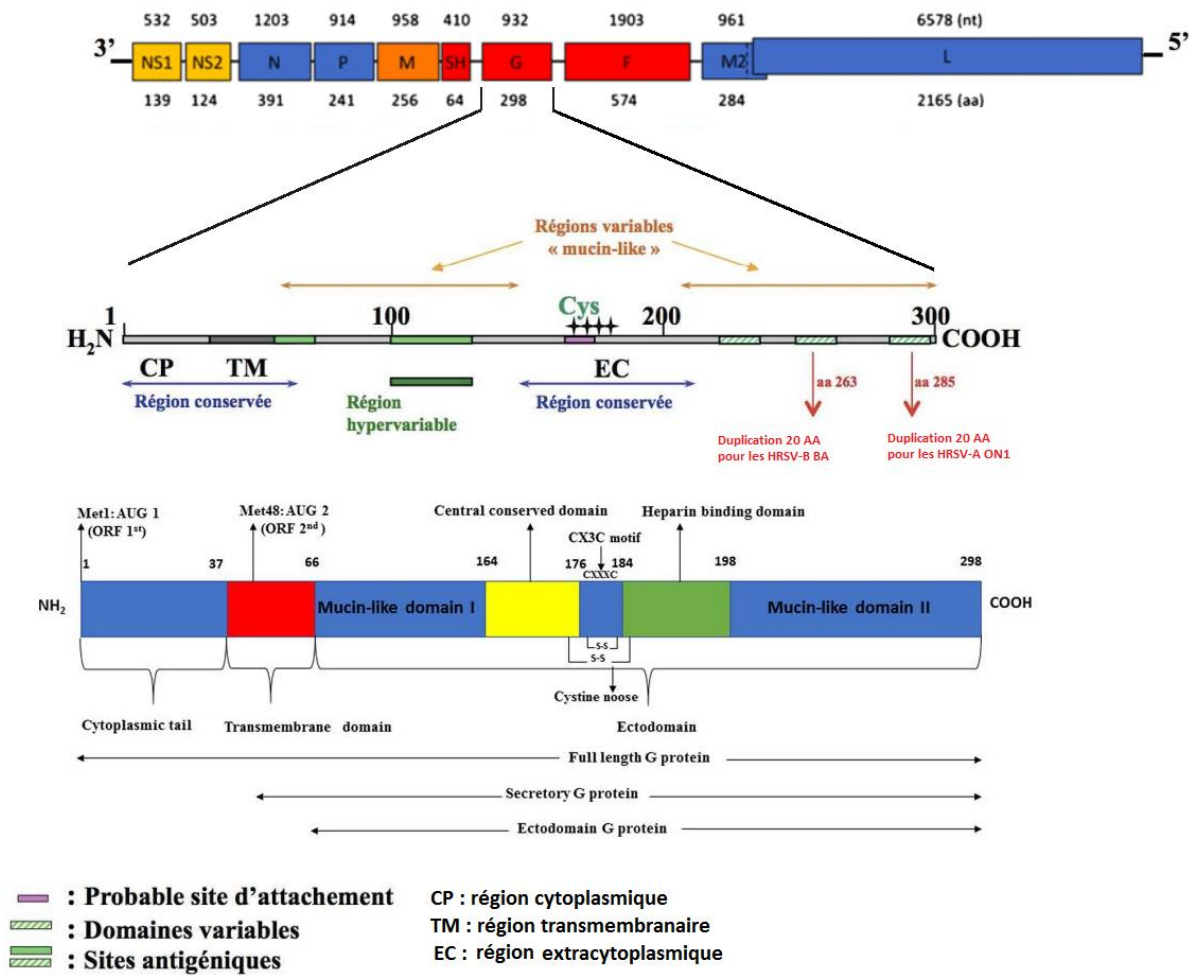


Figure 10 : Représentation schématique du gène codant la glycoprotéine G. adapté de (Hamza et al., 2021 ; Moriceau, 2019)

L'énorme variabilité génétique de la protéine G du HRSV ont fait d'elle la cible majeure de plusieurs recherches sur l'épidémiologie moléculaire et l'évolution du virus respiratoire syncytial, la plupart de ces études se sont focalisées sur la deuxième région hypervariable (HVR-2) du gène codant la protéine G (Anderson et al., 1985; Aamir et al., 2013; Eshaghi et al., 2012; P. R. Johnson et al., 1987; Hibino et al., 2018; Mufson et al., 1985; Scott et al., 2004).

Grâce aux analyses de variabilité génétique de la région HVR-2, plusieurs génotypes sont identifiés au sein des sous-groupes HRSV-A et HRSV-B (J. A. Melero, 2006). 16 génotypes de HRSV-A (GA1 à 7, SAA1,SAA2, CB-A, NA1 à 4, ON-1 et ON-2) et 29 génotypes de HRSV-B (BA1 à 14, GB1 à 5, SAB1 à 4, URU1, URU2, CB1, BA-C, CB-B et THB) ont été décrits (Dapat et al., 2010; Eshaghi et al., 2012; Ono et al., 2023; Peret et al., 2000; Shobugawa et al., 2009). Alors que les nouveaux génotypes

continuent d'émerger, d'autres qui circulaient auparavant tendent à disparaître (Peret et *al.*, 1998; Zhang et *al.*, 2010).

Tableau 5 : Description des protéines virales du HRSV et de leurs fonctions. (Collins et Karron, 2013)

| Protéine | Fonction |
|---------------------------|--|
| N - nucléoprotéine | Composant de la nucléocapside virale |
| P - phosphoprotéine | Composant de la nucléocapside virale |
| L - "grosse protéine" | Composant de la nucléocapside virale |
| M - protéine matricielle | Protéine structurale, composant de la surface interne de l'enveloppe. |
| F - protéine de fusion | Une protéine de surface transmembranaire qui médie la fusion virale et la formation de syncytia. |
| G - glycoprotéine | Protéine transmembranaire de surface, principale protéine d'adhésion/ de liaison du virus à la cellule hôte. |
| SH - "petite hydrophobe" | Protéine transmembranaire de surface, fonction pas complètement connue. |
| M2-1 (Orf1) | Une protéine associée à la nucléocapside jouant un rôle dans la transcription virale. |
| M2-2 (Orf2) | La fonction des protéines n'est pas complètement connue. |
| NS1 - "non structurel-1" | Protéine non structurale, action sur l'interféron cellulaire. |
| NS2- « non structurel-2 » | Protéine non structurale, action sur l'interféron cellulaire. |

4.3.2. Cycle de réplication :

Le HRSV se lie aux glycosaminoglycanes de la surface cellulaire via la glycoprotéine virale G. Lors de l'interaction virus-récepteur, la fusion entre le HRSV et la cellule a lieu par la liaison de la protéine virale F à la membrane cytoplasmique. L'internalisation du HRSV est considérée comme indépendante du pH et peut se produire soit dans le plasma, soit dans membranes endosomales. L'expression de la protéine virale F sur la membrane plasmique des cellules infectées favorise la fusion entre cellules adjacentes, entraînant la formation de syncytia, caractéristique de l'effet cytopathique du virus (J. Melero, 2006).

Une fois dans le cytoplasme, l'ARN viral à brin négatif est transcrit par l'action coordonnée des protéines L, N, P et M2-1 ; résultant en un ensemble des ARNm, qui dirigent ensuite la synthèse des protéines virales. À un moment donné, sous l'action de la protéine M2-2, le complexe polymérase passe de la transcription de l'ARNm à la réplication de l'ARN viral, générant un ARN complet de polarité opposée à celle du génome (anti génome). L'antigénome sert de modèle au complexe polymérase pour générer des génomes d'ARN de sens négatif de la descendance (J. Melero, 2006).

La protéine de la matrice virale (M) médie l'association des nucléocapsides avec la membrane cellulaire contenant des protéines d'enveloppe du HRSV, donnant lieu au bourgeonnement du virus (Figure 11).

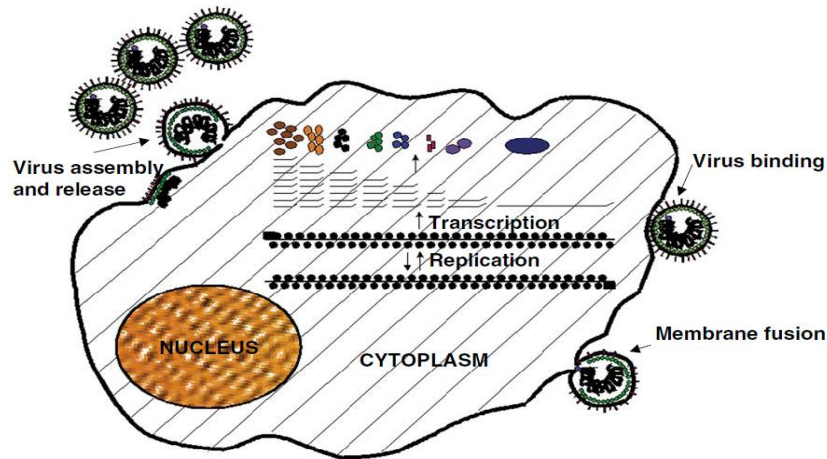


Figure 11 : schéma général de du cycle de réplication du Virus Respiratoire Syncytial. (J. Melero, 2006)

4.3.3. Transmission et épidémiologie :

Le HRSV est l'un des pathogènes les plus vulnérables aux changements environnementaux. La survie du HRSV dans l'environnement dépend largement de l'humidité présente. Le virus est aussi sensible aux divers agents chimiques, tels que les détergents, les alcools et l'éther (Berry et Babady, 2023).

Le HRSV est transmis par les sécrétions respiratoires des personnes infectées. Ainsi, le principal mode de transmission du HRSV est par de gouttelettes générées par les éternuements, la toux ou la parole. Les hôtes humains sont la seule source de propagation du virus et sa dissémination nécessite un contact étroit entre les individus ou un contact direct des mains contaminées avec les muqueuse nasale ou conjonctivales (Collins et Karron, 2013).

Bien que le HRSV soit un agent pathogène assez vulnérable, ce virus semble être l'un des virus les plus infectieux qui affectent les individus de tout âge (Collins et Karron, 2013). Pratiquement, tous les enfants auront contracté ce virus au moins une fois à l'âge de trois ans, et les réinfections peuvent survenir fréquemment tout au long de leur vie (Sullender, 2000). En effet, l'immunité acquise lors de la première infection à HRSV a tendance à décroître rapidement au fil du temps (Griffiths et *al.*, 2017).

Le virus peut causer des infections respiratoires aiguës basses (LRTIs) chez les personnes de tout âge, mais la population infantile reste la plus touchée. Le HRSV est la cause la plus fréquente de bronchiolite et de pneumonie chez les nourrissons et les enfants dans le monde. L'infection par le HRSV est la deuxième cause de décès suite à une LRTI au niveau mondial (Troeger et *al.*, 2018).

Les enfants -notamment les nourrissons moins de 6 mois-, les porteurs des maladies pulmonaires et cardiaques chroniques, les personnes âgées et les sujets immunodéprimés sont les plus disposés à développer une grave maladie suite à l'infection par le HRSV (Berry et Babady, 2023; Sullender, 2000).

Les environnements surpeuplés sont propices à propagation du HRSV parmi les individus sensibles, tel les écoles et les garderies. Dans les hôpitaux également, le virus provoque des épidémies hospitalières annuelles chez les enfants et les adultes, y compris l'équipe soignante. Les enfants hospitalisés peuvent avoir une période d'excrétion virale prolongée, entraînant une prolongation de la période de propagation de l'épidémie. Des procédures d'isolement sont recommandées pour les patients hospitalisés infectés par le virus (Berry et Babady, 2023; Thorburn et *al.*, 2004).

Les épidémies à HRSV marquent une saisonnalité claire. Le virus provoque des épidémies au cours des mois d'automne-hiver dans les climats tempérés de l'hémisphère nord. L'épidémie débute généralement au cours du mois d'octobre ou en novembre, le pic est atteint en décembre ou janvier et les derniers cas surviennent généralement en avril. Alors que dans les climats tropicaux, le HRSV circule principalement pendant la saison pluvieuse. Le schéma des épidémies saisonnières du virus peut être modifié par les changements climatiques ou par les changements dans la saisonnalité des autres virus respiratoires (Donaldson, 2006; Mak et *al.*, 2012).

Les deux sous-types (HRSVA et HRSVB) peuvent co-circuler chaque année, avec un sous-groupe prédominant, qui peut varier d'une saison à l'autre. Différents schémas de prévalence des sous-groupes A et B avait été décrits (Arbiza et *al.*, 2005; Collins et Karron, 2013; Scott et *al.*, 2004; Zhang et *al.*, 2010). Il a également été observé que pendant une épidémie, le nombre de génotypes circulants est limité et qu'ils ont tendance à être remplacés par d'autres génotypes différents la saison suivante. Cette transition d'un

génotype à l'autre serait favorable pour le virus, en lui permettant d'échapper à l'immunité acquise par son hôte (Jain *et al.*, 2015; Peret *et al.*, 1998).

4.3.4. Manifestations cliniques :

La présentation clinique de l'infection à HRSV va dépendre de l'âge du patient et de son statut immunitaire. La période d'incubation de la maladie respiratoire à HRSV est de 3 à 8 jours, nettement supérieur à celle de la grippe (Lessler *et al.*, 2009). L'effet pathologique est dû à l'invasion directe l'épithélium respiratoire par le virus, accompagnée de dommages cellulaires causés par la réponse immunitaire (Collins et Karron, 2013).

La maladie débute par une infection des voies respiratoires supérieures (URTI) caractérisée par un écoulement nasal, des éternuements et de la toux. La fièvre est moins fréquente chez les enfants infectés par le HRSV, en particulier chez les jeunes nourrissons (Chughtai *et al.*, 2017; Yan *et al.*, 2017). Ces manifestations cliniques sont plus fréquentes chez les enfants plus âgés (>2 ans) et les adultes, tandis que chez les nourrissons plus jeunes, le virus détermine souvent une LRTI.

L'atteinte des voies respiratoires basses due au HRSV chez les nourrissons se manifeste le plus souvent par une bronchiolite, qui est généralement précédé de 2 à 3 jours de symptômes des voies respiratoires supérieures et se caractérise par tachypnée, dyspnée, toux, et respiration sifflante expiratoire. La fièvre est présente chez 50 % des nourrissons suite à l'infection (Boncristiani *et al.*, 2009). Une étude prospective menée par l'équipe de Hall chez des nourrissons hospitalisés moins de 1 an pendant les saisons 2000-2004 et diagnostiqués positifs au HRSV, a montré que (85%) d'eux souffraient de la bronchiolite, alors que pour les enfants de 2-5 ans d'asthme (60%) et de pneumonie (51%). L'infection à HRSV chez les enfants plus âgés et les adultes est récurrente, touche les voies respiratoires supérieures et généralement asymptomatique (Hall *et al.*, 2009).

Les populations à haut risque d'hospitalisation pour une LRTI liée au HRSV sont généralement les enfants prématurité, les personnes atteintes des troubles immunologiques sous-jacents, naturels ou acquis, des anomalies génétiques et chromosomiques (par exemple, le syndrome de Down), la présence d'autres maladies pulmonaires et cardiaques chroniques, des néoplasies et des anomalies du système nerveux central. Les enfants atteints de malformations cardiaques congénitales sont particulièrement à risque (Berry et

Babady, 2023). La surinfection bactérienne est fréquente lors des bronchiolites sévères à HRSV chez les nourrissons, et la répétition des épisodes obstructives avec sifflement, doit faire invoquer le diagnostic d'asthme du nourrisson (Thorburn et *al.*, 2006; Freymuth et *al.*, 2010; Griffiths et *al.*, 2017). Les données d'une étude récente démontrent l'importance clinique du HRSV chez la population juvénile, estimant une moyenne annuelle d'infections à plus de 30 millions, 3 à 3,5 millions d'hospitalisations et 34 114 à 46 485 décès d'enfants moins de cinq ans dans les pays en voie de développement (LMICs) (Antillón et *al.*, 2023; Berry et Babady, 2023; Griffiths et *al.*, 2017).

Les recherches sur les infections au HRSV chez les adultes âgées sont limitées. Cependant, le HRSV représente une cause notable d'augmentation la morbidité et la mortalité chez cette catégorie, probablement en partie à cause de la « sénescence immunitaire ». En moyenne, aux États-Unis, le HRSV serait responsable de 17 milles décès par an, dont 78 % chez les personnes âgés de > 65 ans (Thompson et *al.*, 2003). Ainsi, dans les pays développés, les décès dus au HRSV sont beaucoup plus fréquents chez les personnes âgées, alors que la population pédiatrique est la plus vulnérable dans les pays en voie de développement (LMICs) (Collins et Melero, 2011).

4.3.5. Prophylaxie et traitement :

Les URTIs dues au HRSV ne nécessitent aucun traitement spécifique, et les antibiotiques ne peuvent être envisagé qu'en présence de complications bactériennes comme l'otite moyenne aiguë. Chez les nourrissons avec Bronchiolite à HRSV, le traitement est principalement axé sur le soulagement des symptômes: décongestion nasopharyngée, kinésithérapie ou (massage) respiratoire, bronchodilatateurs, réhydratation et oxygénothérapie lors d'une hypoxémie (SatO₂ inférieure à 94%) (Aubin et *al.*, 2003).

Actuellement, il n'existe que deux médicaments approuvés pour le traitement de la maladie à HRSV (Empey et *al.*, 2010). Le palivizumab® (Synagis) qui consiste en des anticorps monoclonaux (IgG) humanisé ciblant les épitopes stables de la protéine de fusion (F), fournissant une immunité passive. Il est indiqué pour la prévention chez les nourrissons à haut risque, y compris ceux souffrant de maladies pulmonaires chroniques, de cardiopathies congénitales et les prématurés. Cependant, le coût élevé de palivizumab a fini par restreindre son utilisation et générer de nombreux discussions sur les populations qui devraient avoir accès à ce médicament (Lanari et *al.*, 2013; Meissner et *al.*, 2003).

La Ribavirine® est un analogue de la guanosine actif contre les virus à ARN et ADN, disponible sous différentes formes (Aérosols, solutions injectables ou formes orales). La FDA (US Food and Drug Administration agency) avait approuvé sa forme aérosol en 1986 pour le traitement des LRTIs dues au HRSV chez les nourrissons et les jeunes enfants, et il est toujours le seul médicament approuvé pour cette indication. Cependant, ce médicament a présenté des preuves limitées de ses bénéfices, un risque de toxicité pour les professionnels de santé et un coût élevé. L'American Academy of Pediatrics ne recommande généralement pas le traitement à la ribavirine pour les infections par le HRSV (Empey et *al.*, 2010; Hall et *al.*, 1983; Shah et Chemaly, 2011; Glanville et *al.*, 2005).

Globalement, il y a un grand besoin de développement de vaccins contre le HRSV. Ce développement a été placé comme priorité par l'OMS depuis plus de 20 ans (Hall, 2010). La recherche d'un vaccin actif contre le HRSV a commencé depuis de nombreuses années, des projets de futurs vaccins basés sur différentes techniques (virus vivants atténués, basés sur des sous-unités protéiques et basés sur des vecteurs) sont à des différentes phases d'essais. Les difficultés pour ce développement résident dans le fait que ce vaccin il faudrait l'administrer durant le premier stade de vie de l'enfant et à cette période le système immunitaire est très immature, les protéines G et F du HRSV sont faiblement immunogènes et la présence d'anticorps maternels pourrait interférer avec le vaccin. Cependant, une alternative pour protéger les nourrissons durant leurs premiers mois de vie, serait de vacciner les femmes enceintes, cela permettra aux futurs nourrissons de naître avec un taux élevé des anticorps protecteurs contre le HRSV (Anderson, 2013; Chang, 2011).

Un autre obstacle fait référence à un échec antérieur survenu dans les années 1960 qui a entraîné une augmentation de la gravité de la maladie à HRSV chez les nourrissons vaccinés. Le vaccin était développé à partir du virus inactivé en utilisant du formol mélangé à un adjuvant et administré par voie intramusculaire. Le vaccin formolé était inopérant et dangereux pour les nourrissons, le groupe vaccinés a été plus susceptible à des infections plus graves que le groupe témoins non vaccinés (4/5 de la population vaccinée a nécessité d'être hospitalisé contre 1/20 dans le groupe témoin) (Kim et *al.*, 1969).

Récemment, la FDA aux États-Unis a approuvé Abrysvo®, le premier vaccin contre le HRSV pour prévenir les LRTIs chez les nourrissons dès la naissance par induction des d'Ac circulants contre le HRSV chez la maman. Abrysvo® est administré en une d'injection unique intramusculaire entre la 32ème et 36ème semaine de gestation. Abrysvo® a aussi été approuvé pour la prévention du LRTIs causés par le HRSV chez les personnes âgées de 60 ans et plus.

4.4 Le métapneumovirus humain (HMPV) :

La découverte du Métapneumovirus humain (HMPV) est relativement récente, Cet agent a été découvert au Pays-Bas en 2001, grâce à l'étude par séquençage d'anciens isolats non identifiés, qui dataient de 20 ans, et ayant induit un effet cytopathogène sur des lignées de cellules (LLC-MK2). En parallèle, des études utilisant des sérums archivés collectés dans les années 1950 ont révélé une séroprévalence de 100 % chez les humains de plus de 5 ans (Van Den Hoogen et *al.*, 2001). L'analyse phylogénétique suggère que le HMPV a divergé des métapneumovirus aviaires il y a 200 à 300 ans (De Graaf et *al.*, 2008).

4.4.1. Taxonomie et structure virale :

Le HMPV appartient à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-famille *Pneumovirinae*, genre *Metapneumovirus*. Des études génétiques et antigéniques indiquent que, comme le HRSV, les isolats du Metapneumovirus humain se regroupent en deux sous-types génétiques distincts, A et B, et chaque sous-type comprend au moins deux génotypes (A1, A2, B1 et B2). Il n'a été démontré aucune relation apparente entre les sous-groupes et le degré de sévérité de l'infection (Crowe et Williams, 2014).

Le HMPV est un virus pléomorphe sphérique ou filamenteux, le virus est doté d'une enveloppe ou (péplos), la taille des virions varie entre 150 à 600 nm, le génome viral consiste en un ARN simple brin à sens négatif. Les gènes du HMPV sont analogues à ceux du HRSV, bien que l'organisation des gènes entre M et L soit différente et le (NS1 et NS2) soient absents (Crowe et Williams, 2014).

4.4.2. Cycle de réplication :

La réplication du HMPV se fait de manière similaire au HRSV (Figure 10) ; La protéine G du virus se lie à l'héparane et les glycosaminoglycanes membranaires (Thammawat et *al.*, 2008). La protéine F est nécessaire à la réplication, elle contient un motif conservé arginine – glycine – aspartate (RGD). Le HMPV engage le sous-ensemble d'intégrines se liant au RGD, notamment $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 1$ et $\alpha V\beta 5$, pour s'attacher aux cellules et y pénétrer. Les gènes SH et G ne sont pas essentiels à la réplication du virus (Cox et *al.*, 2012).

4.4.3. Transmission et épidémiologie :

L'infection due au virus HMPV a été relatée chez toutes les tranches d'âge de la société, avec une incidence plus grande chez les enfants et principalement les nourrissons moins de 6 mois. D'autres groupes sont à risque accru de développer une infection respiratoire grave due au HMPV notamment les personnes immunodéprimés (Boncristiani et *al.*, 2009).

Dans les climats tempérés, le HMPV circule essentiellement pendant la période couvrant la fin de l'hiver au début du printemps, suivant de près ou se chevauchant avec le pic d'activité du HRSV, alors que dans les régions à hiver court (climat-subtropicale), la circulation du virus a tendance à culminer au printemps et l'été. Les différents sous-groupes A et B cocirculent dans la même saison, et leur prédominance varient d'un endroit à l'autre et d'une année à l'autre (Boncristiani et *al.*, 2009).

4.4.4. Manifestations cliniques :

Le HMPV provoque à la fois les infections des voies supérieures et inférieures. Le délai entre l'infection par le virus et l'apparition des premiers symptômes est 4 à 6 jours, et ces derniers durent généralement 1 à 2 semaines (Williams et *al.*, 2004).

Les symptômes cliniques du HMPV sont similaires à ceux du HRSV. La gravité varie de légers symptômes respiratoires à une maladie grave des voies respiratoires inférieures incluant les bronchiolites et pneumonies chez les enfants de bas âge.

Cependant, l'âge médiane des enfants hospitalisés pour une LRTI à HMPV est plus élevé que ceux atteints de HRSV. Les symptômes systémiques comprenaient de la fièvre, des myalgies et des vomissements (van der Hoogen et *al.*, 2001; Boncristiani et *al.*, 2009).

4.4.5. Prophylaxie et traitement :

Outre les traitements symptomatiques, l'oxygénothérapie, les bronchodilatateurs, corticostéroïdes et la ventilation mécanique, actuellement, il n'y a pas de traitement antiviral spécifique ni un vaccin contre le HMPV (Boncristiani et *al.*, 2009).

4.5 Les Parainfluenza virus (HPIVs) :

Les quatre sérotypes de virus Parainfluenza humain (HPIV-1 à HPIV-4) ont été isolés pour la première fois entre 1956 et 1960 (Henrickson, 2003). Les HPIV-1, 2 et 3 ont été initialement isolés chez des nouveau-nés et des enfants atteints de LRTIs et le PIV-4 a été récupéré chez des enfants et des jeunes atteints d'URTIs. Ce nouveau groupe de virus qui causent des maladies respiratoires se développe difficilement dans les œufs embryonnés et aussi partage peu d'antigènes avec le virus de la grippe et est donc d'où leur classement dans une autre famille taxonomique : les *Paramyxoviridae*. En fait, cette famille de virus est l'une des plus coûteuses en termes de charge de morbidité et d'impact économique. Les membres récemment découverts des *Paramyxoviridae* (virus Hendra, Nipah, et métagneumovirus) témoignent de ce point (Nichol et *al.*, 2000; van der Hoogen et *al.*, 2001). Peu de temps après leur découverte, les virus Parainfluenza ont été répertoriés comme l'une des principales causes du croup chez les nourrissons, en particulier le HPIV-1. Actuellement HPIV-1 à 3 sont classés en deuxième rang, après le HRSV, comme cause principale de LRTIs chez les nourrissons et les enfants (Falsey, 2012; Henrickson, 2003).

4.5.1. Taxonomie et structure virale :

Les HPIVs appartiennent à la famille des *Paramyxoviridae*, sous-famille des *Paramyxovirinae*. Les sérotypes HPIV-1 et HPIV-3 sont classés dans le *genus* *Respirovirus*, tandis que Les HPIV-2 et HPIV-4 se regroupent dans le *genus* *Rubulavirus*. Les virions sont pléomorphes, avec un diamètre de 150 à 200 nm. C'est un virus enveloppé à ARN sens négatif. Le génome, contrairement à celui de la grippe, est non

segmenté, mesure environ 15 000 nucléotides et code pour six protéines structurales (Figure 12). Le virus possède deux protéines membranaires, l'hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la protéine de fusion (F). Les HPIVs ne possèdent pas de protéines non structurales NS (Falsey, 2012).

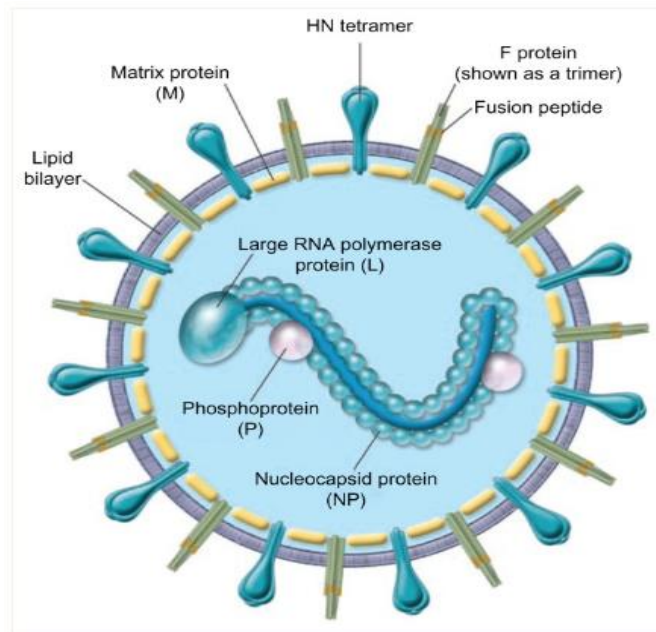


Figure 12 : schéma d'un virus Parainfluenza humain. (Falsey, 2012)

4.5.2. Cycle de réplication :

La glycoprotéine (HN) reconnaît les glycoprotéines contenant de l'acide sialique présentes sur la membrane cellulaire de la cellule hôte et permet l'attachement entre le virus et sa cible. L'interaction HN est nécessaire pour déclencher la fusion virus-cellule médiée par la protéine F. Ainsi, après fusion du virus avec la cellule hôte, il est libéré dans le cytoplasme. Le cycle viral est similaire à celui des autres Paramyxoviridae (Figure 10) (Boncristiani et *al.*, 2009; Henrickson, 2003).

4.5.3. Transmission et épidémiologie :

Le HPIV est un virus qui est facilement inactivé par la chaleur, sensible au taux d'humidité et aux solvants organiques. La transmission se fait par les gouttelettes générées lors des éternuements, toux ou parole. Un autre mode potentiel de transmission virale est par les fomites, le HPIV peut survivre jusqu'à 10 heures sur des surfaces poreuses (Henrickson, 2003).

La primo-infection par HPIV se produit pendant la petite enfance. La plupart des enfants sont séropositifs à l'âge de 5 ans. Les réinfections sont fréquentes, mais la gravité de la maladie est inversement proportionnelle au taux d'anticorps neutralisants (Boncristiani *et al.*, 2009).

Les virus parainfluenza ont également marqué une saisonnalité. Les infections dues au sous-type HPIV-3 sont plus fréquentes et apparaissent au printemps et particulièrement en été de chaque année. Le HPIV-1 survient le plus souvent en automne et tous les 2 ans. Alors que le PIV-2 -moins commun que les deux autres sous-types mentionnés- peut provoquer des épidémies en alternance avec le HPIV-1. Le HPIV-4 apparaît sporadiquement tout au long de l'année (Branche et Falsey, 2016).

Les HPIV-1 et 3 sont les sous-types des parainfluenza virus les plus fréquemment associés au LRTIs chez les nourrissons, les immunodéprimés, les patients avec des comorbidités chroniques, et les personnes âgées. L'infection par le HPIV-3 chez les nourrissons de moins de 6 mois est souvent présenté comme la deuxième cause de bronchiolite et de pneumonie, juste après le virus respiratoire syncytial. Le HPIV-1 a tendance à provoquer des épidémies biennales où il représente environ 30 à 50 % des cas de croup chez les jeunes enfants. La plupart des enfants infectés par Les HPIV-2 sont généralement âgés de 2 à 5 ans. Le HPIV-4 est le sérotype le plus rare, il cause des URTIs principalement chez les enfants plus âgés et les adultes (Branche et Falsey, 2016; Falsey, 2012; Henrickson, 2003).

4.5.4. Manifestations cliniques :

Les virus Parainfluenza peuvent causer des infections se traduisant par une grande variété de signes cliniques allant d'une infection banale des voies respiratoires supérieures (URTI) naturellement résolutive à une pneumonie aux conséquences graves (Falsey, 2012; Hall, 2001).

Le principal syndrome clinique lié au Parainfluenza virus est la laryngotrachéite ou le croup viral. Il est causé principalement par le sérotype HPIV-1 (26 à 74% des cas de croup liés aux HPIVs), les HPIV-2 et HPIV-3 (10% des cas chacun) (Denny *et al.*, 1983). La sévérité du croup est variable. Généralement, les symptômes s'atténuent rapidement

avec résolution de la toux en deux jours, bien que peuvent persister jusqu'à une semaine (Branche et Falsey, 2016).

En plus du croup viral, le HPIV peut provoquer d'autres infections des voies respiratoires inférieures. En particulier chez les personnes âgées atteintes d'une maladie chronique cardiaque ou pulmonaire. Enfin, des LRTIs grave et pneumonies ont été rapportées chez des patients immunodéprimés, en particulier les personnes atteintes d'hémopathies malignes et des receveurs d'organes (Branche et Falsey, 2016).

4.5.5. Prophylaxie et traitement :

Il n'existe actuellement aucun agent antiviral homologué pour le traiter les infections aux HPIVs. Le traitement est principalement symptomatique (Falsey, 2012); La ribavirine sous forme aérosol ou systémique en association avec la gammaglobuline intraveineuse a été rapporté dans certaines études. Chez les enfants atteints d'immunodéficiences sévères et infection par le HPIV, la ribavirine a été administrée sur une longue période (3 à 10 mois) sans toxicité apparente. Bien que la ribavirine ait été bien tolérée, son efficacité pour traiter les cas d'infection dues au HPIV est difficile à déterminer vu que la plupart des études portent sur un petit nombre de cas, avec des différentes voies d'administration, utilisation simultanée avec la gammaglobuline intraveineuse et les différences des populations d'étude (Falsey, 2012; Stankova et *al.*, 2007).

4.6 Les Rhinovirus humains :

Les rhinovirus humains (HRV), anciennement appelé 'coryzaviruses', ont été découverts pour la première fois dans les années 1950 dans un effort pour identifier l'étiologie du rhume. Les rhinovirus sont la cause la plus courante d'URTIs dans le monde entier et presque toute l'année, entraînant des conséquences économiques importantes en termes de visites médicales, pertes de journées de travail et d'absentéisme d'école (Mackay, 2008).

4.6.1. Taxonomie et structure virale :

Les HRV sont de petits virus à ARN monocaténaire sens positif d'environ 7,2 kb, non enveloppés, qui sont maintenant classés dans le genre *Enterovirus*, famille des *Picornaviridae* (Le Gall et al., 2008).

Actuellement, les HRV sont divisés en trois espèces approuvées : HRV-A (75 sérotypes), HRV-B (25 sérotypes) et la nouvelle espèce HRV-C récemment décrite (McErlean et al., 2008). La structure du HRV révèle une particule icosaédrique composée de 12 pentamères avec un diamètre d'environ 30 nm. La capsid virale est composée de quatre protéines : VP-1, VP-2, VP-3 et VP-4 (Figure 13). Les protéines VP-1, VP-2 et VP-3 sont responsables de la diversité antigénique et la réponse immunitaire de l'hôte après l'infection. La protéine VP-4 se trouve à l'intérieur du virus et ancre la nucléocapside à la capsid virale.

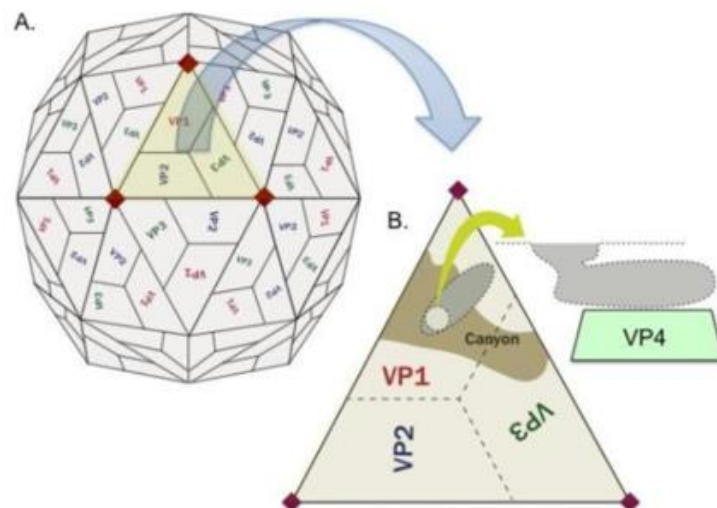


Figure 13: schéma d'un virion du Rhinovirus humain (Kennedy et al., 2012).

(A) Structure du rhinovirus. (B) Une poche hydrophobe ou « canyon » existe au sein de VP1, qui est le point de contact probable du récepteur cellulaire ICAM-1. VP4 est situé sur la surface interne du virus et joue un rôle important dans l'assemblage du virus lors de la réplication.

4.6.2. Cycle de réplication :

La majorité des sérotypes (90%) du HRV utilisent le ICAM-1 comme récepteur cellulaire pour l'attachement viral. Quelques sérotypes utilisent le protéoglycane sulfate d'héparine comme récepteur secondaire tandis que d'autres (≈ 10 sérotypes) utilisent les lipoprotéines de basse densité (LDL-récepteur). La séquence des événements après la

liaison du virus à la surface cellulaire n'est pas encore élucidée (Kennedy et *al.*, 2012; Kieninger et *al.*, 2013; Roy et Post, 2012).

L'ARN viral sert d'ARNm, il code pour les protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4) composantes de la capsule virale et les protéines non structurales impliquées lors de la reproduction du génome viral et la formation de nouveaux virus (Greenberg, 2016).

4.6.3. **Transmission et épidémiologie :**

Les HRVs sont inactivées à un pH<6, l'inactivation étant complète à pH=3. Le virus est relativement stable à 20-37⁰C et peut rester viables sur les surfaces pendant des jours. Certains sérotypes survivent une heure à 50⁰C. La transmission des HRVs peut se produire par contact étroit, auto inoculation, par contact indirect (fomites) ou par des aérosols (Kieninger et *al.*, 2013).

Les infections respiratoires dues aux HRVs se produisent dans le monde entier, touchent tous les groupes d'âge et surviennent pendant toute l'année. Cependant, l'infection par les rhinovirus est plus fréquente pendant l'automne et le printemps dans les climats tempérés (Arruda et *al.*, 1997). Le rhinovirus est l'agent causal le plus courant du rhume. Plus de la moitié de tous les rhumes sont causés par un rhinovirus (Mäkelä et *al.*, 1998). L'immunité après l'infection est faible et les réinfections sont fréquentes (Mackay, 2008). Les enfants sont infectés au moins une fois par an, bien qu'environ un quart des infections à HRV restent asymptomatiques chez les enfants de moins de 4 ans (Van Benten et *al.*, 2003).

4.6.4. **Manifestations cliniques :**

Les épisodes de rhume banale sont principalement attribués aux HRVs, et s'observent chez tous les groupes d'âge (Mäkelä et *al.*, 1998). Outre le rhume, les HRVs peuvent également provoquer d'autres URTIs tels que l'otite moyenne aiguë, la rhinosinusite, la pharyngite et le croup. Les HRVs peuvent aussi causer des LRTIs chez les nourrissons et les petits enfants ; incluant la toux, la respiration sifflante (wheezing), la bronchiolite et la pneumonie, particulièrement chez les enfants souffrant d'asthme ou d'autres maladies pulmonaires chroniques (Juvén et *al.*, 2000; Kesson, 2007; Mackay, 2008; Miller et *al.*, 2007; Winther, 2011).

4.6.5. Prophylaxie et traitement :

Actuellement, aucun médicament antiviral n'est approuvé pour traiter les infections des voies respiratoires dues aux HRVs, seul un traitement symptomatique est envisageable. Il peut consister en des décongestionnants et antitussif sans prescription médicale, des antihistaminiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (Mackay, 2008).

Les vaccins n'ont pas été jugés utiles contre les HRVs en raison de la faible spécificité des anticorps neutralisants issues après le contact avec les sérotypes circulants et de leur grande diversité dans la nature (Greenberg, 2016).

4.7 Le Bocavirus humain (HBoV) :

Les HBoVs ont été découverts pour la première fois en 2005 par Tobias Allander et ses collègues de l'Institut de recherche « Karolinska » en Suède (Allander et *al.*, 2005). Après un criblage par approche métagénomique d'un pool de prélèvements respiratoires qui avaient été testés négatifs pour les autres virus. Le HBoV a maintenant été détecté dans des échantillons provenant d'enfants atteints d'infections respiratoires aiguës dans des études menées à travers le monde (Foulongne et *al.*, 2006; Verbeke et *al.*, 2019).

4.7.1. Taxonomie et structure virale :

Les génotypes du HBoV appartiennent à la famille des *Parvoviridae*, sous-famille des *Parvovirinae*, *genus Bocavirus*, qui comprenait déjà deux autres virus : le parvovirus bovin 1 (BPV1) et le virus minute des chiens (MVC). Les quatre sous-types distincts du Bocavirus humain ont été nommés HBoV1-4 (Guido et *al.*, 2016).

Les HBoVs sont de petites particules virales icosaédriques nus, leur diamètre est d'environ 25 nm avec un génome à ADN monocaténaire polarité négative d'environ 5,3 kb, le génome du HBoV est organisé de manière similaire à celui d'autres bocavirus connus, avec trois cadres ouverts de lecture (ORFs), les 2 premiers codent pour les protéines non structurales NS1 et NP-1, et le troisième code pour les deux protéines de capsid, VP1 et VP2 (Guido et *al.*, 2016).

4.7.2. Cycle de réplication :

Actuellement, il n'y a pas eu d'études pertinentes sur le cycle de réplication du HBoV, il serait probablement similaire à celui d'autres Parvoviridae (Schildgen et Echavarria, 2014).

4.7.3. Transmission et épidémiologie

Le virus n'a pas de saisonnalité marquée et a été retrouvé sur tous les continents (Foulongne et Segondy, 2009). Des études de prévalence réalisées principalement par méthodes moléculaires sur des échantillons respiratoires de jeunes enfants, ont montré des taux de détection de 1,5 à 18 %, selon les régions et la sensibilité des techniques utilisées (Kahn, 2008). D'autres études sérologiques ont montré que la plupart des enfants ont contracté le bocavirus avant l'âge de 5 ans (Kantola et *al.*, 2008). La détection du Bocavirus est beaucoup plus rare chez l'adulte et, le plus souvent, dans un contexte d'immunodépression (Kahn, 2008).

Les HBoVs sont souvent détectés simultanément dans les spécimens respiratoires avec les autres virus, les pourcentages de codétectations vont de 30% à 50% (Foulongne et Segondy, 2009).

4.7.4. Manifestations cliniques :

Le fait que les bocavirus humains soit souvent co-détectés avec d'autres virus respiratoires rend difficile toute conclusion sur le rôle des HBoVs en tant que véritables agents pathogènes. Cependant, le virus a été détecté en association avec des symptômes d'URTIs, notamment la toux, la rhinite, et la fièvre, ainsi qu'en LRTIs, particulièrement chez des patients souffrant de bronchite, de bronchiolite, de pneumonie et d'exacerbations d'asthme. Des signes digestifs sont assez fréquemment décrits chez les enfants infectés par le HBoV, et des virémies ont été rapportés (Allander, 2008; Kantola et *al.*, 2008).

4.7.5. Prophylaxie et traitement :

Actuellement, il n'existe pas d'études confirmant que le HBoV joue un rôle significatif dans les infections respiratoires chez l'homme, donc un vaccin dirigé contre le HBoV n'est pas encore envisageable.

4.8 Les Coronavirus humains :

Les coronavirus humains (HCoVs) étaient pour longtemps considérés comme des virus peu redoutables et principaux responsables du rhume, depuis qu'ils ont été décrits pour la première fois (Tyrrell et Bynoe, 1965; Hamre et Procknow, 1966). Les HCoVs 229E et OC43 étaient les premiers découverts dans les années 1960. Le syndrome respiratoire aigu sévère (SARS) est la première maladie grave et transmissible du 21^{ème} siècle. L'épidémie a commencé en Chine fin 2002 et s'est propagée au reste du monde en 2003, le coronavirus (SARS-CoV-1), inconnu jusqu'à l'époque, a été identifié comme agent causal. Après l'épidémie de SARS, l'intérêt pour le coronavirus s'est accru et depuis 2003, deux autres nouveaux coronavirus ont été décrits : Les HCoVs NL63 et HKU1 découvert en 2004 et 2005 respectivement (van der Hoek et *al.*, 2004; Woo et *al.*, 2005). L'émergence du coronavirus MERS-CoV responsable du « Syndrome respiratoire du Moyen-Orient » en Arabie Saoudite l'année 2012 et du nouveau coronavirus nommé (SARS-CoV-2) en Chine le mois décembre 2019, et qui a été responsable de la pandémie de maladie COVID-19, sont autant d'exemples d'infections humaines entraînant un nombre important de décès causés par les coronavirus (Guarner, 2020).

4.8.1. Taxonomie et structure virale :

La famille des *coronavirus* (HCoVs) comprend les genres *Alpha*, *Beta*, *Gamma* et *Deltacoronavirus*, seuls les deux premiers genres concernent l'homme. Les coronavirus humains HCoV-NL63 et HCoV-229E appartiennent au genre *Alphacoronavirus*. Le genre *Betacoronavirus* comprend le HCoV-HKU1, le HCoV-OC43, le (SARS-CoV-1), le MERS-CoV et le SARS-CoV-2 récemment apparu. Les virions HCoVs sont enveloppés, leur taille varie entre 120-160 nm et contiennent un génome de 27 à 32 kb, constitué d'un ARN monocaténaire à polarité positive dans sa nucléocapside hélicoïdale (Figure 14) (Artika et *al.*, 2020).

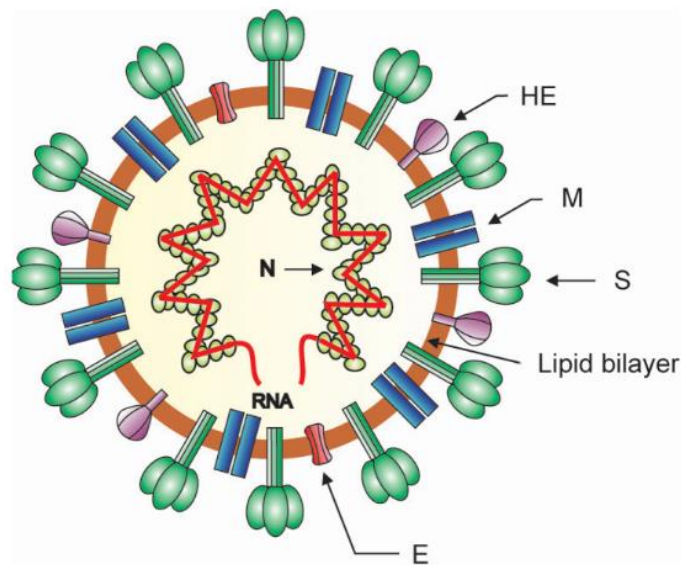


Figure 14 : schéma d'un virion de Coronavirus humain. (Artika et al., 2020)

Le génome des coronavirus code quatre protéines structurales principales : la protéine Spike (S), la protéine nucléocapside (N), la protéine membranaire (M) et la protéine d'enveloppe (E), et uniquement dans le cas de certains Betacoronavirus, l'HE (hémaplastine estérase). La glycoprotéine Spike (S), produite en microscopie électronique la forme de couronne qui a donné son nom au virus (Artika et al., 2020; Boncristiani et al., 2009).

4.8.2. Cycle de réplication :

À l'exception du HCoV-OC43, qui se lie au récepteur cellulaire par la protéine (HE), l'attachement cellulaire des autres HCoVs se fait par l'intermédiaire de la protéine S (spike) qui est constituée de deux sous-unités fonctionnelles : la S1 responsable de la liaison au récepteur cellulaire et la S2 moyenne la fusion membranaire.

Bien que les récepteurs de nombreux coronavirus soient encore inconnus, plusieurs récepteurs ont été identifiés. L'enzyme de conversion de l'angiotensine-2 (ACE2) fonctionnant comme de récepteur cellulaire dans le cas du HCoV-NL63, SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2 (Fung et Liu, 2019; Henrickson, 2003). Le cycle viral des Coronavirus a été largement développé, il suit généralement celui des virus à ARN à polarité positive (Figure 2).

4.8.3. Transmission et épidémiologie :

Les infections par le HCoVs NL63, OC43, et 229E surviennent principalement pendant l'hiver et le printemps dans les régions tempérées, alors que l'épidémiologie du

HCoV-HKU1 n'est pas encore élucidée. Une circulation simultanée des quatre coronavirus courants survient lors des saisons épidémiques. Le premier contact avec le virus survient généralement pendant l'enfance et des réinfections peuvent survenir au cours de la vie de l'individu (Vabret et *al.*, 2009).

4.8.4. **Manifestations cliniques :**

Les HCoVs 229E, HKU1, NL63 et OC43 sont considérée comme la deuxième cause la plus fréquente de rhumes, ils ont été détectés chez les individus de tout âge et partout dans le monde. La durée d'incubation des infections à coronavirus humains est variable, elle peut aller de 2 à 10 jours. Les HCoVs humains courants ne sont généralement pas considérés comme hautement pathogènes et sont associés à des symptômes cliniques relativement légers chez les individus immunocompétents et provoquent une maladie des voies respiratoires supérieures spontanément résolutive. Dans certains cas, ils peuvent également provoquer une LRTI grave surtout chez les immunodéprimées, les jeunes enfants, et les personnes âgées. Cependant, Le SARS-CoV-1, le MERS-CoV et le SARS-CoV-2 sont tous les trois des agents pathogènes hautement transmissibles apparus chez l'homme au cours des deux dernières décennies, ces virus ont pu franchir la barrière des espèces pour provoquer des pneumonies mortelles chez l'homme (Artika et *al.*, 2020 ; Andersen et *al.*, 2020 ;Cui et *al.*, 2019 ; Enjuanes et *al.*, 2016).

4.8.5. **Prophylaxie et traitement :**

La plupart des personnes atteintes d'infections respiratoires dues aux HCoVs courants présentent des symptômes légers, et le traitement est essentiellement symptomatique. Lors des épidémies de SARS et de MERS, les patients hospitalisés présentaient souvent des symptômes graves pouvant aboutir à un détresse respiratoire nécessitant des soins intensifs. Cela a stimulé la recherche sur ces virus et les scientifiques ont pu identifier un grand nombre de cibles antivirales appropriées, telles que les protéases virales (Lopinavir®/Ritonavir®), les polymérases (Remdesivir®/ribavirin®) et les bloqueurs d'attachement viral (Hydroxychloroquine), ces molécules ont été utilisées pendant la pandémie Covid-19(Beeraka et *al.*, 2021). Les vaccins représentent les principales stratégies thérapeutiques de contrôle des maladies infectieuses, en tant que moyen efficace de protéger les personnes sensibles et de bloquer les chaînes de contamination. Dans cet objectif, plusieurs types de vaccins contre le SARS-CoV-2 ont

été développés sur la base de virus inactivés, de sous-unités virales, de vaccins à base d'ARNm et de vecteurs (Beeraka et *al.*, 2021).

5. Les méthodes de diagnostic :

La symptomatologie ne suffit pas pour l'identification du virus respiratoire responsable de la maladie, vue le manque de spécificité des signes cliniques. Deux types de méthodes permettent de poser un diagnostic de certitude : le diagnostic virologique direct et le diagnostic sérologique indirect. Ce dernier est utilisé principalement pour des enquêtes d'épidémiologie et de mesure l'efficacité vaccinale. Par conséquent, le diagnostic étiologique spécifique repose exclusivement sur l'investigation virologique. Il existe une large gamme de méthodes permettant une recherche directe du virus ou de ces constituants dans les sécrétions respiratoires (Leruez-Ville, 2007; Petric et *al.*, 2006). Un diagnostic rapide et précis des virus respiratoires peut faciliter la surveillance épidémiologique, ainsi que la prise de mesures de prévention efficaces et la mise en œuvre de thérapies antivirales appropriées (Zhang et *al.*, 2020).

Le prélèvement d'un échantillon adéquat est fondamental pour un diagnostic précis et pour éviter des coûts et des investigations inutiles. Classiquement, les prélèvements effectués au niveau des voies respiratoires supérieures correspondent à des écouvillonnages nasaux ou pharyngés, parfois à des aspirations naso-pharyngées. Si l'état du patient nécessite d'avoir recours aux voies respiratoires inférieures se sont le plus souvent des aspirations trachéales et des lavages broncho-alvéolaires qui sont réalisées (Covalciuc et *al.*, 1999; OMS, 2011).

Le succès d'un diagnostic direct dépend de la rigueur avec laquelle l'acte de prélèvement est réalisé, il doit être effectué durant la phase aigüe de la maladie (idéalement 72 heures après le début des symptômes). L'échantillon doit être conservé dans des conditions adéquates (+4°C), dans des récipients isolés et, de préférence, envoyé au laboratoire dès que possible. Le temps et la température sont des problèmes critiques pour la collecte d'échantillons, ceci est particulièrement pertinent pour les techniques de culture virale et pour la recherche des virus à ARN par des méthodes moléculaires en raison de la labilité des ARNs (Johnson, 1990).

5.1 La culture virale :

La culture des virus sur des lignées cellulaires reste la « méthode référence » pour la détection de virus respiratoires vue sa sensibilité envers la plupart des virus lorsqu'elle est entamée sur des prélèvements récents. Cependant, tous les virus ne se développent pas sur les mêmes lignées cellulaires. Ainsi, les échantillons cliniques doivent être inoculés dans divers types de cellules pour fournir un environnement le plus approprié pour l'isolement viral. Cette technique est obligatoire pour isoler le virus sous 'vivant' et infectieux. Elle est longue, fastidieuse et relativement coûteuse (Costa et *al.*, 2014).

Les échantillons sont inoculés dans une nappe cellulaire. La formation d'un effet cytopathogène (ECP) évoque la présence de virus viable dans le milieu (Leruez-Ville, 2007). Lorsque l'effet cytopathogène est minimal ou absent, la technique d'hémagglutination sur des globules rouges permet de détecter la présence de virus hémagglutinants dans le surnageant des cultures cellulaires (Tableau 6). La culture virale sert également comme multiplicateur de la charge virale initiale, améliorant la sensibilité des techniques utilisée ultérieurement.

Les lignées cellulaires doivent être bien entretenues et leur sensibilité à l'infection par le virus doit être rigoureusement contrôlée (Costa et *al.*, 2014). L'obtention de résultats de culture est longue, et peut prendre jusqu'à 3 semaines dans certains cas. Pour cela, il est difficile d'employer cette technique pour des fins de diagnostic. Toutefois, des variantes plus rapides ont été introduites, associant une collecte des cellules inoculées par centrifugation et révélation de la présence des antigènes viraux par des anticorps Monoclonaux dirigés contre le virus recherché (Leruez-Ville, 2007).

Tableau 6 : Les lignées Cellulaires pour l'isolement des virus respiratoires. (Manuguerra et Hannoun, 1999)

| Virus | Cellules utilisables pour l'isolement | Virus provoquant une hémagglutination ou une hémadsorption |
|------------------------------|---|--|
| Virus Respiratoire Syncytial | HeLa, Hep-2, MRC5, Vero (en présence de trypsine) | Non |
| Virus Parainfluenza Type I | MDCK (en présence de trypsine) | Oui (GR du cobaye ou poulet) |
| Virus Parainfluenza Type II | MDCK (en présence de trypsine) | Oui (GR du cobaye ou poulet) |
| Virus Parainfluenza Type III | MDCK (en présence de trypsine) | Oui (GR du cobaye ou poulet) |
| Virus Parainfluenza Type IV | MDCK (en présence de trypsine) | Oui (GR du cobaye ou poulet) |
| Virus influenza | MDCK (en présence de trypsine) | Oui (GR du cobaye ou poulet) |
| Coronavirus | Isolement très difficile | Oui |
| Rhinovirus | HeLa | Non |
| Adénovirus | Hep-2, HeLa | Oui (GR de singe ou Rat) |

5.2 Tests de diagnostic rapide (TDR) :

Les tests de détection rapide sont largement utilisés en milieu hospitalier et dans les laboratoires car ils permettent une caractérisation qualitative (présence/absence) des virus les plus répandus en un temps réduit. La technique de détection consiste en une immun-chromatographie des antigènes viraux sur membrane où s'absorbent des anticorps monoclonaux spécifiques, accouplée à une révélation par méthode enzymatique. Les TDRs sont généralement réalisés sur les spécimens respiratoires sans préalable préparation. La présence du virus respiratoire est révélée par une coloration (enzyme-substrat) qui succède à une fixation des antigènes viraux sur les anticorps monoclonaux spécifiques ancrés dans la bande réactive. Une bande contrôle est nécessaire pour validation technique du test. La détection repose sur un signal visuel ou nécessite un lecteur pour interpréter la réflectance ou la fluorescence. La sensibilité de la méthode ainsi que sa spécificité restent variables, elle dépend en grande partie de l'âge du patient, de la durée de la maladie, du type de prélèvement, et le virus recherché (Harper et *al.*, 2009; Leruez-Ville, 2007).

Actuellement, ces tests trouvent toujours leur utilité lors des épidémies, dans l'adaptation d'une thérapie, ou lorsque les tests virologiques de biologie moléculaire ne sont pas accessibles (Hazelton et *al.*, 2015). Plusieurs TDRs sont actuellement commercialisés pour détecter les virus Influenza, le HRSV, l'adénovirus, le HMPV, et le nouveau coronavirus SARS-CoV-2 (Brümmer et *al.*, 2021; Gómez et *al.*, 2016; Hazelton et *al.*, 2015).

5.3 Immunofluorescence directe :

La détection d'antigènes avec des anticorps monoclonaux et la coloration par immunofluorescence (IF) est une méthode largement utilisée pour la détection rapide des virus respiratoires. La technique IF consiste en une visualisation par microscopie à fluorescence de l'existence des antigènes viraux intracellulaires grâce à des anticorps monoclonaux spécifiques du virus recherché, la présence d'une coloration verte homogène ou en inclusions des cellules un sur fond rouge indique l'infection par le virus et permet de poser le diagnostic de la maladie. Un prélèvement adéquat est extrêmement important. Une quantité suffisante de cellules épithéliales dans les échantillons respiratoires est nécessaire pour effectuer un examen approprié. Un personnel qualifié pour examiner les

lames est également nécessaire. La détection d'antigènes avec IF est relativement peu coûteuse (Madeley et Peiris, 2002).

La technique immunofluorescence offre une bonne sensibilité et spécificité pour le diagnostic viral. Des anticorps monoclonaux sont disponibles commercialement pour rechercher et identifier les virus grippaux A et B, les quatre virus parainfluenza, le HRSV, les HAdVs, et le HMPV. Le nombre important de sérotypes de Rhinovirus constitue un facteur limitant pour le développement anticorps monoclonaux dirigés contre ce virus (Freythuth et *al.*, 2007).

L'immunofluorescence directe est encore employée dans certains laboratoires en raison de sa spécificité, sa rapidité et son rapport coût-efficacité, mais sa sensibilité est toujours inférieure à celle offerte par la plupart des méthodes moléculaires.

5.4 La biologie moléculaire :

Les tests d'amplification moléculaires ou (NAATs) sont actuellement la méthode la plus couramment utilisée pour diagnostiquer les infections respiratoires virales. En effet, ils permettent de pallier certains inconvénients de la culture cellulaire tel que le risque élevé de contamination, le délai long pour l'obtention des résultats (quelques jours à quelques semaines), et l'existence de virus non cultivables (Freythuth et *al.*, 2007; Leland et Ginocchio, 2007). Aussi les méthodes d'amplification des acides nucléiques offrent des alternatives aux inconvénients des méthodes immunologiques pour identifier les agents viraux, tels les disparités de sensibilité et de spécificité entre les différentes variétés de ces techniques, et le nombre limité de virus détectables par les panels respiratoires commercialisés (Tableau 7) (Mahony et *al.*, 2011; Costa et *al.*, 2014; Olofsson et *al.*, 2014).

Les (NAATs) permettent non seulement une détection rapide, précise et sensible des virus respiratoires dans des échantillons cliniques, mais ont également amélioré notre compréhension de l'épidémiologie des nouveaux virus émergents, tels que le virus de la grippe H1N1pdm09, les rhinovirus et les coronavirus (Mahony et *al.*, 2011). Il existe plusieurs techniques d'amplification des acides nucléiques (NAATs) qui sont actuellement utilisées dans les laboratoires cliniques de routine pour le diagnostic viral, en particulier la

réaction en chaîne par polymérase (PCR) conventionnelle, la PCR en temps réel et la PCR multiplex (Costa et *al.*, 2014).

Tableau 7 : Les Principaux caractères des différentes techniques de diagnostic direct des infections virales respiratoires. (Costa et al., 2014)

| | Culture cellulaire et Isolement viral | Détection d'antigènes viraux | Méthodes moléculaires |
|-------------------------------|---|------------------------------------|---|
| Le nombre de virus détecté | Nombreux | Limité | Nombreux, possibilité d'identifier de nouveaux pathogènes |
| Temps requis | 5-10jours (Classique) 24-48heures (Rapide) | 30 minutes | 2-6 heures |
| Niveau technique | Élevé | Faible | Élevé |
| Sensibilité | Bonne | Faible | Élevée |

5.4.1. La PCR ou RT-PCR :

Développée par Kary Mullis et ses collègues en 1983. La PCR est un outil performant, très sensible et spécifique pour l'analyse qualitative et quantitative d'acides nucléiques et dont il existe de très nombreuses applications (Freymuth et *al.*, 2007). La PCR ou Reverse transcriptase PCR (RT-PCR) est la méthode la plus couramment utilisée en biologie moléculaire pour la détection de la présence des acides nucléiques viraux.

La PCR consiste en une succession de cycles d'amplification d'ADN, chaque cycle est composé de 3 phases principales : la première étape est la dénaturation de l'ADN double brin, la deuxième consiste en l'hybridation ou couplage des amorces sens et antisens avec la matrice ADN linéaire et la dernière étape comporte l'extension ou élongation du Novo ADN synthétisé. Le mélange réactionnel contient un excès des quatre désoxyribonucléosides triphosphates (dNTPs), des amorces et d'enzyme polymérase, sont présents en très large excès dans le mélange réactionnel qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chacune des étapes. Le thermocycleur permet la programmation automatique de la durée et de la série de changements de températures.

Lors de l'amplification génique d'un ARN, plus sensible aux changements de températures, il est obligatoire de le transformer en un brin d'ADNc (complémentaire) par une enzyme spécifique la transcriptase inverse. Cette technique est dite RT-PCR (Leruez-

Ville, 2007). La PCR ou RT-PCR conventionnelles (Tableau 8) sont des techniques en point terminal où le produit de la réaction d'amplification n'est visualisé qu'en fin de séries PCR par migration sur un gel d'acrylamide moyennant un marqueur de taille pour localiser le fragment amplifié sous lumière ultra-violet (UV).

Tableau 8 : Différentes variantes de PCR disponibles pour le diagnostic viral

| Méthode | Description et avantages | Limites |
|-------------------------------|---|--|
| PCR ou RT-PCR conventionnelle | <ul style="list-style-type: none"> • Détection par électrophorèse sur gel avec agent intercalant (Point terminal) suivi par une hybridation de sondes marquées (enzymes, radio-isotopes) | <ul style="list-style-type: none"> • Absence de quantification • Contaminations fréquentes • Technique obsolète |
| PCR OU RT-PCR en temps réel | <ul style="list-style-type: none"> • Produits de PCR évalués à chaque cycle • Amorces spécifiques fluorescentes • Faible risque de contamination • Possibilité de PCR « maison » • Quantitatif ou semi-quantitatif | <ul style="list-style-type: none"> • Multiplexage limité • Coût élevé des réactifs et plateformes |
| PCR ou RT-PCR multiplex | <ul style="list-style-type: none"> • Plusieurs amorces et cibles dans la même réaction d'amplification | <ul style="list-style-type: none"> • Risque de contamination • Coût élevé des tests commercialisés |

La technique présente des limites tel le risque de contaminations (faux positifs) et de présence des inhibiteurs de PCR contenus dans le prélèvement initial (faux négatifs). Un autre inconvénient de la PCR utilisant des amorces et des sondes spécifiques est que les petites dérives génétiques dans le génome du virus peuvent donner des résultats faussement négatifs en raison du manque de sites de liaison pour les amorces. Une surveillance approfondie des souches circulantes est donc nécessaire afin de disposer de méthodes sensibles (Tse et Capeau, 2003).

Le processus de PCR n'est pas réalisé directement sur un échantillon initial ; il est nécessaire d'extraire les acides nucléiques (ADN/ARN) qui y sont contenus. L'extraction se déroule généralement en 4 étapes : une lyse cellulaire, une adsorption des acides nucléiques sur des particules adsorbantes (exemple : silice), une série de lavages avec un tampon contenant des sels chaotropes qui, en milieu acide et alcoolique attirent les molécules d'eau permettant une réaction d'adsorption des acides nucléiques et finalement une étape d'élution des acides nucléiques purifiés dans un tampon aqueux à pH basique. Les méthodes manuelles prennent du temps pour la réalisation, et utilisent à cet effet des colonnes contenant une membrane "silicée", d'autres méthodes d'extraction manuelles existent comme par exemple l'extraction chimique à l'« éthanol /isopropanol ».

Les techniques automatisées ont repris le dessus et reposent essentiellement sur la méthode d'extraction par adsorption à des billes magnétiques associée aux lavages chimiques (éthanol /isopropanol). Les ARNs sont plus labiles que l'ADN et sensibles aux nucléases, et à cet effet imposent une technique plus rigoureuse pour leur extraction (Wilhelm *et al.*, 2005).

5.4.2. La qPCR ou qRT-PCR :

La PCR en temps réel (qPCR) repose sur le suivi continu dans le temps des cycles d'amplification des acides nucléiques, en mesurant les changements de l'intensité du signal fluorescent émis à l'aide d'un système optique. La courbe d'amplification en temps réel contient 3 phases distinctes (Figure 15): Une phase initiale durant laquelle aucun signal n'est détecté par le système optique ; Une phase exponentielle où l'amplification est en augmentation logarithmique constante proportionnelle au nombre de copies d'ADN générées, le point de départ de cette phase est appelé cycle seuil optique ou « threshold cycle », inversement proportionnel au logarithme du nombre de molécules d'acide nucléique cible présentes avant amplification ; la dernière phase plateau où la fluorescence est constante correspond à l'épuisement des constituants du mélange réactionnel (Wilhelm *et al.*, 2005).

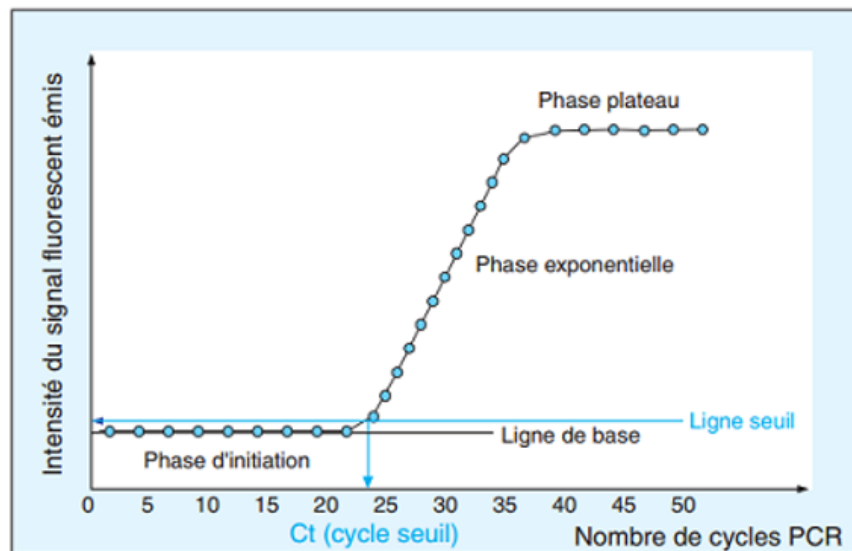


Figure 15 : La cinétique de la réaction PCR*. (Tse et Capeau, 2003)

*Ct (cycle seuil) : Le nombre de cycles d'amplification nécessaires pour obtenir un signal fluorescent statistiquement significatif par rapport au bruit de fond (ligne seuil).

Il existe deux principales variantes de la qPCR : la chimie des agents intercalants fluorescents et celle des sondes hydrolysables fluorogéniques.

Le (SYBRGreenI[®]) est l'un des agents intercalants couramment utilisés en PCR en temps réel pour la détection et la quantification de l'ADN amplifié. Il présente l'avantage de s'intercaler spécifiquement dans l'ADN double brin nouvellement synthétisé au cours des cycles d'élongation, émettant ainsi une fluorescence spécifique lorsqu'il est excité par le système optique. La mesure de la fluorescence émise au fil du temps permet de suivre l'amplification de l'ADN au cours de la réaction PCR. L'utilisation d'agents intercalants dans la PCR nécessite une technique rigoureuse pour éviter les contaminations et assurer la spécificité de la réaction (Poitras et Houde, 2002).

Les sondes fluorogéniques sont spécifiques d'un fragment de l'acide nucléique cible. Les sondes TaqMan[®] sont les plus fréquemment utilisées. Ce sont des courtes séquences d'ADN marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à leur extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) qui éteint l'émission de fluorescence. Pendant la réaction PCR, la sonde TaqMan[®] s'hybride spécifiquement à la séquence cible si elle est présente dans l'échantillon. Lorsque l'enzyme Taq polymérase atteint la position de la sonde, elle exerce son activité exonucléasique, conduisant à l'hydrolyse de la sonde. L'éloignement du reporter de son quencher permet la détection de la fluorescence spécifique à la sonde hybridée (Figure 16). L'accumulation de l'intensité de fluorescence au cours des cycles PCR est directement proportionnelle à la quantité d'ADN amplifié. Les sondes TaqMan[®] offrent une grande spécificité, elles sont de plus en plus utilisées en diagnostic médical et tendent à supplanter le (SYBRGreenI[®]) malgré leur coût élevé (Poitras et Houde, 2002; Mackay et *al.*, 2002).

A la différence de la PCR conventionnelle, la PCR en temps réel ne nécessite pas de manipulations post-amplification des amplicons, par conséquent, cette technique est décrite comme système homogène ou "fermé". Les avantages des systèmes fermés comprennent une minimisation du risque de contamination et une réduction du temps de l'analyse. En outre, cette technique fait preuve d'une efficacité de coût lorsqu'elle est appliquée dans un laboratoire à haut débit, en particulier lors du remplacement des techniques de diagnostic conventionnelles pour la recherche et identification des virus respiratoires (Mackay et *al.*, 2002). Au fil des années, la technologie PCR a évolué avec le

développement des PCR dites « multiplex » permettant de détecter une panoplie de virus à la fois.

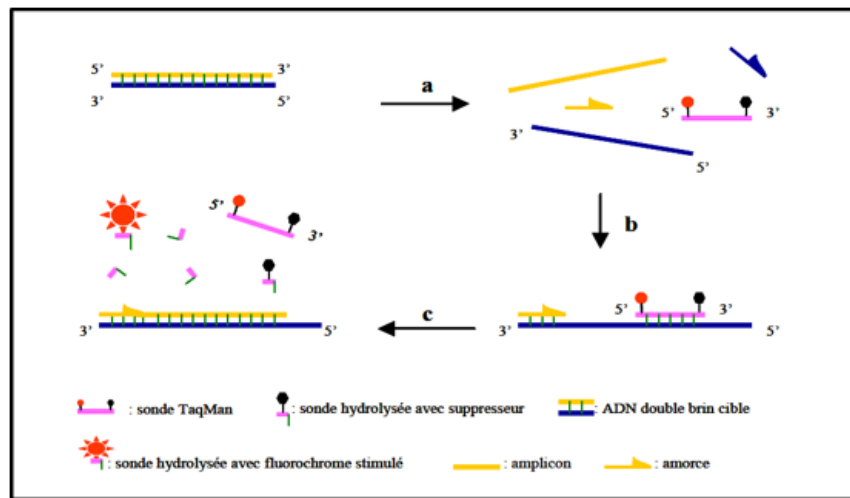


Figure 16 : Hydrolyse de sondes TaqMan® (Poitras et Houde, 2002)

(a) Durant l'étape de dénaturation, la sonde est libre en solution. (b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes permet l'inhibition de la fluorescence. La polymérisation débute. (c) La polymérase déplace et hydrolyse la sonde. Le fluorochrome émetteur est libéré de l'environnement du suppresseur permettant ainsi l'émission de la fluorescence.

5.4.3. Le séquençage génomique :

Le séquençage consiste à déterminer l'ordre de succession des nucléotides d'un fragment d'ARN ou ADN donné. C'est la méthode la plus utilisée pour le génotypage des virus respiratoires. Pendant longtemps, le séquençage reposait essentiellement sur la méthode de synthèse enzymatique sélective ou 'technique de Sanger'. En tant que technologie de séquençage classique et très précise, le séquençage de Sanger est désigné comme le « gold standard » ou « méthode référence » pour valider la séquence de gènes spécifiques. Actuellement, Le séquençage à haut débit ou 'next-generation sequencing' (NGS) est devenu l'approche la plus populaire pour séquencer les génomes viraux, en particulier dans les situations où de nombreux gènes doivent être séquencés simultanément, lors de la recherche de nouvelles variantes génétiques et dans des échantillons en faible charge virale (Houldcroft et al., 2017).

Le séquençage à haut débit de l'ADN (NGS) est une méthode automatisée, basé sur la génération massive de données de séquences par des cycles successifs d'incorporation

de nucléotides et d'émission de signaux, traduites en séquences de nucléotidique. Le séquençage 'Ion Torrent', le séquençage par synthèse (SBS – Illumina) et le pyroséquençage font partie des nombreuses méthodes de séquençage (NGS) qui ont été développées. La méthode Illumina est de loin la plus couramment utilisée, près de 90 % des données de séquençage (NGS) mondiales sont produites par cette méthode.

L'ensemble du flux de travail NGS pour amplifier le génome du HRSV par méthode Illumina consiste en quatre étapes : extraction d'échantillons, préparation de la Librairie, séquençage et analyse des données (Figure 17). l'ARN nécessite une étape supplémentaire au cours de laquelle l'ARN est d'abord converti en ADNc par l'enzyme transcriptase inverse (SuperScript™ IV cDNA ; Invitrogen®), puis l'ADNc résultant est ensuite divisé en quatre réactions PCR parallèles pour amplifier le génome à l'aide de Platinum SuperFi® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) moyennant des paires d'amorces spécifiques (Bose *et al.*, 2015).

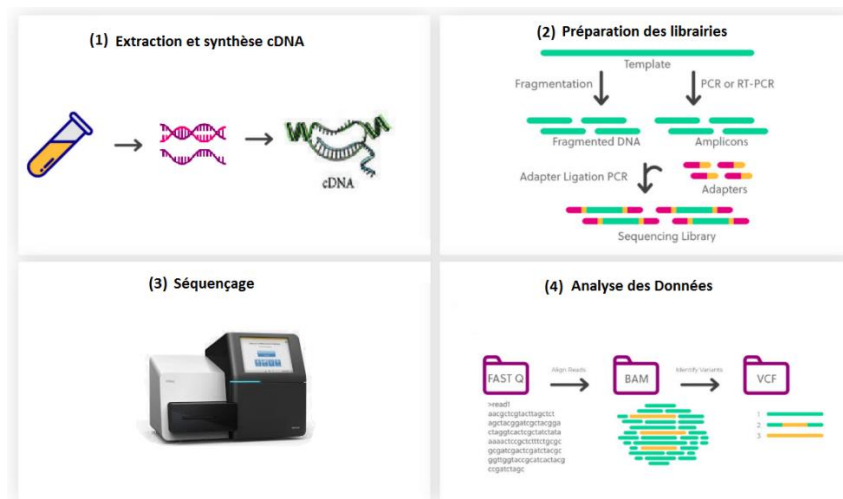


Figure 17 : Diagramme schématique représentant les étapes de base du (NGS)

Pour les échantillons amplifiés avec succès, La préparation de la Librairie consiste en l'ajout d'adaptateurs de séquençage qui interagissent plus tard avec la 'Flowcell' en verre recouverte de millions d'oligonucléotides complémentaires aux adaptateurs de séquençage, la bibliothèque est préparée à l'aide du panel Illumina Nextera XTDNA®. L'étape de séquençage parallèle est effectuée à l'aide de plateforme MiSeq® (Illumina, San Diego, Californie, États-Unis), chaque fragment de bibliothèque s'hybride avec les amorces et est ensuite amplifié pour générer des millions de clusters clonaux. Ensuite, des nucléotides marqués par fluorescence sont utilisés pour synthétiser un brin

complémentaire pour chaque fragment. Après l'ajout de chaque nucléotide marqué, la 'Flow Cell' est imagée et l'émission de chaque cluster est enregistrée. La longueur d'onde et l'intensité de l'émission fluorescente sont utilisées pour identifier nucléotides incorporés dans la séquence.

Une fois le séquençage terminé, des ordinateurs performants munis de logiciels spécialisés sont nécessaires pour l'analyse des données générées, avec la prise en compte de critères de qualité du séquençage (en particulier l'analyse de la « couverture » et de la « profondeur de lecture » de la séquence d'intérêt). Les séquences des adaptateurs de séquençage sont enlevées de résultats bruts par le logiciel Trimmomatic®, l'assemblage des fragments et la création des séquences consensus est fait par les logiciels (Trinity®) et (BowTie-2®) respectivement (Bose et *al.*, 2015; Di Giallonardo et *al.*, 2018).

Le séquençage est un examen onéreux et qui demande des compétences techniques particulières, et il n'est généralement pas nécessaire au diagnostic. Cependant, il est nécessaire à la surveillance des infections virales respiratoires. Cette surveillance comprend la caractérisation du génome viral, l'évaluation de l'efficacité des traitements médicaux, tels que les antirétroviraux et les anticorps monoclonaux, le génotypage des souches circulantes dans le pays et leur comparaison à celles prévenantes de différentes parties du monde en vue de suivre et prédire la survenue des épidémies potentielles. Cela est particulièrement valable pour la grippe, le virus respiratoire syncytial et d'autres virus à potentiel épidémique, tels que les coronavirus (Makoni, 2023).

III. Programme de surveillance des virus respiratoires :

Des épidémies récurrentes de maladies virales respiratoires, principalement causées par la grippe et les coronavirus, ont été observées partout dans le monde (Baber, 2020). L'histoire mondiale des pandémies au cours du siècle dernier indique le potentiel maximal des virus grippaux à muter, se réassortir et évoluer pour provoquer des épidémies dont le dernier exemple est la pandémie de la grippe porcine H1N1pdm09 (Fontana et *al.*, 2014). Le potentiel d'émergence d'épidémies zoonotiques d'infections respiratoires par les coronavirus est accru, il s'est traduit jusqu'à présent, en trois épidémies de HCoV, parmi lesquelles la pandémie du SARS-CoV-2 (Louca, 2021). Dans l'ensemble, les épidémies répétées d'infections virales respiratoires ont eu un impact négatif sur la santé des populations du monde entier, sur les systèmes de santé, sur les travailleurs de première

ligne, sur la communauté mondiale, et sur l'économie et le développement. De là l'obligation de renforcer la surveillance de la santé publique pour détecter et contrôler précocement les flambées émergentes de grippe et d'autres virus respiratoires (Gupta et *al.*, 2022).

1. A l'échelle mondiale :

Le programme mondial de lutte contre la grippe (GIP) a été créé en 1947, ensuite élargi avec la création de l'(OMS) et renommé Système mondial de surveillance et de réponse à la grippe (GISRS) (Ziegler et *al.*, 2018). Le cadre OMS-GISRS comprend quatre laboratoires de réglementation essentiels de l'(OMS), sept centres de coordination de l'(OMS) et 13 laboratoires de référence H5 de l'(OMS) au niveau mondial, ainsi que 148 centres nationaux de référence grippe (NICs) dans 124 états membres de l'(OMS) au niveau national(OMS, 2022). Ces centres servent de système de surveillance en laboratoire pour surveiller les virus grippaux en circulation et formuler des recommandations annuelles sur la composition du vaccin antigrippal pour les hémisphères nord et sud. Le (GISRS) détecte, caractérise et suit également le plus tôt possible toute souche grippale inhabituelle ou émergence d'un nouveau virus respiratoire à potentiel pandémique tel que le H5N1 et le coronavirus du syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS-CoV) (Al-Tawfiq et *al.*, 2014).

L'(OMS) avait lancé une initiative fin 2015 visant à intégrer la surveillance du virus respiratoire syncytial dans la plateforme de surveillance de la grippe existante (GISRS), afin de normaliser la surveillance du HRSV, déterminer la saisonnalité du virus dans différents pays, déterminer les groupes de risque pour l'infection grave à HRSV et soutenir politique éclairée de vaccination contre le HRSV chez ces sujets. Et cela sans avoir d'impact négatif sur le réseau actuel de surveillance de la grippe (Hirve et *al.*, 2020; OMS, 2022; WHO, 2017). Le Maroc a intégré la deuxième phase de cette stratégie pilote en 2018, et les attributions du NIC étaient d'assurer le typage et soutypage du HRSV surtout chez la population infantile, de partager les données de surveillance sur la plateforme de l'(OMS), et de partager de souches avec le laboratoire de référence CDC pour le génotypage du HRSV.

L'impact dévastateur et prolongé de la pandémie de COVID-19, cautionne l'importance de renforcer la surveillance de la santé publique pour détecter et contrôler

précocement les flambées émergentes de grippe et d'autres virus respiratoires. Dans ce cadre, l'OMS a recommandé aux pays d'intégrer la surveillance du SARS-CoV-2 et de la grippe à une unique plateforme de surveillance des syndromes grippaux/maladies respiratoires aiguës sévères (SG/IRAS) (OMS, 2019a).

2. Au Maroc :

Le programme de surveillance de la grippe et de autres virus respiratoires fonctionne à travers deux composantes complémentaires : la surveillance épidémiologique et virologique.

- La surveillance virologique de la grippe et des autres virus respiratoires a été mise en place par le laboratoire de virologie de l'Institut National d'Hygiène (INH) depuis la saison 1995/1996, constitué d'un réseau de médecins volontaires du secteur libéral (généralistes, pédiatres et pneumo-phtisiologues) répartis géographiquement au niveau de différentes régions du royaume. Ce réseau a été renforcé en 2000 par l'intégration de 8 centres de santé répartis au niveau de 8 préfectures, chef-lieu de régions et en 2007 par l'insertion de huit centres hospitaliers sentinelles du secteur public (Rabat, Fès, Meknès, Agadir, Tanger, Oujda et Béni Mellal). Cette surveillance repose sur l'identification hebdomadaire tout au long de la saison des syndromes grippaux et des Infections Respiratoires Aiguës.
- La surveillance épidémiologique : un réseau de 379 Centres de Santé et de 8 Centres Hospitaliers (intégrés en 2006) est animé, depuis 2004, par la Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies. Elle estime tout au long de l'année le nombre hebdomadaire de patient consultant pour un Syndrome Grippal (SG) ou pour une Infection Respiratoire Aigüe Sévère (IRAS) (Rguig et *al.*, 2020).

Ce système a pour objectif global, la collecte de données épidémiologiques et virologiques nécessaires pour mettre en place les mesures d'intervention appropriées pour assurer un meilleur contrôle de la maladie. Les objectifs spécifiques sont beaucoup plus attachés à l'aspect épidémiologique ou virologique de la surveillance.

- Aspect Epidémiologique :

- ✓ Signaler le début et la fin de la saison de la grippe ;
- ✓ Identifier et surveiller les groupes à haut risque de complications graves et de décès ;
- ✓ Estimer la charge de morbidité et de mortalité de la grippe afin d'évaluer l'impact et la gravité de chaque saison et prédire l'impact d'éventuelles pandémies futures ;
- ✓ Aider à développer une compréhension de la relation entre les souches du virus et la gravité de la maladie.

- Aspect Virologique :

- ✓ Assurer une surveillance intégrée des virus de la grippe, le HRSV et le SARS-CoV-2 ;
- ✓ Participer au réseau de surveillance mondial de la grippe de l'(OMS) en fournissant des virus candidats pour la production de vaccins ;
- ✓ Décrire le caractère antigénique et génétique des virus en circulation ;
- ✓ Surveiller la sensibilité des virus aux antiviraux ;
- ✓ Détecter les événements inhabituels et inattendus, comme les éclosions de cas de grippe en dehors de la saison typique ;
- ✓ Détecter d'autres virus respiratoires (Adénovirus ; Parainfluenza 1,2,3 et 4 ; Coronavirus, HMPV, HRSV...)



Chapitre II :
Matériel et Méthodes



I. Population de l'étude :

Pour constituer l'échantillonnage de cette étude, nous avons collectés les prélèvements dans le cadre de la surveillance virologique de la grippe, chez des patients présentant soit un Syndrome Grippal ou une Infection Respiratoire Aigüe Sévère.

1. Définitions de cas :

- le syndrome grippal (SG) : est attribué à toute personne présentant brusquement : une fièvre supérieure à 38° C, une toux ou un mal de gorge, et en l'absence d'autre diagnostic (Fitzner et *al.*, 2018; Rguig et *al.*, 2020).
- Infections respiratoire aigües sévère (IRAS) : sont attribuées toute personne, quel que soit son âge, présentant un tableau clinique associant une apparition brutale de signes respiratoires (toux associée à une difficulté respiratoire) dans un contexte infectieux (fièvre, asthénie et céphalée).

2. Conception de l'étude :

Le système nationale de surveillance sentinelle de la grippe a été établi par les autorités sanitaires au pays en 1996 (Barakat et *al.*, 2011).

Le réseau de surveillance respiratoire du pays comprend deux composantes concomitantes. Alors que le système de surveillance ambulatoire du syndrome grippal (SG) collecte les échantillons des patients fréquentant les établissements de santé et les praticiens privés présentant un syndrome grippal, le système de surveillance des infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) prend en charge les spécimens des patients souffrant d'IRAS et hospitalisés dans les établissements publics (Figure 18).

Cinq prélèvements au maximum par jour (les 5 premières personnes qui répondent aux critères de la définition d'un 'syndrome grippal') sont recrutés parmi la population servie au niveau des centres de santé du réseau sentinelle ou chez des médecins privés volontaires.

Toute personne qui répond à la définition de cas d'IRAS fait l'objet d'un prélèvement dès son admission au niveau des services hospitaliers de Pédiatrie, de Réanimation et de Pneumologie des hôpitaux sentinelles.

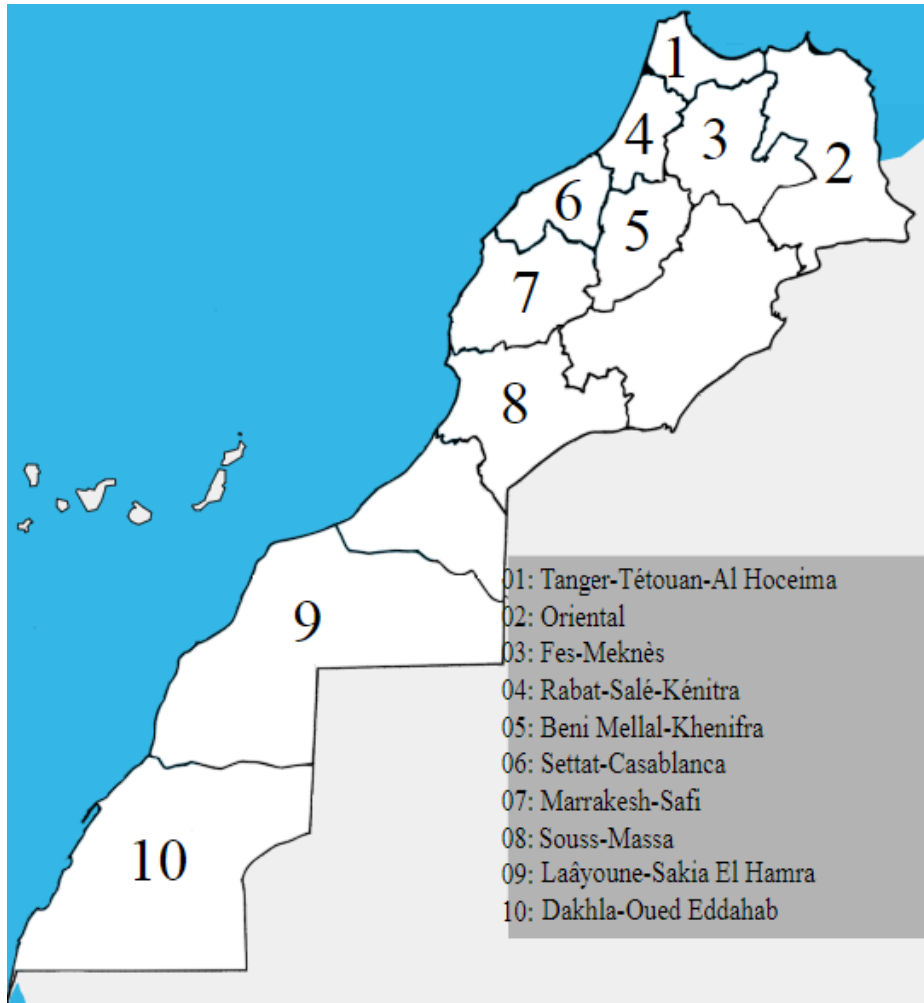


Figure 18 : Répartition géographique des sites sentinelles de la surveillance des cas de SG et IRAS au Maroc

3. Nature des échantillons :

Les écouvillonnages nasaux, pharyngés ou naso-pharyngés, sont réalisés dans un délai de dix jours suivant l'apparition des symptômes qui correspond à la phase aiguë de la maladie (Johnson, 1990). Il s'agit d'un geste techniquement simple en médecine ambulatoire, à l'aide d'un écouvillon stérile, on prélève le plus de cellules possibles par rotation contre les parois internes des narines et/ou les zones inflammatoires du fond de la gorge. Les écouvillons sont placés dans un milieu de transport VTM (Viral Transport Medium) contenant généralement un milieu pour culture cellulaire, une source de protéine (le sérum de veau fœtale), des antibiotiques et antifongiques, et tamponné pH (7.5 à 8.0). Après étiquetage, chaque prélèvement est associé à une fiche d'investigation dûment remplie (Annexe 1) et envoyée au centre national de référence de la grippe dans une caisse

isotherme à une température de +4°C dans les 72 heures suivantes au maximum (Barakat et al., 2011).

4. Approche générale :

Dans la présente étude :

- 2009 écouvillons ont été collectés chez les patients durant la période du 1^{er} septembre 2014 au 31 décembre 2016, ils ont été investigués par la technique de RT-PCR en temps réel, pour la détection des 16 virus respiratoires les plus courants.
- 3679 échantillons collectés précédemment par le réseau national de surveillance sentinelle de la grippe ont été rétrospectivement investigués pour la détection, le soutypage et le génotypage du virus respiratoire syncytial (Figure 19).

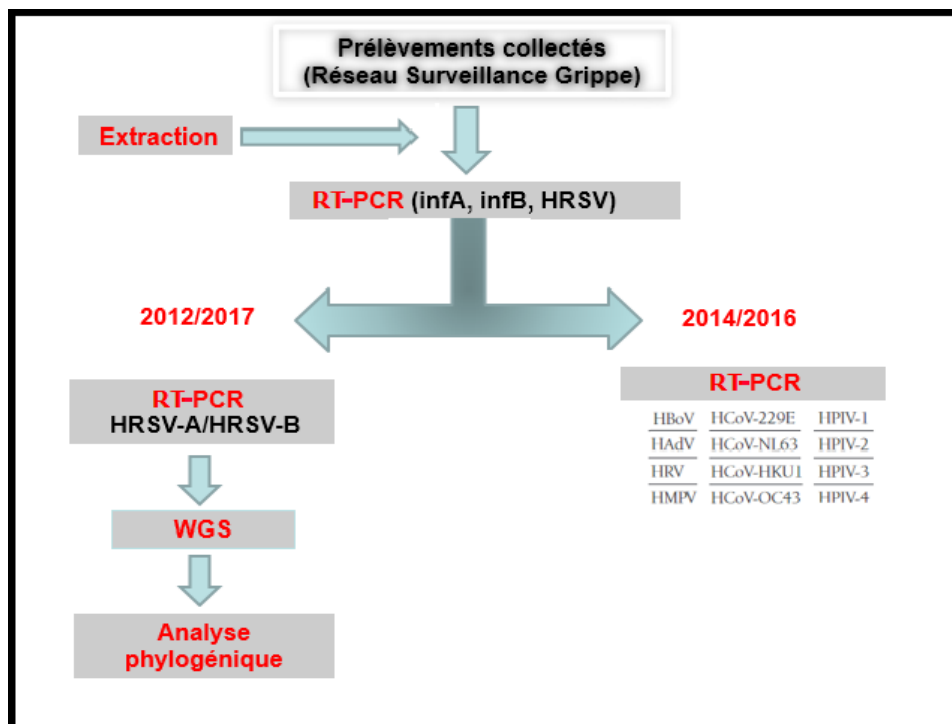


Figure 19 : Flux de travail adopté au cours de cette étude.

Abbreviations: WGS : Séquençage du génome complet ;HCoV-229E,NL63,HKU1,OC43 coronavirus humains 229E,NL63,HKU1; HAdV, adénovirus humain; HMPV, Métapneumovirus humain;HPIV-1,2,3,4 les virus parainfluenza 1,2,3,4; HRSV, virus respiratoire syncytial ;HBoV,bocavirus humain ; HRV, le Rhinovirus humain.

4.1 Recueil et traitement des données :

Les données sur le sexe, l'âge, les symptômes cliniques, les facteurs de risque, le statut de vaccination contre la grippe et l'historique de voyage durant les sept jours avant l'apparition des symptômes ont été recueillies chez tous les patients prélevés pour un syndrome grippal (SG) ou une infection respiratoire aiguë sévère (IRAS), en utilisant un formulaire standardisé de rapport de cas (Annexe 1).

Les données démographiques, cliniques et virologiques de tous les patients inscrits ont été saisies dans une base de données créée à l'aide d'Epi Info 7.1™ (Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ; Atlanta, États-Unis). Des comparaisons de groupes ont été effectuées en utilisant χ^2 pour la dépendance/relation entre les variables. Les valeurs de $P < 0,01$ ont été considérées comme statistiquement significatives. L'analyse des données a été réalisée à l'aide de SPSS 20.0™ (SPSS, Inc., Chicago, IL).

4.2 Considérations éthiques :

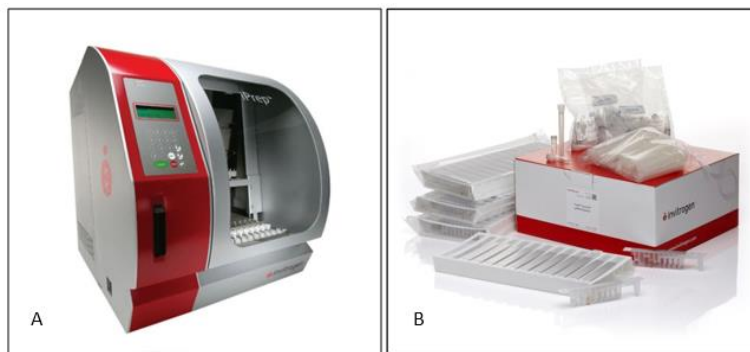
Le protocole de l'étude a été approuvé par le ministère de la Santé dans le but de mener une surveillance des maladies respiratoires à potentiel épidémique, dans laquelle les participants restent anonymes, et ne nécessitait donc pas d'évaluation du comité d'éthique ni d'approbation du comité d'examen institutionnel. Le consentement verbal a été obtenu de tous les participants adultes ou de leurs tuteurs.

II. Procédures de laboratoire :

1. Extraction des acides nucléiques :

L'extraction des acides nucléiques (ADN et ARN) a été réalisée par méthode automatisée sur « iPrep™ instrument, Invitrogen® » (Figure 20.A). Le protocole d'extraction des ADN/ARN viraux par la méthode automatisée via les kits « iPrep™ PureLink™ virus Kit » prêt à l'emploi sous forme de cartouches scellés (Figure 20.B), permet une extraction rapide et automatisée des acides nucléiques à partir d'une variété d'échantillons respiratoires (prélèvements nasopharyngés, lavages bronchoalvéolaires, aspirations, surnageants de culture...). La purification est réalisée l'aide d'un procédé : « Dynabeads® MyOne™ SILANE » (Figure 21), ce sont des billes de 1 μm de diamètre, en

fer magnétique recouvertes de polystyrène, avec une surface de contact optimisée (~20 m²/g).



**Figure 20 : Image (A) : Instrument de purification des acides nucléiques iPrep®
Image (B) : le kit « iPrep™ PureLink virus Kit » 52 tests, utilisé au cours de cette étude.**

Ils fournissent un excellent outil pour l'isolement d'acides nucléiques à partir de divers prélèvements biologiques, à la suite d'un protocole simple de séparation magnétique, évitant l'utilisation des centrifugeuses ou collecteurs à vide. Les échantillons sont lysés à l'aide du tampon de lyse, Le lysat est ensuite mélangé avec Dynabeads® MyOne SILANE™ pour subséquente fixation des acides nucléiques qui adhèrent parfaitement et spécifiquement aux perles magnétiques. Les billes sont ensuite lavées avec des tampons de lavage pour enlever les contaminants. L'ARN/ADN total est récupéré dans 60µL de tampon d'éluion et conservé à -70°C jusqu'à utilisation.

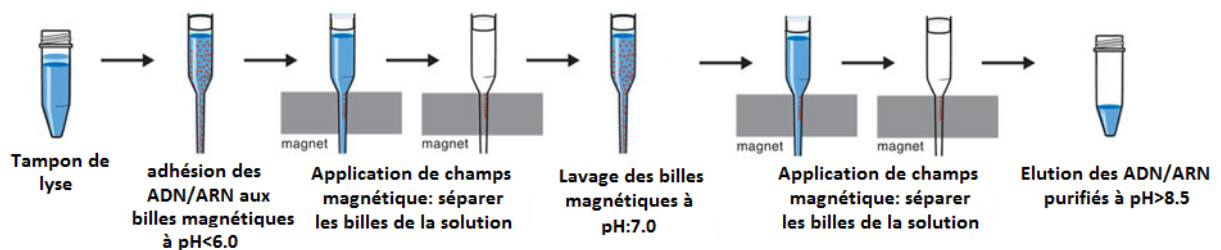


Figure 21 : Schéma des étapes de purification des acides nucléiques avec la méthode des billes « Dynabeads® MyOne™ SILANE ». (Thermofisher®,2012)

L'ADN/ARN total purifié convient à une utilisation ultérieure dans les études d'expression génique telle que l'analyse en temps réel RT-PCR quantitative (qRT-PCR).

2. Détection des virus respiratoires :

Les prélèvements collectés durant la période de l'étude 2012/2017, ont été testés pour la recherche des virus respiratoires par la technique qRT-PCR, en utilisant des amorces spécifiques. L'amplification est réalisée en une seule étape, en utilisant le système « Superscript III Platinum® RT-PCR quantitative One-step avec ROX » (Invitrogen®) et un détecteur Prism SDS 7500 FAST ABI (Applied Biosystems®) dans des plaques de 96 puits (Figure 22).

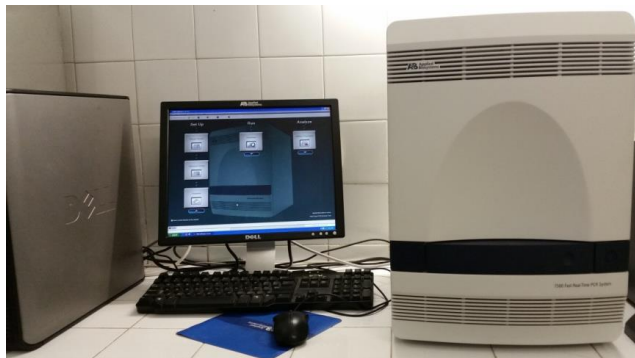


Figure 22 : Le thermocycleur Prism SDS 7500 FAST ABI. (CNR Grippe, 2015)

Le système « Superscript III Platinum® RT-PCR quantitative One-step avec ROX» est un kit RT-PCR quantitative (qRT-PCR) en une seule étape, compatible avec les instruments qui supportent le ROX (carboxy-X-rhodamine) comme fluorophore de Référence. Ce système combine la 'Superscript® III Transcriptase inverse' et 'Platinum® ADN polymérase Taq' dans un mélange d'enzymes unique. La synthèse d'ADNc et la PCR sont effectuées dans un seul tube en utilisant les amorces spécifiques des gènes à amplifier.

2.1 Panel qRT-PCR pour la détection de la grippe A/B :

La détection de l'ARN viral du virus de la grippe A/B a été réalisée en suivant le protocole de dépistage pour détecter les cas de grippe A et B, et sous-typage, dans les cas positifs de Grippe A, des sous-types H1N1pdm09 et H3N2 comme recommandé par le ministère de la Santé (OMS, 2011). Le protocole expérimental implique l'utilisation de huit couples d'amorces et sondes : RNase P, InfA, InfB, A/H3N2, SW-InfA, et le SW-H1 (voir annexe 2). Le couple d'amorces et sondes RNase P sert comme contrôle positif interne pour les acides nucléiques humains, tandis que les autres amorces et sondes sont

impliqués dans la détection et l'identification des différents types et sous-types de virus grippaux selon l'algorithme représenté au niveau de la figure 23.

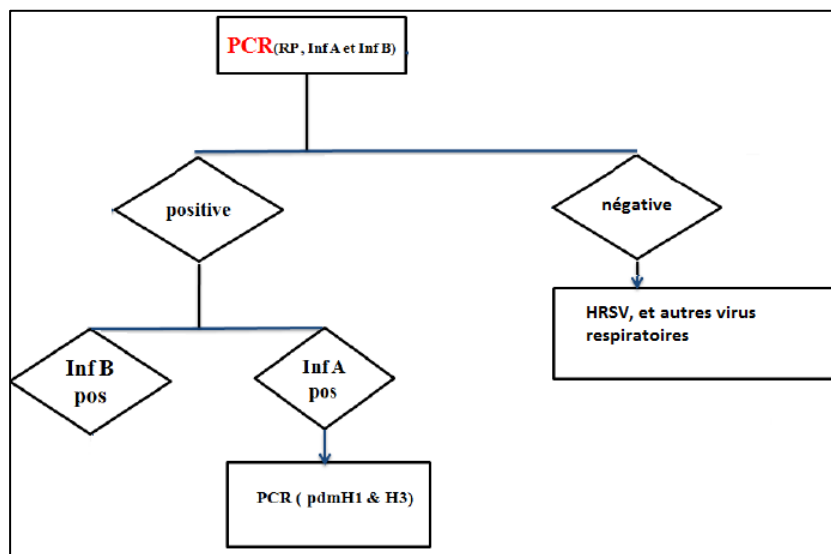


Figure 23 : Schéma de l'algorithme de détection et d'identification des virus grippaux par qRT-PCR

Un volume de 20 μL du mélange réactionnel préparé selon le tableau 9 est introduit dans chaque puit de la 'plaque 96 puits'. Par la suite 5 μL de l'extrait de l'échantillon est ajouté comme indiqué dans la figure 24.

Tableau 9 : Composition du mélange réactionnel

| Réactif (concentration) | Volume pour une réaction (μL) |
|--------------------------------------|--|
| H ₂ O | 5.5 |
| Amorce sens (10 μM) | 0.5 |
| Amorce anti-sens (10 μM) | 0.5 |
| Sonde (10 μM) | 0.5 |
| Super scriptIII RT/Platinum Taq Man | 0.5 |
| 2X PCR Master Mix | 12.5 |
| Volume total | 20 |

La plaque scellée est introduite dans un thermocycleur (ABI7500 Fast), le programme qRT-PCR consiste en une reverse transcription à 50°C pendant 30 minutes, suivie d'une inhibition de l'activité reverse transcriptase de l'enzyme et activation de l'enzyme Taq polymérase à 95°C pendant 2 min, puis une séquence de 45 cycles composée de : 95°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 30 secondes (la fluorescence est mesurée à cette étape de chaque cycle).

| | | | | | | | | | | | | |
|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| RP | NTC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 |
| RP | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | NTC | HSC |
| InfA | NTC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 |
| InfA | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | NTC | PTC |
| InfB | NTC | S1 | S2 | S3 | S4 | S5 | S6 | S7 | S8 | S9 | S10 | S11 |
| InfB | S12 | S13 | S14 | S15 | S16 | S17 | S18 | S19 | S20 | S21 | NTC | PTC |
| | | | | | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | | |

Figure 24: Schéma de plaque PCR pour le typage des virus grippaux A/B par qRT-PCR

Lorsque tous les contrôles (positif et négatif) sont valides, l'interprétation du typage/soutypage viral est faite selon le tableau 10 :

- ✓ A/H3N2 positif : réaction positive INFA et A/H3N2 avec un (Ct < 40).
- ✓ A/H1N1pdm09 positif : réaction positive INFA, SW-INFA et SW-H1 avec un (Ct < 40).
- ✓ Grippe B positif : réaction positive INFB avec un (Ct < 40).

Tableau 10: Critères d'interprétation d'un test de typage/sous typage du virus de la grippe par qRT-PCR

| RP | InfA | InfB | SW InfA | SWH1 | A/H3N2 | Résultat |
|-----|------|------|---------|------|--------|--|
| +/- | + | - | + | + | | A/H1N1pdm09 |
| +/- | + | - | | | + | A/H3N2 |
| +/- | - | + | - | - | - | La grippe B |
| + | - | - | - | - | - | Négatif grippe A et B |
| +/- | + | - | - | - | - | A sous-typer pour les autres grippes humaines (H5, H7 et H9) |

2.1 Panel qRT-PCR pour la détection des autres virus respiratoires :

La détection de 13 virus respiratoires (Tableau 11) a été réalisée sur 5µL d'extrait d'échantillon dans un volume de 20 µL de mélange réactionnel (Tableau 9) à l'aide de la réaction qRT-PCR avec le kit (Invitrogen® Superscript III Platinum®), sur le thermocycleur (Prism SDS 7500 FAST ABI).

Brièvement, le programme qRT-PCR consiste en une reverse transcription à 48°C pendant 10 minutes, suivie d'une inhibition de l'activité reverse transcriptase de l'enzyme et activation de l'enzyme Taq-polymérase à 95°C pendant 5 min, puis une série de 45 cycles composée de : 95°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 1 minute (la fluorescence est mesurée à cette étape de chaque cycle). Le programme d'amplification ainsi que la synthèse des amorces pour la détection des virus respiratoires non grippaux a été faite conformément au protocole développé par les 'Centers for Disease Control and Prevention' (CDC ; Atlanta, GA) (Annexe 3).

Tableau 11 : Liste des Virus respiratoires non grippaux investigués par qRT-PCR monoplex

| Virus | Type/sous-type viral |
|-------------------------------------|----------------------|
| Coronavirus (HCoV) | NL63 |
| | OC43 |
| | 229E |
| | HKU1 |
| Para-influenza (HPIV) | Para-influenza 1 |
| | Para-influenza 2 |
| | Para-influenza 3 |
| | Para-influenza 4 |
| Virus respiratoire syncytial (HRSV) | |
| Métapneumovirus (HMPV) | |
| Rhinovirus (HRV) | |
| Adénovirus (AdV) | |
| Bocavirus (HBoV) | |

Un contrôle négatif et un autre positif polyvalent sont intégrés dans chaque manipulation. Pour que le test soit valide, il faut que ces contrôles soient corrects (figure 25). Un prélèvement positif pour un virus doit exhiber une courbe d'amplification exponentielle avec un Ct < 40.

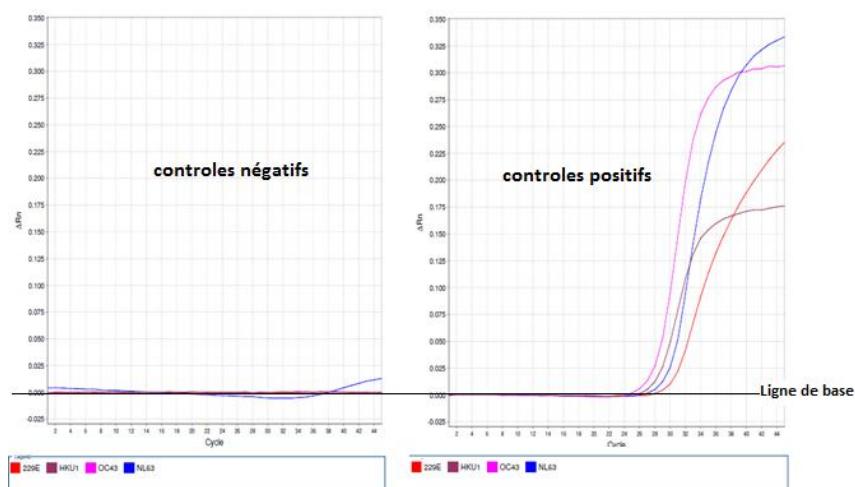


Figure 25: Aspect des courbes obtenues par qRT-PCR d'un contrôle négatif et un contrôle positif pour chaque'un des sous-types du coronavirus humain.

2.2 Panel qRT-PCR pour le soutypage du HRSV :

Le soutypage du virus respiratoire syncytial a été réalisé par technique qRT-PCR duplex (de-Paris et *al.*, 2012; Hu et *al.*, 2003), avec des amorces spécifiques au gène codant pour la protéine de la nucléocapside 'N' du HRSV-A et du HRSV-B, le protocole d'amplification consiste en une reverse transcription à 50°C pendant 30 minutes, suivie d'une inhibition de l'activité reverse transcriptase de l'enzyme et activation de l'enzyme Taq-polymérase à 95°C pendant 2 min, puis une série de 45 cycles composée de : 94°C pendant 15 secondes, 55°C pendant 35 secondes (la fluorescence est mesurée à cette étape de chaque cycle). La détection simultanée des deux sous-types du HRSV dans un seul puit était réalisable par l'utilisation de deux sondes spécifiques marqué par deux fluorophores différents (Tableau 12).

Tableau 12 : Séquences oligonucléotidiques des amorces et sondes soutypage HRSV. (de-Paris et *al.*, 2012)

| Soutype ciblé (gene N) | Amorces ou Sonde | Séquence de nucléotides |
|---------------------------|------------------|--|
| HRSV-A | HRSV-A -A21 | 5' GCTCTTAGCAAAGTCAAGTTGAATGA3' |
| | HRSV-A -A102 | 5'TGCTCCGTTGGATGGTGTATT3' |
| | HRSV-A -APB48 | 5'FAM-ACACTCAACAAAGATCAACTTCTGTCATCCAGC-TAMRA3' |
| HRSV-B | HRSV-B-B17 | 5' GATGGCTCTTAGCAAAGTCAAGTTAA3' |
| | HRSV-B-B120 | 5' TGCAATATTATCTCCTGTACTACGTTGAA3' |
| | HRSV-B-BPB45 | 5' VIC-TGATACATTAAATAAGGATCAGCTGCTGTCATCCA-TAMRA3' |

3. Amplification et Séquençage du génome du HRSV :

3.1 Sélection des échantillons :

Dans le cadre de la deuxième phase (2018-2021) d'une étude pilote de la stratégie de l'(OMS) pour un projet mondial de surveillance du HRSV basé sur la plateforme de surveillance de la grippe existante (Broor et *al.*, 2020), le centre national de la grippe et des virus respiratoires (NIC) effectue un envoi périodique d'échantillons positifs au HRSV

sélectionnés pour fournir une représentation temporelle et géographique des souches circulantes au Maroc, ils ont été envoyés au (CDC, Atlanta), pour le séquençage du génome viral par NGS Illumina selon leurs protocoles établis. 57 HRSV-A et 78 HRSV-B ont été sélectionnés pour le séquençage du génome complet.

3.2 Règles de nomenclature des séquences :

Les séquences ont été identifiées selon la nomenclature nouvellement adoptée des souches de HRSV (en dessous du niveau de l'espèce) par la communauté scientifique (Barr et *al.*, 2022; Salimi et *al.*, 2021), comme suit : HRSV/identifiant de sous-groupe/code de pays (en ISO3166-1alpha-3)/numéro d'échantillon /année d'isolement.

3.3 Disponibilité des données

Les séquences produites dans ce travail ont été déposées sur la plateforme GISAID™ sous les numéros d'accèsion : EPI_ISL_15004431-EPI_ISL_15004437, EPI_ISL_15120665-EPI_ISL_15120779, et EPI_ISL_16905445-EPI_ISL_16905450.

4. Analyse phylogénétique :

Le gène de la glycoprotéine d'attachement est le plus variable de tout le génome du HRSV (Melero et *al.*, 1997). Actuellement, le génotypage des souches du HRSV est basé sur la deuxième région hypervariable du gène G (HVR-2) (Ivancic-Jelecki et *al.*, 2018; Ono et *al.*, 2023).

L'analyse phylogénétique de nos échantillons a été basée sur l'alignement de la séquence nucléotidique partielle du gène G du HRSV, incluant les HRSV-A et HRSV-B circulantes au Maroc ainsi que les souches de référence représentatives des génotypes connus récupérées du Genbank (Annexe 4).

Les séquences identiques ont été détectées et supprimées à l'aide de 'ElimDupes Duplicate Sequence Removal tool'(Apetrei et *al.*, 2021). Les arbres phylogénétiques ont été générés à l'aide de l'algorithme du maximum de vraisemblance du logiciel MEGA (version 7.0), et le Bootstrap pour 1 000 itérations a été calculé. Le test de robustesse de l'arbre (« boot strap ») de 1000 itérations permet de déterminer le degré de fiabilité des branchements dans les arbres. Lorsque ce nombre est supérieur à 70%, le nœud est

fortement prédit, lorsqu'il est compris entre 50 et 70%, il est douteux, et lorsqu'il est inférieur à 50%, cela signifie que la branche concernée est très faiblement prédite, donc non significative. Seules les valeurs de Bootstrap > 60 % ont été affichées sur les arbres.

La distance moyenne par paire (distance p) a été calculée par le modèle Tamura-Nei, distribué gamma, incluant les transitions et les transversions dans le même logiciel. Comparaison des modifications des acides aminés de la protéine G du groupe HRSV-A marocain à la souche prototype du génotype ON1 du Canada [JN257693] et de la protéine G du groupe HRSV-B à la souche prototype du génotype BA d'Argentine [AY333364] a été réalisé à l'aide de l'éditeur d'alignement de séquences BioEdit™ (version 7) (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA).

Les potentiels sites de N-glycosylation (N-X-T/S, où X n'est pas une proline) ont été prédits à l'aide du serveur « NetNGlyc-1.0 » (Gupta et Brunak, 2002) et acceptés si le potentiel de glycosylation était $\geq 0,5$. Alors que les résidus de O-glycosylation ont été prédits à l'aide du serveur « NetOGlyc-4.0 » (Steentoft et *al.*, 2013) et acceptés si le score G était $\geq 0,5$.



*Chapitre III : Résultats et
Discussion*



I. Etiologie virale des infections respiratoires au Maroc durant 2014-2016 :

1. Résultats :

- **Données démographiques :**

Un total de 2009 échantillons a été prélevés auprès des patients ayant un syndrome grippal (SG) ou infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) selon la définition de cas de l'OMS entre Septembre 2014 et Décembre 2016. 89% des sites sentinelles (59/66) ont été actifs et ont collectés des prélèvements chez toutes les tranches d'âge de la population.

1 187 (59 %) échantillons ont été prélevés dans des services hospitaliers (IRAS) et 822 (41 %) sur des sites ambulatoires (SG). Les écouvillons nasopharyngés représentaient 99,8% des échantillons collectés, seul 3 aspirations nasales et un lavage bronchoalvéolaire (LBA) ont été collectés durant la période de l'étude. Le sexe féminin était un peu plus représenté avec 51,3 % des échantillons collectés, soit un sexe ratio de 1,05 (1031/978).

L'âge des patients variait entre 1 mois et 99 ans. La médiane était 16 ans IQR [0,08-99,00], et la moyenne en années 23,78 ans (SD ± 23,8). Au total, 740 patients (36,8 %) étaient âgés de moins de 5 ans, 842 (41,9 %) étaient âgés de 5 à 24 ans, 273 (13,6 %) étaient âgés de 25 à 64 ans, tandis que 127 (6,4 %) étaient âgés de plus de 65 ans.

Plus de la moitié des échantillons ont été collectés dans deux des huit régions du Maroc, Fès-Meknès (n = 753, 37,5%) et Rabat-Salé-Kénitra (n= 555, 27,6%). Bien que les patients aient été recrutés pour cette étude tout au long de l'année, la plupart des échantillons ont été collectés entre le mois Octobre et Avril de chaque saison (Tableau 13).

- **Détection virale :**

Le taux de positivité de nos échantillons correspond à 70,8% [IC 95% : 68,8-72,8%], soit 1423 positifs pour au moins un virus respiratoire sur les 2009 échantillons testés. Le virus de la grippe A/B était le plus couramment détecté dans 612 (30,4 % ; IC 95% : 28,5-32,5%) échantillons positifs, suivi du HRSV (n = 359 ;17,9 % ; IC 95% : 16,2-19,2%), et du HRV (n = 263 ;13,1 % ; IC 95% : 11,7-14,3%). Les autres virus comprenaient le HAdV (n = 124 ; 6,2 %) et des HPIVs (n = 107 ; 5,3 %), les HCoV (n = 94 ; 4,7 %), le HBoV (n = 92 ; 4,6 %) et HMPV (n = 74 ; 3,7 %) (Figure 26).

Tableau 13: Caractéristiques démographiques des patients ayant un syndrome grippal et infection respiratoire aiguë sévère, Maroc, 2014-2016.

| | N=1187 | N=822 | N=2009 |
|------------------------------------|------------|------------|-------------|
| | ILI n (%) | SARI n (%) | Total n (%) |
| Sexe | | | |
| <i>Masculin</i> | 515(43.4) | 463(56.3) | 978(48.7) |
| <i>Féminin</i> | 672(56.6) | 359(43.7) | 1031(51.3) |
| Age (ans) | | | |
| 0–4 | 203(17.1) | 537(65.3) | 740(36.8) |
| 5–14 | 182(15.4) | 44(5.3) | 226(11.2) |
| 15–24 | 518(43.6) | 98(12.0) | 616(30.7) |
| 25–64 | 198(16.7) | 75(9.1) | 273(13.6) |
| + 65 | 74(6.2) | 53(6.5) | 127(6.4) |
| <i>Inconnu</i> | 12(1.0) | 15(1.8) | 27(1.3) |
| Regions (sites sentinelles) | | | |
| <i>Beni mellal-Khenifra</i> | 99 (8.3) | 88 (10.7) | 187 (9.3) |
| <i>Fes-Meknes</i> | 458 (38.6) | 295 (35.9) | 753 (37.5) |
| <i>Laayoune-Dakhla</i> | 2 (0.2) | 2 (0.2) | 4 (0.2) |
| <i>Marrakech-Safi</i> | 60 (5.1) | 5 (0.6) | 65 (3.2) |
| <i>Oriental (Oujda)</i> | 52 (4.3) | 51 (6.2) | 103 (5.1) |
| <i>Rabat-Sale-Kenitra</i> | 284 (24) | 271 (33.0) | 555 (27.6) |
| <i>Souss-Massa (Agadir)</i> | 99 (8.3) | 99 (12.1) | 198 (9.9) |
| <i>Tanger-Tetouan</i> | 133 (11.2) | 11 (1.3) | 144 (7.2) |

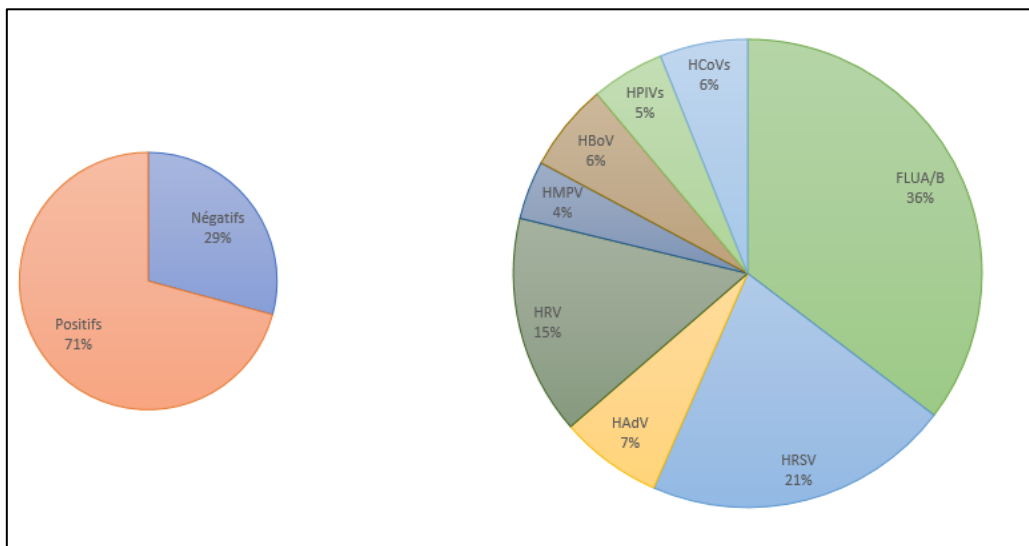


Figure 26 : Taux de positivité et fréquences de détection des virus respiratoires, Maroc, 2014-2016

Tableau 14 : fréquences de détections des virus respiratoires par tranche d'âge chez des patients ayant un (SG) ou (IRAS) au Maroc, 2014-2016.

| Virus détecté | Catégorie d'âge | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------------|-------|----------|-------|--------|-------|---------|-------|----------|-------|----------|-------|--------|-------|-----|------|--|--|
| | 0-6mois | | 7-23mois | | 2-4ans | | 5-14ans | | 15-49ans | | 50-64ans | | >65ans | | unk | | | |
| | (N) | % | (N) | % | (N) | % | (N) | % | (N) | % | (N) | % | (N) | % | (N) | % | | |
| Grippe A/B | 23 | 3,8% | 32 | 5,2% | 51 | 8,3% | 105 | 17,2% | 267 | 43,6% | 95 | 15,5% | 35 | 5,7% | 4 | 0,7% | | |
| HRSV | 155 | 43,2% | 75 | 20,9% | 52 | 14,5% | 17 | 4,7% | 28 | 7,8% | 19 | 5,3% | 9 | 2,5% | 4 | 1,1% | | |
| HAdV | 27 | 21,8% | 34 | 27,4% | 30 | 24,2% | 16 | 12,9% | 12 | 9,7% | 4 | 3,2% | 1 | 0,8% | 0 | 0,0% | | |
| HRV | 48 | 18,3% | 26 | 9,9% | 22 | 8,4% | 34 | 12,9% | 72 | 27,4% | 45 | 17,1% | 13 | 4,9% | 3 | 1,1% | | |
| HPIV-1 | 3 | 10,0% | 9 | 30,0% | 8 | 26,7% | 4 | 13,3% | 1 | 3,3% | 1 | 3,3% | 3 | 10,0% | 1 | 3,3% | | |
| HPIV-2 | 2 | 14,3% | 1 | 7,1% | 5 | 35,7% | 2 | 14,3% | 2 | 14,3% | 1 | 7,1% | 1 | 7,1% | 0 | 0,0% | | |
| HPIV-3 | 12 | 22,2% | 9 | 16,7% | 8 | 14,8% | 9 | 16,7% | 5 | 9,3% | 4 | 7,4% | 6 | 11,1% | 1 | 1,9% | | |
| HPIV-4 | 2 | 22,2% | 1 | 11,1% | 1 | 11,1% | 3 | 33,3% | 1 | 11,1% | 0 | 0,0% | 1 | 11,1% | 0 | 0,0% | | |
| HMPV | 18 | 24,3% | 10 | 13,5% | 8 | 10,8% | 6 | 8,1% | 13 | 17,6% | 11 | 14,9% | 6 | 8,1% | 2 | 2,7% | | |
| HCoV-HKU1 | 2 | 10,5% | 2 | 10,5% | 1 | 5,3% | 1 | 5,3% | 7 | 36,8% | 5 | 26,3% | 1 | 5,3% | 0 | 0,0% | | |
| HCoV-NL63 | 7 | 18,4% | 9 | 23,7% | 4 | 10,5% | 6 | 15,8% | 11 | 28,9% | 1 | 2,6% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | | |
| HCoV-OC43 | 2 | 9,1% | 7 | 31,8% | 2 | 9,1% | 1 | 4,5% | 4 | 18,2% | 4 | 18,2% | 2 | 9,1% | 0 | 0,0% | | |
| HCoV-229E | 3 | 20,0% | 2 | 13,3% | 1 | 6,7% | 2 | 13,3% | 3 | 20,0% | 2 | 13,3% | 2 | 13,3% | 0 | 0,0% | | |
| HBoV | 11 | 12,0% | 31 | 33,7% | 14 | 15,2% | 15 | 16,3% | 13 | 14,1% | 3 | 3,3% | 4 | 4,3% | 1 | 1,1% | | |

Les virus les plus fréquemment détectés chez les nourrissons < 6mois sont de loin le virus respiratoire syncytial (155cas), puis le rhinovirus (48cas), l'adénovirus (27cas), la grippe A/B (23cas), le HMPV (18cas), et le Parainfluenza3 (12cas). Chez les nourrissons de 7-23 mois, le HRSV était encore le type dominant avec 75 détections, puis l'adénovirus (34cas), la grippe A/B (32cas), et le Bocavirus (31cas).

Les adultes 15-49 ans qui étaient affectés principalement par le virus de la grippe (267cas), suivi du rhinovirus (72 cas), du HRSV (28cas), et du Bocavirus (13 cas). La grippe continuait à être le virus majoritaire chez la population âgée (>65 ans) avec 35 cas positifs (Tableau 14).

Tandis que 44,3 % (P < 0,001) des cas positifs pour le virus de la grippe ont été détectés chez des patients âgés de plus de 5 ans présentant un syndrome grippal, les détections positives du HRSV (42,4 % ; P < 0,001) et du HAdV (13,0 % ; P < 0,001) ont occasionnés des infections sévères chez les enfants moins de 5 ans d'âge (Tableau 15).

Tableau 15 : Prévalence des virus respiratoires les plus fréquents par tranche d'âge et syndrome Maroc, Septembre 2014 – Décembre 2016.

| | TOTAL | | SG | | IRAS | | P value |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------|---------|
| | <5ans ; N=740 | > 5ans ; N=1242 | <5ans ; N=203 | > 5ans ; N=972 | <5ans ; N=537 | > 5ans ; N=270 | |
| Inf A/B | 106 (14,3%) | 502 (40,4%) | 53 (26,1%) | 431 (44,3%) | 53 (9,8%) | 71 (26,3%) | < 0,01 |
| HRSV | 282 (38,1%) | 73 (5,9%) | 54 (26,6%) | 63 (6,5%) | 228 (42,4%) | 10 (3,7%) | |
| HAdV | 91 (12,3%) | 33 (2,6%) | 21 (10,3%) | 25 (2,6%) | 70 (13,0%) | 8 (2,9%) | |
| HRV | 96 (12,9%) | 164 (13,2%) | 15 (7,3%) | 128 (13,2%) | 81 (15,1%) | 36 (13,3%) | 0,225 |

Parmi tous les prélèvements positifs, le taux des co-infections a enregistré 18,8% (268/1423). La monodétection virale représente 66,9% (1155/1725), les détections doubles, triples et quadruples représentent respectivement 27,4% (474/1725), 4,8%

(84/1725) et 0,7% (12/1725) du total des détections virales (Tableau 16). Le HRSV faisait part de la plupart des coinfections (123/570), bien avant le virus de la grippe (110/570), l'Adénovirus (84/570) et le Bocavirus (55/570).

Tableau 16 : Répartition des codétections des virus respiratoires. Maroc, Septembre 2014 – Décembre 2016.

| | Grippe | HRSV | HAdV | HRV | HPIV-1 | HPIV-2 | HPIV-3 | HPIV-4 | HMPV | HCoV-HKU1 | HCoV-NL63 | HCoV-OC43 | HCoV-229E | HBoV |
|------------------|--------|------|------|-----|--------|--------|--------|--------|------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| Grippe A/B | | 31 | 23 | 23 | 2 | 0 | 8 | 1 | 6 | 3 | 5 | 4 | 0 | 15 |
| HRSV | | | 37 | 22 | 2 | 2 | 7 | 1 | 12 | 5 | 3 | 2 | 3 | 15 |
| HAdV | | | | 16 | 1 | 1 | 3 | 1 | 7 | 1 | 3 | 1 | 2 | 12 |
| HRV | | | | | 1 | 1 | 3 | 0 | 6 | 2 | 2 | 1 | 0 | 7 |
| HPIV-1 | | | | | | 0 | 2 | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 1 | 5 |
| HPIV-2 | | | | | | | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HPIV-3 | | | | | | | | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| HPIV-4 | | | | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| HMPV | | | | | | | | | | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 |
| HCoV-HKU1 | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 0 | 0 |
| HCoV-NL63 | | | | | | | | | | | | 0 | 0 | 5 |
| HCoV-OC43 | | | | | | | | | | | | | 0 | 1 |
| HCoV-229E | | | | | | | | | | | | | | 2 |
| HBoV | | | | | | | | | | | | | | |
| mono détection | 502 | 236 | 40 | 188 | 15 | 9 | 29 | 5 | 44 | 9 | 21 | 13 | 7 | 37 |
| double-détection | 99 | 105 | 62 | 66 | 13 | 5 | 20 | 1 | 23 | 9 | 12 | 8 | 6 | 45 |
| triple | 11 | 17 | 20 | 9 | 0 | 0 | 4 | 2 | 7 | 1 | 4 | 0 | 2 | 7 |
| quadruple | 0 | 1 | 2 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 3 |

*Les données présentées sont: les monodétections sur la diagonale et les détections mixtes dans la matrice.

- **Présentation clinique :**

Parmi les 822 cas d'IRAS, les motifs d'hospitalisation ont été principalement des troubles respiratoires : toux (700 cas), fièvre (555 cas), gêne respiratoire (186 cas), sifflement (116) et tirage sous costal (96 cas).

Alors que parmi les 1187 cas ambulatoires, les symptômes dominants lors de la consultation étaient : Toux (1002 cas), fièvre (968 cas), mal de gorge (280 cas), céphalées (241 cas), et rhinite (210 cas).

Sur le tableau 17, représentant l'association entre la positivité virale et les symptômes cliniques, on observe que la fièvre (55,2 % ; P = 0,013), la rhinite (16,5 % ; P < 0,001), les maux de tête (21,4 % ; P < 0,001) et les douleurs de la gorge (23,7 % ; P < 0,001) ont été signalés plus souvent chez les individus ayant une infection par virus de la grippe A ou B. La toux était le signe clinique le plus rapporté pour tous les virus prévalents, en particulier pour les cas positifs au HRSV (90,8 % ; P < 0,001). La fièvre

été moins signalée chez des enfants moins de 5 ans HRSV positifs 68% (155/228), cette proportion est encore plus basse chez nourrissons hospitalisés HRSV positif 58% (88/150).

Tableau 17 : Nombre et taux d'échantillons positifs par virus et symptôme clinique, Maroc, Septembre 2014 – Décembre 2016.

| Symptômes | N (%) | | | |
|-----------------------|---------------------|------------------------|--------------------|-------------------|
| | HRSV (n=359) | INF A/B (n=612) | HRV (n=263) | HAdV (124) |
| Toux | 326 (90,8) | 509 (83,2) | 231 (87,8) | 104 (83,8) |
| Fièvre > 38 | 176 (49,0) | 338 (55,2) | 121 (46,0) | 66 (53,2) |
| Rhinite | 20 (5,6) | 101 (16,5) | 28 (10,6) | 10 (8,0) |
| Mal de gorge | 52 (14,5) | 145 (23,7) | 39 (14,8) | 14 (11,3) |
| Myalgies | 25 (6,9) | 131 (21,4) | 31 (11,8) | 9 (7,2) |

- **Facteurs de risque :**

Les données sur les positives détections des virus prédominants : la grippe A/B, le HRSV et l'adénovirus, montrent une corrélation avec le type de syndrome et la tranche d'âge des patients. Cependant, le Rhinovirus a affiché une positivité indépendante de ces deux facteurs. La détection des quatre virus n'était pas statistiquement liée au sexe du patient (Tableau 18).

Tableau 18 : Corrélation des facteurs Age, sexe, et syndrome avec les détections positives des virus respiratoires les plus dominants. Maroc, septembre 2014 – décembre 2016.

| | | Positifs (N) | | | |
|----------|----------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
| | | Grippe A/B | HRSV | HRV | HAdV |
| Sexe | Masculin | 275 | 190 | 140 | 65 |
| | Féminin | 337 | 169 | 123 | 59 |
| | <i>P value</i> | <i>0,015</i> | <i>0,43</i> | <i>0,065</i> | <i>0,22</i> |
| Age | < 5ans | 106 | 282 | 96 | 91 |
| | > 5ans | 634 | 73 | 164 | 33 |
| | <i>P value</i> | <i>< 0,01</i> | <i>< 0,01</i> | <i>0,94</i> | <i>< 0,01</i> |
| Syndrome | IRAS | 126 | 240 | 117 | 48 |
| | SG | 486 | 119 | 146 | 76 |
| | <i>P value</i> | <i>< 0,01</i> | <i>< 0,01</i> | <i>0,42</i> | <i>< 0,01</i> |

- **Saisonnalité :**

Durant la période d'étude, la circulation virale s'étendait durant toute l'année. Cependant, il a été noté une circulation concomitante des virus grippaux A/B et HRSV qui débutait le mois de novembre et s'étendait au mois d'avril de chaque saison, la circulation de ces deux prédominant pathogène arrivait à son acmé au cours des mois de décembre à mars. Tandis que le HMPV est détecté principalement pendant la saison froide (Décembre-Mars), l'Adénovirus et le Rhinovirus circulaient pendant toute l'année avec des pics pendant la période d'hiver. Les autres virus circulaient souvent pendant la saison froide avec des cas sporadiques détectés pendant toute l'année (Figure 27).

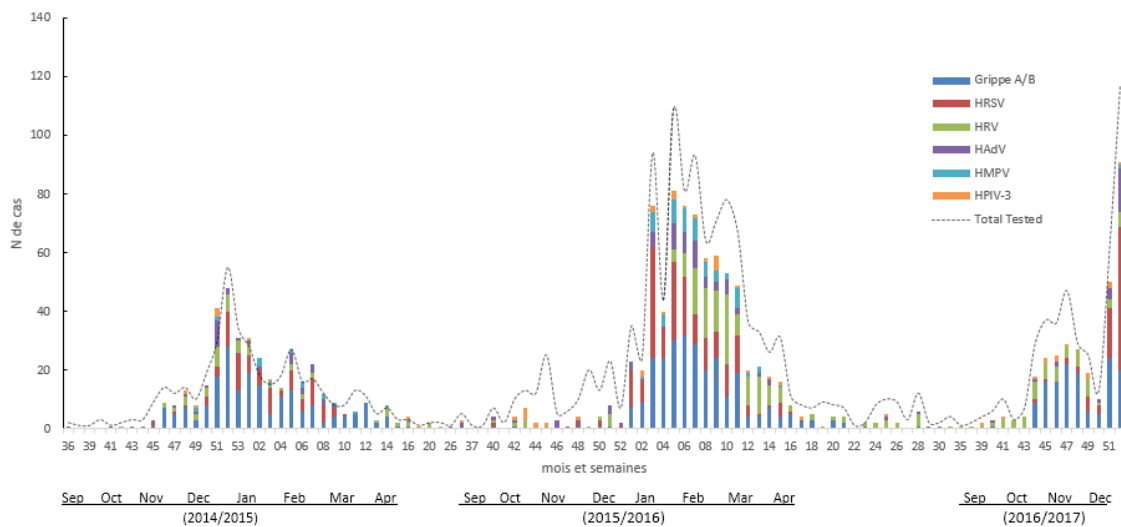


Figure 27: prévalence des virus respiratoires prédominants détectés au Maroc, Septembre 2014-Décembre 2016.

2. Discussion :

Dans cette étude, nous avons pu détecter 16 virus respiratoires dans les 2009 échantillons collectés au cours des 3 saisons grippales 2014/2015, 2015/2016 et début 2016/2017. Grâce à la plateforme du système de surveillance de la grippe sentinelle et moyennant la technique qRT-PCR. Parmi ces échantillons, 1 423 (70,8 %) étaient positifs pour au moins un virus, ce qui concorde avec les résultats d'autres études qui ont rapporté des taux de positivité compris entre 63 % et 75 % (Marcil *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2013; Razanajatovo *et al.*, 2011).

Selon les directives de l'OMS, le prélèvement des échantillons des patients doit être effectué le plus rapidement possible après l'apparition des symptômes, idéalement dans les 7 jours, et les échantillons doivent parvenir au laboratoire dès que possible après le prélèvement (WHO, 2006).

Il convient de noter que les virus sont généralement détectables dans les prélèvements de gorge de la plupart des patients dès l'apparition des symptômes jusqu'à la fin de la deuxième semaine (WHO, 2006). Dans notre étude, 72 % (1446/2009) des échantillons positifs ont été prélevés dans la première semaine suivant l'apparition des symptômes.

Les résultats ont également montré que le virus de la grippe A/B (n = 612, 35,5 %), le HRSV (n = 359, 20,8 %), le HRV (n = 263, 15,2 %) et le HAdV (n = 124, 7,2 %) étaient les virus les plus courants détectés. La représentativité des autres virus variait entre 5,3 % et 0,5 %. Ceci est corroboré par une étude turque sur une période proche de la nôtre (Çiçek *et al.*, 2015), tandis que d'autres ont évoqué les HRV ou HRSV comme les virus les plus prédominants (Kim *et al.*, 2013; Marcil *et al.*, 2018; Razanajatovo *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs explications à ces différences. Premièrement, les taux d'infections peuvent être spécifiques aux zones géographiques, à la taille de l'échantillonnage, à la méthode de collecte des prélèvements, la période d'étude, et à la population étudiée. Deuxièmement, les méthodes de détection (généralement les méthodes multiplex rapportent des taux plus élevés) et les amorces PCR peuvent différer d'une étude à l'autre, ce qui rend difficile la comparaison directe des données. L'analyse des

résultats d'autres études pourrait être utile pour clarifier cette question en évaluant les spécificités des différentes méthodes de détection utilisées.

Bien que des virus grippaux aient été détectés chez tous les groupes d'âge, la proportion de cas positifs pour la grippe A/B était comparativement plus élevée chez les patients âgés de plus de 5 ans, en particulier dans les syndromes grippaux (44,3 % ; $P < 0,01$), ce qui concorde avec les études similaires menées sur des adultes qui ont rapporté que le virus de la grippe est la principale cause de SG chez les adultes et que le HRSV était la deuxième cause la plus fréquente de SG dans cette catégorie d'âge (Al-Romaihi et al., 2019; Çiçek et al., 2015; Razanajatovo et al., 2011).

L'agent pathogène viral le plus fréquent chez les enfants de moins de cinq ans atteints d'IRAS était le HRSV, suivi du HRV, et de l'Adénovirus, comme l'ont révélé plusieurs études (Çiçek et al., 2015; Jroundi et al., 2015, 2014; Kim et al., 2013; Kwofie et al., 2012; Marcil et al., 2018; Uduman et al., 1996).

La prévalence élevée du HRSV qui a atteint 42,4% chez les enfants de moins de 5 ans atteints d'IRAS épar rapport aux données d'autres études, qui varient de 18 % à 34 % (Çiçek et al., 2015; Hall et al., 2009; Kim et al., 2013) peut être attribuée à la propagation nosocomiale du virus au sein des unités de soins pédiatriques pendant la haute saison du virus. Malgré le manque de données pour étayer cette hypothèse, certains auteurs ont pointé le HRSV comme la cause majeure des épidémies nosocomiales annuelles, notamment chez les enfants admis dans les unités pédiatriques (de-Paris et al., 2014).

L'infection par le HRSV est également reconnue comme un problème prédominant chez les personnes âgées, en particulier chez les adultes de plus de 65 ans souffrant de maladies cardiaques chroniques, d'asthme, de maladies pulmonaires et chez les patients immunodéprimés. Malgré le faible nombre de patients recrutés parmi les adultes de plus de 65 ans dans cette étude, la prévalence de l'infection par le HRSV était de 7,1 % dans cette tranche d'âge, ce qui concorde avec des recherches qui évoquent une prévalence du HRSV d'environ 5 à 10 % par chez les personnes âgées (Falsey et Walsh, 2005).

Plusieurs études (Jin et *al.*, 2012 ; Ampuero et *al.*, 2012; Tang et *al.*, 2008) ont démontré que la proportion d'infections dues aux Adénovirus était en accroissement. En effet, dans cette présente étude, la prévalence des Adénovirus dans les IRAS chez les enfants de moins de 5 ans était de (13,0 % ; $P < 0,001$). D'autre part, même si le Rhinovirus est connu comme agent principal du rhume banal, la prévalence de 13,3% du HRV chez les enfants hospitalisés pour une LRTI démontre son importance. En effet, cette constatation suggère que les HAdV représentent, à côté du HRSV et les Rhinovirus des pathogènes importants impliqués dans les IRAS chez les enfants hospitalisés.

Les co-infections ont été observées dans 18,8 % (268/1423) des échantillons, ce qui est cohérent avec des pourcentages rapportés dans la littérature allant de 10 % à près de 40 % (Mandelia et *al.*, 2021; Richter et *al.*, 2016). Plus que la moitié des détections virales du Bocavirus était des coinfections, principalement avec le HRSV, la grippe et l'adénovirus. Des chercheurs ont rapporté des taux de codétection des agents pathogènes qui surviennent simultanément avec le HBoV variant entre 60 % à 90 %. Ce taux élevé peut s'expliquer par le fait que le HBoV peut être excrété et persister longtemps chez les patients après leur primo-infection (Allander, 2008; Foulongne et Segondy, 2009; Verbeke et *al.*, 2019).

Le HRSV faisait part de la plupart des codétections (123/570). Un taux de co-infection dû au HRSV de 60,4 % a été détecté chez les enfants de moins de 5 ans, ce qui concorde avec plusieurs études suggérant que les co-infections étaient significativement plus répandues en pédiatrie (Drews et *al.*, 1997; Mandelia et *al.*, 2021; Richard et *al.*, 2008; Richter et *al.*, 2016). Cela est probablement dû au système immunitaire immature des enfants associé à l'absence d'antécédents d'infection par des virus respiratoires (primo-infection par plus d'un virus à la fois) ou par le fait que l'infection par le HRSV est un élément qui favoriserait éventuellement la réinfection du système respiratoire par d'autres virus. Drew et *al.* ont rapporté 85,7 % de co-infections par le HRSV chez les enfants de moins de 5 ans (Drews et *al.*, 1997).

De plus, les résultats d'autres études ont indiqué que les cas cliniques graves étaient plus fréquents chez les enfants présentant des co-infections, en particulier avec des co-infections par le HRSV, ce qui peut augmenter la gravité de la maladie chez ces enfants (Richard et *al.*, 2008; Cho et *al.*, 2013; Wu et *al.*, 2015).

La toux représente le symptôme le plus fréquent lors de l'infection virale. Aussi, le mal de gorge et les céphalées étaient les signes cliniques les plus rapportés lors de l'infection par le virus grippal, ce qui est caractéristique du syndrome grippal. Lors de l'infection par le virus HRSV, la fièvre n'est pas toujours rapportée chez les patients et spécialement chez les nourrissons. En effet, près de la moitié des enfants infectés par le HRSV ne présentent pas de fièvre lors de l'infection (Saha et *al.*, 2015).

Alors que les virus de la grippe, le HRSV et les coronavirus circulent surtout pendant la saison hivernale dans les régions tempérées, le HRV, le HMPV, le HBoV et l'HAdV ne présentent pas de saisonnalité perceptible et peuvent être considérés comme des virus présents toute l'année (Moriyama et *al.*, 2020).

Au Maroc, la circulation des virus grippaux culmine entre octobre et avril (Barakat et *al.*, 2011). Durant cette étude, les taux des virus de la grippe, du HRSV, et du HMPV fulminent pendant la saison hivernale. Les HRV et les HAdV ont tendance à circuler pendant les mois d'automne, tandis que les HCoV, les HPIV et les HBoV circulaient tout au long de l'année sans schémas saisonniers distincts.

Notre étude présente certaines limites. Initialement, la taille de l'échantillonnage était relativement petite. Secundo, la collecte des facteurs de risque potentiels, des données démographiques/cliniques et de l'évolution des patients n'a pas été exhaustive. Par conséquent, cette étude est considérée comme une recherche préliminaire pilote. Elle pourrait être complétée ultérieurement par des investigations visant à analyser les facteurs de risque associés aux formes sévères d'infections respiratoires chez les patients hospitalisés. Troisièmement, la collecte des cas répondant à la définition de cas IRAS/SG, initialement conçu pour la surveillance de la grippe, pourrait induire une sous-estimation des taux de détection des infections respiratoires liées aux autres pathogènes viraux. De plus, pour établir le caractère saisonnier des modes de circulation des virus respiratoires, davantage séries de données sont nécessaires sur des périodes de 3 à 5 ans.

II. Epidémiologie des infections à HRSV au Maroc de 2012 à 2017 :

1. Résultats :

- **Données démographiques :**

3679 échantillons ont été inclus dans cette étude, auprès des patients ayant un (SG) ou (IRAS) selon la définition de cas de l'OMS, entre Septembre 2012 et Aout 2017. Parmi, 422 (11%), 101 (3%), 441 (12%), 1126 (31%), et 1589 (43%) échantillons ont été collectés pendant les saisons grippales 2012/13, 2013/14, 2014/15, 2015/16 et 2016/17 respectivement. Une nette évolution du nombre d'échantillons respiratoires recruté est observée au fil des saisons.

Chaque saison débute généralement en septembre et prend fin en avril l'année suivante. La proportion des échantillons collecté auprès des sites ambulatoires a été 55,8% (2054/3679) et les prélèvements reçus des services hospitaliers ont représenté 44,2% du total des échantillons. Le sexe féminin était un peu plus représenté avec 50,8 % des échantillons collectés, soit un sexe ratio de 1,03 (1868/1811).

L'âge des patients variait entre 1 mois et 99 ans. La médiane était 11 ans IQR [0,08-99,00], et la moyenne en années 21,9 ans (SD \pm 24,0). Au total, 1490 patients (40 %) étaient âgés de moins de 5 ans, 1391 (39%) étaient âgés de 5 à 49 ans, tandis que 663 (18 %) étaient âgés de plus de 65 ans.

Parmi les sites sentinelles inclus dans cette étude, la majorité des échantillons de patients ont été collectés dans la région de Fès-Meknès (1 121 ; 30 %), suivie de celle de Rabat-Salé-Kénitra (876 ; 24 %). Bien que des échantillons aient été collectés durant toute l'année, le plus grand nombre des prélèvements (2 269 ; 62 %) ont été réalisés au cours du premier trimestre (janvier-mars) de chaque saison, par rapport au reste de l'année (Tableau 19).

Tableau 19: Caractéristiques démographiques et cliniques des cas (SG) et (IRAS) par statut d'infection au HRSV, Maroc, 2012-2017.

| Caractéristiques cliniques et démographiques | HRSV-Positifs N=726 (19,7%) n (%) | HRSV-Négatifs N=2953 (80,3%) n (%) | P-value |
|--|---|--|---------|
| <i>Age (n=3544) **</i> | | | |
| 0-6 mois | 320 (52) | 293 (48) | < 0.001 |
| 7-23 mois | 143 (28) | 357 (72) | |
| 2-4 an | 86 (23) | 291 (77) | |
| 5-14 an | 30 (8) | 362 (92) | |
| 15-49 an | 71 (7) | 928 (93) | |
| 50-64 an | 37 (8) | 406 (92) | |
| >65 ans | 21 (9) | 199 (91) | |
| unk | 18 (13) | 117 (87) | |
| <i>Sexe</i> | | | |
| Masculin | 384 (21) | 1427 (79) | 0,027 |
| Féminin | 342 (18) | 1526 (82) | |
| <i>Symptômes</i> | | | |
| <i>Toux</i> | | | |
| Oui | 652 (21) | 2430 (79) | < 0.001 |
| Non | 74 (12) | 523 (88) | |
| <i>Stridor</i> | | | |
| Oui | 43(61) | 27(39) | < 0.001 |
| Non | 683(19) | 2926(81) | |
| <i>Fièvre</i> | | | |
| Oui | 473(19) | 1936(81) | 0,434 |
| Non | 253(20) | 1017(80) | |
| <i>Mal de gorge</i> | | | |
| Oui | 103(17) | 501(83) | 0,038 |
| Non | 623(20) | 2452(80) | |
| <i>Syndrome</i> | | | |
| IRAS | 498(31) | 1127(69) | < 0.001 |
| SG | 228(11) | 1826(89) | |
| <i>Période</i> | | | |
| Q1 : Janvier – Mars | 560 (77) | 1709 (58) | < 0.001 |
| Q2 : Avril – Juin | 11 (2) | 362 (12) | |
| Q3 : Juillet – Septembre | 0 (0) | 59 (2) | |
| Q4 : Octobre – décembre | 155 (21) | 823 (28) | |
| <i>Sites sentinelles</i> | | | |
| Fes-Meknes | 240 (33) | 881 (30) | < 0.001 |
| Rabat-Sale-Kenitra | 111 (15) | 765 (26) | |
| Souss-Massa (Agadir) | 142 (20) | 247 (8) | |
| Marrakech | 52 (7) | 269 (9) | |
| Tanger-Tetouan | 37 (5) | 262 (9) | |
| Beni Mellal | 79 (11) | 219 (7) | |
| Oujda | 37 (5) | 161 (6) | |
| Casablanca | 28 (4) | 129 (4) | |
| Laayoune | 0 (0) | 14 (0) | |

**Certaines variables de données liées à l'âge n'ont pas été incluses dans l'analyse en raison de données incomplètes.

Q= Trimestre.

- **Détection virale :**

Sur les 3 679 échantillons testés provenant des cas de SG et d'IRAS, un total de 726 échantillons étaient positifs pour le HRSV par qRT-PCR, ce qui donne un taux de détection de 19,7 % (726/3679).

Nous avons constaté une proportion plus élevée d'infections par le HRSV parmi les nourrissons âgés de 0 à 6 mois (52 % ; 320/613), suivis par les jeunes âgés de 7 à 23 mois (28 % ; 143/500) et ceux âgés de 2 à 4 ans (23% ; 86/377). Chez les adultes 15-49ans, l'infection par le HRSV est moins fréquente, avec une proportion de 7,1% (71/999). Parmi les adultes de plus de 65 ans dans cette étude, la prévalence de l'infection par le HRSV était de 9,5 % (21/220) dans cette tranche d'âge (Figure 28.1). Parmi les IRAS, proportion d'infections par le HRSV parmi les nourrissons âgés de 0 à 6 mois était encore plus importante (53 % ; 303/572), suivis par les jeunes âgés de 7 à 23 mois (31 % ; 110/359) et ceux âgés de 2 à 4 ans (26% ; 37/143) (Figure 28.2).

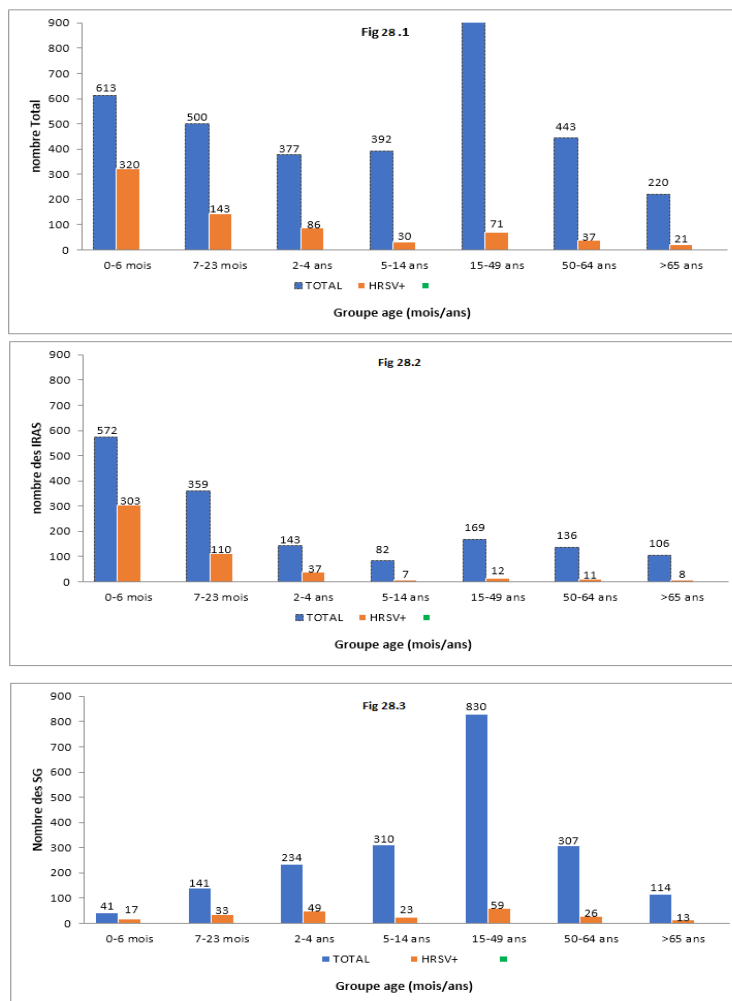


Figure 28 : les cas positifs du HRSV détectés, détaillés par tranches d'âge et syndrome, Maroc. 2012-2017.

Le virus HRSV était moins prévalent chez les nourrissons dans les syndromes grippaux, avec proportion d'infections par le HRSV parmi les nourrissons âgés de 0 à 6 mois (41 % ; 17/41), suivis par les jeunes âgés de 7 à 23 mois (23 % ; 33/141) et ceux âgés de 2 à 4 ans (21% ; 49/234) (Figure 28.3).

Sur l'ensemble des cas positifs au HRSV, 35 % (257/726) étaient du sous-type HRSV-A, le sous-type HRSV-B représentait 61 % (442/726) des cas et une codétection des deux sous-types est notée sur 3,7 % (27 /726) d'échantillons. Les deux sous-types ont co-circulent pendant toutes les périodes d'étude, le HRSV-B prédominant au cours de trois des cinq saisons. La répartition des souches de HRSV est présentée dans la Figure 29 : 63 cas (14 HRSVA, 49 HRSVB) en 2012/13 ; 20 cas (15 HRSVA, cinq HRSVB) en 2013/14 ; 82 cas (74 HRSVA, huit HRSVB) en 2014/15 ; 182 cas (64 HRSVA, 118 HRSVB) en 2015/16 ; et 352 cas (90 HRSVA, 262 HRSVB) en 2016/17.

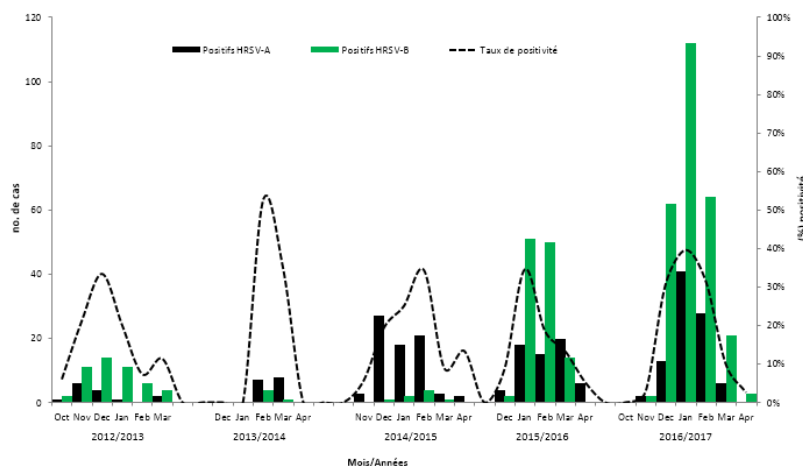


Figure 29 : Circulation des sous-types HRSV-A et HRSV-B au Maroc. 2012-2017.

- **Présentation clinique :**

La toux était le symptôme clinique le plus rapporté (84 %, 3 082/3 679), suivie de la fièvre (65 %, 2 409/3 679). Une comparaison des cas positifs et négatifs du HRSV avec les principales caractéristiques cliniques, à savoir la toux, la fièvre, et le mal de gorge, a montré que la répartition des patients souffrant de toux et de stridor était statistiquement significative ($P < 0,001$).

Néanmoins, nous n'avons pas trouvé de différence statistiquement significative dans les infections positives au HRSV en ce qui concerne la fièvre ($P = 0,434$) et les maux de gorge ($P = 0,038$).

- **Facteurs de risque :**

Les données sur les positives détections du virus respiratoire syncytial ont montré que le groupe d'âge des patients, le type de syndrome (IRAS vs SG), et la période où le prélèvement a été réalisé étaient liés à l'infection par le virus ($P < 0,001$). Cependant, le sexe ($P = 0,027$) n'était pas lié à l'infection par le HRSV (Tableau 19).

- **Saisonnalité :**

Durant la durée de l'étude (2012/2017), la plupart des cas de HRSV sont détectés durant la saison épidémique, du mois novembre à début Avril. Les premiers cas sont couramment détectés autours de la semaine 47, le pic épidémique est atteint entre la semaine 52 et la semaine 2, et le nombre de cas est en décroissance vers la 10^{ème} et 13^{ème} semaine épidémiologique. Par conséquent, la période de circulation du HRSV a duré de 16 à 21 semaines pour chaque saison (Figure 30).

Les pics épidémiques des saisons 2014/2015, 2015/2016, et 2016/2017 sont similaires. Les saisons 2012/2013 et 2013/14 était une exception, en raison d'un échantillonnage moins nombreux sur une plus courte durée, et le taux de détection d'infection positive au HRSV était le plus élevé au cours du quatrième et du premier trimestre de chaque saison (Tableau 1 ; $P < 0,001$). Des cas sporadiques du HRSV peuvent être isolés hors saison épidémique.

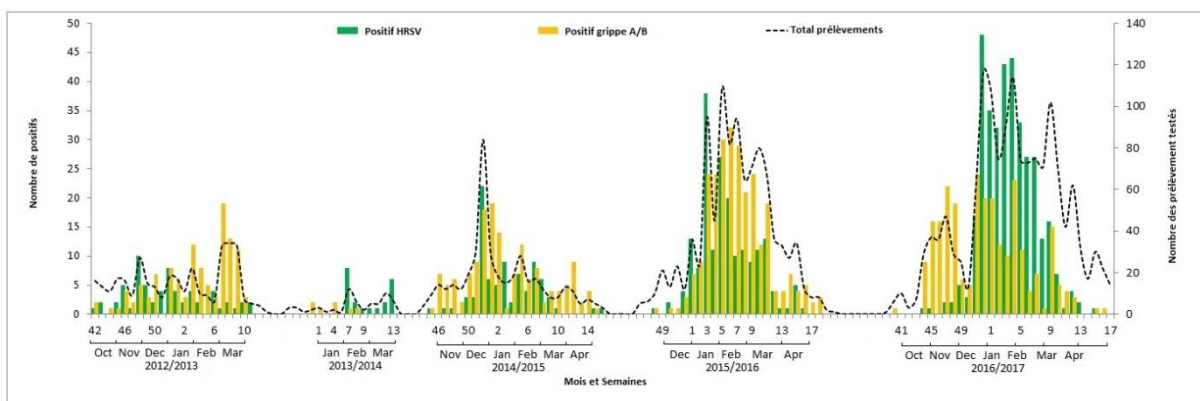


Figure 30 : Circulation du HRSV et du virus grippal entre 2012 et 2017 au Maroc.

2. Discussion :

Le virus respiratoire syncytial est reconnu depuis longtemps comme l'une des principales causes des LRTIs, en particulier parmi les jeunes enfants et les personnes âgées (Fleming et *al.*, 2007). La surveillance et la collecte à long terme des données sur la circulation et les schémas de variation du HRSV sont essentielles en vue de prédire le niveau d'ampleur globale de l'épidémie et pour élaborer des stratégies efficaces de contrôle et de prévention chez les sujets à risque (Luo et *al.*, 2020). C'est dans ce cadre que s'inscrit cette première étude épidémiologique de la circulation du virus respiratoire syncytial au Maroc. L'analyse de l'épidémiologie du virus a été réalisée sur les cinq saisons 2012-2013 à 2016-2017.

La surveillance du HRSV dans le pays a été greffé sur le système national de surveillance sentinelle de la grippe établi depuis une vingtaine d'années (Barakat et *al.*, 2011) ; par conséquent, le HRSV et le virus de la grippe A/B ont été détectés simultanément chez des patients présentant la définition de cas spécifique à la surveillance de la grippe (Fitzner et *al.*, 2018): une infection respiratoire aiguë sévère ou un syndrome grippal.

La prévalence globale du HRSV dans les échantillons respiratoires était de 19,7 %. Ce fait est consolidé par les rapports des autres chercheurs. Gaymard et *al.* ont rapporté une prévalence du HRSV qui variait de 12 à 18 % sur quatre saisons consécutives (Gaymard et *al.*, 2018), tandis que les rapports portant sur une population plus jeune ont révélé des pourcentages encore plus élevés (Aamir et *al.*, 2013; Vianna et *al.*, 2021). Ainsi, la nécessité d'un dépistage du HRSV chez les nourrissons hospitalisés pour infections respiratoires aiguës pour assurer une bonne gestion des admissions à l'hôpital, prévenir infections nosocomiales, et rationaliser le recours aux antibiotiques (Aamir et *al.*, 2013).

Alors que l'étude sur la prévalence des virus respiratoires au Maroc a démontré la prédominance de la grippe chez des adultes présentant des symptômes légers (SG), les IRAS pédiatriques ont été principalement attribuées à une infection par le HRSV ; nos résultats concordent avec ceux d'autres pays où le HRSV reste le virus le plus répandu chez les nourrissons de moins de 6 mois (Gaymard et *al.*, 2018; Vianna et *al.*, 2021). La prévalence du HRSV chez les personnes âgées de plus de 65 ans était 9,5%, ce fait est

consolidé par les rapports d'autres recherches, qui ont décrit des taux variant de 5-10%, et qui considèrent les personnes âgées atteintes de maladie cardiaque ou pulmonaire sous-jacente et les patients immunodéprimés comme des sujets à grand risque de pneumonie et d'affections sévères liée au HRSV (Falsey et Walsh, 2005).

Plus que la moitié des prélèvements positif HRSV était un sous-type B, le sous-type A comptait 35% et les échantillons coïnfectés par les deux sous-types ont représenté 3,7%. Une étude du Sénégal a décrit un taux de co-infection de 3,4 % (Fall et *al.*, 2016), tandis qu'un autre rapport du Brésil a trouvé 1,4 % de codétections (Vianna et *al.*, 2021). En général, les doubles infections se produisent rarement dans les échantillons respiratoires positifs au HRSV (Barr et *al.*, 2022).

Les deux sous-types du virus respiratoire syncytial circulaient simultanément au cours des saisons épidémique, avec changement du sous-type dominant d'une année à une autre (Hibino et *al.*, 2018; Eshaghi et *al.*, 2012; Cane, 2001). En se référant aux données de cette étude, on a observé une alternance biannuelle des sous-types HRSV dominants, une telle périodicité des épidémies de virus respiratoire syncytial a été signalée par d'autres chercheurs (Duppenhaler et *al.*, 2003; Waris, 1991). Il est possible de ce changement périodique de la souche prédominante soit un mécanisme propre au HRSV pour contourner l'amélioration de l'immunité collective contre un sous-type prédominant subséquente à une épidémie, et de là entretenir sa circulation dans la population (Cane, 2001; White et *al.*, 2005).

Les données que nous avons recueillies dans le cadre de cette étude consolident les observations de la précédente étude sur les étiologies virales des infections respiratoires, à savoir que la toux était très probablement liée aux symptômes cliniques de l'infection par le HRSV (84 % ; $P < 0,001$), tandis que la fièvre était inconstamment présente surtout chez les nourrissons.

En fait, l'(OMS) a rapporté que près du demi des enfants touchés par le HRSV ne présentent pas de fièvre comme symptôme évocateur (WHO, 2015) ; par conséquent, certains chercheurs recommandent la définition de cas de l'infection respiratoire aiguë (ARI) comme étant plus appropriée et très sensible pour la surveillance du virus respiratoire syncytial (Saha et *al.*, 2015).

Récemment, l'(OMS) a préconisé dans son projet pilote mondial de surveillance du virus respiratoire syncytial basé sur le (GISRS), le recrutement de cas répondant à la définition d'une IRAS ou SG élargie. Le syndrome grippal élargie correspond à une infection respiratoire aiguë avec au moins un symptôme respiratoire (Toux) et l'IRAS élargie a été définie comme une infection respiratoire aiguë nécessitant une hospitalisation avec une toux ou difficultés respiratoire (Davis et *al.*, 2022; Hirve et *al.*, 2020; OMS, 2019b). Cette méthode de sélection des cas conduit à une sensibilité plus élevée pour les virus de la grippe et du HRSV. En revanche, les définitions de cas exigeante une fièvre mesurée entraîneraient une sous-estimation de l'infection par le HRSV, en particulier pour les groupes d'âge jeunes (Davis et *al.*, 2022; Hirve et *al.*, 2020).

L'équipe de Nyawanda et *al.* ont rapporté dans leur étude, que la toux seule présentait la sensibilité la plus élevée (96%) pour détecter le HRSV. Les symptômes : sifflement, stridor, et hypoxie était moins sensibles (<31%) mais les plus spécifiques (>75%) pour détecter le HRSV. Ainsi, ils ont recommandé la définition de cas IRAS, nécessitant une toux et une fièvre signalée ou mesurée et développée initialement pour la surveillance mondiale de la grippe, comme définition sensible pour la détection du HRSV avec une sensibilité de 83 % (Nyawanda et *al.*, 2016).

Le genre masculin a été décrit par certains chercheurs comme plus disposé à développer une maladie sévère suite à une infection virale (Larsen et *al.*, 2020; Orimadegun et *al.*, 2020; Shi et *al.*, 2015). Cependant, on n'a pas observé de corrélation entre le sexe et la sévérité de l'infection ($P = 0,027$) par le HRSV.

La circulation du virus respiratoire syncytial marque une saisonnalité claire. L'épidémie débute en novembre, culmine de janvier à février de l'année suivante et dure jusqu'en avril. Une saisonnalité similaire est signalée dans les régions tempérées, où les épidémies de HRSV commencent généralement en novembre ou décembre de chaque année, culminent en janvier ou février et durent 4 à 5 mois (Aamir et *al.*, 2013; Cane, 2001; Donaldson, 2006; Mak et *al.*, 2012; White et *al.*, 2005).

Certaines limites doivent être prises en compte lors de l'interprétation des données de cette étude. Premièrement, le recrutement des cas selon la définition de cas SG/IRAS sous-estimerait la prévalence des infections à HRSV, en particulier chez la population juvénile, nous avons donc besoin d'une définition de cas plus sensible et plus spécifique.

Deuxièmement, les informations cliniques qui ont été extraites des formulaires de déclaration, contenaient souvent des incohérences et des données manquantes, ce qui peut entraîner des biais dans l'analyse.

De plus, L'analyse comparative des schémas de circulation du HRSV dans différentes régions pourrait être entravée par les différences de cas recrutés entre les régions et la participation irrégulière des sites sentinelles au cours de l'étude.

III. Phylogénie du HRSV et les génotypes circulants au Maroc de 2012 à 2017 :

1. Résultats :

127 génomes complet du HRSV ont pu être obtenu à partir des échantillons sélectionnés, dont 56 HRSV-A et de 71 HRSV-B. huit échantillons ont échoué au NGS en raison d'une faible charge virale (Annexe 5).

- **Arbre phylogénétique :**

Les reconstructions phylogénétiques basées sur l'alignement de la séquence nucléotidique partielle du gène G du HRSV, ont révélé que les 56 HRSV-A du Maroc (2, 13, 9, 18 et 14 échantillons des années 2012, 2014, 2015, 2016 et 2017, respectivement) étaient classés dans le génotype ON1 (Figure 31), ce génotype relativement nouveau génotype comporte une duplication commune de 72 nucléotides (nt) dans la région HVR-2 du gène de la protéine G, ce qui donne un polypeptide allongé de 24 acides aminés supplémentaires (GQEETLHSTTSEGYLSPSQVYTTS) couvrant les positions 284 à 307 par rapport à la souche prototype A2 (Eshaghi et *al.*, 2012). La plupart des souches HRSV-B (1, 4, 30 et 32 échantillons de 2012, 2015, 2016 et 2017 respectivement) appartenaient au génotype BA9, à l'exception de quatre séquences de l'année 2012 qui se regroupaient dans le génotype BA10 (Figure 32).

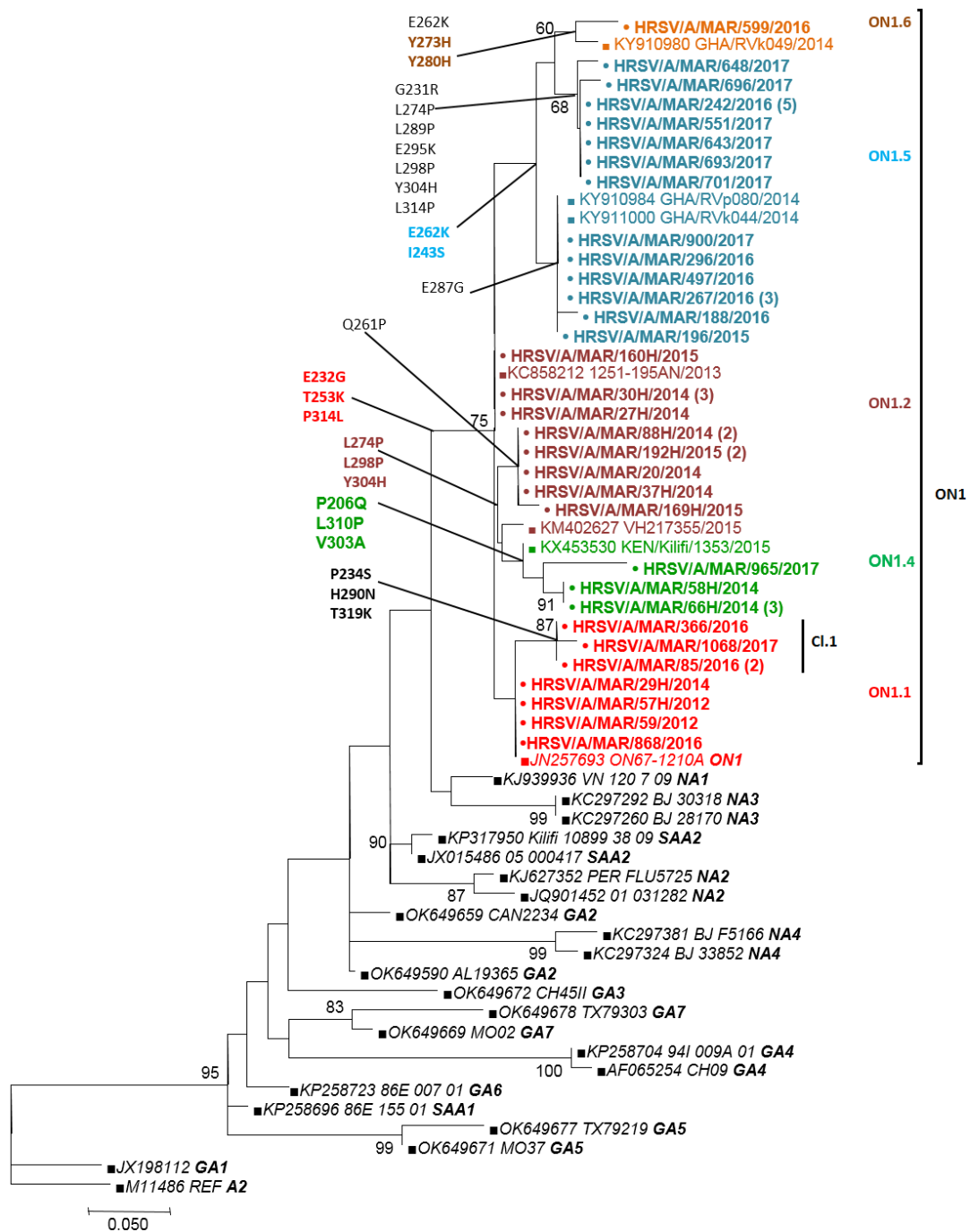


Figure 31 : Arbre phylogénétique de la région HVR-2 du G gène de 56 accessions HRSV type A. L'arbre a été construit avec la méthode du maximum de vraisemblance avec 1 000 répétitions bootstrap à l'aide du logiciel MEGA 7. Les prélèvements du HRSV du Maroc sont indiquées par des points « • » suivis de leur numéro d'identification. Les souches de référence représentant des génotypes connus ont été extraites de GenBank et incluses dans l'arbre, elles sont indiquées par un rectangle « ■ », (les étiquettes incluent le numéro d'accès). L'attribution du génotype est indiquée à droite. La souche prototype (M11486 pour le sous-groupe A) a été utilisée comme groupe externe. Les valeurs de bootstrap supérieures à 60 % sont indiquées au niveau des nœuds de branche. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions de nucléotides par site. Le nombre 'entre parenthèses' après l'identifiant du prélèvement indique les souches identiques. Les différents couleurs indiquent les sous-groupes du génotype ON1, avec leurs signatures en changements d'acides aminés. Cl.1=cluster 1

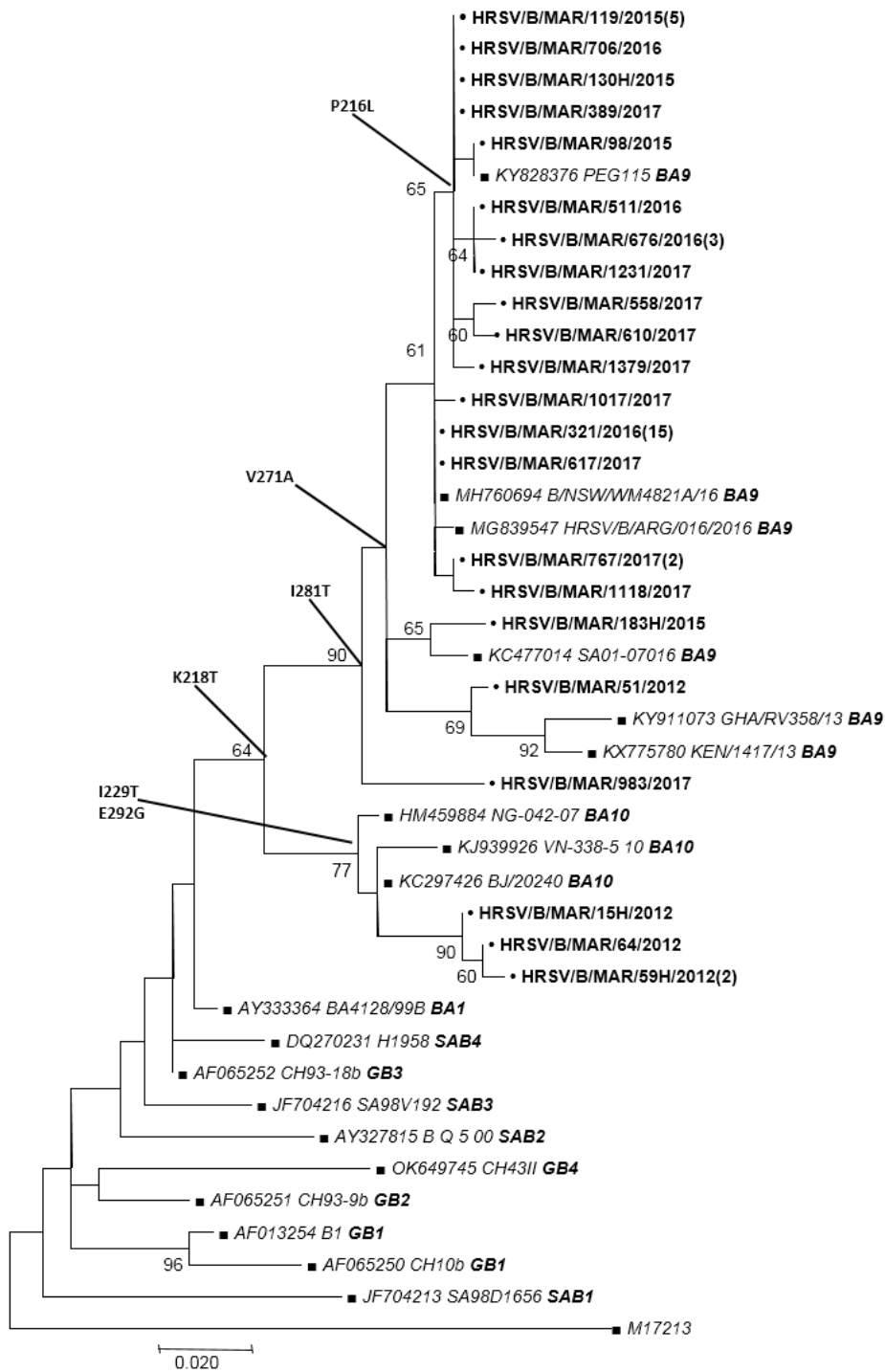


Figure 32 : Arbre phylogénétique de la HVR-2 du G gène de 71 accèsions HRSV type B.

L'arbre a été construite avec la méthode du maximum de vraisemblance avec 1 000 répétitions bootstrap à l'aide du logiciel MEGA 7. Les prélèvements du HRSV du Maroc sont indiquées par des points « • » suivis de leur numéro d'identification. Les souches de référence représentant des génotypes connus ont été extraites de GenBank et incluses dans l'arbre, elles sont indiquées par un rectangle « ■ », (les étiquettes incluent le numéro d'accès). L'attribution du génotype est indiquée à droite. La souche prototype (M17213 pour le sous-groupe B) a été utilisée comme groupe externe. Les valeurs de bootstrap supérieures à 60 % sont indiquées au niveau des nœuds de branche. La barre d'échelle représente le nombre de substitutions de nucléotides par site. Le nombre 'entre parenthèses' après l'identifiant du prélèvement indique les souches identiques. Les signatures en changements d'acides aminés sont indiquées à gauche.

- **Polymorphisme nucléotidique et protéique :**

L'homologie entre les séquences du HRSV-A marocaines et la souche de référence ON1 [ON67-1210A] était $\geq 97,9$ % au niveau nucléotidique et $\geq 95,6$ % au niveau des acides aminés, et la distance intra-génotypique p globale était de 1,4 % pour les séquences ON1 isolées au Maroc. La longueur de la protéine du gène G dans toutes les souches HRSV-A génotype ON1 de cette étude est 322 acides aminés (AA) avec un codon d'arrêt 'TGA' similaire à la souche prototype (ON1-ON67-1210A) [JN257693] du Canada.

L'homologie entre les séquences du HRSV-B du Maroc et la souche de référence BA [AY333364] était de 95,3 % à 96,8 % au niveau des nucléotides et de 91,5 % à 93,7 % au niveau des acides aminés. La distance intra-génotypique p parmi les séquences appartenant au génotype BA9 était de 1,6 %, tandis que la distance intra-génotypique p était de 0,1 % pour les séquences BA10 ; la divergence estimée entre les groupes BA9 et BA10 était de 4,1 %. Les séquences du HRSV-B ont été alignées sur la souche de référence BA d'Argentine [BA AY333364], qui contient une duplication de 60 nt dans la région HVR-2 du gène G, ce qui donne 20 acides aminés supplémentaires (Trento et *al.*, 2003). La longueur de la protéine G était de 313 AA pour le génotype BA10, et 313 AA ou 320 AA pour les souches du génotype BA9.

- **Analyse mutationnelle :**

Dix des 16 substitutions décrites précédemment comme universellement identifiées dans les génotypes ON1 ou NA1 par rapport à la souche de référence HRSV-A2 (T253K, I244R, L258H, P283S, P226L, S222P, E233K, S269T, P313S et R321K) ont été conservées dans toutes les souches HRSV-A marocaines (Eshaghi et *al.*, 2012).

On a pu identifier dans toutes les souches marocaines HRSV-A trois substitutions spécifiques au génotype ON1 (E232G, T253K et P314L). Au sein du génotype ON1, cinq sous-groupes phylogénétiques décrits précédemment (ON1.1, ON1.2, ON1.4, ON1.5 et ON1.6) ont été distingué sur l'arbre phylogénétique présenté dans la figure 31 sur la base de certaines substitutions d'AA en comparaison avec la souche prototype ON-1 [JN257693] (Obodai et *al.*, 2018; Eshaghi et *al.*, 2012; Tabatabai et *al.*, 2014).

Le premier sous-groupe ON1.1 comprend des isolats étroitement apparentés à la souche canadienne [JN257693] avec peu de substitutions mixtes. Fait intéressant, nous

avons trouvé au sein de ce sous-groupe quatre isolats regroupés avec une valeur bootstrap signifiante de 87 %, partageant les substitutions P234S, T319K et H290N qui sont uniques aux souches marocaines ; ils ont été identifiés comme Cluster1 (Figure 31). Le deuxième sous-groupe ON1.2 a aligné les souches locales avec des isolats d'Italie et d'Espagne [KC858212, KM402627] et a été caractérisé par les modifications des acides aminés L274P, L298P et Y304H. Les souches du sous-groupe ON1.5 partageaient deux substitutions d'acides aminés clés, E262K et I243S, qui ont également été observées dans certaines souches du Ghana et de Gambie [KY911000, KY910984]. Alors que les souches appartenant au sous-groupe ON1.4 se distinguaient des autres sous-groupes par un changement unique d'acide aminé P206Q. De plus, le sous-groupe ON1.6 est caractérisé par des modifications uniques des acides aminés au niveau de Y273H et Y280H/P en plus de E262K et I243S caractéristiques du sous-groupe ON1.5 (Agoti et *al.*, 2014; Otieno et *al.*, 2017).

Presque toutes les souches BA marocaines présentaient des substitutions clés K218T, L223P et S247P (sauf deux souches). Alors que les souches BA9 ont été caractérisées par une substitution I281T, le génotype BA10 présentait des substitutions particulières L219P, E226D, I229T et E292G (Figure 33.B).

- **Profils N-glycosylation :**

L'analyse des sites de la N-glycosylation de la région hypervariable du gène G des souches HRSV-A qui présentent le génotype ON1 révèle, globalement, la présence de deux sites de N-glycosylation prévus aux positions AA 237 et 318 et ont perdu le site de N-glycosylation à la position AA 251 en raison d'une mutation T253K/R, cette substitution est caractéristique de toutes les souches ON1. Le changement de l'acide aminé thréonine en position 239 en asparagine (T239N) a provoqué un déplacement du site de N-glycosylation de la position 237 à la position 239 dans 4 échantillons. Le cluster 1 du sous-groupe ON1.1 composé de 4 souches a acquis un troisième site de N-glycosylation en raison d'une substitution H290N unique aux souches marocaines (Figure 33.A).

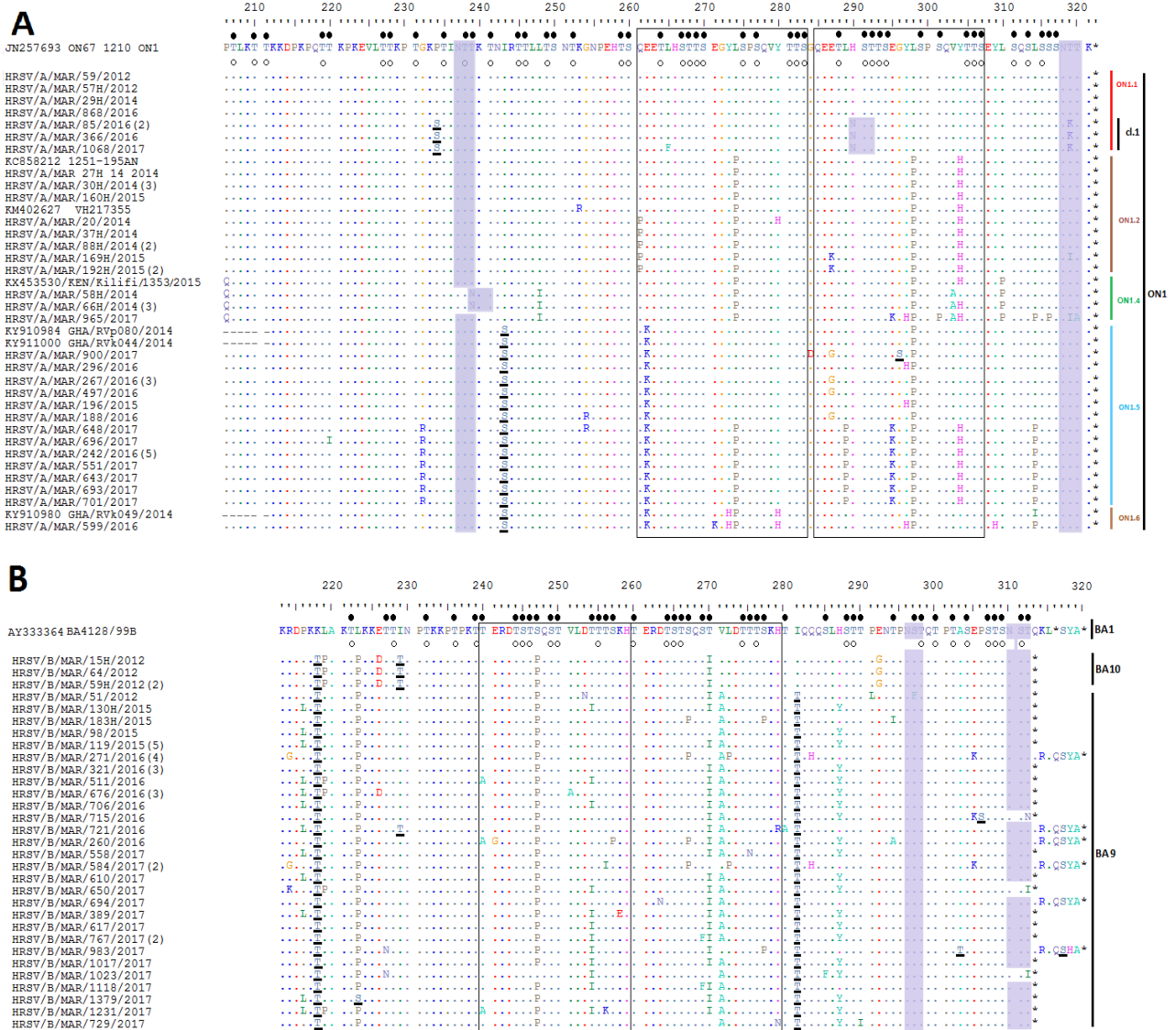


Figure 33 : Aligment des séquences d'acides aminés déduites de la région HVR-2 des souches marocaines de HRSV.

(A) Aligment des séquences du génotype ON1 du HRSV-A du Maroc et des souches de référence des sous-groupes connus au sein du génotype ON1. Les alignements sont présentés et les résidus numérotés par rapport aux séquences de la souche prototype ON1 [JN257693]. **(B) Aligment des virus HRSV-B du Maroc par rapport à la souche prototype BA.** Les résidus sont numérotés par rapport aux séquences d'acides aminés de la souche prototype BA [AY333364]. Le nombre de séquences dupliquées est indiqué entre parenthèses (). Les résidus identiques sont indiqués par des points, les espaces d'alignement par des tirets et les codons d'arrêt par des astérisques. Les sites potentiels de N-glycosylation (N-X-T/S, où X n'est pas une proline) sont indiqués par des rectangles grisés. Les sites potentiels de O-glycosylation de la souche prototype ON1 sont indiqués par des cercles noirs, tandis que les cercles vides indiquaient les sites de O-glycosylation prévus communs à toutes les souches marocaines. D'autres sites de O-glycosylation prédits, non trouvés dans toutes les souches de cette étude, sont soulignés. Les sous-groupes identifiés au sein des souches HRSV-A ON1 ou HRSV-B sont indiqués sur le côté de l'alignement. C1 = cluster.

Les souches HRSV/B avaient 2 sites de N-glycosylation prédits par le serveur NetNGlyc 1.0 aux positions d'acides aminés 296 et 310. Cependant, trois souches de 2016 et 2017 ont perdu le site de N-glycosylation en position AA 310, en raison des substitutions T312N et T312I.

- **Profils O-glycosylation :**

Le nombre de sites de O-glycosylation à l'intérieur de la région HVR-2 du gène G pour les séquences HRSV-A étudiées varie entre 39 à 43 sites prédits et a montré quatre sites de O-glycosylation potentiels supplémentaires par rapport à la souche prototype ON1 (en raison de Substitutions des AA : P234S, I243S, L274S et G296S). Comparablement au prototype ON1 (ON67-1210A), la région de duplication contient un maximum de 10 sites de glycosylation dans les isolats HRSV ON1 du Maroc, à l'exception de trois souches différentes en raison d'une substitution en S299N dans un échantillon et S301P dans deux autres. Les potentiels sites de O-glycosylation des souches BA variaient entre 40 et 45 sites prédits, dont 27 étaient partagés avec la souche prototype BA. En outre, ils ont montré six sites prédits supplémentaires par rapport à la souche de référence [BA AY333364] en raison des substitutions K218T, I229T, I281T, L223S, A303T et P306S.

2. Discussion :

L'énorme variabilité génétique, ainsi que le grand nombre de séquences d'ectodomaine G disponibles sur les bases génomiques, ont été la base pour le choix de cette région du génome du HRSV comme région adaptée au génotypage du HRSV (Aamir et *al.*, 2013; Eshaghi et *al.*, 2012; Goya et *al.*, 2020; Hibino et *al.*, 2018; Scott et *al.*, 2004).

La plupart des définitions de génotypes du HRSV basées sur la région HVR-2 du gène G, se concentrent sur le regroupement de clades phylogénétiques avec des valeurs de bootstrap significatives (> 70 %) soutenu par une distance génétique moyenne (distance p) <0,07 entre les souches du même cluster génétique (Venter et *al.*, 2001). Cependant, cette définition ne fait pas l'unanimité. Récemment, des chercheurs ont proposé un protocole objectif pour le génotypage du HRSV pouvant être adopté en tant que norme internationale pour soutenir l'expansion mondiale de la surveillance moléculaire du HRSV (Goya et *al.*, 2020), dans cette méthode, le nombre de génotypes a été réduit de 16 à trois pour le HRSV-A (GA1-GA3) et de 29 à sept pour le HRSV-B (GB1-GB7).

Selon l'approche de Goya et *al.*, tous les HRSV-A et HRSV-B détectés durant la période 2012/2017 au Maroc appartenait aux génotypes GA2 et GB5 respectivement (Cacciabue et Goya, 2020).

L'analyse phylogénétique de nos isolats locaux de HRSV-A durant 2012/2017, a montré que ces souches appartenait au génotype ON1, ce qui confirme la diffusion mondiale des souches HRSV avec duplication de nucléotides (Luo et *al.*, 2020; Vianna et *al.*, 2021). Des résultats similaires ont été rapporté dans les pays de la région du Moyen-Orient et Afrique du Nord (MENA) et sur d'autres continents où l'ancien génotype NA1 a été rapidement remplacé par le génotype ON1 (Luo et *al.*, 2020; Obodai et *al.*, 2018; Tabatabai et *al.*, 2014; Vianna et *al.*, 2021; Yassine et *al.*, 2020). Les souches Marocaines du HRSV-A pouvaient être divisées en cinq sous-groupes (ON1.1 ; ON1.2 ; ON1.4 ; ON1.5 et ON1.6) avec des substitutions caractéristiques des acides aminés (Agoti et *al.*, 2014; Eshaghi et *al.*, 2012; Obodai et *al.*, 2018; Otieno et *al.*, 2017; Salimi et *al.*, 2021; Tabatabai et *al.*, 2014).

La plupart des séquences du HRSV-A avaient deux sites de N-glycosylation prédits dans la région HVR-2 (237/239 et 318), tandis que quatre séquences locales possédaient un maximum de trois sites (237, 290 et 318). Ces souches hautement N-glycosylées appartenait à la saison 2016/2017, regroupées avec une valeur bootstrap de 87 %, et partageaient trois substitutions supplémentaires (P234S, T319K et H290N) par rapport aux autres souches ON1. Les positions AA 234 et 290 ont été précédemment décrites comme étant sous sélection positive et identifiées comme potentiellement des mutants sélectionnés les anticorps monoclonaux spécifiques (Eshaghi et *al.*, 2012; Zlateva et *al.*, 2004; Botosso et *al.*, 2009). De plus, la position 290 a été décrite comme présentant un motif de « bascule » (Botosso et *al.*, 2009; Eshaghi et *al.*, 2012). Les mutations P234S et T319K se sont déjà produites dans divers pays, tandis que la substitution d'acides aminés H290N a été observée pour la première fois dans les souches marocaines.

L'acquisition de ce site additionnel de N-glycosylation pour les souches ON-1 (Cluster1) pourrait leur procurer un avantage sélectif supplémentaire. En effet, les changements dans la structure glucidique de la chaîne latérale de la protéine G ont été associées à des variations antigéniques du virus influençant son interaction avec des anticorps spécifiques contre la protéine G (Kimura et *al.*, 2004) . De plus, L'accumulation

de substitutions des AA à l'intérieur du gène G peut non seulement entraîner un gain ou une perte de sites de N-glycosylation ou de O-glycosylation, mais également conduire à des modifications de l'efficacité de certains antiviraux. En effet, nous avons trouvé une séquence HRSV-A de 2017 portant la substitution (I189T) dans le domaine de liaison à l'héparine, précédemment rapportée chez des mutants résistants aux médicaments dirigés contre la protéine G virale (Kimura *et al.*, 2004). Des recherches antérieures ont révélé que les changements dans le profil d'O-glycosylation sont à l'origine d'une grande partie de la variabilité génétique entre les souches de HRSV, et cela peut être lié à un mécanisme évolutif d'évasion de la réponse immunitaire (Leemans *et al.*, 2019).

Tous les virus HRSV-B de l'étude actuelle présentaient la duplication de 60 nucléotides spécifiques aux génotypes BA. Les génotypes HRSV-B/BA sont parus à la fin des années 1990 à Buenos Aires en Argentine, et se sont répandus à l'échelle mondiale pour devenir les génotypes du sous-type HRSV-B prédominants dans le monde. Cette grande diffusion des virus BA indique leur grande adaptation à l'hôte humain (Trento *et al.*, 2003). Près de 15 génotypes HRSV-B sont actuellement connus mondialement. Cette grande variabilité génétique serait favorisée par la réponse immunitaire de l'hôte, qui exerce une pression sélective favorisant l'évolution du virus (Di Giallonardo *et al.*, 2018).

Le génotype HRSV-B prédominant au cours de la période d'étude était BA-9 (n = 67 ; 94 %), tandis que le génotype BA-10 n'a été détecté qu'au cours de la saison 2012. Des chercheurs du Liban, du Pakistan, d'Arabie Saoudite, de France et du sud de la Chine ont découvert que BA-9 et BA-10 étaient les génotypes dominants du HRSV-B entre 2010 et 2017 (Gaymard *et al.*, 2018; Luo *et al.*, 2020; Yassine *et al.*, 2020). Tandis qu'un autre rapport du Japon a décrit le BA-10 comme un génotype de 'courte durée' qui n'a circulé que pendant plusieurs mois entre 2012 et 2015 (Hibino *et al.*, 2018).

Nous avons constaté une accumulation progressive de substitutions des AA au sein de la région HVR-2 des génotypes BA au fil du temps ; passant de 10 à 15 substitutions au cours de la période 2012 à 2017. Notamment, le changement (Q313/STOP) qui s'est produit dans la majorité des séquences BA conduisant à un raccourcissement de la protéine G de 320 à 312 AA. La position 313 a été décrite comme étant sélectionnée positivement (Botosso *et al.*, 2009). En effet, l'accumulation exclusive de substitutions dans le gène G et la sélection diversifiée détectée dans plusieurs domaines G du HRSV

suggèrent qu'il existe des contraintes évolutives assouplies sur ce gène (Tan *et al.*, 2013). Par conséquent, la protéine G du HRSV n'est peut-être pas la meilleure cible pour des vaccins efficaces, car elle ne devrait pas induire une immunité fonctionnelle médiée par les lymphocytes B.

Des modifications des sites de glycosylation ont également été observées au sein de la région HVR-2 des souches HRSV-B génotypes BA. Une perte du site de N-glycosylation en position 310 en raison d'une substitution T312N/I dans trois séquences et d'une substitution de tyrosine aux positions (218, 229 et 281) entraînant le gain de nouveaux sites de O-glycosylation supplémentaires dans BA9/BA10, BA10 et BA9, respectivement. Ces substitutions supplémentaires, ainsi que la duplication, pourraient avoir augmenté la valeur adaptative de ce génotype pour l'hôte humain par rapport aux autres génotypes du HRSV-B (Trento *et al.*, 2003). D'autres chercheurs affirment que l'existence d'additionnels sites de O-glycosylation confère aux génotypes BA une plus grande faculté d'attachement à la cellule cible (Hotard *et al.*, 2015).

Parmi les limites de cette étude on peut noter le faible nombre des échantillons séquencés, surtout pendant la saison 2012/2013. Par la suite, nous ne pouvons pas exclure la possibilité de manquer la détection d'autres génotypes en circulation. Néanmoins, nous pensons que nos résultats fourniront des informations significatives sur les schémas de circulation et l'épidémiologie moléculaire du HRSV dans la communauté marocaine.



*Chapitre IV : Conclusion
générale et perspectives*



I. Conclusion générale :

En conclusion, il s'agit de la première étude à l'échelle du Maroc visant à caractériser les 16 virus respiratoires les plus communs (Grippe A/B, HRSV-A et HRSV-B, HAdV, HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, HRV, HMPV, HBoV, HPIV-1, 2, 3 et 4,) chez les personnes hospitalisées pour un syndrome respiratoire aigu sévère ou consultants pour un syndrome grippal. La détection de ces virus a été faite sur une période de 3 saisons successives. Les cas investigués ont été collectés sur la base du système de surveillance de la grippe mis en place depuis une dizaine d'années.

Pour cette surveillance, les techniques moléculaires ont été utilisées comme méthode de choix pour le diagnostic virologique, vu leurs avantages, incluant l'automatisation, le délai d'exécution plus court et des résultats sensibles et spécifiques. Moyennant la technique de qRT-PCR monoplex, nous avons pu identifier une grande variété de ces virus avec une part non négligeable de co-infections virales. Les virus de la grippe A/B, le virus respiratoire syncytial, les rhinovirus et l'adénovirus ont été les plus couramment détectés.

Alors que le virus de la grippe A/B était l'agent pathogène le plus couramment détecté chez les adultes, surtout lors des syndromes grippaux bénins. Le virus le plus fréquemment détecté chez les enfants de moins de cinq ans hospitalisés était le virus respiratoire syncytial. Cette association entre le HRSV et l'hospitalisation des jeunes enfants pour des IRAS, suggère l'impact significatif des infections à HRSV sur la santé infantile au Maroc. Tandis que les rhinovirus ont été détectés chez tous les groupes d'âge et souvent en coinfection virale, les adénovirus semblent avoir un rôle significatif dans les des IRAS chez l'enfant. En effet, les HAdVs ont représenté le deuxième virus respiratoire le plus fréquemment détecté -après le HRSV- chez les enfants hospitalisés pour des IRAS au Maroc. Ce constat est soutenu par les résultats de plusieurs recherches au travers le monde (Ampuero et *al.*, 2012; Chen et *al.*, 2015; De Paulis et *al.*, 2011). Les taux de détection des autres agents viraux variaient de 3,7% à 5,3 %. Néanmoins, on ne pouvait exclure leur contribution dans les IRAS surtout parmi les enfants.

Les données recueillies au cours de ce travail ont montré que chaque virus respiratoire affiche une tendance de circulation particulière. Contrairement aux virus de la grippe, le HRSV et le HMPV qui marquent une saisonnalité distincte pendant la saison

hivernale, les rhinovirus et les adénovirus ont tendance à circuler pendant les mois d'automne mais peuvent être isolés tout au long de l'année ; Tandis que les coronavirus courants, les HPIVs, et les bocavirus humains circulent selon un schéma perannuelle sans saisonnalité distincte.

Ainsi, la surveillance des virus respiratoires, qu'il s'agisse des virus les plus courants ou émergents, est un élément important pour l'orientation des stratégies visant à minimiser l'impact de ces agents pathogènes sur la communauté. Ces stratégies de surveillance des maladies respiratoires contribueraient à réduire les coûts de santé, la morbidité et mortalité liés aux IRAs.

La deuxième partie de cette étude consiste en l'étude rétrospective des tendances de circulation du virus respiratoire syncytial au Maroc durant les cinq saisons de 2012/2013 à 2016/2017.

La prévalence du HRSV chez la population globale était de 19,7 % alors qu'elle atteignait 42,2% chez la population infantile hospitalisée. Cette forte prévalence du HRSV chez les enfants moins de 5 ans témoigne de l'importante implication du HRSV dans les infections respiratoires aiguës sévères chez cette catégorie d'âge. En outre, les personnes âgées sont aussi susceptibles à des infections respiratoires graves liées au HRSV, surtout chez les porteurs de comorbidités et les immunodéprimés. Faisant de ces deux catégories la cible de développement de thérapies et de vaccins futurs.

L'analyse de la tendance de circulation du HRSV a permis de distinguer le caractère saisonnier de l'infection par le virus. Les positifs sont détectés entre novembre et avril et les cas culminent pendant la saison froide. Les deux sous-types du HRSV co-circulaient durant toutes les saisons, avec une prédominance biennale d'un des sous-types.

La définition de cas optimale pour la détection du HRSV est encore sujet de discussion. Pour estimer la charge de l'infection dans le contexte de notre pays où le système de surveillance sentinelle de la grippe est déjà mis en œuvre, la définition de cas IRAS/SG de l'(OMS) pourrait présenter un bon compromis.

Par ailleurs, les résultats issus lors de l'étude d'épidémiologie moléculaire du HRSV fournissent également les premières informations sur les géotypes circulants au

Maroc. La caractérisation génétique de la glycoprotéine G, précisément son ectodomaine hypervariable, a indiqué qu'un seul génotype du HRSV-A (ON1) et deux génotypes du HRSV-B (BA10 et BA-9) ont circulé au cours de l'étude. Ce qui confirme la large diffusion des génotypes avec duplication de nucléotides dans le monde.

Les disparités observées dans les méthodes d'analyse phylogénétique des séquences du HRSV, soulève la nécessité d'établir des standards internationaux plus précis pour définir et classer les nouveaux génotypes de HRSV, cela pourra faciliter la comparabilité des données entre différentes études. Les modifications des sites de glycosylations associé à l'accumulation progressive de substitutions dans la région HVR-2 du HRSV sont preuve d'une évolution rapide du virus. Ces données sur la diversité génétique des souches HRSV en circulation au Maroc au cours de ces cinq saisons épidémiologiques, contribueront ainsi aux récentes données virologiques pour mieux comprendre l'évolution des génotypes du virus, sa circulation, et aider au développement des approches efficaces de prévention et de contrôle.

En résumé, la présente étude met en évidence l'importance de mener une surveillance active des virus respiratoires pour fournir aux autorités de santé des informations clés et à jour en vue de détecter de nouvelles menaces émergentes, cibler les interventions et évaluer les progrès des efforts existants.

A l'instar du programme de surveillance de la grippe, un réseau de surveillance international bien établi contribuant dans le choix périodique la composition optimale du vaccin saisonnier et la mise en évidence des menaces potentielles parmi les souches virales émergentes. Le programme de surveillance du HRSV devrait jouer un rôle central en caractérisant l'influence du virus sur la morbidité et la mortalité à l'échelle mondiale, en identifiant les populations à risque, et en évaluant l'effet potentiel de mesures prophylactiques ou d'un vaccin préventif.

II. Perspectives de l'étude :

Pour atteindre les objectifs de la surveillance du virus respiratoire syncytial au niveau national, ce système de veille intégrée épidémiologique et virologique du HRSV doit être maintenu et renforcé conformément aux recommandations suivantes :

- ✓ Développer les capacités de diagnostic du HRSV par l'acquisition des équipements modernes et l'élargissement du réseau de surveillance virologique au niveau des hôpitaux régionaux par des techniques moléculaires dites « au lit du malade » ou (POC) assurant un diagnostic rapide et fiable aux profit des patients, une meilleure gestion des antibiothérapies et une mise en œuvre de mesures de contrôle des infections à HRSV appropriées (ex. procédures d'isolements pour limiter les infections nosocomiales liées au HRSV dans les services hospitaliers).
- ✓ Promouvoir et sensibiliser les cliniciens à l'importance d'opter pour des traitements incluant des agents anti-infectieux, antiviraux, ou des vaccins contre le virus respiratoire syncytial (HRSV) afin de prévenir les formes graves de la maladie chez les populations vulnérables.
- ✓ Assurer une surveillance génomique continue du HRSV afin de détecter et surveiller non seulement les nouveaux génotypes en circulation, mais également les variants présentant de nouvelles caractéristiques virales susceptibles de modifier l'antigénicité et la gravité de la maladie.
- ✓ Mener des séries d'études épidémiologiques à plus grande échelle, visant à déterminer la charge de morbidité et de mortalité liée au HRSV dans le Maroc, et qui peuvent éclairer les décideurs sur la politique de vaccination optimale à adopter dans le contexte du pays et de définir les catégories cibles.
- ✓ Sensibiliser les cliniciens sur l'apport de la prophylaxie par des anticorps monoclonaux pour la diminution du nombre d'hospitalisations causées par le HRSV parmi les nourrissons âgés de moins six mois, en les protégeant durant leur primo-infection.

D'autres axes de recherche en génomique du HRSV pourraient aussi être explorés, tel que :

- ✓ Examiner la phylogénie du HRSV en se basant sur le génome complet des souches des deux sous-types A et B.
- ✓ Investiguer les phénomènes de recombinaison des souches, en particulier celles présentant des mutations distinctes, à l'aide de l'outil RDP4 (Recombination Detection Program 4).
- ✓ Prédire les épitopes des séquences génétiques de HRSV-A et B, en se concentrant particulièrement sur la région codante pour la protéine G, et en utilisant des outils de prédiction tels que "BepiPred", "ABCpred", etc.
- ✓ Envisager des études de modélisation pour évaluer *in silico* l'impact de l'accumulation de substitutions d'acides aminés à l'intérieur du gène G sur la résistance aux antiviraux spécifiques au HRSV et cela en vue de mieux comprendre les mécanismes de résistance du virus et optimiser de traitements cibles.
- ✓ Examiner les variations des profils de O-glycosylation et N-glycosylation et leur effet sur l'immunogénicité du virus respiratoire syncytial, ainsi que sur l'efficacité potentielle des vaccins.



Productions scientifiques



Circulation of Respiratory Syncytial Virus in Morocco during 2014-2016: Findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza

A. Bimouhen¹, F. El Falakji¹, H. Ihazmad¹, Z. Regragui¹, S. Benkerroum¹ and A. Barakat¹

تجوال الفيروس المخلوي التنفسي في المغرب خلال الأعوام 2014-2016: نتائج مأخوذة من نظام لترصد فيروس الإنفلونزا

عبد الرحمان بيموحن، فاطمة الفلكي، حسن احزامض، زكية الركراكي، سميرة بنكروم، أمال بركات

الخلاصة: عل الرغم من أن الفيروس المخلوي التنفسي يعتبر أحد الأسباب الرئيسية للوفيات والمراضة في أوساط صغار الرضع فلم يكن معروفاً سوى القليل عن أنماط وطُرُز تجواله في المغرب. أجرينا دراسة استباقية باستخدام ترصد الإنفلونزا للكشف عن الفيروس المخلوي التنفسي بواسطة "تفاعل البلمرة المتسلسل - الزمن الحقيقي" لدى مرضى مصابين بأمراض تنفسية حادة سُجلوا خلال موسمين (2014-2015، 2015-2016). من الفترة ما بين سبتمبر/أيلول 2014 إلى أبريل/نيسان 2016 حصلنا على 1450 عينة، ثبتت إصابة 267 (18.4%) منها بالفيروس المخلوي التنفسي. وكانت نسبة العدوى المثبتة بالفيروس المخلوي التنفسي أعلى لدى المرضى الذين أدخلوا إلى المستشفى لإصابتهم بمرض تنفسي حاد مقارنة مع المصابين بأعراض خفيفة في العيادات الخارجية. وكانت أعلى نسب العدوى بالفيروس المخلوي التنفسي لدى الأطفال الذين تتراوح أعمارهم بين 0 و 6 أشهر (45%; $p < 0.001$). وقد لوحظ ارتفاع في معدل الإيجابية بين ديسمبر/كانون الأول ومارس/آذار. لا يزال الفيروس المخلوي التنفسي عاملاً سببياً فيروسياً مهماً يسبب أمراضاً شبيهة بالإنفلونزا وأمراضاً تنفسية حادة وخيمة؛ خصوصاً في أوساط الرضع في المغرب. المطلوب مزيد من الترصد - باستخدام النظام الحالي - للوصول إلى فهم أفضل لوبائيات العدوى بالفيروس المخلوي التنفسي ولعوامل خطر الإصابة به.

ABSTRACT Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of mortality and morbidity in young infants, little was known on its circulation types and patterns in Morocco. We conducted a prospective study using sentinel-based influenza surveillance to detect RSV by real time PCR in patients with acute respiratory infections, enrolled during two seasons (2014/15, 2015/16). During September 2014–April 2016, we obtained 1450 specimens, of which 267(18.4%) tested positive for RSV. The proportion of positive RSV infection was higher in patients hospitalized with acute respiratory infection compared to those with mild symptoms in out-patient clinics. The proportion of RSV infection was highest in children aged 0–6 months (45%; $P < 0.001$). Higher positivity rate was observed between months of December and March. RSV remains important viral etiological agent causing influenza-like illness and severe acute respiratory infections especially among infants in Morocco. Further surveillance, is required to understand better the risk factors of RSV infections.

Circulation du virus respiratoire syncytial au Maroc de 2014 à 2016 : constatations provenant du système de surveillance virologique sentinelle de la grippe

RÉSUMÉ Bien que le virus respiratoire syncytial (VRS) soit l'une des principales causes de mortalité et de morbidité chez les jeunes nourrissons, les modes et les tendances de la circulation de ce virus au Maroc sont très peu connus. Nous avons réalisé une étude prospective en recourant à la surveillance de la grippe basée sur des sites sentinelles dans le but de dépister le VRS grâce à la PCR en temps réel chez des patients souffrant d'infections respiratoires aiguës recrutés au cours de deux saisons (2014-2015 et 2015-2016). De septembre 2014 à avril 2016, nous avons prélevé 1450 échantillons, parmi lesquels 267 (18,4 %) se sont avérés positifs au VRS. La proportion d'infections positives au VRS était plus élevée chez les patients hospitalisés pour une infection respiratoire aiguë que chez les patients en consultation externe souffrant de légers symptômes. Cette proportion était la plus élevée chez les enfants de 0 à 6 mois (45 % ; $p < 0,001$). Le pic du taux de positivité a eu lieu de décembre à mars. Le VRS demeure un agent étiologique viral important au Maroc, responsable de syndromes de type grippal et d'infections respiratoires aiguës sévères, en particulier chez les nourrissons. Une surveillance renforcée est indispensable pour mieux comprendre les facteurs de risque des infections à VRS.

¹ Centre National de Référence de la Grippe, Institut National d'Hygiène, Ministère de la Santé, Rabat, Maroc.

Received: 25/08/2016; accepted: 22/09/2016

Introduction

Respiratory syncytial virus (RSV) is a leading cause of severe respiratory disease in infants, young children and immunocompromised and elderly populations worldwide with highest burden of disease in low-income and middle-income countries. (1). The RSV infects more than 60% of children in their first year of life (almost 100%) by age of 2 years) with peak hospital admission from RSV-related disease at 2-3 months. (2). In Morocco, 13% of paediatric deaths during 2012 were due to acute respiratory infections (3). The burden of RSV as attributable cause of death amongst these paediatric patients remained unknown.

Although respiratory infections can be caused by bacteria and fungi, viruses remain the most frequent etiological agents (4). Respiratory syncytial virus (RSV) is recognized to be the most important viral pathogen causing acute lower respiratory tract infection in young children less than five years of age causing seasonal outbreaks worldwide (5,6). While RSV is a common agent of respiratory infections causing bronchiolitis, pneumonia, and chronic obstructive pulmonary infections in people of all ages, RSV is also responsible for nosocomial infections resulting in prolonged hospital stay in intensive care units resulting in worsening the prognosis of the patients. RSV is seasonal, occurring in the winter months in temperate climates (7).

RSV is a non-segmented negative-sense single-stranded enveloped RNA virus that belongs to the family of *Paramyxoviridae*, genus *Pneumovirus*, subfamily *Pneumovirinae*. There are two subgroups of the virus, A and B, which distinguishes on both genetic and antigenic sides (8).

In Morocco, there are limited data on the circulation of RSV, its sub-types as well as the pre-dominant epidemiological and clinical characteristics of the

RSV infection. In an effort to address this gap, virological data from the existing influenza surveillance system in the country was used to understand characteristics and circulating patterns of RSV in patients with acute respiratory infections admitted in either hospitals or seen at out-patient clinics in Morocco over the period of 2014-2016.

Methods

Study design and case definition

The Ministry of Health of Morocco established a sentinel-based influenza surveillance system in 1996 (9). The surveillance system for influenza and influenza-like illness (ILI) was revamped in 2014 that currently includes- (i) surveillance system for severe acute respiratory infection (SARI) using the WHO's case definition for SARI (10). The system collects data from 8 public sector general hospitals located in all the eight regions in the country; (ii) surveillance system for influenza-like illness (ILI) using the WHO's case definition for ILI (10). The system collects data from out-patients over 425 out-patient clinics in both public and private sector.

While the SARI surveillance is conducted throughout the year for hospitalized patients. Both epidemiological and virological data are collected from all SARI cases that meet the WHO's case definition for SARI. The patients admitted in either paediatrics, pneumology or internal medicine are enrolled for the SARI surveillance system.

The surveillance system for ILI is conducted in 375 public sector out-patient clinics and aggregated data (number of ILI cases out of total consultations, etc) on total ILI and ARI consultations are collected from all these 375 public sector clinics. Of these, 8 out-patient clinics collect specimen for virological testing only. The first five

cases meeting the WHO's case definition for ILI are enrolled for specimen collection.

In addition to the public sector clinics, the ILI surveillance system in Morocco also uses a private practitioner network comprising of 50 physicians (including general practitioners, pediatricians and lung specialists) located in 9 large cities across the country (Tanger, Fès, Meknès, Oujda, Casablanca, Rabat, Marrakech, Agadir and Laayoune). The physicians enroll the first 5 ILI cases per day during October through April for specimen collection

For the purpose of understanding the circulation and characteristic of circulating RSVs, the National Influenza Center (NIC), based in Rabat, Morocco, collected and tested the patient's specimens from its existing influenza surveillance system for RSVs over a period from September 2014 to April 2016. Additional epidemiological data using a standardized data collection instrument were also collected from 8 SARI and 33 ILI sites. Patient's specimens from a total of 1450 patients meeting the case definition for either ILI and SARI were collected.

Sample and data collection

Both nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) swabs were collected from 1450 patients who met the case definition for either ILI or SARI. The specimens were placed in tube containing 3 mL of viral transportation medium (ViCUM), stored at 4°C at the health facilities, and sent to the NIC within 48 hours. A standardized questionnaire with patient-specific information (medical history, clinical symptoms, demographic and epidemiological data) was filled up by trained personnel.

Nucleic acid extraction

Total nucleic acids were extracted automatically from 400 µL of samples, using a High Pure Viral Nucleic Acid Kit and iPrep instrument, according to the manufacturer's instructions

(Lifetechnologies, Carlsbad, USA), thereafter (RNase P) was considered as the internal control during extraction of human specimens. 100µL of extracted nucleic acids were stored at -70°C until processing.

Detection of RSV& Influenza by real time RT-PCR

All enrolled patients were tested for both influenza and RSV viruses. Detection of these two viruses was performed in 5µL volume using Invitrogen® SuperScript III Platinum® One-step RT-PCR, amplification and reaction conditions were in accordance to the protocols developed by Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA) (11,12), with an ABI 7500 Fast Sequence Detection System.

Subtyping of RSV by real time RT-PCR

The real-time RT-PCR for Subtyping RSV was performed with primers specific to the N gene of RSVA and RSVB, the amplification protocol was 50°C for 30 min, followed by 95°C for 2 min, and then by and 45 cycles of 15 s at 94°C, and 35 s at 55°C (13,14).

Statistical analysis

To describe the temporal distribution of RSV positive cases, we aggregated RSV results as obtained by RT-PCR by calendar month and week. Demographic, clinical and virological data for all enrolled patients were entered into a database created using Epi Info 7.1. Group comparisons were performed using χ^2 or Fisher's exact test for the dependency/relationship between two variables. P-values <0.05 were considered statistically significant. Data analysis was conducted using the same software.

Ethical considerations

The protocol was approved by the Ministry of Health for the objective of conducting surveillance of respiratory diseases with epidemic potential, in

which participants remain anonymous, and therefore did not require an assessment of the ethics committee or IRB approval. Verbal consent was obtained from all patients.

Results

Demographic characteristics

During the period of 2014–2016, patient's specimens were collected from 1450 patients meeting the WHO's case definition for ILI and SARI from all age groups from 41 sentinel sites for SARI and ILI. An NP/OP swab was collected from all those patients. Of those, 842 (58%) patients specimens were collected from the ILI sites while the remaining 608 (42%) patients specimens were enrolled from the SARI sentinel sites. The proportion of females was slightly greater than the proportion of males whose specimens were collected during the period of 2014–2016. (52.2% vs. 47.8%). The mean age in years of patients was 24.41 years (± 23.69) and the median age was 18.00 years [0.08–89.00]. A total of 503 cases (35%) were younger than 5 years, 608 cases (42%) were aged between 5–49 years while 283 patients (20%) were older than 50 years (Table 1). Among the eight regions, highest number of patients specimens were collected from Fes-Meknes (549/38%) followed by Rabat –Sale –Kenitra (405/28%). Patients were enrolled for this study throughout the year but during the first quarter (January–April), the number of enrollment was higher compared to other quarters.

Detection rates of RSV, percentages of positives and subgroups

Of the 1450 specimens tested from both ILI and SARI, a total of 267 specimens were positive for RSV by RT-PCR resulting in the detection rate of 18.4% (267/1450). The detection rate for RSV, plausibly, was comparably

higher amongst the patients presenting with SARI than ILI (73% vs. 27%). The proportion of RSV infection detection was highest in children ($P < 0.001$), aged between 0–6 months (45% ;121/267) followed by those aged between 7–23 months old (19%; 52/267), children aged between 2–4 years (12%;31/267) and adults between 15–49 years (9%; 25/267).

We were able to determine the subtypes of RSV in all 267 samples that were positive for RSV. During 2014/15 season, 92% (80 of 87) of RSV strains were sub-typed as RSV A which was the predominant strain compared to only 8% (7 of 87) of RSV strains sub-typed as RSV-B. On the other hand, RSV B was the predominantly circulating during 2015/16 season accounting for 70.5% of all RSV strains circulating in the country during this period (127 patients with RSV Group B among 180 RSV positive samples in 2015/16) (Figure 1).

RSV seasonal distribution and co-circulation with influenza viruses

Throughout the period under observation, the RSV showed a periodic circulating pattern. Positivity rate is predominantly observed to have occurred from November to March of the year (during the fourth and the first quarters of year each season; $P < 0.001$); peaks were detected during week 52 of 2014 and week 03 of 2016 (Figure 2).

The largest proportion of samples (89%) were collected from patients in main five regions of the country: Fes-Meknes, Rabat-Sale-Kenitra, Souss-Massa, Beni mellal-Khenifra and Oriental. Most of RSV-positive samples (97%; $P < 0.001$) were collected from these 5 regions. During the period of 2014–2016, both the RSV and Influenza viruses (Table 2) were also observed to be co-circulating (18%; 267/1450 versus 31%; 447/1450)

Table 1 : Demographic and clinical characteristics of patients with influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infections by Respiratory Syncytial Virus infection status, Morocco, 2014–2016.

| | No of patients enrolled N=1450 n (%) | RSV-Positive N=267 (18%) n (%) | RSV-Negative N=1183 (82%) n (%) | P-value |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|---------------------------------------|---------|
| Age (n=1395) | | | | |
| 0-6 month | 217 (15) | 121 (45) | 96 (8) | |
| 7-23 month | 153 (11) | 52 (19) | 101 (9) | |
| 2-4 year | 134 (9) | 31 (12) | 103 (9) | |
| 5-14 year | 150 (10) | 7 (3) | 143 (12) | < 0.001 |
| 15-49 year | 458 (32) | 25 (9) | 433 (37) | |
| 50-64 year | 200 (14) | 16 (6) | 184 (16) | |
| >65 year | 83 (6) | 7 (3) | 76 (6) | |
| unknown | 55 (4) | 8 (3) | 47 (4) | |
| Sex | | | | |
| Female | 757 (52) | 129 (17) | 628 (83) | 0.159 |
| Male | 693 (48) | 138 (20) | 555 (80) | |
| Clinical symptoms | | | | |
| onset of symptoms | | | | |
| >10 days | | 35 (15) | 198 (85) | 0.145 |
| <10 days | | 232 (19) | 985 (81) | |
| Fever (n=752) | | | | |
| ≤ 37.5 C | | 3 (12) | 22 (88) | 0.458 |
| >37.5 C | | 129 (18) | 598 (82) | |
| Cough | | | | |
| Yes | | 246 (20) | 975 (80) | < 0.001 |
| No | | 21 (9) | 208 (91) | |
| The regions (n=1450) | | | | |
| Fes-Meknes | 549 (38) | 133 (50) | 416 (35) | |
| Rabat-Sale-Kenitra | 405 (28) | 49 (18) | 356 (30) | |
| Souss-Massa (Agadir) | 159 (11) | 41 (15) | 118 (10) | |
| Beni mellal-Khenifra | 98 (7) | 27 (10) | 71 (6) | < 0.001 |
| Oriental (Oujda) | 88 (6) | 9 (3) | 79 (7) | |
| Tanger-Tetouan | 92 (6) | 4 (2) | 88 (7) | |
| Marrakech-Safi | 52 (4) | 4 (2) | 48 (4) | |
| Laayoune-Dakhla | 7 (0) | 0 (0) | 7 (0) | |
| Season | | | | |
| First Quarter | 1033 (71) | 230 (86) | 803 (68) | |
| Second quarter | 41 (3) | 1 (0) | 40 (3) | < 0.001 |
| Third quarter | 11 (1) | 0 (0) | 11 (1) | |
| Fourth quarter | 365 (25) | 36 (13) | 329 (28) | |
| Syndrome | | | | |
| ILI | 842 (58) | 73 (27) | 769 (65) | < 0.001 |
| SARI | 608 (42) | 194 (73) | 414 (35) | |

*Some data variables from age, clinical syndrome and regions have not been included in the analysis owing to incomplete data.

Clinical manifestations

For all age groups, the commonest presenting symptoms of RSV-positive

cases were cough (92.1%; $P < 0.001$).

The onset of symptoms for RSV-positive patients was in 19% of patients

within 10 days of admission while it was 81% for RSV-negative patients (81%; $P = 0.145$). Fever (>37.5 C) was

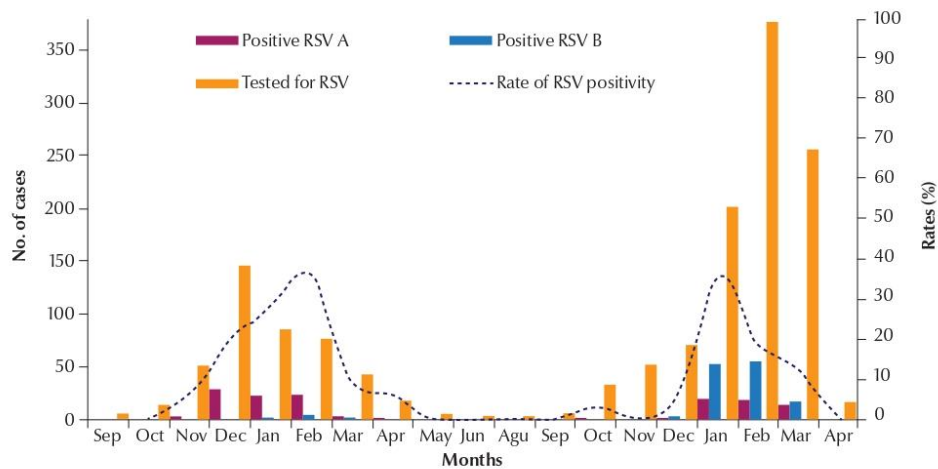


Figure 1 Samples tested for RSV, proportion positive for RSV A and RSVB, and positivity rates by months, Morocco, September 2014–April 2016.

found in only 18% (129/752) of RSV-positive patients compared with RSV-negative patients (82.0%; $P = 0.458$). Further, in infants aged between 0–6 months affected by RSV, only 60.3% (73/121) presented with fever during the period the data were collected.

Discussion

Using data from sentinel-based surveillance system for influenza, we report for the first time ever the circulating patterns of RSV in Morocco during 2014–2016. We have detected RSV by singleplex Real-Time RT-PCR in patients with severe acute respiratory infections who were enrolled in the sentinel-based influenza surveillance network in Morocco during the period of 2014–2016. Among the patients whose specimens were collected during 2014–2016 from the SARI and ILI sentinel sites, the rate of RSV positivity was 18.4%.

Although, RSV was detected in all age groups, the proportion of positive cases for RSV was comparatively higher in children aged between 0–6 months amongst all age groups which

was statistically significant. Children below 5 years of age comprised of 35% of all patients enrolled in this study while the RSV detection rate in children under 5 years of age was 76%. This rate was high compared to the findings reported in USA and Turkey with 18% and 24.5% respectively (6–15). Similar to our findings, Weber et al. reported higher percentage of RSV-infection in children less than 6 months of age in developing countries (16). In this study, the higher percentage of RSV infection among infants may probably be due to nosocomial spread of the virus within paediatric care units during the high circulating season of RSV. However, there is no data to substantiate this assumption. Indeed, some authors suggested RSV as the major cause of nosocomial outbreak during its annual outbreaks, specially among the children admitted in the paediatric unit (17).

Consistent with other studies (1, 4–6), we also found that proportion of patients with respiratory illness who tested positive for RSV varied with age, with the highest overall detection rate occurring in infants less than 6 months

of age during 2014–2016 (45%; $P < 0.001$) making this age category the highest priority target population for the candidate vaccines (1,18).

The circulation of RSV follows a clear seasonality pattern. In temperate climate, RSV usually circulates during the winter season from November to April. Epidemics of RSV occurs when the circulation of influenza virus peak in the period from October through April (9). Although no clear seasonal pattern on the circulation of RSVs could be gathered from these data, the detection rate for RSV-positive infection was highest from November to March every year (during the fourth and the first quarter; $P < 0.001$) while the detection rate was observed to have peaked in our study during week 52 of 2014 and week 3 of 2016. Similar circulating pattern has been observed in other temperate countries, where RSV-positive infection rate begins in late fall or early winter, peaks between mid-December and early February, and offset in late spring (7,8,16). Alternating strong early onset epidemics with more moderate and

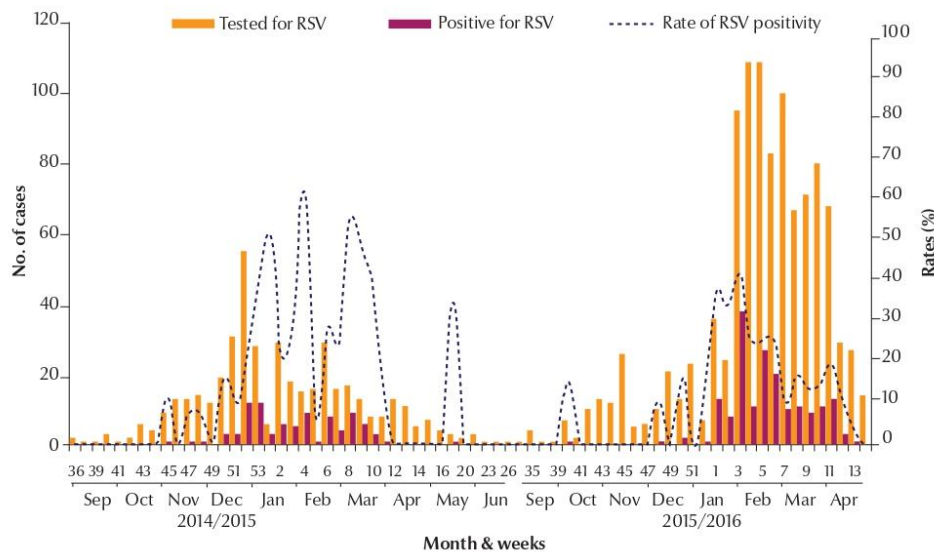


Figure 2: Samples tested for RSV and proportion positive for RSV by weeks and -months, Morocco, September 2014–April 2016

later epidemics have also been reported in the temperate region (19).

The data reveal that that RSV positivity was highest among patients enrolled from five regions (Fes-Meknes, Rabat -Sale -Kenitra, Souss-Massa, Oriental and Beni mellal-Khenifra) reaching to a combined rate of approximately 97%. This could be due to fact that these regions are most populated in Morocco and therefore, comparatively higher numbers of patients were enrolled (89%) from these regions than the other remaining regions in the SARI and ILI surveillance system.

In addition to the higher percentage of RSV infection in infants aged

0–6 months, we also observed in our study that 40% of these infants infected with RSV did not have fever as the predominant presenting symptom during 2014–2016. Indeed, WHO reported that nearly half of RSV-infected children do not show fever as the presenting symptom (20). Another report found that the burden of RSV would have been under-estimated by 50–85% among young children if only SARI and ILI case definitions are used to pick up a probable RSV infected children. This underlines the importance of using WHO's case definition for ARI as more suitable and highly sensitive for RSV surveillance amongst children (21).

In our data, both subtypes of RSV were detected during each season. While higher number of RSV group A viruses (92%) were detected amongst patients who were tested positive for RSV during 2014/15, the pattern was changed during the following season of 2015/16. During this period, there was a decline in the circulation of RSV group A viruses and RSV group B viruses predominantly circulated during this season accounting for 70.5% of all RSV-infected cases. Esposito et al. reports that RSV has complex circulation patterns characterized by periodic replacement of the predominant genotypes with new one during successive epidemic seasons (22). Additional investigations are needed to determine the genotypes of RSV strains circulating in Morocco, since many reports described the novel RSVA genotype ON1 in the world as well as the increasing spread of the RSV group B virus genotype BA.

There are several limitations to the way these data presented in this

Table 2 Influenza and RSV positivity rate among ILI and SARI patients, Morocco, 2014–2016.

| Pathogen | RT-PCR Test Results | | Total |
|------------------------|---------------------|-----------|--------------|
| | Negative | Positive | |
| RSV | 1,183 (82%) | 267 (18%) | 1,450 (100%) |
| Influenza virus | 1,003 (69%) | 447 (31%) | 1,450 (100%) |

manuscript need to be interpreted. First, our sample size was small. We did not collect swab specimens from all patients meeting the case definition for ILI and the possibilities that some SARI patients that were eligible for enrolment were not included for patient's specimen collection owing to either incorrect use of case definition or selection bias cannot be ruled out. Hence there are possibilities for sampling bias in some cases. Second, data on the full epidemiological spectrum of patients positive for RSV infection including the risk factors were not collected. Third, owing to small sample size, the association between RSV subtypes and other clinical and epidemiological characteristics and severity of infection could not be established. Fourth, to establish seasonality of the RSV's circulating patterns,

more time-series analysis of data are required over 3 to 5 year period. Finally, the molecular characterization of the RSV group viruses could not be done during this study.

Conclusion

This study underscored the importance of RSV as a viral aetiological agent causing both mild and severe acute respiratory infections in Morocco, especially in children aged less than 5 years. Additional sentinel based surveillance embedded in influenza surveillance will be required to be established in order to fully understand the burden of disease caused by RSVs including epidemiology, seasonality and risk factors for the RSV infection in Morocco. Further research will also be required

using molecular epidemiology for characterization of predominantly prevalent RSV strains in different regions of Morocco and its prevalent age groups for early detection of emerging genotypes responsible for causing periodic outbreaks.

Acknowledgments

We would like to acknowledge all the physicians and nurses in the public and private network who have contributed to the collection of samples at the sentinel sites.

Funding: This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) grant no. 5U51C1000469 and PIP.

Conflicting interests: None declared.

References

- Collins PL, Melero JA. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 2011 Dec;162(1-2):80-99. PMID:21963675
- WHO. The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- Imane Jroundi, Chafiq Mahraoui, Rachid Benmessaoud, Cinta Moraleda, Badr Sououd Benjelloun and Quique Bassat. Knowledge gaps on paediatric respiratory infections in Morocco, Northern Africa. *Archives of Public Health* 12/2015; 73(1). DOI: 10.1186/s13690-015-0076-x.
- Costa LF, Yokosawa J, Mantese OC, Oliveira TF, Silveira HL, Nepomuceno LL, et al. Respiratory viruses in children younger than five years old with acute respiratory disease from 2001 to 2004 in Uberlândia, MG, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006 May;101(3):301-6. PMID:16862327
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010 May 1;375(9725):1545-55. PMID:20399493
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med.* 2009 Feb 5;360(6):588-98. PMID:19196675
- Aitken C, Jeffries DJ. Nosocomial spread of viral disease. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Jul;14(3):528-46. PMID:11432812
- Borchers AT, Chang C, Gershwin ME, Gershwin LJ. Respiratory syncytial virus—a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013 Dec;45(3):331-79. PMID:23575961
- Barakat A, Ihazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, et al. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS One.* 2011;6(9):e24579. PMID:21931764
- World Health Organization (WHO). WHO surveillance case definitions for ILI and SARI. Geneva: WHO. January 2014. [Accessed 11 Jul 2016.] Available from: <http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/ili_sari_surveillance_case_definition/en/>
- Centers for Disease Control and Prevention. Real-time RT-PCR assays for non-influenza respiratory viruses. Version 1.4 (unpublished), Atlanta: CDC, 2009.
- WHO. CDC protocol of real time RT-PCR for detection and characterization influenza 2009 A (H1N1) pdm virus. 2009.
- Hu A, Colella M, Tam JS, Rappaport R, Cheng SM. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):149-54. PMID:12517840
- de-Paris F, Beck C, Machado AB, Paiva RM, da Silva Menezes D, de Souza Nunes L, et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods.* 2012 Dec;186(1-2):189-92. PMID:22796284
- Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, Yalaz M, Saz EU, Pullukçu H, et al. [Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014]. *Mikrobiyol Bul.* 2015 Apr;49(2):188-200. PMID:26167819
- Weber MW, Mulholland EK, Greenwood BM. Respiratory syncytial virus infection in tropical and developing countries. *Trop Med Int Health.* 1998 Apr;3(4):268-80. PMID:9623927
- Mlinaric-Galinovic G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000 Aug;37(4):237-46. PMID:10974574
- Anderson LJ, Dormitzer PR, Nokes DJ, Rappuoli R, Roca A, Graham BS. Strategic priorities for respiratory syncytial virus (RSV) vaccine development. *Vaccine.* 2013 Apr 18;31 Suppl 2:B209-15. PMID:23598484

19. Freymuth F, Vabret A, Dina J, Cuviron-Nimal D, Lubin C, Vau-decrane A, et al. Les virus des bronchiolites aiguës. *Arch Pediatr*. 2010 Aug;17(8):1192-201. PMID:20558050
20. Global Influenza Programme WHO. Informal Consultation on Surveillance of RSV on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Platform. Geneva. World Health Organisation, 2015(WHO/HSE/PED/GIP/RSV/2015.01).
21. Saha S, Pandey BG, Choudekar A, Krishnan A, Gerber SI, Rai SK, et al. Evaluation of case definitions for estimation of respiratory syncytial virus associated hospitalizations among children in a rural community of northern India. *J Glob Health*. 2015 Dec;5(2):010419. PMID:26649172
22. Esposito S, Piralla A, Zampiero A, Bianchini S, Di Pietro G, Scala A, et al. Characteristics and Their Clinical Relevance of Respiratory Syncytial Virus Types and Genotypes Circulating in Northern Italy in Five Consecutive Winter Seasons. *PLoS One*. 2015 06 05;10(6):e0129369. PMID:26047100

Circulation patterns and molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus over five consecutive seasons in Morocco

Abderrahman Bimouhen^{1,2} | Zakia Regragui² | Fatima El Falaki² | Hassan I hazmade² | Samira Benkerroum² | Amal Barakat³ | Ahmed Rguig⁴ | Touria Benamar⁴ | Soumia Triki⁵ | Youssef Bakri^{1,6} | Hicham Oumzil^{2,7}

¹Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

²National Influenza Center, Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Rabat, Morocco

³World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo, Egypt

⁴Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Rabat, Morocco

⁵World Health Organization Country Office of Morocco, Rabat, Morocco

⁶Center of human pathologies genomic, faculty of Medicine and Pharmacy, Mohammed V university in Rabat, Rabat, Morocco

⁷Pedagogy and Research Unit of Microbiology, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

Correspondence

Abderrahman Bimouhen; National Influenza Center, Virology department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Rabat, Morocco.
Email: bimouhen@yahoo.fr

Funding information

This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) grant no. 5U51CI000469 and PIP.

Abstract

Background: Respiratory syncytial virus (HRSV) is the leading cause of respiratory tract infections in infants and young children. We investigated the prevalence and characteristics of HRSV in Morocco and explored trends in circulating genotypes through partial G gene analysis of HRSV strains prevalent from 2012 to 2017.

Methods: Respiratory samples were gathered from both outpatients and inpatients meeting ILI or SARI case definitions. The patients' ages varied from 1 month to 99 years old. Nucleic acids were extracted and HRSV type/subtype was detected by RT-qPCR. A subset of positive samples was randomly selected in each epidemic year, the complete viral genome was sequenced, phylogenetic analysis was performed using the MEGA7 program and the genotypes were confirmed.

Results: The 3679 specimens were collected from 2012 to 2017, of which 726 (19.7%) were positive for HRSV. The 35% (257/726) of HRSV-positives were of the HRSV-A subtype, while the HRSV-B subtype accounted for 61% (442/726). The co-infection rate was 3.7% (27/726). The virus circulates in a periodic pattern, where epidemics occur during the fall months through early spring. HRSV genotype was confirmed in 127 specimens (56 HRSV-A and 71 HRSV-B). Based on phylogenetic analysis, all HRSV-A were ON1 genotype, and HRSV-B were mostly BA9 genotype. HRSV-B belonging to the BA10 genotype was detected in 2012 exclusively.

Conclusions: BA9, BA10, and ON1 were the only HRSV genotypes detected between 2012 and 2017. Variations in the G gene amino acid chain were identified in local strains, which suggests an increased need for continuous genomic surveillance.

KEYWORDS

circulation patterns, genotype, Morocco, phylogenetic analysis, respiratory syncytial virus

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2023 The Authors. *Influenza and Other Respiratory Viruses* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

A significant part of acute lower respiratory infections (ALRIs) in infants and young children worldwide are attributed to the respiratory syncytial virus (HRSV). These infections can be severe, resulting in pediatric hospitalizations and childhood deaths, mostly in developing countries.¹ HRSV is also recognized as a major viral pathogen in the elderly, especially among those with chronic diseases and immunocompromised patients.²

HRSV is a non-segmented, negative, single-strand enveloped RNA virus, a member of the *Pneumovirinae* subfamily of the *Paramyxoviridae* family. The viral genome is about 15.2 kb in length, and it contains 10 genes that encode 11 proteins: nonstructural proteins NS1 and NS2; three nucleocapsid proteins N, P, and L; two matrix proteins, M and M2-1; a transcription regulatory protein M2-2; three transmembrane glycoproteins G, F, and small hydrophobic protein SH.³ HRSV is divided into two antigenic subtypes (A and B) that are mostly distinguished by differences in the viral attachment (G) protein and each has been divided into multiple genotypes.⁴ The sequence of the G gene is the most variable; thus, all molecular epidemiology studies of HRSV have focused on the second hypervariable region in the C-terminal (HVR2) of the G protein and it has been used for virus genotyping.⁵ Fifteen genotypes of HRSV-A (GA1 to -7, SAA1, CB-A, NA1 to -4, ON1 and ON2) and 29 genotypes of HRSV-B (BA1 to -14, GB1 to -5, SAB1 to -4, URU1, URU2, CB1, BA-C, CB-B, and THB) have been described.⁶⁻¹⁰ Among these genotypes, HRSV-A ON1 and HRSV-B BA with respectively 72 and 60 nucleotide duplications within the second hypervariable region of the G gene spread rapidly throughout the world and have been detected globally.⁹

The World Health Organization (WHO) launched a project for global respiratory syncytial virus surveillance in 2017 using the already long-established, well-functioning Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).¹¹ The main expected key outcomes of this project were understanding the epidemiology and global circulation of HRSV strains, developing genetic resources of HRSV viruses in publicly accessible databases, determining highly risk groups for severe respiratory syncytial disease and building evidence that would enable countries to make informed policy decisions for introducing effective HRSV vaccines and monoclonal antibodies especially for infants and young children.

In Morocco, a sentinel-based influenza surveillance system has been established since 1996¹²; however, data regarding other respiratory viruses remain scarce. Recent studies have attempted to describe circulation characteristics of respiratory viruses prevailing in Moroccan patients with Severe acute respiratory infections (SARI) or Influenza Like Illness (ILI), including the prevalence of HRSV.¹³ However, data on molecular epidemiology and phylogeny of HRSV strains in the country is still limited. Therefore, this study aims to investigate the prevalence of HRSV in patients with SARI or ILI, explore the seasonality of the virus, describe the clinical characteristics of patients with the infection, and to conduct phylogenetic and molecular analysis of different genotypes of HRSV strains in Morocco compared to what is observed in other countries in the world over the period 2012 to 2017.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample and data collection

In this study, we retrospectively investigate respiratory samples collected from the existing influenza surveillance system for HRSV over five seasons from September 2012 to August 2017. As described earlier,¹³ virological surveillance for SARI was carried out throughout the year at nine public hospitals located in different regions of the country. Patients of all ages who met the World Health Organization's (WHO) criteria for SARI were enrolled,¹⁴ and medical staff recorded relevant epidemiological information (age, gender, medical history, clinical symptoms, and underlying conditions). The ILI virological surveillance system collects specimens and records data daily from the first five cases that meet the WHO's case definition for ILI¹⁴ in eight out-patient public clinics and 50 private physicians located in nine major cities across the national territory. A total of 3679 Specimens were collected from patients, were stored at 4°C at the health facilities then sent to the National Influenza Center (NIC) within 48 h for immediate processing.

2.2 | RNA extraction and diagnosis by real time RT-qPCR

An initial volume of 400 µL of samples was extracted automatically using a High Pure Viral Nucleic Acid Kit and iPrep™ instrument, according to the manufacturer's instructions (Lifetechnologies, Carlsbad, USA). Ribonuclease P (RNase P) was considered as the internal control during specimen extraction. All samples were initially tested for Influenza A and B using a TaqMan® one-step real-time Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) assay with specific primers and probes for influenza (CDC, USA), according to the manufacturer's recommendations. Detection of HRSV was performed in 5-µL volume using Invitrogen® Superscript III Platinum® One-step Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR), amplification and reaction conditions were made with an ABI 7500 Fast Sequence Detection System® in accordance with the non-published protocols developed by Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA). The RT-qPCR for Subtyping HRSV was performed with primers specific to the N gene of HRSV-A and HRSV-B; the amplification protocol was 50°C for 30 min, followed by 95°C for 2 min, and then by 45 cycles of 15 s at 94°C, and 35 s at 55°C.¹⁵ The reaction volume was 25 µL, including 5 µL of extracted RNA and 20 µL of reagent mix. Negative controls (Nuclease-Free Water) were used in each reaction, and detection of a human gene (RNase P) was used as the internal control for the reaction.

2.3 | Whole virus genome sequencing

As the country joined the second phase of a pilot study of WHO strategy for global HRSV surveillance project based on existing Influenza surveillance platform. Moroccan NIC performed detection and

subtyping of HRSV over the year and periodic shipment of samples selected to provide temporal and geographical representation of HRSV circulating strains was sent to The Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Atlanta), for whole genome sequencing (WGS) using the Illumina Nextera XT DNA library prep kit[®] on a MiSeq[®] platform (Illumina, San Diego, CA, USA) according to their established protocols. Fifty-seven HRSV subtype-A and 78 HRSV subtype-B were randomly selected for sequencing.

Sequences were identified according to the newly adopted nomenclature of HRSV strains (below the Species Level) by the scientific community,¹⁶ as follows: HRSV/subgroup identifier/country code (ISO 3166-1 alpha-3)/unique sequence identifier/year of sampling.

2.4 | Phylogenetic analysis

Among all relevant HRSV genes, the attachment glycoprotein gene holds the highest number of variations that can affect viral infection and transmission.¹⁷ Currently, genotyping of HRSV strains is based on the second hypervariable region of gene G (HVR-2).^{5,10} The phylogenetic analysis based on the alignment of HRSV G sequences, included sequences of HRSV-A and HRSV-B strains circulating in Morocco along with representative strains of known genotypes retrieved from the Genbank¹⁸ as at February 16, 2023. Identical sequences were detected and removed using "ElimDupes Duplicate Sequence Removal tool."¹⁹ Multiple sequence alignments of the HVR-2 of gene G compared to available reference genotypes were performed using the ClustalW algorithm. Phylogenetic trees were generated using the maximum likelihood algorithm in MEGA 7 software, and the bootstrapping for 1000 iterations was calculated to evaluate confidence estimates, only bootstrap values >60% were shown on the trees. The average pairwise distance (p-distance) was calculated by the Tamura-Nei model, gamma distributed, including transitions and transversions in the same software.

Comparison of the amino acid changes in the G protein of Moroccan HRSV-A group to the prototype strain of ON1 genotype from Canada [JN257693] and the G protein of the HRSV-B group to the prototype strain of BA genotype from Argentina [AY333364] was carried using BioEdit (version 7.1.3.0) sequence alignment editor (Ibis Biosciences, Carlsbad, CA).

2.5 | Amino acid glycosylation site analysis

Potential N-glycosylation sites (N-X-T/S, where X is not a proline) were predicted using NetNGlyc-1.0 server²⁰ and accepted if the glycosylation potential was ≥ 0.5 . Where the O-glycosylation residues were predicted using the NetOGlyc-4.0 Server²¹ and accepted if the G-score was ≥ 0.5 .

2.6 | Statistical analysis

To describe the temporal distribution of positive cases, we aggregated results as obtained by (RT-qPCR) by calendar month and week. All

enrolled patients' demographic, clinical, and virological data were entered into a database created using Epi Info[™] 7.1 (CDC; Atlanta, USA) and summarized. Group comparisons were performed using χ^2 for the dependency/relationship between variables. *P*-values of less than 0.01 were considered statistically significant. Data analysis was conducted using SPSS 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL).

3 | RESULTS

Between September 2012 and August 2017, we enrolled 3679 patients meeting the ILI or SARI case definition for five successive seasons. We collected 422 (11%), 101 (3%), 441 (12%), 1126 (31%), and 1589 (43%) samples during 2012/13, 2013/14, 2014/15, 2015/16 and 2016/17 influenza seasons (October–April) respectively. The proportion of samples collected from outpatients was 55.8% (2054/3679), slightly higher than those recruited from inpatients with 1625 samples (44.2%).

3.1 | Demographic and clinical characteristics

A total of 1811 samples (49.2%) were collected from males and 1868 samples (50.8%) from females, with a male-to-female ratio of 0.97. Patients' ages ranged from 1 month to 99 years, with a mean age of 21 years, 11 months, and a median age of 11 years. The 1490 cases (40%) were younger than 5 years, 1391 cases (39%) were aged between 5–49 years, and 663 patients (18%) were older than 50 years. Among all sentinel sites included in this study, the highest number of patient specimens were collected from the Fes-Meknes region (1121; 30%), followed by Rabat–Sale–Kenitra (876; 24%). Although samples were collected throughout the year, the majority of enrollments (2269; 62%) were recorded during the first quarter (January–March) of each season compared to other quarters (Table 1).

Cough was the most reported clinical symptom (84%, 3082/3679), followed by fever (65%, 2409/3679). A comparison of HRSV positive and negative cases alongside main clinical and demographic characteristics, that is, cough, fever, sore throat, sex, and age group, showed that the distribution of patients for cough was statistically significant ($P < 0.001$). However, we did not find a statistically significant difference in HRSV-positive infections regarding fever ($P = 0.434$), sore throat ($P = 0.038$), or sex distribution ($P = 0.027$). Nevertheless, we found that the age group of patients and hospitalization status were statistically significantly related using the chi-square test with a $P < 0.001$ (Tables 1 and 2).

3.2 | Detection of HRSV and flu, the proportion of positives

All enrolled patients' respiratory samples were analyzed by RT-qPCR for influenza viruses A/B and HRSV. Of the 3679 specimens tested from both ILI and SARI cases, a total of 726 specimens were positive for HRSV by RT-qPCR, resulting in a detection rate of 19.7%

TABLE 1 Demographic and clinical characteristics of cases with influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infections (SARI) by respiratory syncytial virus infection status, Morocco, 2012–2017.

| Demographic and clinical characteristic | HRSV-positive N = 726 (19.7%) n (%) | HRSV-negative N = 2953 (80.3%) n (%) | P-value |
|---|---|--|---------|
| Age group (n = 3544)^a | | | |
| 0–6 month | 320 (44) | 293 (10) | <0.001* |
| 7–23 month | 143 (20) | 357 (12) | |
| 2–4 year | 86 (12) | 291 (10) | |
| 5–14 year | 30 (4) | 362 (12) | |
| 15–49 year | 71 (9) | 928 (31) | |
| 50–64 year | 37 (5) | 406 (14) | |
| >65 year | 21 (3) | 199 (7) | |
| unknown | 18 (3) | 117 (4) | |
| Sex | | | |
| Male | 384 (53) | 1427 (48) | 0.027 |
| Female | 342 (47) | 1526 (52) | |
| Clinical feature | | | |
| Cough | | | |
| Yes | 652 (90) | 2430 (82) | <0.001* |
| No | 74 (10) | 523 (18) | |
| Fever | | | |
| Yes | 473 (65) | 1936 (65) | 0.434 |
| No | 253 (35) | 1017 (35) | |
| Sore throat | | | |
| Yes | 103 (14) | 501 (16) | 0.038 |
| No | 623 (86) | 2452 (84) | |
| Season | | | |
| October–December | 155 (21) | 823 (28) | <0.001* |
| January–March | 560 (77) | 1709 (58) | |
| April–June | 11 (2) | 362 (12) | |
| July–September | 0 (0) | 59 (2) | |
| Sentinel sites | | | |
| Fes-Meknes | 240 (33) | 881 (30) | <0.001* |
| Rabat-Sale-Kenitra | 111 (15) | 765 (26) | |
| Souss-Massa (Agadir) | 142 (20) | 247 (8) | |
| Marrakech | 52 (7) | 269 (9) | |
| Tanger-Tetouan | 37 (5) | 262 (9) | |
| Beni Mellal | 79 (11) | 219 (7) | |
| Oujda | 37 (5) | 161 (6) | |
| Casablanca | 28 (4) | 129 (4) | |
| Laayoune | 0 (0) | 14 (0) | |

^aSome data variables from age have not been included in the analysis owing to incomplete data.

*Statistically significant at $P < 0.01$.

(726/3679). Influenza frequency was 22.1% (812/3679), of which 34.1% (277/812) were Influenza A H1N1 pdm09, 33.0% (268/812) were Influenza A H3N2, and 32.8% (267/812) were Influenza B.

Of 2054 ILI cases, 645 (31%) tested positive for influenza A/B, and 228 (11%) were positive for HRSV. While Of 1625 SARI cases,

498(31%) were positive for HRSV and 167(10%) for influenza virus (Table 2).

We found a higher proportion of HRSV infection in infants aged between 0–6 months old (44%; 320/726) followed by children aged between 7–23 months (20%; 143/726) and those aged between

TABLE 2 Influenza and HRSV detection rate among ILI and SARI patients, Morocco, 2012–2017.

| Virus detection by qRT-PCR N(%) | Syndrome | | | P-value |
|---------------------------------|----------------|---------------|--------------|---------|
| | Total N = 3679 | SARI N = 1625 | ILI N = 2054 | |
| HRSV-Negative | 2953 (80) | 1127 (69) | 1826 (89) | <0.001* |
| HRSV-Positive | 726 (20) | 498 (31) | 228 (11) | |
| Influenza virus-Negative | 2867 (78) | 1458 (90) | 1409 (69) | <0.001* |
| Influenza virus-Positive | 812 (22) | 167 (10) | 645 (31) | |

*Statistically significant at $P < 0.01$.

2–4 years (12%; 86/726). Further, Influenza virus infection was most detected among adults aged between 15 and 49 years (39%; 315/812), followed by children aged between 5 and 14 years (17%; 142/812) and adults aged between 50 and 64 years (14%; 112/812). Positive cases for Influenza A/B and HRSV detailed by age group and syndrome are shown in Figure 1 and Table 2, respectively.

3.3 | HRSV seasonal distribution

For the period of study, the HRSV showed a clear periodic circulating pattern. Throughout 2012/13, 2014/15, 2015/16, and 2016/17 periods, the HRSV season started in the 47th epidemiologic week (November) of the year, peaked between the 52nd and 53rd week (December–January), and ended between the 10th and 13th week (March) of the next year. Season 2013/14 was an exception, owing to a fewer and time-shortened sampling. Therefore, the circulation period of HRSV lasted for 16 to 21 weeks (Figure 2), and the detection rate for HRSV-positive infection was highest during the fourth and the first quarter of each season (Table 1; $P < 0.001$).

3.4 | Prevalence and distribution of HRSV subtypes

From the total HRSV-positive cases, 35% (257/726) were HRSV-A subtype, the HRSV-B subtype amounted to 61% (442/726) of the cases, and co-infection was detected in 3.7% (27/726) of samples. Both subtypes co-circulated during all study periods, with HRSV-B predominating in three of the five seasons. The distribution of the HRSV strains is shown in Figure 3: 63 cases (14 HRSV-A, 49 HRSV-B) in 2012/13; 20 cases (15 HRSV-A, five HRSV-B) in 2013/14; 82 cases (74 HRSV-A, eight HRSV-B) in 2014/15; 182 cases (64 HRSV-A, 118 HRSV-B) in 2015/16; and 352 cases (90 HRSV-A, 262 HRSV-B) in 2016/17.

3.5 | Phylogeny of HRSV and circulating genotypes

Full-length HRSV gene sequences were obtained from 56 HRSV subtype-A and 71 HRSV subtype-B; eight samples failed in WGS owing to poor viral load. Successfully assembled sequences were

deposited in the GISAID® database under assigned accession numbers EPI_ISL_15004431-EPI_ISL_15004437, EPI_ISL_15120665-EPI_ISL_15120779, and EPI_ISL_16905445-EPI_ISL_16905450.

All HRSV-A sequences from Morocco (2, 13, 9, 18, and 14 samples from 2012, 2014, 2015, 2016, and 2017, respectively) clustered in the novel ON1 genotype which has been described as having a common duplication of 72 nucleotides (nt) within the HVR2 region of the G protein gene, resulting in polypeptide elongated by 24 extra amino acids (GQEEETHSTTSEGYLSPQVYTTT) spanning positions 284–307 compared to prototype strain A2.⁹

Sequence homology between Moroccan HRSV-A sequences and the ON1 reference strain ON67-1210A was $\geq 97.9\%$ at the nucleotide level and $\geq 95.6\%$ at the amino acid level, and the overall intra-genotypic p-distance was 1.4% for ON1 sequences.

The length of the G gene protein in all ON1 strains in this study was 322 amino acids (AA) with a TGA as a stop codon similar to the prototype ON1 strain ON67-1210A [JN257693] from Canada. Ten of 16 previously described substitutions as universally identified in ON1 or NA1 genotypes when compared to reference strain HRSV-A2 (S222P, P226L, E233K, T253K, I244R, L258H, S269T, P283S, P313S, and R321K) were conserved in all HRSV-A from this study.⁹

Firstly, all Moroccan strains have identified three substitutions specific to genotype ON1 (E232G, T253K, and P314L). Within the ON1 genotype, five previously described phylogenetic subgroups (subgroup ON1.1: $n = 8$ strains; subgroup ON1.2: $n = 12$ strains; subgroup ON1.4: $n = 5$ strains; subgroup ON1.5: $n = 19$ strains and subgroup ON1.6: $n = 1$ strain), could be distinguished in the phylogenetic tree shown in Figure 4A on the basis of some amino acid substitutions in comparison with the ON1 prototype strain [JN257693].^{9,22,23}

The first subgroup ON1.1 comprises isolates that are closely related to the primary Canadian strain with few mixed substitutions. Interestingly, we found within this subgroup four isolates clustering together with a bootstrap value of 87%, sharing P234S, T319K, and H290N substitutions which were unique to Moroccan strains; they were identified as Cluster1 (Figure 4A). The second subgroup ON1.2 aligned local strains with isolates from Italy and Spain [KC858212, KM402627] and was characterized by amino acid changes L274P, L298P, and Y304H. Strains of the ON1.5 subgroup shared two key amino acid substitutions, E262K and I243S, which were also seen in some strains from Ghana and Gambia [KY911000, KY910984]. While strains belonging to the ON1.4 subgroup were distinguished from

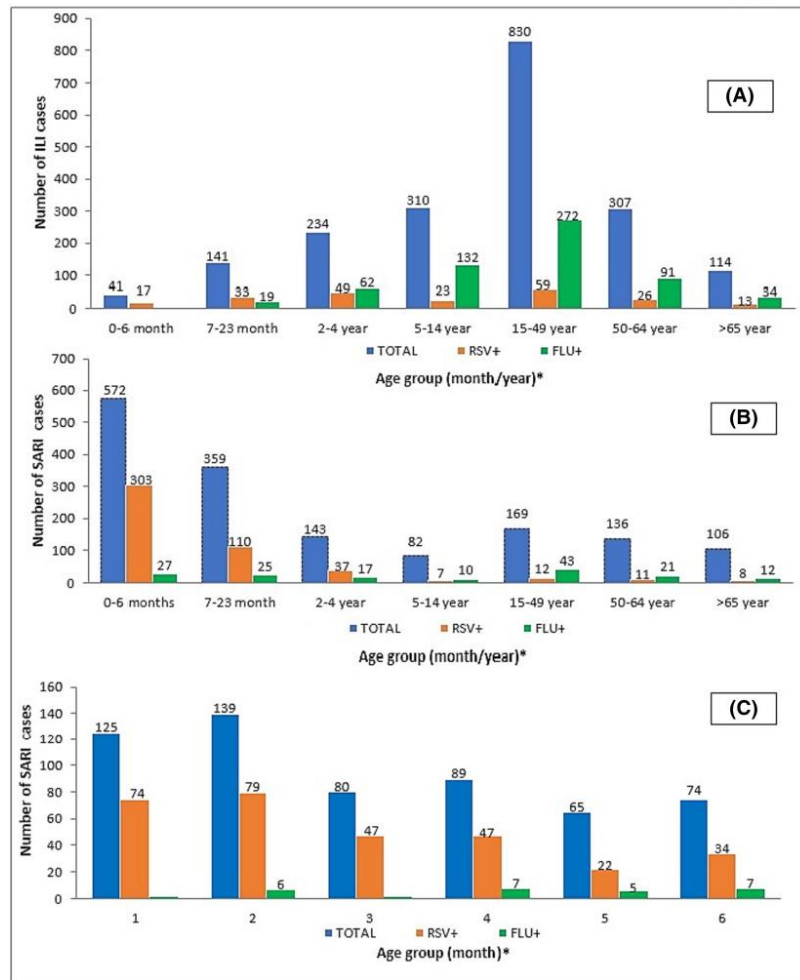


FIGURE 1 Positive cases for Influenza A/B (FLU) and HRSV detected in Morocco during 2012 - 2017 seasons detailed by age groups and SARI/ILI syndrome. The X-axis shows the different categories of patient age groups. The Y-axis displays the total number of enrolled SARI/ILI cases and the number of positive cases for Influenza A/B or HRSV. *Samples with missing data from age have not been included in the figure.

other subgroups by a unique amino acid change P206Q. Further, the ON1.6 subgroup is characterized by unique amino acid changes at Y273H and Y280H/P in addition to E262K and I243S from the ON1.5 subgroup.^{24,25}

Analyzing the N-glycosylation sites within the HVR-2 of Morocco ON1 strains reveals that overall, they had two predicted N-glycosylation sites at AA positions 237 and 318 and lost the N-glycosylation site at AA position 251 due to a T253K/R substitution found in all ON1 strains. The change of amino acid threonine at position 239 into asparagine (T239N) caused a shift of the

N-glycosylation site from position 237 to position 239 in 4 samples. There was a unique H290N substitution that led to the gain of the N-glycosylation site in four different strains assigned to cluster 1 in subgroup ON1.1 (Figure 5A).

The number of O-glycosylation sites within the HVR-2 of gene G in the investigated HRSV-A sequences varies from 39 to 43 predicted sites and showed four additional potential O-glycosylation sites when compared to the ON1 prototype strain (due to P234S, I243S, L274S, and G296S AA substitutions). The duplication region contained a maximum of 10 glycosylation sites, as observed in the ON67-1210A strain

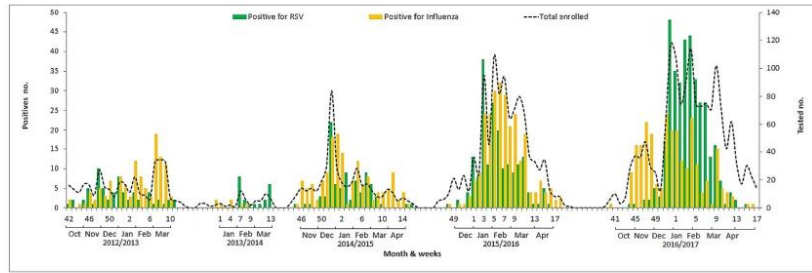


FIGURE 2 Circulation of HRSV and influenza virus between 2012 and 2017 in Morocco. The X-axis shows the epidemiological weeks (EW) and months for each season. The primary Y-axis displays the number of positive cases for each virus and the secondary Y-axis shows the number of total enrolled samples.

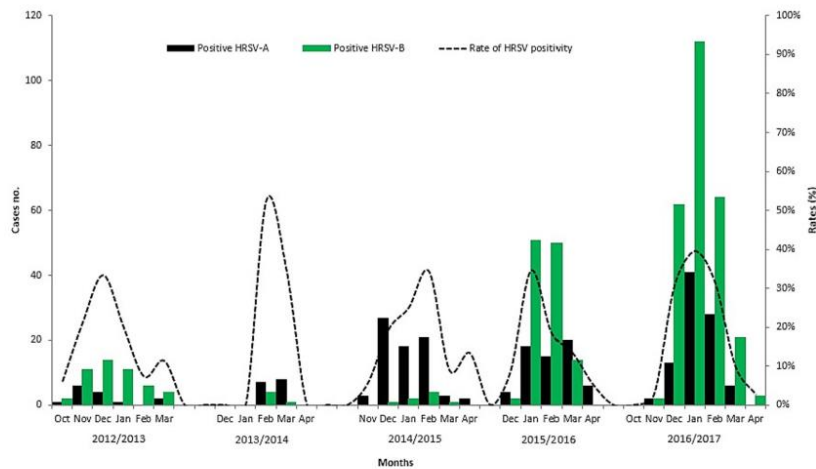


FIGURE 3 Circulation of HRSV-A and HRSV-B subtypes in Morocco between 2012 and 2017 seasons. The X-axis shows the months for each epidemiological season. The primary Y-axis displays the number of positive cases for each subtype and the secondary Y-axis shows the evolution of HRSV positivity rate during the period of study.

in 53 ON1 isolates from Morocco, except for three different strains due to substitution at S299N in one sample and S301P in two samples.

Almost all of the HRSV-B strains (1, 4, 30, and 32 samples from 2012, 2015, 2016, and 2017 respectively) belonged to the BA9 genotype except for four sequences from the year 2012 which clustered in the BA10 genotype (Figure 4B). Sequence homology between Morocco HRSV-B sequences and the BA reference strain [AY333364] was 95.3%–96.8% at the nucleotide level and 91.5%–93.7% at the amino acid level. The intra-genotypic *p*-distances in BA9 was 1.6%, while the overall intra-genotypic *p*-distance was 0.1% for BA10 sequences, and the estimated divergence between BA9 and BA10 groups was 4.1%.

HRSV-B sequences were aligned with the BA reference strain from Argentina [BA AY333364], which contain a 60 nt duplication in

the HVR2 region of the G gene, resulting in 20 additional amino acids representing the ancestral evolutionary strain for both HRSV-B BA9 and BA10 genotypes.²⁶ The length of G protein was 313 AA for the BA10 genotype and either 313 AA or 320 AA for the remaining BA9 strains (Figure 5B).

Almost all Moroccan BA strains had K218T, L223P, and S247P key substitutions (except two strains). While BA9 strains have been characterized with I281T substitution, the BA10 genotype had L219P, E226D, I229T, and E292G particular substitutions. HRSV-B strains had two N-glycosylation sites that the NetNGlyc 1.0 server predicted at amino acid positions 296 and 310. However, three strains from 2016 and 2017 did not meet the typical amino acid pattern for the N-glycosylation site at AA position 310 due to T312N and T312I substitutions. The potential O-glycosylation sites of BA strains varied

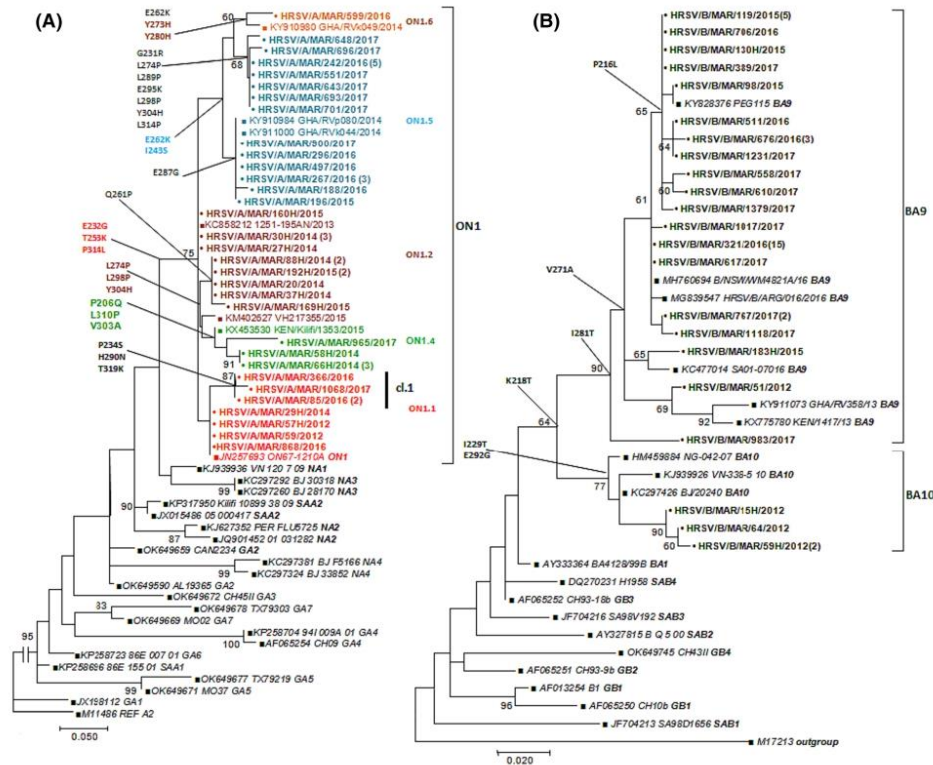


FIGURE 4 (A) Phylogenetic tree of the second hypervariable region of the G gene of HRSV-A. (B) Phylogenetic tree of the second hypervariable region of the G gene of HRSV-B. trees were constructed by the maximum likelihood method with 1000 bootstrap replicates using MEGA 7.0. Reference sequences of HRSV-A or HRSV-B genotypes from GenBank were included in the analysis and are indicated by their accession numbers. The reference genotypes are indicated in bold at the end of the isolate name. Moroccan HRSV viruses are in bold font. The genotypes are indicated by the brackets on the right side. Different font color indicates each phylogenetic subgroup within ON1 genotype. The number of identical nucleotides is indicated in brackets next to sequence name. Only bootstrap values above 60% are displayed at the nodes. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Genotype/subgroup specific amino acid changes are reported along the tree branch. Cl = cluster.

between 40 and 45 predicted sites, 27 of which were shared with the BA prototype strain. Also, they showed six additional predicted sites compared to the reference strain [BA AY333364] due to K218T, I229T, I281T, L223S, A303T, and P306S AA substitutions.

4 | DISCUSSION

The respiratory syncytial virus has long been recognized as a leading cause of lower respiratory tract infections, especially in young children and older adults.²⁷ Since there is neither an effective specific drug nor a vaccine for HRSV infection,²⁸ long-term monitoring and collection of data on HRSV circulation and variation patterns can help predict the overall level and scale of the epidemic to produce effective

control and prevention strategies.²⁹ This study investigated the prevalence, seasonality, and clinical characteristics of HRSV infection in patients with SARI or ILI. As well, we conducted phylogenetic and molecular analyses of different genotypes of HRSV strains detected in Morocco from 2012 to 2017.

HRSV surveillance in the country was built on the established Influenza surveillance system; therefore, HRSV and flu A/B virus were detected simultaneously in patients with a SARI or ILI infection. While influenza was mainly detected in adults presenting with mild symptoms, pediatric SARIs were mostly attributed to HRSV infection; our findings mirror those from other countries where HRSV remains the most prevalent virus in infants younger than 6 months.^{30,31}

The overall prevalence of HRSV in respiratory samples was 19.7%. Gaymard et al. reported a prevalence of HRSV ranging from

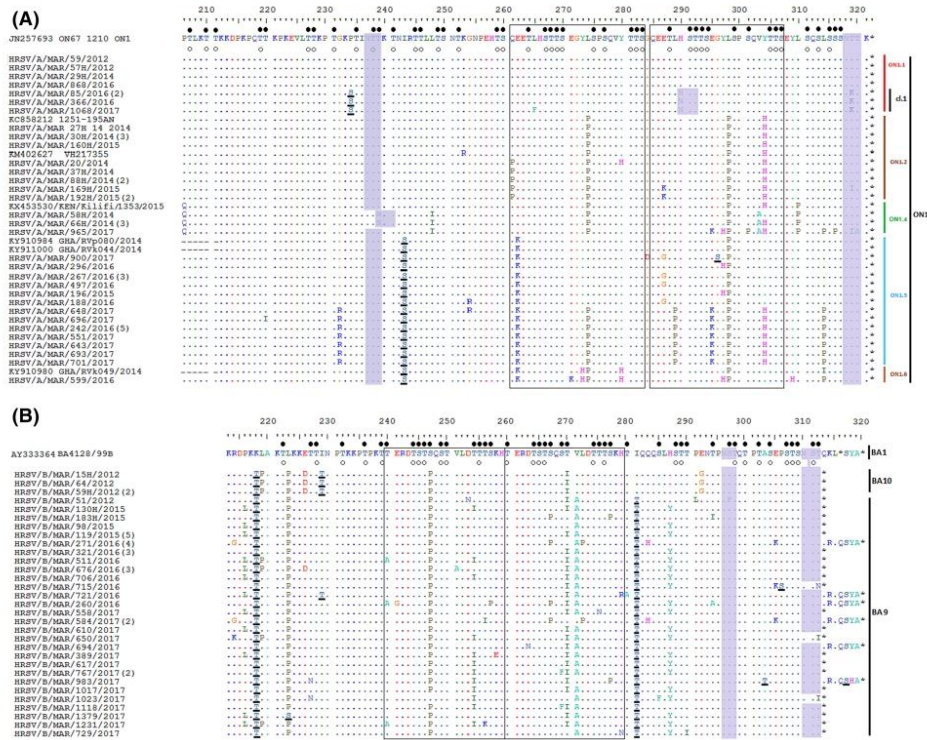


FIGURE 5 Alignment of deduced amino acid sequences of 2nd hypervariable region of Moroccan HRSV strains. (A) Alignment of HRSV-A genotype ON1 sequences from Morocco and reference strains of known subgroups within the ON1 genotype. Alignments are shown and residues numbered relative to sequences of prototype ON1 strain [JN257693]. (B) Alignment of HRSV-B viruses from Morocco in relation to prototype BA strain. Residues are numbered relative to the amino acid sequences of prototype BA strain [AY333364]. Number of duplicated sequences is indicated between parentheses (). Identical residues are indicated by dots, alignment gaps by dashes and stop codons by asterisks. Potential N-glycosylation sites (N-X-T/S, where X is not a proline) are indicated by gray-shaded rectangles. Potential O-glycosylation sites of the prototype ON1 strain are indicated by black circles, while unfilled circles indicated the predicted O-glycosylation sites common in all Morocco strains. Other predicted O-glycosylation sites, not found in all the strains in this study are underlined. Identified subgroups within HRSV-A ON1 or HRSV-B strains are indicated in the side of alignment. CI = cluster.

12 to 18% over four consecutive seasons,³⁰ while reports that looked at a younger population found even higher percentages.^{31,32} Thus, the need for HRSV screening to ensure proper management of hospital admissions and to prevent nosocomial infections.³²

Most (61%) HRSV-positive samples were from subgroup B, where HRSV-A accounted for 35%. The percentage of codetection was 3.7%. A study from Senegal described a 3.4% coinfection rate with both subgroups,³³ while another report from Brazil found 1.4% of codetections.³¹ Generally, dual infections occur rarely in HRSV-positive respiratory samples.³⁴

The data we gathered from this study consolidate what we found previously,¹³ that cough was most likely related to clinical symptoms of HRSV infection rather than fever (84%; $P < 0.001$). In fact, WHO reported that nearly half of the HRSV-infected children do not show

fever as the presenting symptom³⁵; therefore, some researchers recommend the WHO-ARI case definition as more appropriate and highly sensitive for HRSV surveillance.³⁶ Recently, WHO advocated in their global respiratory syncytial virus surveillance pilot based on GISRS, the recruitment of cases meeting the “Extended SARI” case definition which was defined as hospitalized illness with cough and onset of symptoms within the last 10 days or an acute respiratory infection without fever as criterion.^{11,37,38} This case selection method leads to higher sensitivity for both influenza and HRSV viruses. In contrast, case definitions including fever (i.e. SARI) would result in an underestimate of HRSV infection, especially for young age groups.^{37,38}

Previous research established that both HRSV-A and HRSV-B subtypes circulate concurrently during each season, with the predominant subtype changing from year to year.^{3,9,39} Based on our limited

data, there was a shift in the predominant subtype in the population every two seasons. Such periodicity of respiratory syncytial virus epidemics has been noted by other scholars.^{40,41} One possible explanation for this displacement of the predominant strain is improved homologous herd immunity after an epidemic, which favors heterologous variants to circulate in a subsequent season and sustains annual outbreaks of HRSV disease.^{3,42}

The circulation of HRSV exhibits a clear periodic pattern. The epidemic starts in November, peaks in January to February of the following year, and last until April. Similar seasonality is reported in temperate regions, where HRSV epidemics generally begin in November or December each year, peak in January or February, and last for 4–5 months.^{3,32,42}

ON1 was the sole HRSV-A genotype detected during the study period, similar to what has been previously found in countries from the Middle East and North Africa (MENA) region and other continents where NA1 was rapidly replaced by ON1 genotype.^{22,23,29,31,43} The ON1 strain was first detected in Canada in 2010⁹ and has since widely spread and displaced the previously dominant HRSV-A/NA1 genotype.²⁴ The phylogenetic analysis of our local HRSV-A isolates, including the ON1 prototype strain ON67-1210A and various strains of known ON1 sub-genotypes, revealed that Morocco strains could be divided into five subgroups (namely: subgroups ON1.1; ON1.2; ON1.4; ON1.5 and ON1.6) with characteristic AA substitutions as previously described.^{9,22–25}

Most of HRSV-A sequences had two predicted N-glycosylation sites within the HVR2 (237/239 and 318), while four sequences owned a maximum of three sites (237, 290, and 318). These highly N-glycosylated strains belonged to the 2016/2017 season, clustered together with a bootstrap value of 87%, and shared three additional substitutions (P234S, T319K, and H290N) compared to other ON1 strains. AA positions 234 and 290 were previously identified as being under positive selection and described as possibly escape mutants selected with specific monoclonal antibodies (mAbs).^{9,44,45} Also, position 290 was described as exhibiting a “flip-flop” pattern.^{9,45} P234S and T319K mutations already occurred in diverse countries, whereas amino acid substitution H290N was observed for the first time. Accumulation of AA substitutions inside the G gene may not only result in the gain and loss of N-glycosylation or O-glycosylation sites but also lead to changes in the effectiveness of some antiviral drugs. Indeed, we found a HRSV-A sequence from 2017 carrying the (I189T) substitution in the heparin-binding domain, previously reported in G-Protein drug-resistant mutants.⁴⁶

HRSV-B/BA genotypes emerged in the late 1990s, spreading globally to become the predominant genotypes worldwide.²⁶ The prevalent HRSV-B genotype during the study period was BA-9 ($n = 67$; 94%), while the BA-10 genotype was detected only in the 2012 season. Researchers from Lebanon, Pakistan, Saudi Arabia, France, and southern China found that BA-9 and BA-10 were the prevailing HRSV-B genotypes during 2010 to 2017.^{29,30,43} Another report from Japan described the BA-10 as a short live genotype that circulated only for several months during 2012 to 2015.³⁹ By observing amino acid changes within the HVR-2 of gene G, compared to the

reference strain [BA AY333364], we deduced a gradual accumulation of substitutions over time; shifting from 10 to 15 substitutions over the period 2012 to 2017. Notably, the change (Q313/STOP) occurred in the majority of BA sequences leading to G protein shortening to 312 amino acids. Position 313 has been described as positively selected.⁴⁵ Glycosylation site changes were also observed within HVR-2 of HRSV-B/BA strains. A loss of the N-glycosylation site at position 310 due to T312N/I substitution in three sequences and a tyrosine substitution at positions (218,229 and 281) resulting in the gain of additional new O-glycosylation sites in BA9/BA10, BA10, and BA9, respectively. These additional substitutions, along with the duplication, might have increased the fitness of this genotype relative to other HRSV-B genotypes.⁴⁷

Despite extensive knowledge about managing HRSV disease in infants and children, developing preventive strategies remains limited. Palivizumab was for a long time the sole effective monoclonal antibody against HRSV fusion protein agreed for intervention to prevent the disease infection and whose use intended to preterm infants and children with congenital heart disease at high risk for severe lower respiratory tract disease (LRTD).^{2,28} On August 2023, the US Food and Drug Administration (FDA) approved (Abrysvo™), the first HRSV vaccine for use in pregnant women to prevent (LRTD) and severe (LRTD) caused by HRSV in infants, the same vaccine was previously approved in May for the prevention of (LRTD) caused by HRSV in individuals 60 years of age and older.⁴⁸

Some limitations need to be considered when interpreting the data presented. First, recruiting cases by SARI/ILI criteria would underestimate the prevalence of HRSV disease, particularly in children. Therefore, we need a more sensitive and specific case definition. In addition, clinical information was extracted from reporting forms, which often contained inconsistencies and missing data, which may lead to bias in the analysis. Furthermore, due to the small sample size during our study, we could not exclude the possibility of missing detection of other circulating genotypes. Despite those limitations, we believe our findings will provide significant insight into circulation patterns and the molecular epidemiology of HRSV in the Moroccan community. This study highlights potential areas for further research.

5 | CONCLUSIONS

In summary, the present study underlines the importance of HRSV as a Leading respiratory virus that can be a life-threatening pathogen for infants, especially in developing countries. It describes the virus circulation as exhibiting a periodic pattern where Epidemics occur during fall months through early spring. Molecular studies identified the novel strain ON1 as the sole HRSV-A genotype circulating in Morocco during 2012 to 2017, all HRSV-B prevailing in the country during the same period belonged to BA genotypes. Therefore, it is necessary to continue monitoring HRSV surveillance to detect genotypes newly circulating in the country alongside new variants with relevant mutations that can lead to changes in virus characteristics and affect either antiviral drug effectiveness or vaccine development.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

H. Oumzil, A. Barakat, F. El Falaki, and A. Bimouhen: designed the study; S. Triki, T. Benamar, A. Barakat, and A. Rguig: provided data and materials; Z. Regragui, F. El falaki, H. Iahzmade, and S. Benkerroum: Data collection and processing; A. Bimouhen: Data analysis and Writing the paper; Y. Bakri and H. Oumzil: reviewing the manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge all the Ministry of Health workers at the regional and national levels and the voluntary physicians from the private sector who contributed to collecting samples as part of the National Influenza Surveillance System. Also, we would like to thank the World Health Organization and CDC Atlanta for their financial and technical support.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

PEER REVIEW

The peer review history for this article is available at <https://www.webofscience.com/api/gateway/wos/peer-review/10.1111/irv.13203>.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICS STATEMENT

The protocol was approved by the Ministry of Health for the objective of conducting surveillance of respiratory diseases with epidemic potential, in which participants remain anonymous, and therefore did not require an assessment of the ethics committee or IRB approval. Verbal consent was obtained from all patients.

ORCID

Abderrahman Bimouhen  <https://orcid.org/0000-0003-1719-5759>
Fatima El Falaki  <https://orcid.org/0000-0001-6978-4681>

REFERENCES

- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Lond Engl*. 2010; 375(9725):1545-1555. doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1
- Griffiths C, Drews SJ, Marchant DJ. Respiratory syncytial virus: infection, detection, and new options for prevention and treatment. *Clin Microbiol Rev*. 2017;30(1):277-319. doi:10.1128/CMR.00010-16
- Cane PA. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev Med Virol*. 2001;11(2):103-116. doi:10.1002/mv.305
- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001;344(25):1917-1928. doi:10.1056/NEJM200106213442507
- Ivancic-Jelecki J, Slovic A, Ljubin-Sternak S, Mlinarić Galinović G, Forčić D. Variability analysis and inter-genotype comparison of human respiratory syncytial virus small hydrophobic gene. *Viral J*. 2018;15(4):109. doi:10.1186/s12985-018-1020-9
- Peret TCT, Hall CB, Hammond GW, et al. Circulation patterns of group A and B human respiratory syncytial virus genotypes in 5 communities in North America. *J Infect Dis*. 2000;181(6):1891-1896. doi:10.1086/315508
- Dapat IC, Shobugawa Y, Sano Y, et al. New genotypes within respiratory syncytial virus group B genotype BA in Niigata, Japan. *J Clin Microbiol*. 2010;48(9):3423-3427. doi:10.1128/JCM.00646-10
- Shobugawa Y, Saito R, Sano Y, et al. Emerging genotypes of human respiratory syncytial virus subgroup A among patients in Japan. *J Clin Microbiol*. 2009;47(8):2475-2482. doi:10.1128/JCM.00115-09
- Eshaghi A, Duvvuri VR, Lai R, et al. Genetic variability of human respiratory syncytial virus strains circulating in Ontario: a novel genotype with a 72 nucleotide G gene duplication. *PLoS ONE*. 2012; 7(3):e32807. doi:10.1371/journal.pone.0032807
- Ono T, Hashimoto K, Kume Y, et al. Molecular diversity of human respiratory syncytial virus before and during the COVID-19 pandemic in two neighboring Japanese cities. *Microbiol Spectr*. 2023; 11(4):e02606. doi:10.1128/spectrum.02606-22
- WHO strategy for the Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance based on Influenza Surveillance. Geneva: World Health Organisation; 2019. Accessed April 27, 2023. https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/rsv-surveillance/who-rsv-surveillance-strategy-phase-26mar2021-final.pdf?sfvrsn=d8b1c36a_9
- Barakat A, Iahzmad H, Benkaroum S, et al. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS ONE*. 2011;6(9):e24579. doi:10.1371/journal.pone.0024579
- Bimouhen A, El Falaki F, Iahzmad H, Regragui Z, Benkerroum S, Barakat A. Circulation of respiratory syncytial virus in Morocco during 2014-2016: findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza. *East Mediterr Health J*. 2016;22(7): 482-489. doi:10.26719/2016.22.7.482
- Fitzner J, Qasmieh S, Mounts AW, et al. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bull World Health Organ*. 2018;96(2):122-128. doi:10.2471/BLT.17.194514
- de Paris F, Beck C, Machado ABMP, et al. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J Virol Methods*. 2012; 186(1):189-192. doi:10.1016/j.jviromet.2012.07.008
- Salimi V, Viegas M, Trento A, et al. Proposal for human respiratory syncytial virus nomenclature below the species level. *Emerg Infect Dis*. 2021;27(6):e204608. doi:10.3201/eid2706.204608
- Melero JA, García-Barreno B, Martínez I, Pringle CR, Cane PA. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J Gen Virol*. 1997;78(10): 2411-2418. doi:10.1099/0022-1317-78-10-2411
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, Ostell J, Sayers EW. GenBank. *Nucleic Acids Res*. 2010;38(Database issue):D46-D51. doi:10.1093/nar/gkp1024
- Apetrei C, Hahn B, Rambaut A, et al. HIV Sequence Compendium 2021.ElimDupes. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR-23-22840. Published [10/08/2016]. Updated [31/10/2022]. Accessed January 05, 2023. <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupes2/elimdupes.html>
- Gupta R, Brunak S. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac Symp Biocomput*. 2002;310-322.
- Stentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, et al. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO j*. 2013;32(10):1478-1488. doi:10.1038/emboj.2013.79
- Obodai E, Odoom JK, Adiku T, et al. The significance of human respiratory syncytial virus (HRSV) in children from Ghana with acute lower respiratory tract infection: a molecular epidemiological

- analysis, 2006 and 2013–2014. *PLoS ONE*. 2018;13(9):e0203788. doi:10.1371/journal.pone.0203788
23. Tabatabai J, Prifert C, Pfeil J, Grulich-Henn J, Schnitzler P. Novel respiratory syncytial virus (RSV) genotype ON1 predominates in Germany during winter season 2012–13. *PLoS ONE*. 2014;9(10):e109191. doi:10.1371/journal.pone.0109191
 24. Agoti CN, Otieno JR, Gitahi CW, Cane PA, Nokes DJ. Rapid spread and diversification of respiratory syncytial virus genotype ON1, Kenya. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):950–959. doi:10.3201/eid2006.131438
 25. Otieno JR, Kamau EM, Agoti CN, et al. Spread and evolution of respiratory syncytial virus a genotype ON1, coastal Kenya, 2010–2015. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(2):264–271. doi:10.3201/eid2302.161149
 26. Trento A, Galiano M, Videla C, et al. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J Gen Virol*. 2003;84(11):3115–3120. doi:10.1099/vir.0.19357-0
 27. Fleming DM, Elliot AJ, Cross KW. Morbidity profiles of patients consulting during influenza and respiratory syncytial virus active periods. *Epidemiol Infect*. 2007;135(7):1099–1108. doi:10.1017/S0950268807007881
 28. Neuzil KM. Progress toward a respiratory syncytial virus vaccine. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(3):186–188. doi:10.1128/CVI.00037-16
 29. Luo HJ, Huang XB, Zhong HL, et al. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011–2016 in southern China. *Int J Infect Dis*. 2020;90:5–17. doi:10.1016/j.ijid.2019.10.009
 30. Gaymard A, Bouscambert-Duchamp M, Pichon M, et al. Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. *J Clin Virol*. 2018;102:12–18. doi:10.1016/j.jcvi.2018.02.004
 31. Vianna LA, Siqueira MM, Volpini LPB, Louro ID, Resende PC. Seasonality, molecular epidemiology, and virulence of respiratory syncytial virus (RSV): a perspective into the Brazilian influenza surveillance program. *PLoS ONE*. 2021;16(5):e0251361. doi:10.1371/journal.pone.0251361
 32. Aamir UB, Alam MM, Sadiq H, Zaidi SSZ, Kazi BM. Molecular characterization of circulating respiratory syncytial virus (RSV) genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011–2012 winter season. *PLoS ONE*. 2013;8(9):e74018. doi:10.1371/journal.pone.0074018
 33. Fall A, Dia N, Cisse EHAK, et al. Epidemiology and molecular characterization of human respiratory syncytial virus in Senegal after four consecutive years of surveillance, 2012–2015. *PLoS ONE*. 2016;11(6):e0157163. doi:10.1371/journal.pone.0157163
 34. Barr IG, Williams TC, Salimi V, Buchholz UJ. Addendum to proposal for human respiratory syncytial virus nomenclature below the species level. *Emerg Infect Dis*. 2022;28(3):764. doi:10.3201/eid2803.212438
 35. World Health Organization. Meeting Report WHO Informal Consultation on Surveillance of RSV on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Platform, 25–27 March 2015, Starling Hotel & Conference Centre, Geneva, Switzerland World Health Organization; 2015. Accessed March 17, 2023. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/200762>
 36. Saha S, Pandey BG, Choudekar A, et al. Evaluation of case definitions for estimation of respiratory syncytial virus associated hospitalizations among children in a rural community of northern India. *J Glob Health*. 2015;5(2):010419. doi:10.7189/jogh.05.020419
 37. Hirve S, Crawford N, Palekar R, Zhang W. Clinical characteristics, predictors, and performance of case definition—interim results from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance pilot. *Influenza Other Respi Viruses*. 2020;14(6):647–657. doi:10.1111/irv.12688
 38. Davis W, Duque J, Huang QS, et al. Sensitivity and specificity of surveillance case definitions in detection of influenza and respiratory syncytial virus among hospitalized patients, New Zealand, 2012–2016. *J Infect*. 2022;84(2):216–226. doi:10.1016/j.jinf.2021.12.012
 39. Hibino A, Saito R, Taniguchi K, et al. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three seasons and hospitalization risk of genotype ON1. *PLoS ONE*. 2018;13(1):e0192085. doi:10.1371/journal.pone.0192085
 40. Waris ME. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J Infect Dis*. 1991;163(3):464–469. doi:10.1093/INFDIS/163.3.464
 41. Duppenhaler A, Gorgievski-Hrisoho M, Frey U, Aebi C. Two-year periodicity of respiratory syncytial virus epidemics in Switzerland. *Infection*. 2003;31(2):75–80. doi:10.1007/s15010-002-3124-8
 42. White LJ, Waris M, Cane PA, Nokes DJ, Medley GF. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiol Infect*. 2005;133(2):279–289. doi:10.1017/S0950268804003450
 43. Yassine HM, Sohail MU, Younes N, Nasrallah GK. Systematic review of the respiratory syncytial virus (RSV) prevalence, genotype distribution, and seasonality in children from the Middle East and North Africa (MENA) region. *Microorganisms*. 2020;8(5):713. doi:10.3390/microorganisms8050713
 44. Zlateva KT, Lemey P, Vandamme AM, Van Ranst M. Molecular evolution and circulation patterns of human respiratory syncytial virus subgroup a: positively selected sites in the attachment G glycoprotein. *J Virol*. 2004;78(9):4675–4683. doi:10.1128/JVI.78.9.4675-4683.2004
 45. Botosso VF, Zanotto PM, Ueda M, et al. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. *PLoS Pathog*. 2009;5(1):e1000254. doi:10.1371/journal.ppat.1000254
 46. Kimura K, Ishioka K, Hashimoto K, et al. Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. *Antiviral Res*. 2004;61(3):165–171. doi:10.1016/j.antiviral.2003.09.008
 47. Trento A, Casas I, Calderón A, et al. Ten years of global evolution of the human respiratory syncytial virus BA genotype with a 60-nucleotide duplication in the G protein gene. *J Virol*. 2010;84(15):7500–7512. doi:10.1128/JVI.00345-10
 48. U.S. Food and Drug Administration. FDA. 2023. Accessed September 1st, 2023. <https://www.fda.gov/news-events/press-announcements/fda-approves-first-vaccine-pregnant-individuals-prevent-rsv-infants>

How to cite this article: Bimouhen A, Regragui Z, El Falaki F, et al. Circulation patterns and molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus over five consecutive seasons in Morocco. *Influenza Other Respi Viruses*. 2023; 17(10):e13203. doi:10.1111/irv.13203



Viral aetiology of influenza-like illnesses and severe acute respiratory illnesses in Morocco, September 2014 to December 2016

Abderrahman Bimouhen^{1,3}, Zakia Regragui³, Fatima El Falaki³, Hassan Ithazmade³, Samira Benkerroum³, Imad Cherkaoui², Ahmed Rguig², Hind Ezzine², Touria Benamar², Soumia Triki⁴, Youssef Bakri¹, Hicham Oumzil^{3,5}

¹Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco

²Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco;

³National Influenza Center, Virology department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Morocco;

⁴WHO country office of Morocco, Rabat, Morocco

⁵Pedagogy and Research Unit of Microbiology, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Rabat, Morocco

Correspondence to:

Mr Bimouhen Abderrahman
Laboratory scientist
National Influenza Center
National Institute of Hygiene
Agdal, Rabat
Morocco
bimouhen@yahoo.fr

Background There is a scarcity of information on the viral aetiology of influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infection (SARI) among patients in Morocco.

Methods From September 2014 to December 2016, we prospectively enrolled in-patients and outpatients from all age groups meeting the World Health Organization (WHO) case definition for ILI and SARI from 59 sentinel sites. The specimens were tested using real-time multiplex reverse-transcription polymerase chain reaction method for detecting 16 relevant respiratory viruses.

Results At least one respiratory virus was detected in 1423 (70.8%) of 2009 specimens. Influenza viruses were the most common, detected in 612 (30.4%) of processed samples, followed by respiratory syncytial virus (RSV) in 359 (17.9%), human rhinovirus (HRV) in 263 (13.1%), adenovirus (HAdV) in 124 (6.2%), parainfluenza viruses (HPIV) in 107 (5.3%), coronaviruses (HCoV) in 94 (4.7%), human bocavirus (HBoV) in 92 (4.6%), and human metapneumovirus (HMPV) in 74 (3.7%). From 770 samples from children under 5 years old, RSV (288, 36.6%), influenza viruses (106, 13.8%), HRV (96, 12.5%) and HAdV (91, 11.8%) were most prevalent. Among 955 samples from adults, Influenza viruses (506, 53.0%), and HRV (167, 17.5%) were most often detected. Co-infections were found in 268 (18.8%) of 1423 positive specimens, and most (60.4%) were in children under 5 years of age. While influenza viruses, RSV, and HMPV had a defined period of circulation, the other viruses did not display clear seasonal patterns.

Conclusions We found that RSV was predominant among SARI cases in Morocco, particularly in children under 5 years of age. Our results are in line with reported data from other parts of the world, stating that RSV is the leading cause of lower respiratory tract infections in infants and young children.

Acute respiratory tract infections (ARIs) are a major public health problem that leads to higher morbidity and mortality worldwide, with the highest burden of disease in developing countries. Young children, the elderly, the chronically ill, and immunocompromised persons are at imminent risk [1]. ARIs are the leading cause of death among children under five years of age and are responsible for 19% of deaths and around 8% of all disabilities [2,3]. Practically, 13% of deaths reported in Moroccan children under five years old in 2012 were caused by ARIs [4].

The etiological agents for acute respiratory infections include bacteria, viruses, and fungi [5]. Viruses are responsible for around 80% of respiratory infections. They are responsible for upper respiratory infections (rhinitis, laryngotracheitis) and for potentially severe lower respiratory infections (bronchitis, bronchiolitis, and pneumonia) [6]. Several viruses

are implicated in respiratory tract infections, including influenza viruses (Flu A/B), respiratory syncytial virus (RSV), human adenoviruses (HAdV), human coronaviruses (HCoV), human rhinovirus (HRV), parainfluenza viruses (PIVs), and human metapneumovirus (HMPV) [7].

While influenza is considered the most common cause of viral respiratory infections among older adults [8], RSV is recognized as the main viral pathogen in children [9]. RSV infections are responsible for most cases of severe symptoms such as bronchiolitis, asthma exacerbation and pneumonia, and lead to higher hospitalization rates [10]. Other non-influenza viruses may cause respiratory tract infections with similar symptoms and clinical features. Thus, identifying the aetiological agent is usually difficult without laboratory testing [11].

Although Morocco's influenza surveillance system was established in 1996 [12], little data are available on the circulation of other respiratory viruses. To address this gap, virological data from the country's existing influenza surveillance system was used to investigate the characteristics and circulation of respiratory viruses in patients with acute respiratory infections either admitted in hospitals or seen at out-patient clinics in Morocco from 2014 to 2016.

METHODS

Study design and case definition

A sentinel-based influenza surveillance system was established by health authorities in the country in 1996 [12].

The country's respiratory surveillance network includes two concomitant components. While the outpatient influenza-like illness (ILI) surveillance system accepts patients attending health facilities with mild symptoms of fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and cough with an onset of >10 days [13], the severe acute respiratory infection (SARI) surveillance system takes hospitalized patients with SARI with fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$ and cough with an symptom onset within the same period [13].

SARI virological surveillance is conducted throughout the year in eight public general hospitals located in the country's main regions. All patients who meet the WHO case definition of SARI are recruited and relevant epidemiological data are recorded by medical staff. The ILI virological surveillance system conducts specimen collection and data recording from the first five cases meeting the WHO's case definition for ILI daily in eight out-patient public clinics and fifty private physicians located in nine main cities across the country.

The study period lasted from September 1, 2014, to December 31, 2016.

Sample and data collection

Nasopharyngeal (NP) and oropharyngeal (OP) specimens were collected from all patients fulfilling ILI or SARI case definitions. Tubes of viral transportation medium (ViCUM[®]) containing specimens were conserved at 4°C at the health services and were sent to the National Influenza Center within two days. A standardized form with patient-specific information (medical history, clinical symptoms, and demographic and epidemiological data) was completed by physicians or health workers.

Nucleic acid extraction

Total nucleic acids were extracted automatically from 400 μL of samples, using a High Pure Viral Nucleic Acid Kit and iPrep instrument, according to the manufacturer's instructions (Lifetechnologies, Carlsbad, USA). After that, ribonuclease P (RNase P) was considered as the internal control during specimen extraction. 100 μL of extracted nucleic acids were stored at -70°C until processing.

Real-time reverse transcriptase PCR

Detection of 16 respiratory viruses was performed in 5 μL volume using Invitrogen[®] Superscript III Platinum[®] One-step Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), amplification and reaction conditions were made with an ABI 7500 Fast Sequence Detection System[®] in accordance with the protocols developed by Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA) and provided as part of a material transfer agreement that ensures privacy and non-publication.

Statistical analysis

To describe the temporal distribution of positive cases, we aggregated results obtained by real-time RT-PCR by calendar month and week. Demographic, clinical, and virological data for all enrolled patients were entered

into a database created using Epi Info 7.1 (CDC; Atlanta, USA). Group comparisons were performed using χ^2 for the dependency/relationship between variables. *P*-values <0.05 were considered statistically significant. Data analysis was conducted using the same software.

Table 1. Demographic characteristics of patients with influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory infections (SARI), Morocco, 2014–2016

| | N = 1187 | N = 822 | N = 2009 |
|---------------------------------|------------|------------|-------------|
| | ILI n (%) | SARI n (%) | Total n (%) |
| Sex | | | |
| Male | 515 (43.4) | 463 (56.3) | 978 (48.7) |
| Female | 672 (56.6) | 359 (43.7) | 1031 (51.3) |
| Age (years) | | | |
| 0–4 | 203 (17.1) | 537 (65.3) | 740 (36.8) |
| 5–14 | 182 (15.4) | 44 (5.3) | 226 (11.2) |
| 15–24 | 518 (43.6) | 98 (12.0) | 616 (30.7) |
| 25–64 | 198 (16.7) | 75 (9.1) | 273 (13.6) |
| 65+ | 74 (6.2) | 53 (6.5) | 127 (6.4) |
| Missing | 12 (1.0) | 15 (1.8) | 27 (1.3) |
| Regions (sentinel sites) | | | |
| Beni Mellal-Khenifra | 99 (8.3) | 88 (10.7) | 187 (9.3) |
| Fes-Meknes | 458 (38.6) | 295 (35.9) | 753 (37.5) |
| Laayoune-Dakhla | 2 (0.2) | 2 (0.2) | 4 (0.2) |
| Marrakech-Safi | 60 (5.1) | 5 (0.6) | 65 (3.2) |
| Oriental (Oujda) | 52 (4.3) | 51 (6.2) | 103 (5.1) |
| Rabat-Sale-Kenitra | 284 (24) | 271 (33.0) | 555 (27.6) |
| Souss-Massa (Agadir) | 99 (8.3) | 99 (12.1) | 198 (9.9) |
| Tanger-Tetouan | 133 (11.2) | 11 (1.3) | 144 (7.2) |

Table 2. Frequencies of virus detections by age category in Morocco, September 2014 – December 2016

| VIRUS | TOTAL OF DETECTIONS N (%)* | |
|-----------|----------------------------|------------|
| | ≤5 years | >5 years |
| Flu A/B | 106 (13.8) | 506 (53.0) |
| RSV | 282 (36.6) | 77 (8.1) |
| HAdV | 91 (11.8) | 33 (3.5) |
| HRV | 96 (12.5) | 167 (17.5) |
| HMPV | 36 (4.7) | 38 (4.0) |
| HBoV | 56 (7.3) | 36 (3.8) |
| HPIV-1 | 20 (2.6) | 10 (1.0) |
| HPIV-2 | 8 (1.0) | 6 (0.6) |
| HPIV-3 | 29 (3.8) | 25 (2.6) |
| HPIV-4 | 4 (0.5) | 5 (0.5) |
| HCoV-229E | 6 (0.8) | 9 (0.9) |
| HCoV-NL63 | 20 (2.6) | 18 (1.9) |
| HCoV-HKU1 | 5 (0.6) | 14 (1.5) |
| HCoV-OC43 | 11 (1.4) | 11 (1.2) |

Flu A/B – influenza viruses, HCoV-229E – human coronavirus 229E, HCoV-NL63 – human coronavirus NL63, HCoV-HKU1 – human coronavirus HKU1, HCoV-OC43 – human coronavirus OC43, HAdV – human adenovirus, HMPV – human metapneumovirus, HPIV-1 – parainfluenza virus 1, HPIV-2 – parainfluenza virus 2, HPIV-3 – parainfluenza virus 3, HPIV-4 – parainfluenza virus 4, RSV – respiratory syncytial virus

*Percentage of viruses detected equals the number of positives from each group/total number of positives.

RESULTS

Demographic characteristics

From September 1, 2014, to December 31, 2016, NP and OP swabs were collected from 2009 patients meeting the WHO's case definition for ILI and SARI from all age groups from 59 sentinel sites. 1187 (59%) specimens were collected from ILI and 822 (41%) from SARI sentinel sites. A slightly higher proportion of specimens belonged to female than to male patients (51.3% vs 48.7%). The patients' mean age in years was 23.78 years (SD±23.8) and the median age was 16.00 years (IQR=0.08–99.00).

A total of 740 patients (36.8%) were younger than 5 years, 842 (41.9%) were aged between 5–24 years, 273 (13.6%) were aged between 25–64 years, while 127 (6.4%) were older than 65 years (Table 1). More than half of the specimens were collected from two of the eight sentinel regions, Fes-Meknes (n=753, 37.5%) and Rabat-Sale-Kenitra (n=555, 27.6%). Although patients were enrolled for this study throughout the year, most specimens were collected during the fourth and first quarters of the season (October–April).

Virus detection

A total of 1423 of 2009 specimens tested for both ILI and SARI were positive for at least one virus, resulting in a 70.8% detection rate. Among all positive specimens, a single infection occurred in 1155 (81.2%) patients while co-infections were detected in 268 (18.8%) patients. Dual, triple, and quadruple co-infections occurred in respectively 237 (16.7%), 28 (2.0%) and 3 (0.2%) patients.

Influenza was the most common virus, detected in 612 (30.5%) positive specimens, followed by RSV (n=359, 17.9%), HRV (n=263, 13.1%), HAdV (n=124, 6.2%), PIVs (n=107, 5.3%), HCoV (n=94, 4.7%), human bocaviruses (HBoVs) (n=92, 4.6%), and HMPV (n=74, 3.7%) (Table 2). While 44.3% (*P*<0.001) of influenza positives were detected in patients over 5 years of age with mild symptoms, positive RSV (42.4%; *P*<0.001) and HAdVs (13.0%; *P*<0.001) detections were mostly observed during SARI infection in children under 5 years with respectively of positive detections of these two viruses in this age category (Table 3).

The number and rates of positive specimens stratified by virus and clinical symptom (Table 4) showed that fever (55.2%; *P*=0.013), rhinitis (16.5%; *P*<0.001), headache (21.4%; *P*<0.001) and sore throat (23.7%; *P*<0.001) were more often reported in patients infected with influenza A/B compared to those infected with other viruses. Cough was the most reported clinical sign for all prevalent viruses, especially for RSV-positive cases (90.8%; *P*<0.001).

Table 3. Prevalence (n, %) of the viruses frequently related to respiratory infections by age category and origin of specimens, Morocco, September 2014 – December 2016

| | TOTAL | | ILI | | SARI | | P-VALUE |
|--------------------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| | <5 y, N=740 | >5 y, N=1242 | <5 y, N=203 | >5 y, N=972 | <5 y, N=537 | >5 y, N=270 | |
| Positive specimen, n (%) | | | | | | | |
| Inf A/B | 106 (14.3) | 502 (40.4) | 53 (26.1) | 431 (44.3) | 53 (9.8) | 71 (26.3) | <0,001 |
| RSV | 282 (38.1) | 73 (5.9) | 54 (26.6) | 63 (6.5) | 228 (42.4) | 10 (3.7) | <0,001 |
| HAdV | 91 (12.3) | 33 (2.6) | 21 (10.3) | 25 (2.6) | 70 (13.0) | 8 (2.9) | <0,001 |
| HRV | 96 (12.9) | 164 (13.2) | 15 (7.3) | 128 (13.2) | 81 (15.1) | 36 (13.3) | 0,225 |

ILI – influenza-like illnesses, SARI – severe acute respiratory illness, Inf A/B – influenza A and B, RSV – respiratory syncytial virus, HAdV – human adenovirus, HRV – human rhinovirus

* Some variables from age have not been included in the analysis owing to incomplete data.

Table 4. Number and rates of positive specimens by virus and clinical symptom, Morocco, September 2014 – December 2016

| SYMPTOMS | N (%) | | | |
|-------------|---------------|-------------------|---------------|----------------|
| | RSV (n = 359) | INF A/B (n = 612) | HRV (n = 263) | HAdV (n = 124) |
| Cough | 326 (90.8) | 509 (83.2) | 231 (87.8) | 104 (83.8) |
| Fever >38 | 176 (49.0) | 338 (55.2) | 121 (46.0) | 66 (53.2) |
| Rhinitis | 20 (5.6) | 101 (16.5) | 28 (10.6) | 10 (8.0) |
| Sore throat | 52 (14.5) | 145 (23.7) | 39 (14.8) | 14 (11.3) |
| Headache | 25 (6.9) | 131 (21.4) | 31 (11.8) | 9 (7.2) |

Seasonal distribution

During the observation period, the study of seasonality showed that viral circulation extends throughout the year. However, there was a concomitant circulation of influenza and RSV viruses from November to April, with peaks during the months of December-March. HAdVs and HRV circulated throughout the year with peaks during the winter months. Other viruses often circulated during the cold season with sporadic cases throughout the year (Figure 1).

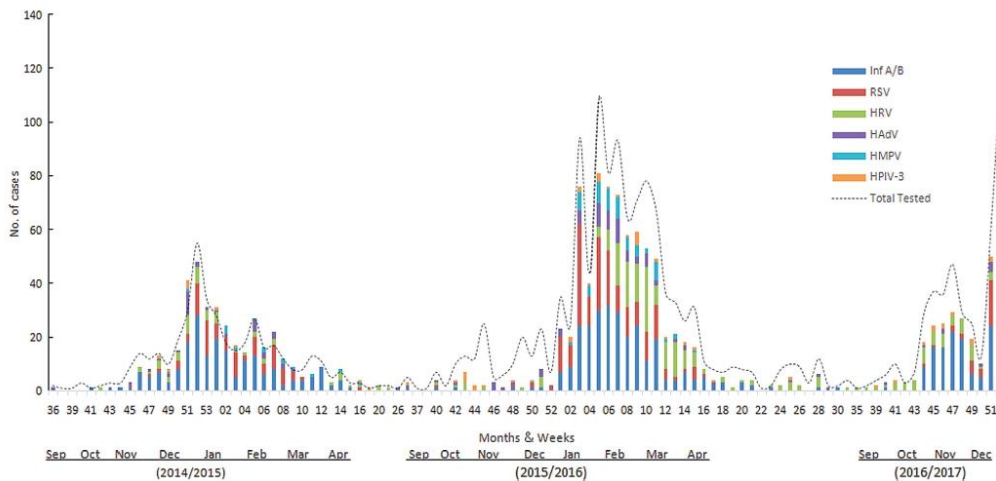


Figure 1. The incidence of the predominant respiratory viruses detected in Morocco, from September 2014 to December 2016. HAdV – human adenovirus, HMPV – human metapneumovirus, HPIV-3 – parainfluenza virus 3, RSV – respiratory syncytial virus, Inf A/B – influenza virus A and B, HRV – human rhinovirus

DISCUSSION

In this study, we detected influenza and other respiratory viruses using RT-PCR in 2009 samples collected during the 2014/2016 influenza seasons through a sentinel-based influenza surveillance system. Among these samples, 1423 (70.8%) specimens were positive for at least one virus, which is consistent with the results from other studies with positivity rates between 63% to 75% [14-16].

According to WHO guidelines, the collection of patients' specimens should be done rapidly after symptom onset, ideally within 7 days, and the specimens should reach the laboratory as soon as possible after collection [17]. It should be noted that viruses are generally detectable in throat swabs of most patients from the onset of symptoms until the end of the second week [17]. In our study, 72.0% ($P=0.005$) of the positive samples were taken in the first week following the onset of the symptoms.

The findings also showed that Flu A/B ($n=612$, 35.5%), RSV ($n=359$, 20.8%), HRV ($n=263$, 15.2%), and HAdV ($n=124$, 7.2%) were the most common viruses detected. The representativeness of other viruses ranged from 5.3% to 0.5%. This is corroborated by one study [18], while others mentioned HRVs or HRSV as the most predominant viruses [14,16]. There are several explanations for these differences. First, the infection rates may be specific to geographic areas, size, type of sampling method, and study period. Second, detection methods and PCR primers may differ from one study to another, making it difficult to directly compare data. Other studies can clarify this question by evaluating the sensitivity and specificity of the different detection methods used [14,19].

Although influenza viruses were detected in all age groups, the proportion of positive cases for Flu A/B was comparatively higher in patients older than 5 years, especially in mild infections (88.7%; $P<0.001$), which was consistent with similar studies conducted on adults that found influenza virus as the leading cause of ILIs among adults and that HRV was the second most common cause of ILIs in this category of age [15,18,20].

The most frequent viral pathogen in patients under five years old with SARI was RSV, followed by HAdV, HRV, and Flu A/B, as found in several studies [14,16,18,21-24].

The prevalence of RSV in children under 5 years of age with SARI was 42.4% ($P<0.001$), which is high compared to data from other studies, which ranges from 18% to 34% [14,18,25]. This high prevalence of RSV infection among children can be attributed to the nosocomial spread of the virus within paediatric care units during the high circulating season of RSV. Despite the lack of data to support this hypothesis, some authors pointed to RSV as the major cause of annual nosocomial outbreaks, especially among the children admitted to paediatric units [26]. RSV infection is also recognized as a predominant problem in the elderly, especially among adults older than 65 years with chronic heart disease, asthma, lung disease, and immunocompromised patients. Despite the low number of patients recruited among adults over 65 years in this study, the prevalence of RSV infection was 7.1% in this age category, which is consistent with research suggesting a prevalence of RSV of approximately 5%-10% per year in the elderly [27].

Several studies [28-30] have revealed that the proportion of infections due to HAdVs was increasing. Indeed, in this present study the prevalence of HAdVs in SARIs among children under 5 years old was (13.0%; $P<0.001$). This finding suggests that HAdVs was a significant pathogen of severe respiratory infections in hospitalized children.

Co-infections were observed in 18.8% (268/1423) of samples, which is coherent with rates reported in the literature ranging from 10% to almost 40% [31,32].

The samples co-infected with RSV and another virus constitute 45.9% (123/268) of the total mixtures. A 60.4% (162/268) co-infection rate was detected in children under 5 years old, which is consistent with several studies that suggest co-infections were significantly more widespread in paediatrics [31-34]. This is probably due to the children's undeveloped immune system associated with the absence of respiratory virus infection history (primary infection with more than one virus at time) or RSV possibly facilitating the reinfection of the respiratory tract system by other viruses. Drew et al. [33] reported 85.7% of coinfections with RSV in children under 5 years old. Moreover, findings from other studies indicated that severe clinical cases were more common in patients with coinfections, particularly with RSV co-infections, which may increase the severity of the disease in children [34-36].

While influenza viruses, RSV, and HCoVs showed a seasonal peak during the winter season in temperate regions, HRV, HMPV, HBoV, and HAdV display no discernible seasonal patterns and can be considered all-year viruses [37].

In Morocco, the circulation of influenza viruses peaks in the period from October through April [12]. The detection rates for RSV and HMPV increased during the winter season and predominated along with influenza viruses. HRVs and HAdVs tend to circulate during the fall months, while HCoVs, PIVs and HBoV were circulating all over the year with no distinct seasonal patterns.

Our study has some limitations. First, specimen collection is limited to patients who fulfil the standard ILI/SARI symptoms according to World Health Organization ILI/SARI case definition, which may have excluded many viral infections and resulted in an underestimation of the detection rates of respiratory virus infections. Second, the small sample size did not allow a thorough investigation of the association between clinical and epidemiological characteristics and risk factors in relation to detected pathogens. Moreover, to establish the seasonality of the respiratory viruses circulating patterns, more time-series data analyses are required over 3 to 5 years periods.

CONCLUSIONS

Our findings facilitate a better understanding of the characteristics and circulating patterns of respiratory viruses in patients with ILI or SARI in Morocco over the period of 2014-2016. While Influenza viruses are the most frequently detected respiratory viruses among outpatient adults, RSV remain the most important viral aetiological agent causing both mild and severe acute respiratory infections among children under 5 years old.

The co-circulation of several respiratory pathogens that cause infection with often similar symptoms requires greater vigilance and regular updating of the national epidemiological and virological surveillance system. Further research is needed to better understand respiratory viral epidemiology in our country, which may be useful for clinicians interested in the treatment and control of viral respiratory infections.

The recent COVID-19 pandemic showed the importance of whole-genome sequencing (WGS), hence the interest in developing the sequencing of emerging viruses. The combination of virological data issued from WGS and epidemiological data will provide precious information for public health decision-making to better manage potential epidemics and minimize socio-economic damage.



Ethical approval: The protocol was approved by the Ministry of Health for the objective of conducting surveillance of respiratory diseases with epidemic potential, in which participants remain anonymous, and therefore did not require an assessment of the ethics committee or IRB approval. Verbal consent was obtained from all patients.

Acknowledgements: We would like to acknowledge all the Ministry of Health workers at both the regional and national level and the voluntary physicians from the private sector who participated in National Influenza Surveillance.

Funding: This work was supported through funding by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) grant No. 5U51CI000469 and PIP.

Authorship contributions: HO, AB, FE, and YB conceived and designed the study. ST, TB, AR, IC, and HO provided data and materials. AR, ZR, HI, FE, SB, HE, and IC contributed to collection and processing. AB, HO, and IC performed the analysis. AB wrote the paper. HO, TB, IC, and YB reviewed the draft. All authors read and approved the final manuscript.

Disclosure of interest: The authors completed the ICMJE Disclosure of Interest Form (available upon request from the corresponding author) and disclose no relevant interest.

- Hodinka RL. Respiratory RNA viruses. *Microbiol Spectr*. 2016;4. Medline:27726802 doi:10.1128/microbiolspec.DMIH2-0028-2016
- Denny FW Jr. The clinical impact of human respiratory virus infections. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;152:S4-12. Medline:7551411 doi:10.1164/ajrccm/152.4_Pt_2.S4
- Shann F, Woolcock A, Black R, Cripps A, Foy H, Harris M, et al. Introduction: acute respiratory tract infections-the forgotten pandemic. *Clin Infect Dis*. 1999;28:189-91. Medline:10064223 doi:10.1086/515107
- World Health Statistics. 2014. WHO.int. Available: https://apps.who.int/tris/bitstream/handle/10665/112738/9789240692671_eng.pdf. Accessed: 10 December 2021.
- Bhuyan GS, Hossain MA, Sarker SK, Rahat A, Islam MT, Haque TN, et al. Bacterial and viral pathogen spectra of acute respiratory infections in under-5 children in hospital settings in Dhaka city. *PLoS One*. 2017;12:e0174488. Medline:28346512 doi:10.1371/journal.pone.0174488
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:1545-55. Medline:20399493 doi:10.1016/S0140-6736(10)60206-1

- 7 Zimmerman RK, Rinaldo CR, Nowalk MP, Gk B, Thompson MG, Mochling KK, et al. Influenza and other respiratory virus infections in outpatients with medically attended acute respiratory infection during the 2011-12 influenza season. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8:397-405. Medline:24852890 doi:10.1111/irv.12247
- 8 Kodama F, Nace DA, Jump RLP. Respiratory Syncytial Virus and Other Non influenza Respiratory Viruses in Older Adults. *Infect Dis Clin North Am*. 2017;31:767-90. Medline:29079159 doi:10.1016/j.idc.2017.07.006
- 9 El-Hajje MJ, Moulin F, Suremain N. Respiratory syncytial virus in hospitalized children, A 3-year study. *Presse Med*. 2008;37:37-43. Medline:18061394 doi:10.1016/j.lpm.2007.06.023
- 10 Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001;344:1917-28. Medline:11419430 doi:10.1056/NEJM200106213442507
- 11 Njouom R, Yekwa EL, Cappy P, Vabret A, Boisier P, Rousset D. Viral etiology of influenza-like illnesses in Cameroon, January-December 2009. *J Infect Dis*. 2012;206:S29-S35. Medline:23169968 doi:10.1093/infdis/jis573
- 12 Barakat A, Ithazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, et al. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS One*. 2011;6:e24579. Medline:21931764 doi:10.1371/journal.pone.0024579
- 13 Fitzner J, Qasmieh S, Mounis AW, Alexander B, Besselaar T, Briand S, et al. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bull World Health Organ*. 2018;96:122-8. Medline:29403115 doi:10.2471/BLT.17.194514
- 14 Kim JK, Jeon J, Kim JW, Rheem I. Epidemiology of Respiratory Viral Infection Using Multiplex RT-PCR in Cheonan, Korea (2006-2010). *J Microbiol Biotechnol*. 2013;23:267-73. Medline:23412071 doi:10.4014/jmb.1212.12050
- 15 Razanajatovo NH, Richard V, Hoffmann J, Reynes J-M, Razafitrimo GM, Randremanana RV, et al. Viral etiology of influenza-like illnesses in Antananarivo, Madagascar, July 2008 to June 2009. *PLoS One*. 2011;6:e17579. Medline:21390235 doi:10.1371/journal.pone.0017579
- 16 Marcil S, Kabbaj H, Jroundi I, Barakat A, Mahraoui C, Kettani S, et al. Epidemiology and diagnosis of the severe acute viral respiratory infections in patients admitted at Ibn Sina University Hospital Rabat- Morocco. *Dis Disord*. 2018;2:1-6.
- 17 Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A(H5N1) virus infection: guide for field operations. WHO.int. Available: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/69392>. Accessed: 20 June 2022.
- 18 Çiçek C, Arslan A, Karakuş HS, Yalaz M, Saz EU, Pullukçu H, et al. Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014. *Mikrobiyol Bul*. 2015;49:188-200. Medline:26167819 doi:10.5578/mb.9024
- 19 Bellei N, Carraro E, Perosa A, Watanabe A, Arruda E, Granato C. Acute respiratory infection and influenza-like illness viral etiologies in Brazilian adults. *J Med Virol*. 2008;80:1824-7. Medline:18712837 doi:10.1002/jmv.21295
- 20 Al-Romaihi HE, Smatti MK, Ganesan N, Nadeem S, Farag E, Coyle PV, et al. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PLoS One*. 2019;14:e0218097. Medline:31194775 doi:10.1371/journal.pone.0218097
- 21 Kwofie AB, Anane YA, Nkrumah B, Annan A, Nguah S, Owusu M. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virology*. 2012;9:78. Medline:22490115 doi:10.1186/1743-422X-9-78
- 22 Uduman SA, Ijaz MK, Kochiyil J, Mathew T, Hossam MK. Respiratory syncytial virus infection among hospitalized young children with acute lower respiratory illnesses in Al Ain, UAE. *J Commun Dis*. 1996;28:245-52. Medline:9057448
- 23 Jroundi I, Mahraoui C, Benmessaoud R, Moraleda C, Thigui H, Sefrar M, et al. The epidemiology and aetiology of infections in children admitted with clinical severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. *J Trop Pediatr*. 2014;60:270-8. Medline:24570343 doi:10.1093/tropej/fmu010
- 24 Jroundi I, Mahraoui C, Benmessaoud R, Moraleda C, Benjelloun B, Bassat Q. Knowledge gaps on paediatric respiratory infections in Morocco, Northern Africa. *Arch Public Health*. 2015;73:28. Medline:26078866 doi:10.1186/s13690-015-0076-x
- 25 Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The Burden of Respiratory Syncytial Virus Infection in Young Children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-98. Medline:19196675 doi:10.1056/NEJMoa0804877
- 26 Mlinarić-Galinović G, Varda-Brkic D. Nosocomial respiratory syncytial virus infections in children's wards. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2000;37:237-46. Medline:10974574 doi:10.1016/S0732-8893(00)00154-1
- 27 Falsey AR, Falsey EE. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly Adults. *Drugs Aging*. 2005;22:577-87. Medline:16038573 doi:10.2165/00002512-200522070-00004
- 28 Tang LF, Wang TL, Tang HF, Chen ZM. Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in China. *Indian Pediatr*. 2008;45:971-5. Medline:19129564
- 29 Jin Y, Zhang R-F, Xie Z-P, Yan K-L, Gao H-C, Song J-R, et al. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzhou, China, from 2006 to 2009. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18:74-80. Medline:21767329 doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03541.x
- 30 Ampuero JS, Ocaña V, Gómez J, Gamero ME. Adenovirus Respiratory Tract Infections JG. in Peru. *PLoS One*. 2012;7:e46898. Medline:23056519 doi:10.1371/journal.pone.0046898
- 31 Richter J, Panayiotou RC, Tryfonos C, Koptides D, Koliou M, Kalogirou N, et al. Aetiology of acute respiratory tract infections in hospitalised children in Cyprus. *PLoS One*. 2016;11:e0147041. Medline:26761647 doi:10.1371/journal.pone.0147041
- 32 Mandelia Y, Procop G, Richter S, Worley S, Liu W, Esper F. Dynamics and predisposition of respiratory viral co-infections in children and adults. *Clin Microbiol Infect*. 2021;27:631.e1-6. Medline:32540470 doi:10.1016/j.cmi.2020.05.042
- 33 Drews AL, Atmar RL, Glezen WP, Baxter BD, Piedra PA, Greenberg SB. Dual respiratory virus infections. *Clin Infect Dis*. 1997;25:1421-9. Medline:9431390 doi:10.1086/516137
- 34 Richard N, Komurian-Pradel E, Javouhey E, Perret M, Rajoharison A, Bagnaud A, et al. The impact of dual viral infection in infants admitted to a pediatric intensive care unit associated with severe bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2008;27:213-7. Medline:18277932 doi:10.1097/INF.0b013e31815b4935

REFERENCES

- 35 Cho HJ, Shim S-Y, Son DW, Sun YH, Tchah H, Jeon I-S. Respiratory viruses in neonates hospitalized with acute lower respiratory tract infections: Respiratory viruses in neonates. *Pediatr Int.* 2013;55:49-53. Medline:22978535 doi:10.1111/j.1442-200X.2012.03727.x
- 36 Wu X, Wang Q, Wang M, Su X, Xing Z, Zhang W, et al. Incidence of respiratory viral infections detected by PCR & QPCR in adult patients with community-acquired pneumonia: a meta-analysis. *Respiration.* 2015;89:343-52. Medline:25791384 doi:10.1159/000369561
- 37 Moriyama M, Hugentobler WJ, Iwasaki A. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu Rev Virol.* 2020;7:83-101. Medline:32196426 doi:10.1146/annurev-virology-012420-022445



**GENOMIC VARIABILITY AND NEURAMINIDASE INHIBITOR DRUG
SUSCEPTIBILITY PATTERNS OF INFLUENZA A/H1N1PDM09 STRAINS
CIRCULATING IN MOROCCO DURING THE 2015-2016 SEASON**

**EL FALAKI F^{1,2*}, BIMOUHEN A^{1,2}, REGRAGUI Z^{1,2}, IHAZMAD H², BAKRI Y¹ AND
OUMZIL H^{2,3}**

1: Laboratory of Human Pathologies Biology, Faculty of Sciences, Mohammed V University in Rabat, Morocco

2: National Influenza Center, Virology department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Morocco

3: Pedagogy and Research Unit of Microbiology and Genomic Center of Human Pathologies, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Morocco

*Corresponding Author: Dr. Fatima El Falaki: E Mail: fatimaelfalaki@yahoo.fr

Received 10th Sept. 2022; Revised 6th Oct. 2022; Accepted 14th Feb. 2023; Available online 1st Oct. 2023

<https://doi.org/10.31032/IJBPAS/2023/12.10.7518>

ABSTRACT

Information regarding the genomic variability, and susceptibility profile to antiviral drug resistance are scarce for influenza A/H1N1pdm09 strains circulating in Morocco. The aims of this study are to survey genetic changes in the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes and to phenotypically assess the antiviral drug resistance (AVR) to neuraminidase inhibitors (NAIs) drugs-related mutations.

During the 2015-2016 flu season, 1189 nasopharyngeal swabs samples were collected from influenza-like illness (ILI) and severe acute respiratory illness (SARI) patients in eight sentinel sites distributed throughout the country. Reactive samples by rRT-PCR were inoculated on MDCK cell-line for virus isolation. Sequencing and phylogenetic analysis of HA and NA genes were performed to evaluate the genetic diversity of Moroccan A/H1N1pdm09 strains. AVR screening against two NAIs (oseltamivir and zanamivir) was performed on MDCK-propagated viruses using the functional neuraminidase inhibition assay.

Among those 1,189 specimens, 185 were A/H1N1pdm09, 59 A/H3N2, and 30 influenza B. Ninety-six of the 185 A/H1N1pdm09 propagated strains had a HA titer of at least 1:16 and were subjected to NAIs assay. Phylogenetic analysis of HA and NA genes revealed that Moroccan A/H1N1pdm09

isolates clustered with the predominate genetic group 6B.1. Several amino acid changes in the antigenic site were identified: S203T, S189T, K163Q, and S162N (N1 numbering), as well as a unique S185T in the receptor-binding domain. The NA assay showed no increased resistance (normal inhibition) against both NAI drugs in all tested isolates.

This study confirms that A/H1N1pdm09 circulating strains in Morocco have undergone genetic variability and dynamic evolution. Surveillance of viral genetic evolution is important for disease management and appropriate public health interventions during influenza outbreaks

Keywords: Influenza, Hemagglutinin; Neuraminidase; Neuraminidase Inhibitors

INTRODUCTION

Human influenza is an acute respiratory infection transmitted via direct contact and respiratory droplets [1] causing respiratory illness and is responsible for significant mortality and morbidity during seasonal epidemics [2, 3].

Indeed, seasonal influenza triggered 5 to 20% of the world's population causing severe disease in 3 to 5 million people and the death of 290,000 to 650,000 people worldwide every year [4].

Two main types of seasonal influenza viruses were identified to be the cause of illness among human being: The flu virus type A, linked to seasonal epidemics in the winter months and global pandemics, and the flu B virus associated with seasonal epidemics, but not typically with pandemic [5].

Despite the seasonal circulation of flu viruses, sporadic and unpredictable pandemic occurs every 3 to 5 decades, enabling the introduction of influenza A virus strain, antigenically different from previous evolving strains [6].

Accumulation of minor mutations within the antibody-binding sites on the two main viral surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) (antigenic drift), or major changes due to genetic reassortment (antigenic shift) can result in the emergence of antigenically distinct viruses and be responsible of seasonal epidemics or pandemics, respectively [7, 8]. In April 2009, a novel A/H1N1 virus emerged and spread rapidly; It spread to all continents in less than nine weeks becoming the first pandemic of the 21st century [9].

The so called A/H1N1pdm09 virus had a complex combination of gene segments from avian, swine, and human influenza viruses [10]. Since 2010, the A/H1N1pdm09 strain replaced the seasonal A/H1N1 and became the endemic strain [11]. Upon the onset of the A / H1N1pdm09 virus, molecular determinants unrecognized by human cells seemed to favor the transmission and the establishment of the AH1N1viruses [10].

This had directed research towards the study of the antigenic sites which are keys to population immunity and viral fitness.

Similarly, monitoring of the susceptibility of influenza viruses to antiviral drugs particularly neuraminidases inhibitors (NAIs) is necessary to allow rapid detection of resistant viruses and prevention of further transmission [8].

In fact, mutations associated with NAI resistance occur at the eight catalytic sites or 11 residues of the sialic acid binding pocket (SA) framework of Neuraminidase. These mutations are responsible for a decrease in the level of interaction of Neuraminidase and the binding pocket of sialic acid [12]. Understanding the diversity and epidemiology of the virus is essential to devising strategies, both for the control of viral spread and in overcoming drug-resistance [13].

The WHO recommends that health authorities should monitor respiratory disease activity and the {Citation}circulation of the influenza A/H1N1pdm09 virus during the post-pandemic period to assess important genetic, antigenic, and functional changes associated with antiviral drug resistance.

In 2012-2013, the World Health Organization (WHO) Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) Expert Working Group for Antiviral Susceptibility Surveillance

conducted global surveillance the susceptibility of influenza A and B viruses to NAIs.

In Morocco, INAs were used for the first time in 2009 as a preventive and curative approach in the management of swine flu and for the care of people at risk. Since then, a more widespread use of NAIs, more particularly Oseltamivir, has been observed at the national level. However, to our knowledge, no study has been undertaken to assess the epidemiological situation of the profiles of susceptibility or resistance to antivirals of influenza viruses circulating in Morocco.

The aims of this study were to establish genetic changes in the hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) genes and to phenotypically assess the antiviral drug resistance (AVR) to neuraminidase inhibitors (NAIs) drugs-related mutations of the A/H1N1 pdm09 evolving in Morocco.

2. MATERIALS AND METHODS

Study population

Out-patients with ILI symptoms, attending the eight sentinel site (health centers) around the country, and in-patients with SARI, admitted in eight University and Regional hospitals were enrolled in the framework on the virological surveillance of influenza. The inclusion criteria for ILI patients were sudden onset of fever (> 37.8 °C) with more than two of the

following symptoms: cough, rhinorrhea, myalgia, arthralgia and diarrhea; The inclusion criteria for SARI patients were requirement for hospitalization for the following symptoms : history or measured fever of ≥ 38 °C, cough, onset within the last 10 days, difficulty in breathing with chest in-drawing for children under 5 years of age, cough, rhinorrhea, myalgia, arthralgia and diarrhea.

Collection and transport of clinical specimens

Oropharyngeal (OP) and Nasopharyngeal (NP) swabs specimens along demographic information were collected at the sentinel surveillance sites from enrolled patients presenting ILI and SARI symptoms. The swabs were placed into collection tubes containing 3ml of viral transport media (VTM). The specimens were packaged using a standard triple packaging system at the sentinel sites and shipped in cool boxes to the national influenza center (NIC) within 48 to 72 hours.

RNA extraction and real-time RT-PCR

Viral RNA was extracted from 200 μ L nasopharyngeal swab supernatant of the original clinical sample for initial typing and subtyping/lineage detection of influenza A or B, using the automatic extraction method (iPrep™ Purelink Virus Kit; Thermo Fisher Scientific Carlsbad, CA 92008 USA).

For sequencing analysis, RNA was purified from isolates using the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Screening of influenza viruses from original clinical specimens for initial typing as Type A or B. and subtyping PCR for A(H1N1)pdm09 or A(H3N2) and differentiation for B/Victoria or B/Yamagata lineages was performed using the CDC Human Influenza Virus Real-time RT-PCR Detection and Characterization kits provided by the CDC in Atlanta as part of a material transfer agreement that ensures privacy and non-publication.

According to the kit providers, amplification curve with a Cycle threshold of less than 37 were considered nucleic acid detected for any target assayed [14].

Virus isolation

Viral isolation was performed by inoculating 100 μ l of samples confirmed positive for A/H1N1pdm09 into two wells of a 24-well plate with 70–90% confluent monolayers Madin–Darby Canine Kidney (MDCK) cell line. After 30 min of adsorption at room temperature, 2 mL per well of minimum essential medium (MEM) supplemented with 0.18% Bovine Serum Albumin (BSA) Fraction V, 50 units/ml of penicillin, 50 μ g/ml of streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, CA) and 2 mg/ml of TPCK trypsin were added. Cells were then

incubated in sealed bags at 35 °C. Viral replication was assessed by the HA assay. Viral isolates showing HA titers ≥ 16 up to two passages were selected for further sequencing and phenotyping analysis [15].

Genome Sequencing and phylogenetic analysis

Conventional PCRs targeting HA and NA genes were performed on the nucleic acid extracts from cell culture isolates. PCR products were purified and sequenced using the ABI Big Dye Terminator, version 3.1 (Applied Biosystems, Cat No 4337455, Foster City, USA) and M13 primers (CDC protocol unpublished) on an ABI 3130XL sequencer. The sequences of HA and NA genes were assembled, edited, and aligned using Sequencher® (Gene Codes Corporation, MI, USA). The phylogenetic analysis of the HA and NA genes were constructed using Mega 7.0 software by the neighbour-joining method with bootstrap analysis of 1000 replicates.

The nucleotide sequence genes of HA and NA from this study have been submitted to the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID).

Neuraminidase (NA) inhibition assay and IC50 analysis,

The NAI phenotypic assay was performed to assess the susceptibility of the Moroccan A/H1N1pdm09 circulating strains to two NAIs drugs, oseltamivir carboxylate (Hoffmann–La Roche (Basel, Switzerland)

and zanamivir (GlaxoSmithKline; Uxbridge, United Kingdom) using a fluorescent enzyme inhibition assay based on a previously published CDC protocol [16]. Two viral strains controls, A/Perth/265/2009 (sensitive) and A/Perth/261/2009 (resistant) by the NAI's were included to validate each assay.

Neuraminidase inhibition activity reciprocal to the fluorescence emitted by each drug concentration was used to calculate the overall median inhibitory concentration (IC50) using JASPER V1.2 curve-fitting software [16]. Interpretation of the IC50 was evaluated using the WHO AVWG criteria based on the fold change of IC50 values compared with drug-sensitive reference virus IC50 values. For influenza A viruses, a <10 fold increase in IC50 represents normal inhibition, and a 10–100 fold increase represents reduced inhibition, while a >100 fold increase is highly reduced inhibition [17].

Statistical analysis:

Proportions, means and all statistical analyses were performed using the Epi-info version 7.1 software developed by the CDC (CDC; Atlanta, USA).

For IC50 values calculation, JASPR curve-fitting software (Meck Alderich). Fold changes in IC50 assessed by comparing IC50 of test viruses to the mean IC50 (outliers excluded) by respective drug and influenza type/subtype.

Ethical consideration:

The protocol was approved by the Ministry of Health as part of the tools used for conducting the virological surveillance of influenza and other respiratory viruses with epidemic potential. Participants identity remain anonymous, and therefore did not require an assessment of the ethics committee or IRB approval. Verbal consent was obtained from all patients.

3. RESULTS**Influenza virological surveillance**

From September 2015 to August 2016, a total of 1189 specimens were collected from ILI and SARI patients, referred to National Influenza Centre; Virology Department, National Institute of Hygiene, Morocco. Using the real time RT-PCR, 23 % (n=274) of all samples were flu positive. The influenza A/H1N1pdm09 represented the majority of circulating viruses during the season 2015-2016 (15,6% , n= 185). Influenza A/H3N2 viruses accounted for 5% (n=59), whereas influenza B strains represented 2,5% (n= 30) of the tested samples (**Table1**).

Phylogenetic characterization

The phylogenetic trees of the HA and NA gene of A/H1N1pdm09 were constructed using sequences from both the Moroccan isolates and public databases (the Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data (GISAID)) (**Table 2**). Phylogenetic analysis of the 10 HA and NA genes of the 2009

Pandemic A/H1N1 viruses circulating during 2015/2016 season demonstrate that the Moroccan isolates clustered with the strains of antigenic group 6B.1, the group that emerged at the end of 2016. High sequence identities were observed for HA and NA in influenza A/ H1N1pdm09, displaying 85 and 99 % nucleotide identities, respectively, with the A/H1N1pdm 09 Northern Hemisphere WHO vaccine strain A/California/07/2009 in the 2017-2018 season (**Figure 1, Figure 2**).

Amino acid variations of HA gene.

Compare to the California strain of 2009 (A/California/7/2009), a significant amino acid change was identified. Using N1 numbering, P83S, S203T and I321V have been found to be consistent in A/H1N1pdm09 of 2009-2010 strains from the initial outbreak. Substitutions of D97N and S185T are characteristic of genetic group 6. K163Q, A256T, and K283E define group 6B, while S84N, S162N and N216T define subclade 6B1. Among the specific amino acid substitutions, four were located in antigenic sites: S203T in Ca and S185T in Sb domains, while K163Q and S162N were found in the Sa domain of HA gene [**18**]. Analysis of the receptor-binding domain (RBD63-286) revealed amino acid variations of S185T in the 190 helix (184–195) regions of predicted antigenic sites of all HA sequences reported during the study

season, while, the 130-loop (131–138) and 220-loop (218–228) structure were found to be highly conserved. In contrast, several minor changes were observed at positions A256T and K283E in HA1 and E374K, S451N, and E499K in the HA2 polypeptide. The notable features in the HA gene sequence of A/Fes/231/2016 were polymorphisms at residues 127 and 222 of HA1 (**Table 3**). The HA D222G substitution is reportedly associated with severe disease [19]. All Moroccan viruses carried nine potential sites of N-glycosylation motifs in HA1 (10, 11, 23, 87, 162, 276, 287 and 154, 213 in HA2). S162N marker which is specific to the subclade 6B1 viruses, creates a new potential N-glycosylation motif within the Sa antigenic site.

Amino acid variations of NA gene.

Globally, H275Y and N295S mutations in the NA polypeptide have been associated with multiple drug resistance in Influenza A [20]. These two mutations were not detected in any of the nine isolates analyzed in this study. However, several other amino acid substitutions like N44S, N200S, V241 and N369K in genetic group 6 viruses;

I34V L40I I321V N386K and K432E in genetic group 6B viruses; and V13I, K264I, N270K, and I314E in genetic group 6B.1 were detected. The 11 framework (E119, R156, W178, S179, D/N198, I222, E227, H274, E277, N294, E425) and eight functional (R118, D151, R152, R224, E276, R292, R371, Y406) residues comprising the NA catalytic site [8] were conserved among all nine viruses (**Table 4**). The Moroccan A/H1N1pdm09 viruses circulating during 2015-2016 carried eight conserved potential N-glycosylation motifs in the NA (position 42, 50, 58, 63, 68, 88, 146, and 235).

Phenotypic analysis

A total of 100 A/H1N1pdm09 virus samples had a titre at least > 1:8 in the haemagglutination and were subjected to the NAI assay. Using the standardised definitions for reporting NAI susceptibility data [17], the NAI test showed that all influenza A/H1N1pdm09 viruses tested in this study were sensitive to both drugs oseltamivir and zanamivir (**Table 5**).

Table 1: Demographic characteristics and influenza prevalence among patients with ILI and SARI, Morocco, 2015–2016

| Characteristic | ILI (n = 624) No. (%) | SARI (n = 565) No. (%) | Total (n = 1189) No. (%) |
|--------------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| <i>Age</i> | | | |
| 0–23 months | 38 (6.1) | 327 (57.9) | 365 (30.7) |
| 2–5 years | 62 (9.9) | 62 (11.0) | 124 (10.4) |
| 6–15 years | 68 (10.9) | 20 (3.5) | 88 (7.4) |
| 16–49 years | 296 (47.4) | 63 (11.2) | 359 (30.2) |
| 50–64 years | 100 (16.0) | 41 (7.3) | 141 (11.9) |
| ≥ 65 years | 42 (6.7) | 28 (5.0) | 70 (5.9) |
| Unknown | 18 (2.9) | 24 (4.3) | 42 (3.5) |
| <i>Gender</i> | | | |
| Female | 352 (56.4) | 244 (43.2) | 596 (50.1) |
| Male | 272 (43.6) | 321 (56.9) | 593 (49.9) |
| <i>Influenza subtype</i> | | | |
| A (H1N1) pdm09 | 124 (19.9) | 61 (10.8) | 185 (15.6) |
| A (H3N2) | 51 (8.2) | 8 (1.4) | 59 (5.0) |
| B | 24 (3.8) | 6 (1.1) | 30 (2.5) |
| Negative | 425 (68.1) | 490 (86.7) | 915 (77.0) |

ILI =influenza-like illness; SARI = severe acute respiratory illness

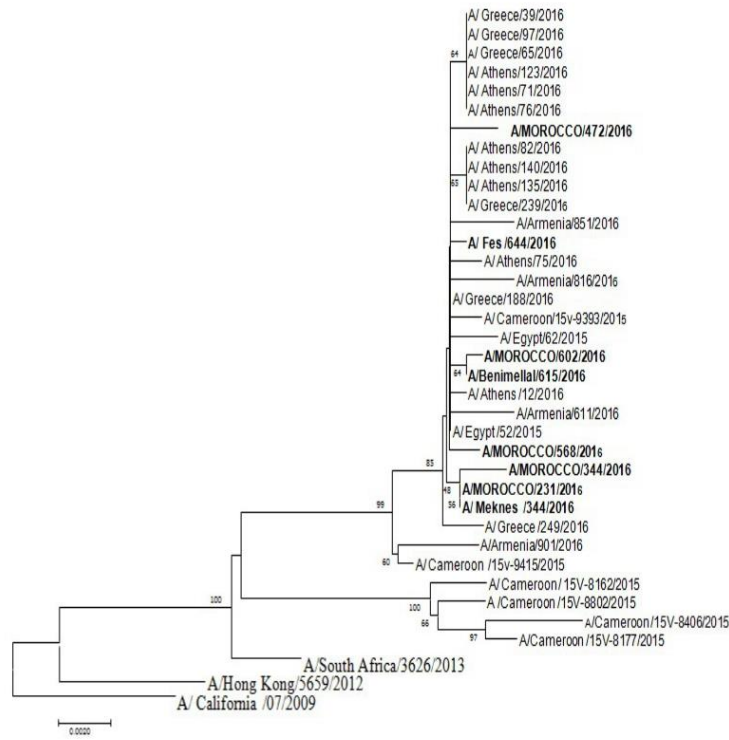


Figure 1: Phylogenetic relationships of the HA of A/H1N1pdm09 viruses isolated in Morocco compared to vaccine strain, A/California/7/09. The tree was constructed with the Neighbour-Joining method with bootstrap analysis of 1000 replicates using Mega7 software

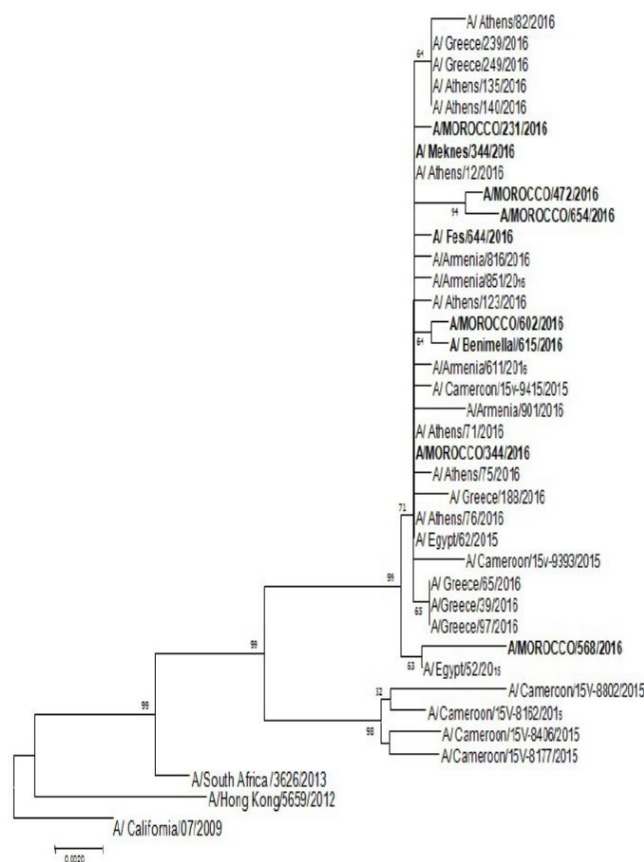


Figure 2: Phylogenetic relationships of the NA of A/H1N1pdm09 viruses isolated in Morocco compared to vaccine strain, A/California/7/09. The tree was constructed with the Neighbour-Joining method with bootstrap analysis of 1000 replicates using Mega7 software

Table 2: GISAID accession numbers for the haemagglutinin sequences (segment 4) and neuraminidase sequences (segment 6) of Moroccan influenza A/H1N1 09pdm strains

| A/H1N12009pdm | accession of HA sequences | accession of NA sequences | Submitting laboratory |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------------|
| A/Morocco/ 11/2009 | EPI316932 | EPI316933 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 51/2009 | EPI316935 | EPI316936 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 49/2009 | EPI316938 | EPI316939 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 231/2016 | EPI729910 | EPI729911 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 602/2016 | EPI729912 | EPI729913 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 344/2016 | EPI748990 | EPI748991 | National Institute of Hygiene |
| A/Benimella/ 614/2016 | EPI748820 | EPI748821 | Crick Worldwide Influenza center |
| A/Fes/ 644/2016 | EPI748906 | EPI748907 | Crick Worldwide Influenza center |
| A/Meknes/ 344/2016 | EPI730811 | EPI737407 | Crick Worldwide Influenza center |
| A/Morocco/ 472/2016 | EPI921259 | EPI921270 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 568/2016 | EPI921376 | EPI921377 | National Institute of Hygiene |
| A/Morocco/ 654/2016 | | EPI921448 | National Institute of Hygiene |

Table 3: Comparison of amino acid sequences of HA gene of A/H1N1pdm09 Morocco viruses with reference strain A/California/7/09, showing the specific substitutions

| Amino Acids HA | 83 | 84 | 97 | 162 | 163 | 185 | 203 | 216 | 222 | 256 | 283 | 321 | 374 | 451 | 499 |
|------------------------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A/california/07/2009 | P | S | D | S | K | S | S | I | | A | K | I | E | S | E |
| A/Morocco/ 11/2009 | S | . | . | . | . | . | T | . | | . | . | V | . | . | . |
| A/Morocco/ 51/2009 | S | . | . | . | . | . | T | . | | . | . | V | . | . | . |
| A/Morocco/ 49/2009 | S | . | . | . | . | . | T | . | | . | . | . | K | . | . |
| A/Morocco/ 231/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Morocco/ 602/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Morocco/ 344/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Benimellal/ 614/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Fes/ 644/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Meknes/ 344/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Morocco/ 472/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |
| A/Morocco/ 568/2016 | S | N | N | N | Q | T | T | T | | T | E | V | K | N | K |

Table 4: Comparison of amino acid sequences of NA gene of A/H1N1pdm09 Morocco viruses with reference strain A/California/7/09, showing the specific substitutions

| Amino Acids NA | 13 | 34 | 40 | 44 | 106 | 200 | 241 | 248 | 264 | 270 | 314 | 321 | 351 | 369 | 386 | 432 |
|------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A/california/07/2009 | V | I | L | N | V | N | V | N | V | N | I | I | Y | N | N | K |
| A/Morocco/ 11/2009 | . | . | . | . | I | . | . | D | . | . | . | . | F | . | . | . |
| A/Morocco/ 51/2009 | . | . | . | . | I | . | . | D | . | . | . | . | F | . | . | . |
| A/Morocco/ 49/2009 | . | . | . | . | I | . | . | D | . | . | . | . | F | . | . | . |
| A/Morocco/ 231/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Morocco/ 602/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Morocco/ 344/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Benimellal/ 614/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Fes/ 644/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Meknes/ 344/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Morocco/ 472/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Morocco/ 568/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |
| A/Morocco/ 654/2016 | I | V | V | S | S | I | D | I | K | M | V | F | K | K | K | E |

Table 5: NAI susceptibility of influenza A/H1N1pdm09 isolates by fluorescent NAI assay

| NA inhibitors | origin of specimens | IC50(nM) | | | |
|---------------|---------------------|------------------|--------------------|-------------|----------------------------------|
| | | No. Analyzed (n) | Median [range] | Mean ± SD | NAI Susceptibility (fold change) |
| Oseltamivir® | ILI | 56 | 1,29 [0,12 - 1,96] | 1,31 ± 0,27 | S(1) |
| | SARI | 40 | 1,43 [1,10 - 1,70] | 1,45 ± 0,16 | S(1) |
| | Total | 96 | 1,35 [0,12 - 1,96] | 1,37 ± 0,24 | S(1) |
| Zanamir® | ILI | 56 | 0,51 [0,15 - 1,59] | 0,54 ± 0,27 | S(1) |
| | SARI | 40 | 0,53 [0,12 - 0,91] | 0,50 ± 0,17 | S(1) |
| | Total | 96 | 0,51 [0,12 - 1,59] | 0,53 ± 0,23 | S(1) |

4. DISCUSSION

In Morocco, the first laboratory-confirmed A/H1N1pdm09 case was identified on 10 June 2009 in a 19-year-old woman travelling from Canada to Morocco [21]. In order to limit the communal spread, the Ministry of Health instituted an infection control plan, which included social distancing, early isolation of cases, and antiviral prophylaxis for close contacts of

case patients. During the initial phase of the 2009 pandemic, antiviral drugs were prescribed for all patients with confirmed infection and close contacts. Thereafter, the drugs were recommended for persons with suspected influenza virus infections who were at high risk for severe disease. Over the six seasons since the 2009 A/H1N1pdm emergence, very little virological surveillance of the 2009 A/H1N1pdm in

Morocco has been published. In order to understand the genetic changes and antiviral drug susceptibility of the 2009 A/H1N1pdm, phylogenetic analysis and amino acid modification of the 2015-2016 influenza viruses were examined.

The phylogenetic analysis of HA and NA genes demonstrated that circulating strains belonged to subclade 6B1. This subclade diverges genetically by the mutations they harbored compared to the prototype A/California/07/2009 strain. Among specific amino acid substitutions in HA genes sequences, four were located in antigenic sites: S203T in Ca and S185T in Sb domains along with K163Q and S162N were found in the Sa domain. Substitution S185T was located in the RBS/190 helix [22]. It has been reported that substitutions near or in the RBS can influence the antigenic properties of A/H1N1pdm09 strains [23]. Certain amino acid substitutions such as D222G are associated with severe disease and poor outcome [24]; only one of the Moroccan strains, A/Fes/231/2016, analyzed here displayed this mutation, thus a more accentuated surveillance is recommended. All of the HA genes sequences analyzed in this study present the I321V polymorphism. In contrast to the HA D222G mutation, the effect of retaining isoleucine at this position on disease severity has not been clearly demonstrated [13]. Substitutions such E374

and S451N were also present in all the analyzed Moroccan strains. In addition to the variation in the antigenic sites of HA sequences; analysis was also done for number of N-glycosylation sequons in HA. Subclade 6B.1 viruses have an additional N-glycosylation motif. S162N substitution, specific to latter subclade generated a new potential N-glycosylation motif at residues 162-164 of HA within the SA antigenic site. Evolutionary studies of A/H1N1 strains indicate that the number of N-glycosylation site in HA is relatively conserved, but it appears to increase as influenza viruses evolve [25]. The acquisition of N-linked glycosylation sites on the HA protein is thought to play a beneficial role for the virus by shielding antigenic sites from interaction with antibodies [26]. In addition, the number and location of glycosylation sites on HA may alter neutralization antibody recognition [27]. NA active sites at catalytic and framework residues were also examined, and showed all the viruses isolates had conserved catalytic and framework residues. The isolates from Morocco are found to have the characteristic amino acid substitutions V241I and N369K. It has been documented that amino acid modification of V241I and N369K would improve protein stability in neuraminidase gene which would possibly improve oseltamivir-resistance and virus

fitness [28]. Furthermore, all strains examined in this study carried the N248D substitution. It has been suggested that mutation at the residue 248 alters the central part of an antibody recognition site on NA [29]. Located near H275, this N248D mutation may be associated with oseltamivir resistance [30]. In Morocco, limited information is available on the drug resistant profiles of circulating A/H1N1pdm09 strains. To evaluate the impact of amino acid substitution to neuraminidase inhibitor susceptibility particularly oseltamivir and zanamivir, phenotypic assay of the representatives isolates (N=100) was performed. All studied viruses showed normal inhibition to both drugs. The decision by the Moroccan Ministry of Health to use NAIs, especially oseltamivir, as the treatment and control for persons with suspected influenza virus infections that were at high risk for severe disease is still recommended and effective.

CONCLUSION

Findings from the present study confirm that influenza A/H1N1pdm09 strains of subclade 6B.1 predominated in Morocco during the 2015/2016 season, as they remained antigenically closely related to the vaccine strain, despite some genetic changes located at the antigenic sites.

Furthermore, Oseltamivir-resistance related mutations were not detected during the study season.

Accumulation of sporadic amino acid substitutions and active dynamic of variation in N-glycosylation sites in the genes of external glycoprotein HA and NA confirm the genetic instability of A/H1N1pdm09 viruses evolving during this season.

Our observation underscores the importance of continued genetic surveillance of A/H1N1pdm09 strains to monitor influenza susceptibility to antiviral drugs. It is also crucial to monitor the virus evolutionary changes in different geographical areas to assist with vaccine strain selection. Influenza surveillance ultimately will help public health in establishing clinical management and therapeutic guidelines.

Author Contributions:

“Conceptualization, methodology FE, IC, AR, TB, YB and HO.; validation, FE, HO and IC formal analysis, FE, ZR, HI, AB IC, SB.; investigation, FE, HO, IC, AB, and IC.; data curation, FE, HO AB IC; writing—original draft preparation, FE, HO; writing—review and editing, EF, HO.; supervision, FE, HO, IC.; project administration, HO TB.; funding acquisition, HO TB.

All authors have read and agreed to the published version of the manuscript

Funding: the details given are accurate and use the standard spelling of funding agency names at

<https://search.crossref.org/funding>. Any errors may affect your future funding.

Acknowledgments:

The authors are grateful to:

- The Medical and laboratory staff in the sentinel sites: Rabat—Tangier – Beni Mellal- Oujda - Fes - Meknes – Marrakech – Agadir, for their commitment to the influenza survey.

- Dr Hugo Guevara, Dr Pan Chao-Yan from the California Department of Public Health, USA, and Dr Ahmed Benabdallah from Schrebrook university Canada, for their comments and their suggestions.

- MsKindaZureik from CDC for her sustainable support and coordination.

- Dr Mohamed Rhajaoui, Director of the INH Morocco, for his support.

- Pr Mariette Ducatez, ENV de Toulous France, et PrSihamFellahi IAV Hassan II, Rabat forproviding assistance in bioinformatic analysis.

Conflicts of Interest: “The authors declare no conflict of interest.”

The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

Funding:

The present work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), grant N° 5U51CI999469 and the

WHO Pandemic Influenza Preparedness (PIP).

REFERENCES

- [1] horlund K, Awad T, Boivin G, Thabane L. Systematic review of influenza resistance to the neuraminidase inhibitors. *BMC Infect Dis.* 2011 Dec;11(1):134.
- [2] Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, *et al.* Influenza. *Nat Rev Dis Primer.* 2018 Dec;4(1):3.
- [3] Gunasekaran P, Krishnasamy K, Arunagiri K, Sambasivam M, Lakshmiopathy M, Arunpon, *et al.* Genetic analysis of HA gene of pandemic H1N1 2009 influenza viruses circulating in India. *Indian J Med Microbiol.* 2012 Jul;30(3):346–9.
- [4] World Health Organization. A manual for estimating disease burden associated with seasonal influenza [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2015 [cited 2022 Jan 19]. 124 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/178801>
- [5] Janik E, Ceremuga M, Niemcewicz M, Bijak M. Dangerous Pathogens as a Potential Problem for Public

- Health. *Medicina (Mex)*. 2020 Nov 6;56(11):591.
- [6] Shen C-F, Ho T-S, Wang S-M, Liao Y-T, Hu Y-S, Tsai H-P, *et al*. The cellular immunophenotype expression of influenza A virus and influenza B virus infection in children. *Clin Immunol*. 2020 Oct;219:108548.
- [7] Treanor J. Influenza Vaccine — Outmaneuvering Antigenic Shift and Drift. *N Engl J Med*. 2004 Jan 15;350(3):218–20.
- [8] Korsun N, Angelova S, Gregory V, Daniels R, Georgieva I, McCauley J. Antigenic and genetic characterization of influenza viruses circulating in Bulgaria during the 2015/2016 season. *Infect Genet Evol*. 2017 Apr;49:241–50.
- [9] Pérez Velasco R, Praditsithikorn N, Wichmann K, Mohara A, Kotirum S, Tantivess S, *et al*. Systematic Review of Economic Evaluations of Preparedness Strategies and Interventions against Influenza Pandemics. Cowling BJ, editor. *PLoS ONE*. 2012 Feb 29;7(2):e30333.
- [10] Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, *et al*. Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans. *Science*. 2009 Jul 10;325(5937):197–201.
- [11] Broor S, Gupta S, Mohapatra S, Kaushik S, Mir MA, Jain P, *et al*. Emergence of 2009A/H1N1 cases in a tertiary care hospital in New Delhi, India: Emergence of pandemic H1N1 in New Delhi, India. *Influenza Other Respir Viruses*. 2011 Nov;5(6):e552–7.
- [12] Bai Y, Jones JC, Wong S-S, Zanin M. Antivirals Targeting the Surface Glycoproteins of Influenza Virus: Mechanisms of Action and Resistance. *Viruses*. 2021 Apr 6;13(4):624.
- [13] Al-Qahtani AA, Mubin M, Dela Cruz DM, Althawadi SI, Ul Rehman MSN, Bohol MFF, *et al*. Phylogenetic and nucleotide sequence analysis of influenza A (H1N1) HA and NA genes of strains isolated from Saudi Arabia. *J Infect Dev Ctries*. 2017 Jan 30;11(01):81–8.
- [14] World Health Organization, 2009. CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A(H1N1). World Health Organization, Geneva. <https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCrealtime>

- eRTPCRprotocol_20090428.pdf.
Accessed 10 January 2022
- [15] World Health Organization, 2017. Information for molecular diagnostic of influenza virus humans-update. World Health Organization, Geneva. https://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/WHO_information_for_the_molecular_detection_of_influenza_viruses_20171023_Final.pdf, accessed 12 October 2021).
- [16] Okomo-Adhiambo M, Mishin VP, Sleeman K, Sagar E, Guevara H, Reisdorf E, *et al.* Standardizing the influenza neuraminidase inhibition assay among United States public health laboratories conducting virological surveillance. *Antiviral Res.* 2016 Apr;128:28–35.
- [17] Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility. Geneva. November 2011 and June 2012. *Wkly Epidemiol Rec.* 2012; 87(39):369-380
- [18] Mukherjee A, Nayak MK, Dutta S, Panda S, Satpathi BR, Chawla-Sarkar M. Genetic Characterization of Circulating 2015 A(H1N1)pdm09 Influenza Viruses from Eastern India. *PLOS ONE.* 2016;11(12):e0168464.
- [19] Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, Lowen AC, Ye J, van Riel D, *et al.* Virulence-Associated Substitution D222G in the Hemagglutinin of 2009 Pandemic Influenza A(H1N1) Virus Affects Receptor Binding. *J Virol.* 2010 Nov 15;84(22):11802–13.
- [20] Nguyen HT, Fry AM, Gubareva LV. Neuraminidase inhibitor resistance in influenza viruses and laboratory testing methods. *Antivir Ther.* 2012;17(1 Pt B):159–73.
- [21] Barakat A, Ihazmad H, El Falaki F, Tempia S, Cherkaoui I, El Aouad R. 2009 Pandemic Influenza A Virus Subtype H1N1 in Morocco, 2009–2010: Epidemiology, Transmissibility, and Factors Associated With Fatal Cases. *J Infect Dis.* 2012 Dec 15;206(suppl_1):S94–100.
- [22] Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B.* 2012;88(6):226–49.
- [23] Koel BF, Møgling R, Chutinimitkul S, Fraaij PL, Burke DF, van der Vliet S, *et al.* Identification of Amino Acid Substitutions Supporting Antigenic Change of Influenza A(H1N1)pdm09 Viruses. *García-*

- Sastre A, editor. *J Virol.* 2015 Apr;89(7):3763–75.
- [24] Glinsky GV. Genomic analysis of pandemic (H1N1) 2009 reveals association of increasing disease severity with emergence of novel hemagglutinin mutations. *Cell Cycle.* 2010 Mar;9(5):958–70.
- [25] Melidou A, Gioula G, Exindari M, Chatzidimitriou D, Diza E, Malisiovas N. Molecular and phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of pandemic influenza H1N1 2009 viruses associated with severe and fatal infections. *Virus Res.* 2010 Aug;151(2):192–9.
- [26] Sun S, Wang Q, Zhao F, Chen W, Li Z. Prediction of Biological Functions on Glycosylation Site Migrations in Human Influenza H1N1 Viruses. Vartanian J-P, editor. *PLoS ONE.* 2012 Feb 15;7(2):e32119.
- [27] Job ER, Deng Y-M, Barfod KK, Tate MD, Caldwell N, Reddiex S, *et al.* Addition of Glycosylation to Influenza A Virus Hemagglutinin Modulates Antibody-Mediated Recognition of H1N1 2009 Pandemic Viruses. *J Immunol.* 2013 Mar 1;190(5):2169–77.
- [28] Fry AM, Gubareva LV. Understanding Influenza Virus Resistance to Antiviral Agents; Early Warning Signs for Wider Community Circulation. *J Infect Dis.* 2012 Jul 15;206(2):145–7.
- [29] Richard M, Deléage C, Barthélémy M, Lin YP, Hay A, Lina B, *et al.* Impact of influenza A virus neuraminidase mutations on the stability, activity, and sensibility of the neuraminidase to neuraminidase inhibitors. *J Clin Virol.* 2008 Jan;41(1):20–4.
- [30] Gíria MT, Rebelo de Andrade H, Santos LA, Correia VM, Pedro SV, Santos MA. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *J Clin Virol.* 2012 Feb;53(2):140–4.

Influenza-associated severe acute respiratory infections among children under five years old in Morocco, September 2017 to March 2019

Zakia Regragui^{1,2}, Abderrahman Bimouhen¹, Fatima El Falaki¹, Hassan Ihazmad¹, Samira Benkerroum¹, Soumia Triki³, Imad Cherkaoui⁴, Chafiq Mahraoui⁶, Abdelkarim Filali-Maltouf², Leila Medraoui², Hicham Oumzil^{1,5}

¹National Influenza Center, Virology Department, National Institute of Hygiene, RABAT, Morocco;

²Equipe de Microbiologie et Biologie Moléculaire (EMBM), Biology Department, Mohamed V University of RABAT, Morocco;

³World Health Organization, Country Office, Rabat, Morocco;

⁴Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Rabat, Morocco;

⁵Pedagogy and Research Unit of Microbiology, and Genomic Center of Human Pathologies, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University In Rabat, Morocco;

⁶Hôpital d'Enfants, Centre Hospitalier Universitaire, Rabat, Morocco.

Article received 23 March 2022, accepted 2 July 2022

SUMMARY

The main aim of this research is to investigate the trend of influenza infection among children under 5 years with severe acute respiratory infections (SARI) as well as those who suffer from a high burden of disease.

This research is based on a survey conducted from September 2017 to March 2019. During this period nasopharyngeal swabs were collected in a group of 942 children under 5 years with SARI, admitted in pediatric services of 8 sentinel hospitals.

The virological surveillance of influenza was carried out at the National influenza Center, located in the National Institute of Hygiene, using a Reverse transcription polymerase chain reaction (qRt-PCR) monoplex assay developed by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC; Atlanta, GA).

The median age of participants was 11 months, and 40% of them were female. A total of 112 samples were reported positive yielding a frequency of 11.88% (112/942).

Among all the influenza confirmed cases, 68.75% (77/112), 15.17% (17/112), 16.04% (18/112) were sub-typed as influenza AHN1pdm09, AH3N2 and influenza B respectively. Meanwhile, the proportion of patients admitted at the intensive care unit was 5.35% (6/112). Out of which 83.33% (5/6) were AHN1pdm09 and it was reported that just 1.78% (2/112) of the positive cases were vaccinated.

The study confirms that influenza affects greatly children with SARI. Thus, the need for influenza vaccines is highly recommended for children under 5 years. Moreover, our findings highlight that influenza virus is not the only cause of SARI among this group of children. Accordingly, special attention should be paid to the non-flu respiratory viruses.

Ke words: influenza, SARI, children.

INTRODUCTION

It is proved that Influenza virus is a serious human pathogen that causes significant morbidity and mortality. Overall, it is annually reported that winter epidemics caused by these viruses affect the whole population worldwide. Consequently, they lead to some economic crises and to severe

Corresponding author

Zakia Regragui

E-mail: zakia.regragui@yahoo.com

diseases and mortality [1]. It is further estimated that about 9% of the world population is subject to these seasonal epidemics each year, which are reported to be responsible for about 3 to 5 million cases of serious diseases and 650,000 deaths yearly. Noticeably, it is detected that these cases are associated with respiratory illnesses due to seasonal influenza [2, 3].

The World Health Organization (WHO) estimates that 20 to 30% of children are infected with the influenza virus each year, causing 1 to 2 million cases of SARI and up to 100,000 deaths per year [4]. Although several studies conducted in Morocco suggest that the burden of influenza is significant, there is still uncertainty about the etiology of hospitalizations associated with respiratory diseases in children under 5 years old [5].

Children are likely to be infected twice to three times more frequently than adults [6]. In addition, young children, especially those under the age of six months, are at a higher risk of serious illnesses, hospitalization and death caused by influenza virus than older children [7]. Furthermore, children under 5 years old play a critical role in the transmission of influenza in the community [8]. The most prevalent consequences of pediatric influenza are bronchitis, bronchiolitis, pneumonia, acute otitis media and seizures or febrile convulsions [9, 10]. Clinical features are non-specific as they are commonly reported also for other respiratory pathogen infections which may have a potential impact on patient management in case of a large co-circulation of all these viruses [11]. On the other hand, the lack of sufficient virological and epidemiological surveillance lead to a wide spread of antibiotic resistance because of the abuse and inappropriate use of antibiotics, with negative impacts on the health of individuals as well as on the economy [12].

Accordingly, it is estimated that influenza surveillance is essential to monitor and control influenza infections, to assess the effectiveness of influenza vaccine and to guide clinicians to employ the appropriate therapeutic management of patients [13].

■ PATIENTS AND METHODS

Influenza surveillance system

The National Influenza Center (NIC), which has been part of the WHO network since 2000, is the one responsible for conducting the virological

surveillance of influenza and other respiratory viruses that are the cause of respiratory infections in Morocco. Its main concern is to ensure the identification of antigenic and genetic characterization of influenza viruses responsible for annual epidemics. This is done in order to assess the adequacy of the vaccine composition with circulating influenza viruses as well as the evolution of natural resistance to antivirals. Since 1996 the laboratory has also provided technical support for epidemiological surveillance through a network of voluntary doctors from the private sector including: general practitioners, pediatricians and pneumo-phthisiologists. This surveillance is based on the weekly recordings of influenza-like illness (ILI) and SARI which are diagnosed by doctors.

The epidemiological surveillance of influenza is also carried by a network of health centers and hospitals selected from 8 Moroccan regions, namely: Rabat-Sale-Kenitra, Fes-Meknes, Souss-Massa, Beni Mellal-Khenifra, Tanger-Tetouan, Marrakech-Safi, Laayoune-Saguia Al Hamra and Oriental. This network, headed by the Department of Epidemiology and Disease Control since 2004, estimates the weekly number of consulting patients for ILI and SARI as well as the virological testing of samples within the platform of the NIC throughout the year.

Study population

The study was conducted at the NIC at the National Institute of Hygiene in Morocco. The samples tested were collected from 8 sentinel sites distributed throughout the country. It targeted a group of children under 5 years who were admitted to pediatric services during September 2018 to March 2019 period. The study involved all patients fulfilling the WHO definition for SARI : acute respiratory infection (ARI) with a history of fever, or fever measured $\geq 38^{\circ}\text{C}$, cough with onset of symptoms within the last 10 days that requires hospitalization [14]. The samples were then stored in an appropriate viral transport medium, at $+4^{\circ}\text{C}$ and sent to the NIC with a patient investigation form filled duly by a clinician, within a period of 48 hours maximum according to the current biosafety measures.

Extraction of nucleic acids

Viral nucleic acids were automatically extracted from 400ul of respiratory specimens by using a

High Pure Viral Nucleic Acid Kit and iPrep instrument. This was done in accordance with the manufacturer's recommendation (Lifetechnologies, Carlsbad, USA). Viral RNA was eluted in a volume of 100 µl and processed immediately or stored at -80°C before testing.

Detection of Influenza virus by qRT-PCR

All samples were tested for the presence of influenza virus. The detection and subtyping of Influenza virus was performed by qRt-PCR and the SuperScript III Platinum® One-Step qRT-PCR System (Invitrogen, Scientific ThermoFisher, USA). The samples were first screened for the detection of influenza A and B viruses. Positive Samples for influenza A virus were then tested for AH1N1pdm09 and AH3N2. The genetic lineage Yamagata and Victoria of detected influenza B viruses were also tested by qRt-PCR. Primers, probes and positive controls were provided by International Reagent Resource (IRR, USA). The amplification was performed on the Applied Biosystems 7500 Fast platform using a qRt-PCR according to the CDC protocol (CDC; Atlanta, GA) [15]: reverse transcription at 50°C for 30 min, inactivation of the Taq inhibitor at 95°C for 2 min, then 45 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing/amplification at 55°C for 30 s. Positive samples had a cycle threshold value (Ct) <38.

Statistical analysis

To collect data, clinicians duly filled a standard surveillance form. Clinical, virological and demographic data were then recorded using the laboratory information system (Kalisil) which generates an excel file. Analysis of the results was performed by Epi-info version 7.1 software developed by the CDC (CDC; Atlanta, USA). The Pearson Chi-square or Fisher exact test estimated group comparisons as appropriate. Meanwhile, P-values for interactions below 0.05 were considered statistically significant. Proportions, means and all statistical analyses were performed using the same software.

■ RESULTS

Demographic characteristics

During the study period of September 2017 to March 2019, 942 nasopharyngeal swabs were collected from children under 5 years old, who were

admitted in sentinel hospitals from 8 regions distributed nationwide. The notification forms were then reviewed and 81.5% (768/942) of the children fulfilled the WHO's case definition of SARI. The sex ratio (male/female) was 1.45 (559/383) and the age of the enrolled patients ranged from 0 days to 5 years (median age 11 months) whereas children under 6 months and between 6 and 23 months represented 42.56% (401/942) and 41.93% (395/942) respectively out of the total number of SARI cases. On the otherhand, children over 24 months represented the lowest age group with a proportion of 15.49% (146/942). Among the 8 sentinel hospital regions, the largest number of specimens collected was in Rabat-Sale-Kenitra (281/942) with a proportion of 29.83%. Specimens were collected throughout all study period but the largest number was collected during the first quarter which corresponds to the cold and wet season in Morocco (January to the end of March) (638/942) with a frequency of 67.8% (Table 1).

Detection of Influenza virus

Out of 942 SARI specimens tested among children under 5 years old, a total of 112 samples were reported positive yielding a frequency of 11.89% (112/942) (Table 2). Among all influenza confirmed cases, 68.75% (77/112), 15.17% (17/112), 16.04% (18/112) were subtyped as influenza AH1N1pdm09, AH3N2 and B respectively. Out of which 94.44% (17/18) were subtyped as influenza B/yamagata (Table 3).

It is reported that the detection rate for influenza was higher among the children between 6 and 23 months (47.32% ; 53/112), followed by those aged between 2 and 5 years (30.35% ; 34/112) and then children under 6 months (22.32% ; 25/112) (Table 1).

Clinical manifestations

The common clinical manifestations in the positive cases among our group of study were the caught (98.20% ; 109/112). The onset of symptoms in patients for influenza within 10 days of admission was in 98.28% (110/112), and the fever was found in 98.20% (109/112). Consequently, 12.5% (14/112) of the cases were admitted in the pediatric unit, 12.5% (14/112) in pediatric emergency unit whereas 5.35% (6/112) at the intensive care unit of which 83.33% (5/6) were subtyped as influenza AH1N1pdm09 and all of them was unvaccinated. Based on the patient data form, only 1.78% (2/112) of

Table 1 - Demographic and clinical characteristics of SARI associated with Influenza virus in children under 5 years, Morocco, September 2017 to March 2019

| | Total | Positives | Negatives | P-value |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|---------|
| | N = 942 | N = 112 | N = 830 | |
| <i>Age</i> | N (%) | N (%) | N (%) | |
| 0-6 months | 401 (42.56) | 25 (22.32) | 376 (45.30) | <0.001 |
| 6 -23 months | 395 (41.93) | 53 (47.32) | 342 (41.20) | |
| 2-5 years | 146 (15.49) | 34 (30.35) | 112 (13.49) | |
| <i>Sex</i> | | | | 0.663 |
| Male | 559 (59.34) | 71 (63.39) | 488 (58.79) | |
| Female | 383 (40.66) | 41 (36.60) | 342 (41.20) | |
| <i>Clinical symptoms</i> | | | | |
| <i>Onset of symptoms</i> | | | | 0.12 |
| >10 days | | 2 (1.80) | 43 (5.18) | |
| <10 days | | 110 (98.28) | 778 (93.73) | |
| <i>Fever</i> | | | | 0.102 |
| <37.5 | | 3 (2.68) | 90 (11.28) | |
| >37.5 | | 109 (98.20) | 708 (88.72) | |
| <i>Caught</i> | | | | 0.603 |
| Yes | | 109 (98.20) | 793 (97.18) | |
| No | | 3 (2.68) | 23 (2.82) | |
| <i>Vaccination</i> | | | | 0.064 |
| Yes | 9 (0.96) | 2 (1.78) | 7 (0.84) | |
| No | 829 (88) | 110 (98.21) | 719 (86.62) | |
| Not indicated | 104 (11.4) | 0 | 104 (12.53) | |
| <i>Service</i> | | | | <0.001 |
| Pediatric emergency | 31 (3.29) | 14 (12.5) | 17 (2.04) | |
| Pediatric department | 876 (93) | 92 (82.14) | 784 (94.45) | |
| ICU | 35 (3.71) | 6 (5.35) | 29 (25.89) | |
| <i>Regions</i> | | | | 0.015 |
| Rabat- Sale-Kenitra | 281 (29.83) | 31 (27.68) | 250 (30.12) | |
| Fes-Meknes | 140 (14.86) | 25 (22.32) | 115 (13.85) | |
| Souss-Massa | 140 (14.86) | 17 (21.43) | 123 (14.82) | |
| Beni Mellal-Khenifra | 69 (7.32) | 3 (2.68%) | 66 (7.95) | |
| Tanger-Tetouan | 159 (16.88) | 15 (13.39) | 144 (17.35) | |
| Marrakech-Safi | 101 (10.72) | 14 (12.5) | 87 (10.48) | |
| Laayoune-Saguia Al Hamra | 1 (0.11) | 1 (0.89) | 0 | |
| Oriental | 51 (5.41) | 6 (5.36) | 45 (5.42) | |
| <i>Season</i> | | | | <0.001 |
| First Quarter | 638 (67.8) | 90 (80.35) | 488 (58.79) | |
| Second Quarter | 26 (2.7) | 9 (8.03) | 17 (2.04) | |
| Third Quarter | 33 (3.5) | 0 (0) | 33 (3.97) | |
| Fourth Quarter | 254 (26) | 13 (11.60) | 228 (27.46) | |

the positive cases were vaccinated while 89.21% (110/112) were unvaccinated (Table 1).

Influenza seasonal distribution

It was observed that the influenza virus was detected mainly from November to April during 2017-2018 and 2018-2019 which correspond to the cold and wet season in Morocco. However, it was noticed that viral activity peaked in January 2017-2018 (14/35; 40%) and in February (63/77; 81.81%) 2018-2019. Positivity rate was noticed during the 2018-2019 period (77/112; 68.75%) as compared to 2017-2018 period (35/112; 31.25%) (Figure 1 and Table 2).

The analysis of the influenza virus characteristics, based on the seasonal circulation, showed that Influenza B virus was the most frequent source of infection during the 2017-2018 influenza season (18/35; 51.43%), followed by influenza AH1N1pdm09 (10/35; 28.57%) and AH3N2 (7/35; 20%). Whereas, the AH1N1pdm09 and AH3N2 subtypes co-circulated during the 2018-2019 season, with a predominance of the AH1N1pdm09 (67/77; 87.01%) followed by the AH3N2 (10/77; 12.99%) (Table 3).

DISCUSSION

It is estimated that Influenza remains a major cause of illness and death worldwide as well as a significant economic burden [6]. While most

people recover fully from influenza infection, the consequences of potential complications in different age groups, especially in children under 5 years, remain uncertain within the Moroccan context in particular.

On the basis of the data collected from the sentinel influenza surveillance within the framework of the NIC, it is reported that influenza virus was one of the causes of SARI during 2017-2018 and 2018-2019 seasons in Morocco. This was clearly noticed in group of children under 5 years who represent a high risk group of influenza complications, resulting in serious diseases, increased hospitalizations, and mortality [16]. The positivity rate in our study group was 11.88%, where in the predominant circulating subtype was the influenza B virus (18/35; 51.43%) during 2017-2018 season. This agrees with overall patterns of influenza circulation reported in Northern Africa and Western Asia by the WHO in the same period in which all subtypes of influenza were detected, with the predominant strain varying by country [17]. Influenza B viruses were the most common in Azerbaijan and Georgia, whereas influenza A and B circulated in almost similar quantities in Armenia, Cyprus and Israel. It was also observed that Influenza AH3N2 viruses were in circulation but in lower proportions. The Yamagata lineage was found in the majority of influenza B virus in circulation during the same period [17].

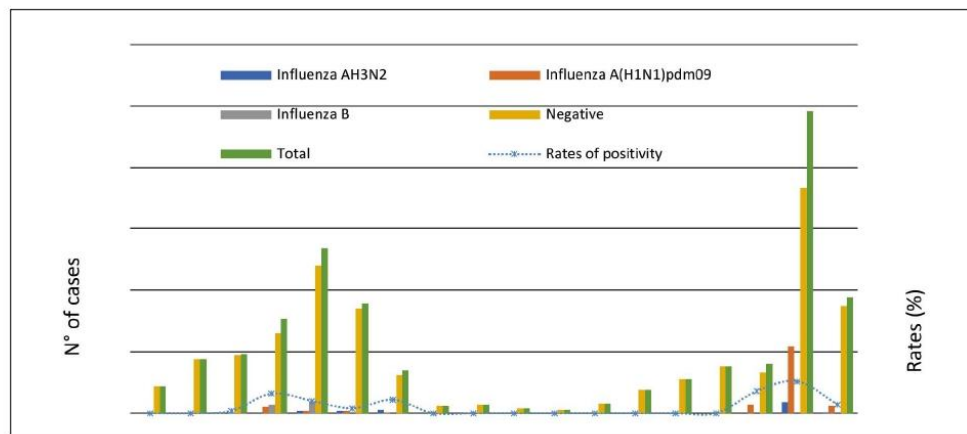


Figure 1 - Rates of samples tested and proportion of positivity for Influenza of SARI in children under 5 years by months, Morocco, September 2017-March 2019.

Table 2 - Influenza positivity rate of SARI in children under 5 years, Morocco, September 2017 to March 2019.

| Period | RT-PCR test Results | | |
|------------------------------|---------------------|--------------|--------------|
| | Negative | Positive | Total |
| September 2017 to March 2018 | 830 (88.11%) | 112 (11.88%) | 942 (100%) |
| 2017-2018 | 434 (52.28%) | 35 (31.25%) | 469 (49.78%) |
| 2018-2019 | 396 (47.71%) | 77 (68.75%) | 473 (50.21%) |

Table 3 - Influenza subtypes positivity rate of SARI in children under 5 years, Morocco, September 2017 to March 2019.

| Period | Influenza A H3N2 | Influenza A(H1N1) pdm 09 | Influenza B |
|-------------|------------------|--------------------------|----------------|
| 2017-2018 s | 7/35 (20%) | 10/35 (28.57%) | 18/35 (51.43%) |
| 2018-2019 | 10/77 (12.99%) | 67/77 (87.01%) | 0 |

However, in accordance with our study, all subtypes of influenza A viruses co-circulated with a predominance of AH1N1pdm09 (67/77; 87,01%) during 2018-2019 period. This matches what the WHO has reported in Northern Africa and western Asia in the same period, with a predominance of influenza A viruses over all influenza viruses detected [18]. The prevalent subtype varied by country. In Algeria and Egypt, influenza AH3N2 viruses predominated, while AH1N1pdm09 was reported to be more frequent in Western Asia (especially in Armenia, Georgia, Kuwait, and Qatar). Influenza AH3N2 spread throughout Western Asia, though in low numbers. In Iraq, Israel, and Turkey it was estimated to be in higher proportions in comparison with influenza AH1N1pdm09 [18] and were therefore considered as an exception. In comparison to some strains of influenza A, influenza B is thought to be a milder virus [19]. However, the mortality rates associated with influenza B infection is significantly higher compared to influenza A in children under 16 years old [20].

During the first quarter of this study period, influenza virus circulation in Morocco among children under 5 years with SARI was clearly noticeable and it peaked in January of 2017-2018 flu season, and in February of 2018-2019 flu season. This is similar to the influenza seasonality observed in Algeria, Azerbaijan, Cyprus, Kuwait and Tunisia, where influenza activity did not increase until early or late January. However, in other countries it increased earlier (Bahrain, Egypt, Kuwait, Oman and Qatar) [17, 18].

It is reported that the influenza-associated SARI

rate in our study population remains lower in comparison with other studies which estimated that among children under 5 years of age, there have been 5 million influenza virus episodes and approximately 10 million cases of influenza-associated SARI [7]. This low rate in Morocco is probably not due to the improved influenza vaccine management in this age group. In fact, according to our study, the vaccination coverage remains very low 1.78% (2/112). Therefore, annual influenza vaccination is recommended for young children, especially for those aged ≥ 6 months to reduce the risk of severe complications [21]. It is therefore observed that the admission in the Intensive Care Unit (ICU) has been reported in 5.35% of positive cases in children under 5 years and all of them were not vaccinated. It follows that influenza vaccination remains the best method of prevention against influenza infection and its associated complications [22]. Routine annual influenza vaccination for all children older than 6 months with no contraindications have been also recommended by the CDC and the CDC Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) since 2010 [21]. In fact, several factors suggest that the influenza vaccine is a possible effective measure to control antibiotic use and also to reduce antibiotic resistance by reducing significantly outpatient visits for influenza-associated ARI for which antibiotics are routinely prescribed [21, 14]. It is then reported that improved influenza vaccine coverage and effectiveness, diagnosis and recognition along with efforts to limit antibiotic use are critical measures for reducing antibiotic prescriptions and thereby mitigating the growth in anti-

biotic resistance [23]. Hence the need for a public awareness program is strongly recommended in Morocco to increase the vaccination coverage each year, especially among the high-risk groups. The co-circulation of other respiratory viruses during influenza seasons, particularly respiratory syncytial virus (RSV), is a significant impediment to estimating the number of influenza cases associated to SARI in children under 5 years in Morocco [24, 25].

The epidemiology is deeply changed during the two years following the present investigation due to COVID 19 pandemic [26]. Indeed, some authors reported a significant sudden decline in the prevalence of all the other respiratory viruses, especially those typically isolated during the winter season, such as RSV and Influenza virus compared to the previous years [27]. This decrease can be attributable to the public health measures and non-pharmacological interventions (NPIs) adopted such as social distancing, facemask wearing, adequate hand hygiene, surface disinfection and ventilation of indoor spaces [28].

Overall, this study is not an exhaustive one. It has encountered some limitations as far as the unavailability of epidemiological and clinical data on SARI in Morocco are concerned. Thus, this makes difficult to implement evidence-based management and prevention strategies. Accordingly much effort should be made to develop research on all areas to obtain a holistic approach to better understand the determinants of SARI in Morocco and to establish adequate control measures.

In conclusion, overall, our findings provided evidence that influenza is a significant burden in children with SARI. Furthermore, it was shown that influenza virus is not the only source of infection of SARI in children under 5 years. In fact, much attention and care should be paid to the non-flu respiratory virus and bacterial pathogens. It is also reported that the pandemic invasion of the new SARS-CoV-2 virus in 2019 has been accompanied by the disappearance of existing circulating strains of Influenza and other respiratory viruses. This is due to the wearing of face masks, social distancing and hand hygiene [29]. These NPIs has positively affected the transmission of Influenza viruses and provided a possibility to make better choices in the future of adapting a strategy to fight the spread of the respiratory viruses.

In order to better understand the epidemiology,

etiology, antiviral susceptibility patterns, and effectiveness of the preventive and therapeutic interventions in place against pediatric SARI in Morocco, more effort should be put into enhancing sufficient surveillance programs.

Ethics approval and consent to participate

The data at hand were obtained from the influenza sentinel surveillance system, which is approved by the Ministry of Health for national surveillance of respiratory diseases. Accordingly, patient confidentiality is respected. Thus, the study does not require formal ethical review. So, verbal consent was obtained from parents prior to sample taking.

Availability of data and materials

The datasets used and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests

Funding

This work was supported by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC), grant n° 5U51CI000469 and WHO in frame work of Pandemic Influenza Preparedness (PIP).

Authors' contributions

HO, ZR, FE, LM and AFM conceived and designed the study. ST, IC and HO provided data and materiel. AB, HI, FE, SB and IC contributed on collection and processing. ZR and HO performed the analysis. ZR wrote the paper. HO, LM and AFM reviewed the draft. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We would like to express our sincere gratitude to the medical doctors, nurses and laboratory technicians in the public network for their kind support on clinical sample collection.

■ REFERENCES

- [1] Uyeki TM, Bernstein HH, Bradley JS et al. Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Man-

- agement of Seasonal Influenza. *Clin Infect Dis*. 2019; 68 (6): e1-47.
- [2] Horm SV, Mardy S, Rith S et al. Epidemiological and Virological Characteristics of Influenza Viruses Circulating in Cambodia from 2009 to 2011. Krammer F, editor. *PLoS ONE*. 2014; 9 (10): e110713.
- [3] Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primer*. 2018; 4 (1): 3.
- [4] Influenza (Seasonal) [Internet]. [cited 2021 Nov 29]. Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- [5] Barakat A, Ihazmad H, Benkaroum S et al. Influenza Surveillance among Outpatients and Inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS One*. 2011; 6 (9): e24579.
- [6] Kurskaya O, Ryabichenko T, Leonova N et al. Viral etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in Novosibirsk City, Russia (2013-2017). *PLoS One*. 2018;13(9):e0200117.
- [7] Nair H, Brooks WA, Katz M et al. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011; 378 (9807): 1917-1930.
- [8] Wang X, Li Y, O'Brien KL, Madhi SA et al. Global burden of respiratory infections associated with seasonal influenza in children under 5 years in 2018: a systematic review and modelling study. *Lancet Glob Health*. 2020; 8 (4): e497-510.
- [9] Poehling KA, Edwards KM, Griffin MR et al. The Burden of Influenza in Young Children, 2004-2009. *Pediatrics*. 2013; 131 (2): 207-216.
- [10] Brooks WA, Goswami D, Rahman M et al. Influenza is a major contributor to childhood pneumonia in a tropical developing country. *Pediatr Infect Dis J*. 2010; 29 (3): 216-221.
- [11] Bouzid D, Mullaert J, Le Hingrat Q et al. Characteristics associated with COVID-19 or other respiratory viruses' infections at a single-center emergency department. *PLoS One*. 2020; 15 (12): e0243261.
- [12] Jroundi I, Benmessaoud R, Mahraoui C et al. Antibiotic usage prior and during hospitalization for clinical severe pneumonia in children under five years of age in Rabat, Morocco. *Antibiotics*. 2013; 2 (4): 450-464.
- [13] Bansal A, Trieu MC, Mohn KGI, Cox RJ. Safety, Immunogenicity, Efficacy and Effectiveness of inactivated influenza vaccines in healthy pregnant women and children under 5 years: an evidence-based clinical review. *Front Immunol*. 2021; 12: 3926.
- [14] Fitzner J, Qasmieh S, Mounts AW et al. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bull World Health Organ*. 2018; 96 (2): 122-128.
- [15] CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf [Internet]. [cited 2021 Nov 29]. Available from: https://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/CDCRealtimeRTPCR_SwineH1Assay-2009_20090430.pdf
- [16] Heikkinen T. Respiratory viruses and children. *J Infect*. 2016; 72, S29-33.
- [17] Hammond A, Laurenson-Schafer H, Marsland M, Besselaar T, Fitzner J, Vandemaele K. Bilan de la saison grippale 2017-2018 dans l'hémisphère Nord. 2018; 34, 16.
- [18] World Health Organization = Organisation mondiale de la santé. Review of the 2018-2019 influenza season in the northern hemisphere – Bilan de la saison grippale 2018-2019 dans l'hémisphère Nord. *Wkly Epidemiol Rec Relevé Épidémiologique Hebd*. 2019; 94 (32), 345-363.
- [19] Sharma L, Rebaza A, Cruz CSD. When "B" becomes "A": the emerging threat of influenza B virus. *Eur Respir J* [Internet]. 2019 Aug 1 [cited 2022 Jun 10];54(2). Available from: <https://erj.ersjournals.com/content/54/2/1901325>
- [20] Tran D, Vaudry W, Moore D, Bettinger JA et al. Hospitalization for Influenza A Versus B. *Pediatrics*. 2016; 138 (3), e20154643.
- [21] Grohskopf LA, Alyanak E, Broder KR et al. Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices - United States, 2020-21 Influenza Season. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep*. 2020; 69 (8), 1-24.
- [22] CDC. Children & Influenza (Flu) [Internet]. Centers for Disease Control and Prevention. 2021 [cited 2021 Nov 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/highrisk/children.htm>
- [23] Smith ER, Fry AM, Hicks LA et al. Reducing Antibiotic Use in Ambulatory Care Through Influenza Vaccination. *Clin Infect Dis*. 2020; 71 (11), e726-34.
- [24] Bimouhen A, El Falaki F, Ihazmad H, Regragui Z, Benkerroum S, Barakat A. Circulation of respiratory syncytial virus in Morocco during 2014-2016: findings from a sentinel-based virological surveillance system for influenza. *EMHJ-East Mediterr Health J*. 2016; 22 (7), 482-489.
- [25] Jroundi I, Mahraoui C, Benmessaoud R, Moraleda C, Benjelloun B, Bassat Q. Knowledge gaps on paediatric respiratory infections in Morocco, Northern Africa. *Arch Public Health*. 2015; 73 (1), 28.
- [26] Kim KW, Deveson IW, Pang CNI et al. Respiratory viral co-infections among SARS-CoV-2 cases confirmed by virome capture sequencing. *Sci Rep*. 2021; 11(1), 3934.
- [27] Ippolito G, La Vecchia A, Umbrello G et al. Disappearance of seasonal respiratory viruses in children under two years old during COVID-19 pandemic: a monocentric retrospective study in Milan, Italy. *Front Pediatr*. 2021; 9, 721005.
- [28] Groves HE, Piché-Renaud PP, Peci A et al. The impact of the COVID-19 pandemic on influenza, respiratory syncytial virus, and other seasonal respiratory virus circulation in Canada: A population-based study. *Lancet Reg Health Am*. 2021; 1, 100015.
- [29] Wu D, Lu J, Liu Y, Zhang Z, Luo L. Positive effects of COVID-19 control measures on influenza prevention. *Int J Infect Dis*. 2020; 95, 345-346.

Factors associated with hospitalization for seasonal influenza in Morocco

Hind Ezzine,^{1,2} Zakia Regragui,^{3,4} Imad Cherkaoui,² Mariam Naciri,¹ Abdelkarim Filali-Maltouf,⁴ Ahmed Rguig,² Soumia Triki,⁵ Amgad Elkholy,⁶ Abderrahman Bimouhen,¹ Fatima Falaki,¹ Hassan Ithazmad,¹ Touria Benamar,² Hicham Oumzil^{1,7} and Mohammed Youbi²

¹Research Center, Laboratory of Biodiversity, Ecology and Genome; ²Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco. ³National Influenza Center, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Rabat, Morocco. ⁴Laboratory of Microbiology and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University Mohammed V, Rabat, Morocco. ⁵World Health Organization Country Office, Rabat, Morocco. ⁶World Health Organization Regional Office for the Eastern Mediterranean, Cairo, Egypt. ⁷Microbiology, Pedagogy and Research Unit, Faculty of Medicine and Pharmacy, University Mohammed V, Rabat, Morocco. (Correspondence to Hind Ezzine: hindezzine3@gmail.com).

Abstract

Background: Morocco is actively working towards expanding its influenza vaccine policy to cover high-risk groups, as recommended by the World Health Organization (WHO).

Aims: We assessed the risk factors for influenza-associated hospitalization for severe acute respiratory infections (SARI) that occurred during the last 5 seasons.

Methods: We conducted a retrospective, analytical study among patients recruited in the ambulatory and hospital sites of the influenza sentinel surveillance system in Morocco between 2014 and 2019. Using multiple logistic regression, we compared the characteristics of influenza-positive patients with SARI to those with influenza-like illness (ILI) to identify factors associated with severe disease.

Results: We included 1323 positive influenza patients with either SARI (41.7%) or ILI diagnosis (58.3%). A(H1N1)pdm09, A(H3N2) and influenza B, respectively, contributed 49.2%, 29.5% and 20.6% of the cases. The main risk factors considered in the bivariate analysis were found in the multivariate analysis to be significantly associated with influenza-related hospitalization (SARI): age < 2 years (aOR = 7.08, $P < 0.001$); age ≥ 65 years (aOR = 3.59, $P < 0.001$); diabetes (aOR = 1.98, $P = 0.017$); obesity (aOR = 2.94, $P = 0.034$); asthma or chronic respiratory disease (aOR = 4.99, $P < 0.001$); chronic renal failure (aOR = 4.74, $P = 0.005$); pregnancy (aOR = 7.49, $P < 0.001$); and the A(H1N1)pdm09 subtype (aOR = 1.82, $P < 0.001$).

Conclusion: This study provides epidemiological evidence for the expected benefit of an influenza vaccination strategy for high-risk groups as recommended by the WHO.

Keywords: influenza vaccine, policy, hospitalization, high-risk groups, Morocco

Citation: Ezzine H, Regragui Z, Cherkaoui I, Naciri M, Filali-Maltouf A, Rguig A, et al. Factors associated with hospitalization for seasonal influenza in Morocco. *East Mediterr Health J.* 2023;29(6):442–450. <https://doi.org/10.26719/emhj.23.072>

Received: 18/08/21; Accepted: 17/12/22

Copyright © Authors 2023; Licensee: World Health Organization. EMHJ is an open access journal. This paper is available under the Creative Commons Attribution Non-Commercial ShareAlike 3.0 IGO licence (CC BY-NC-SA 3.0 IGO; <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>).

Introduction

Seasonal influenza is a contagious acute respiratory infection that usually progresses as a benign influenza-like illness (ILI) caused by influenza viruses, usually A or B types, which circulate in all parts of the world (1). The influenza A virus subtype H1N1 (A/H1N1pdm09) caused a flu pandemic in 2009. It has become seasonal after the world community developed a certain level of immunity. Since then the usual shift of influenza strains has ensued. The severity of H1N1pdm09 has remained stable (2). While H3N2 is more likely to cause severe disease among the elderly and the very young, H1N1pdm09 continues to affect the middle aged group more.

Seasonal influenza epidemics result in considerable annual morbidity and mortality as influenza affects 5–15% of the world population each year, with an estimated 291 243 to 645 832 deaths per year (3). Hospitalization and deaths mainly occur in high-risk groups due to severe infection. In terms of social costs, substantial economic losses due to absenteeism, lost wages and increased

utilization of health care services are associated with these seasonal epidemics (4). Since the 1960s, the World Health Organization (WHO) has produced numerous resolutions and recommendations and invited Member States to strengthen active influenza surveillance and vaccination programmes, particularly for specific risk groups (5–8). However, many countries around the world continue to have low immunization rates due to limited resources or scepticism about vaccine efficacy (9–11).

In Morocco, virological influenza surveillance started in 1995 through a network of volunteer private practitioners aiming to monitor ILI activity. In 2007, ILI and severe acute respiratory infection (SARI) surveillance was established in the public sector in 14 of the 16 regions of the country as part of the pandemic influenza preparedness activities with the support of the United States Centers for Disease Control and Prevention (US-CDC) (12). In 2014, surveillance was reduced to 8 sentinel sites for sustainability reasons (13).

The seasonal influenza vaccine, which was incorporated into the influenza immunization strategy in Morocco, has been provided to healthcare personnel since 2006 as part of preparedness against the avian influenza pandemic. In 2013, Morocco worked actively on expanding its influenza vaccine policy as part of a cooperative agreement with the US-CDC. Pilot influenza vaccination and communication campaigns, as well as field epidemiologic and knowledge, attitude and practice studies, were carried out as advocacy activities for the National Immunization Technical Advisory Group. Ultimately, the national plan for influenza prevention and control was established by the Ministry of Health with an official vaccination strategy in the 2019/2020 season.

The aim of this study was to assess the risk factors for influenza-associated SARI hospitalization that occurred from 2015 to 2019.

Methods

Study design

This was a retrospective analytical study based on surveillance of ILI and SARI data during the period 2015–2019.

Study sample

The sample comprised all 1323 positive influenza patients recruited and sampled as SARI or ILI during the study period. Eligible cases were hospitalized persons who met the SARI case definition and had influenza A or B detected by polymerase chain reaction (PCR) during 2015–2019. The comparison group was outpatients consulting for ILI in sentinel primary health centres where they were randomly selected to have an oropharyngeal sample taken and were confirmed by PCR as having influenza A or B during the same period.

Study sites

The study was conducted in 16 sentinel ambulatory and hospital sites, comprising 8 of the 2126 primary health centres, 2 of the 5 university hospitals (Rabat and Fez) and 6 of the 12 regional public hospitals (Tangiers, Marrakech, Meknes, Beni Mellal, Oujda and Agadir). A network of private medical practitioners also contributed to patient recruitment. The overall network of virological influenza surveillance is deployed in 8 of the 12 administrative regions of Morocco with nearly 72.3% of the total population estimated at 33 848 242 according to the 2014 national census (<http://rgphentableaux.hcp.ma/>). The number of samples increased from 239 during the 2014/2015 season and to 2304 during the 2018/2019 season with an annual average of 61.1% SARI and 38.9% ILI.

Case definitions

We used the WHO recommendations for this purpose (14). Severe acute respiratory infection is identified where a person has an acute respiratory infection that includes:

fever or a history of fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; onset of the disease in the last 10 days; and requiring hospitalization. According to the national influenza technical committee, and based on an epidemiologic study carried out at the Morocco University Hospital of Rabat, 54.5% of 28 influenza positive patients admitted to the intensive care unit from July 2014 to August 2016 did not develop a fever even if they had a viral infection due to metabolic and immune disorders (15). Therefore, all infectious diseases of the respiratory system with comorbidity were considered for recruitment purposes as meeting the case definition despite the absence of fever (16).

Influenza-like illness is an acute respiratory infection that includes: fever measuring $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; and the beginning of the disease in the last 10 days (16).

Data collection

Specimens were collected via nasal and pharyngeal sampling between September and June during each flu season. The cases of SARI were randomly recruited and sampled after admission to paediatric, pulmonary, medical and emergency wards or intensive care units as well as to the maternity wards of the sentinel hospital sites. For the paediatric departments, recruitment of SARI cases was done at the rate of 10 cases per day (5 cases under 2 years old and 5 cases over 2 years old). For non-paediatric services, collection of the maximum number of SARI cases was recommended. The ILI cases were randomly sampled in sentinel primary health centres at a rate of no more than 5 samples per day. A questionnaire was completed with patient identification, clinical and epidemiological data, including vaccination; evidence of travel or similar cases in the surrounding area; results of virological analysis; and information on the patient's progress, particularly death during hospitalization.

Laboratory testing

Molecular investigations were processed at the National Influenza Center, National Institute of Hygiene in Rabat. They were performed using qRT-PCR to detect influenza A or B and to establish viral subtyping. Viral RNA was extracted from 400 μl of nasopharyngeal swabs using an automated method with magnetic bead technology performed using the iPrepPureLink, total RNA and Trisol Plus kits (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). The RNA was eluted in a final volume of 100 μl . The qRT-PCR was performed using a monoplex assay developed by the US CDC using the SuperScript (RT/TaqPlatinum). Cycling was performed on the Applied Biosystems 7500 Fast Platform (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts). The fluorescent signal was collected, and data were analysed using the Applied Biosystems software.

Statistical analysis

Descriptive and analytical assessments were carried out using *EpiInfo*, version 7 and *SPSS*, version 19 software. Demographic, clinical and virological characteristics were hypothesized as risk factors for SARI hospitalization.

In univariate analysis, we compared the proportions of those characteristics among SARI and ILI cases using the χ^2 test or Fisher’s exact test as necessary. In the multivariable analysis, those independent risk factors for SARI hospitalization considered as the outcome were assessed through logistic regression using 1251 positive cases with no missing information. All variables with a univariate significance level of $P < 0.05$ were selected for inclusion in the base model.

Ethical considerations

The sentinel virological surveillance system for influenza is a public health activity established by the Ministry of Health in Morocco through well-established regulation. As a result, no request for authorization from the National Ethics Committees was required according to the Moroccan regulations.

Results

During October 2014–March 2019, a total of 1323 influenza-positive cases were reported by the sentinel system for influenza virological surveillance in Morocco. The sex ratio was 0.88:1 men to women. The records showed that 171 (12.9%) were under 2 years, 300 (22.7%) were aged 2–14 years, 651 (49.2%) were aged 15–64 years and 129 (9.8%) were aged ≥ 65 years.

Testing indicated that a total of 651 (49.2%) patients were infected with A(H1N1)pdm09, 390 (29.5%) with influenza A(H3N2) and 273 (20.6%) with influenza B (Table 1). The remaining 9 influenza-positive cases were A not subtyped. A(H1N1)pdm09 was the dominant subtype among case-patients during the 2015–2016 and 2018–2019 seasons. Influenza A(H3N2) was dominant during 2016–2017 season and influenza B during the 2014–2015 and 2017–2018 seasons. We noted a substantial contribution from influenza A(H3N2) infection during the influenza B-dominant 2017–2018 season (Figure 1, Table 1).

Among the confirmed influenza cases, regardless of type and subtype, 552 (41.7%) were hospitalized SARI cases and 771 (58.3%) were outpatients with ILI. From the bivariate analysis, extreme age and comorbidity were identified in a significantly higher proportion of the hospitalized SARI cases than among the ILI ambulatory patients: 24.4% versus 6.5% for age under 2 years; 17.2% versus 5.7% for age ≥ 65 years; 10.9% versus

3.9% for diabetes; 14.5% versus 3.4% for asthma or chronic respiratory disease; 7.4% versus 2.5% for chronic heart disease; 3.3% versus 0.6% for chronic renal failure; 1.8% versus 0.1% for chronic neurologic disease; 2.2% versus 0.0% for chronic hematologic disease and 14.5% versus 2.6% for pregnancy (Table 1). Considering the distribution of virus types and subtypes according to clinical syndrome, we found significantly higher proportions of A (H1N1)pdm09 in SARI cases and of A(H3N2) and B in ILI cases ($P = 10^{-6}$). The proportion of patients with cases in the surrounding area was significantly higher in ILI cases, than in SARI cases (33.7% versus 9.2%) (Table 2).

The main risk factors considered in the bivariate analysis were found in the multivariable analysis by logistic regression to be significantly associated with influenza-related hospitalization (SARI): age under 2 years (aOR = 7.08, 95% CI: 4.72–10.63, $P < 0.001$); age of 65 years and more (aOR = 3.59, 95% CI: 2.29–5.67, $P < 0.001$); diabetes (aOR = 1.98, 95% CI: 1.13–3.49, $P = 0.017$); obesity (aOR = 2.94, 95% CI: 1.08–7.99, $P = 0.034$); asthma or chronic respiratory disease (aOR = 4.99, 95% CI: 2.97–8.38, $P < 0.001$); chronic renal failure (aOR = 4.74, 95% CI = 1.59–14.04, $P = 0.005$); chronic neurological disease (aOR = 10.48, 95% CI: 1.24–88.58, $P = 0.031$) as well as pregnancy (aOR = 7.49, 95% CI: 3.58–15.69, $P < 0.001$) (Table 2).

The A(H1N1)pdm09 subtype was a significant risk factor for influenza-positive SARI-associated hospitalization (aOR = 1.82, 95% CI: 1.39–2.38, $P < 0.001$). In contrast, the existence of cases in the surrounding area appeared to be a preventive factor (aOR = 0.22, 95% CI: 0.15–0.31, $P < 0.001$) (Table 2). Age 2–14 years, chronic heart disease and chronic hematologic disease were not statistically significant in the multivariable analysis. The model fit the data well according to the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test ($\chi^2 = 8.12$, $df = 7$, $P = 0.32$).

Discussion

At the international level and in the countries of the Eastern Mediterranean Region (17), influenza seasons have an important impact on human morbidity and mortality each year, in particular on account of the additional burden of hospital admissions each winter. The association of influenza virus types and subtypes with disease severity has been a significant research issue over the past few years, and the issue is of

Table 1 Distribution of influenza infection according to subtype and season, Morocco, 2014–2019

| Influenza subtype | Season | | | | | All |
|-------------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| | 2014/2015 | 2015/2016 | 2016/2017 | 2017/2018 | 2018/2019 | |
| | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) | No. (%) |
| A (H1N1)pdm09 | 17 (20.2) | 122 (70.9) | 0 (0.0) | 42 (16.5) | 470 (69.8) | 651 (49.2) |
| A (H3N2) | 6 (7.1) | 30 (17.4) | 84 (60.4) | 79 (31.0) | 191 (28.4) | 390 (29.5) |
| A (not subtyped) | 3 (3.6) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 0 (0.0) | 6 (0.9) | 9 (0.7) |
| B | 58 (69.0) | 20 (11.6) | 55 (39.6) | 134 (52.5) | 6 (0.9) | 273 (20.6) |
| Total | 84 (100.0) | 172 (100.0) | 139 (100.0) | 255 (100.0) | 673 (100.0) | 1323 (100.0) |

Table 2 Risk factors for hospitalization due to influenza-associated severe acute respiratory infection among 1323 positive cases and controls, 2014–2019 seasons, Morocco

| Variable | Influenza-associated SARI (n = 552) | | Influenza-associated ILI (n = 771) | | Univariate analysis | | | Multivariate analysis | | |
|---|--|------|---------------------------------------|------|---------------------|------------|---------|-----------------------|------------|---------|
| | No. | % | No. | % | Crude OR | 95% CI | P-value | Adjusted OR | 95% CI | P-value |
| Sex | | | | | | | | | | |
| Female | 282 | 51.1 | 423 | 54.9 | 0.86 | 0.69–1.07 | 0.17 | | | |
| Male | 270 | 48.9 | 348 | 45.1 | | | | | | |
| Age (years)^{a,b} | | | | | | | | | | |
| < 2 | 122 | 24.4 | 49 | 6.5 | 4.81 | 3.33–66.96 | < 0.001 | 7.08 | 4.72–10.63 | < 0.001 |
| 2–14 | 70 | 14.0 | 230 | 30.6 | 0.59 | 0.43–0.80 | < 0.001 | 0.92 | 0.65–1.29 | 0.62 |
| 15–64 | 222 | 44.4 | 429 | 57.1 | 1 | | | | | |
| ≥ 65 | 86 | 17.2 | 43 | 5.7 | 3.86 | 2.59–5.77 | < 0.001 | 3.59 | 2.29–5.67 | < 0.001 |
| Season | | | | | | | | | | |
| 2014/2015 | 39 | 7.8 | 42 | 5.6 | 1 | | | | | |
| 2015/2016 | 66 | 13.2 | 99 | 13.2 | 0.72 | 0.42–1.23 | 0.22 | | | |
| 2016/2017 | 34 | 6.8 | 101 | 13.4 | 0.36 | 0.20–0.65 | < 0.001 | | | |
| 2017/2018 | 96 | 19.2 | 146 | 19.4 | 0.71 | 0.43–1.17 | 0.18 | | | |
| 2018/2019 | 265 | 53.0 | 363 | 48.3 | 0.79 | 0.49–1.25 | 0.31 | | | |
| Flu vaccination during current season | | | | | | | | | | |
| Yes | 8 | 1.4 | 12 | 1.6 | 0.93 | 0.38–2.29 | 0.87 | | | |
| No | 544 | 98.6 | 759 | 98.4 | | | | | | |
| Existence of cases in the surrounding area | | | | | | | | | | |
| Yes | 51 | 9.2 | 260 | 33.7 | 0.20 | 0.14–0.28 | < 0.001 | 0.22 | 0.15–0.31 | < 0.001 |
| No | 501 | 90.8 | 511 | 66.3 | | | | | | |
| Diabetes | | | | | | | | | | |
| Yes | 60 | 10.9 | 30 | 3.9 | 3.01 | 1.92–4.74 | < 0.001 | 1.98 | 1.13–3.49 | 0.017 |
| No | 492 | 89.1 | 741 | 96.1 | | | | | | |
| Obesity | | | | | | | | | | |
| Yes | 24 | 4.3 | 8 | 1.0 | 4.34 | 1.93–9.72 | < 0.001 | 2.94 | 1.68–7.99 | 0.034 |
| No | 528 | 95.7 | 763 | 99.0 | | | | | | |
| Asthma or chronic respiratory disease | | | | | | | | | | |
| Yes | 80 | 14.5 | 26 | 3.4 | 4.86 | 3.07–7.67 | < 0.001 | 4.99 | 2.97–8.38 | < 0.001 |
| No | 472 | 85.5 | 745 | 96.6 | | | | | | |
| Chronic heart disease | | | | | | | | | | |
| Yes | 41 | 7.4 | 19 | 2.5 | 3.18 | 1.82–5.53 | < 0.001 | | | |
| No | 511 | 92.6 | 752 | 97.5 | | | | | | |

Table 2 Risk factors for hospitalization due to influenza-associated severe acute respiratory infection among 133 positive cases and controls, 2014–2019 seasons, Morocco (continued)

| Variable | Influenza-associated SARI (n = 552) | | Influenza-associated ILI (n = 771) | | Univariate analysis | | | Multivariate analysis | | |
|---|-------------------------------------|------|------------------------------------|-------|---------------------|-------------|----------------------|-----------------------|------------|---------|
| | No. | % | No. | % | Crude OR | 95% CI | P-value | Adjusted OR | 95% CI | P-value |
| Chronic renal failure | | | | | | | | | | |
| Yes | 18 | 3.3 | 5 | 0.6 | | | | | | |
| No | 534 | 96.7 | 766 | 99.4 | 5.16 | 1.91–13.99 | < 0.001 | 4.74 | 1.59–14.04 | 0.005 |
| Chronic neurological disease | | | | | | | | | | |
| Yes | 10 | 1.8 | 1 | 0.1 | | | | | | |
| No | 542 | 98.2 | 770 | 99.9 | 14.21 | 1.81–111.31 | 0.001 ^c | 10.48 | 1.24–88.58 | 10.03 |
| Chronic haematologic disease | | | | | | | | | | |
| Yes | 12 | 2.2 | 0 | 0.0 | | | | | | |
| No | 540 | 97.8 | 771 | 100.0 | Undefined | Undefined | < 0.001 ^c | | | |
| Pregnancy^d | | | | | | | | | | |
| Yes | 41 | 14.5 | 11 | 2.6 | | | | | | |
| No | 241 | 85.5 | 412 | 97.4 | 6.37 | 3.21–12.63 | < 0.001 | 7.49 | 3.58–15.69 | < 0.001 |
| Influenza virus type and subtype^e | | | | | | | | | | |
| A (H1N1) | 319 | 58.7 | 332 | 43.1 | | | | | | |
| A(H3N2)/B | 224 | 41.3 | 439 | 56.9 | 1.89 | 1.51–2.35 | < 0.001 | 1.82 | 1.39–2.38 | < 0.001 |

^aMissing values excluded from data analysis.

^b $\chi^2 = 152.43$, df = 3.

^cFisher's exact test.

^dOnly female cases.

^eAll not subtyped cases excluded.

considerable importance from a clinical and public health perspective, considering its implications for influenza patient management, population vaccination, communication and preparedness for a seasonal epidemic. Indeed, the severity of an influenza season varies from year to year depending on factors such as vaccination efficacy, early administration of antiviral drugs and the circulating influenza strain.

This hypothesis has been examined in several studies, however, these were not comparable in terms of study setting and design, populations studied, sample size, clinical presentation, influenza viruses compared, and consideration for potential confounders. The 2009 H1N1 pandemic suggested that influenza A/H1N1pdm09 (A/H1) may have more severe clinical impacts than other seasonal influenzas and was more severe in the younger age group (18). This evidence has been the subject of critical discussion in the post-pandemic years as study findings on the severity of epidemics by type and subtype of influenza virus have varied widely. Some studies have suggested that influenza A(H1N1)pdm09 led to relatively more severe outcomes compared to other types and subtypes (19,20). Others have reported no statistically significant differences in case-fatality rates and other markers of severity by type and subtype (21,22) or have shown that the risk for serious outcomes was increased in hospitalized patients infected with influenza A(H3N2) (23,24).

In Morocco, this question was of great concern during the 2018/2019 season, where influenza A(H1N1)pdm09 predominated, as was the case in many parts of the world. Following the death of an A(H1N1)pdm09 infected pregnant woman, a fierce social media campaign ensued around the theme of the severity of the circulating A(H1N1)pdm09 subtype and resulted in general panic among the Moroccan population leading to an overload of both hospital and ambulatory health services. In this context, the country's health authorities were required to provide answers to incessant questions around the severity of the influenza season through the social, political and parliamentary organizations.

Our findings, based on the analysis of data provided by the Morocco sentinel virological influenza surveillance system

over 5 seasons, suggested that influenza A/H1N1pdm09 (A/H1) may have more severe clinical impacts than other seasonal influenza types. The sizeable peak in the 2018/2019 season according to established epidemic thresholds in Morocco was certainly due to the rush among the population to access health services (13). However, the predominance of A(H1N1)pdm09 may have contributed considerably because of the increased transmissibility and severity of this circulating strain (Figure 1, Table 2).

The vast majority of patients have mild influenza during seasonal peaks. However, other patients with specific risk factors develop SARI and require hospitalization due to respiratory distress or a complication of an underlying chronic disease (25). Thus, we usually observe an increase in the number of cases of acute asthma (26), acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (27), decompensation of metabolic diseases such as diabetes (28), heart disease (29) or others (30), as well as an increase in hospitalizations of those at the extremes of age (infants and the elderly) (31) and pregnant women (32). Asthma is often debated as a risk factor for severe influenza, but it is instead considered as a risk factor for hospitalization rather than severe outcome.

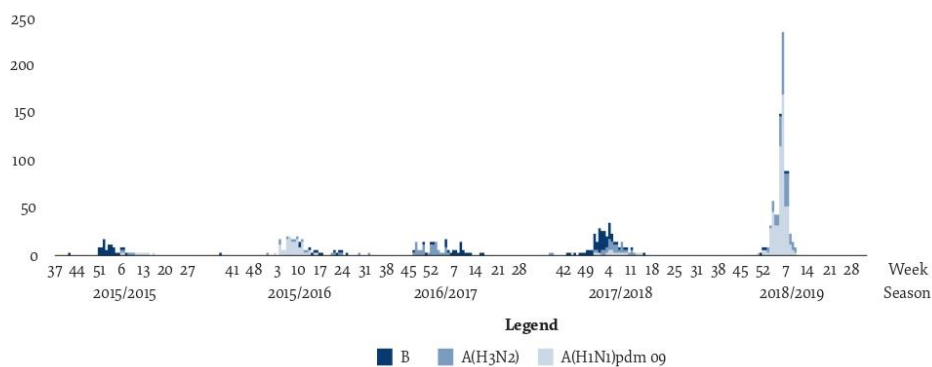
Considering that high-risk groups for influenza-associated acute respiratory infection have not been well defined in the low- and middle-income countries, in 2012 the WHO Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE) proposed specific recommendations based on a comprehensive review of the influenza disease burden, vaccine performance and safety in populations, incorporating available data from low- and middle-income country settings. The SAGE recommended pregnant women, healthcare workers, children aged 6–59 months, the elderly and those with specific chronic medical conditions to be targeted by national influenza vaccination programmes (8).

Available research on risk factors for a severe outcome of influenza were conducted in different settings, designs and sample sizes. They may be of distinct scientific value, yet their results are generally consistent with the WHO recommendations concerning groups at high risk of contracting influenza (8). They assess the association of risk factors with either hospitalization (versus non-hospitalization) for community-based studies (33) or with severe pneumonia (versus non-severe pneumonia) for hospital based studies (34). These studies were carried out in developed countries and used a structured community and hospital health database that included information on clinic visits or hospital admissions. Diagnosis of cases and comorbidities were recorded based on the International Classification of Diseases, 10th revision (ICD 10) codes. There is limited information on risk groups in low- and middle-income countries. In this context, cases identification was based on the WHO case definition of SARI and ILI as usually the study data were provided by sentinel influenza surveillance systems established as recommended by the WHO (34).

Our study falls into this second category, usually designed as a retrospective observational study. Assuming that the sampling method was randomized for both SARI cases in hospitals and ILI outpatients in primary health centres, we could have considered such studies as a powerful tool that could provide evidence to suggest causality as well as information regarding the strength of an association between the disease and the risk factors.

In addition to A(H1N1)pdm09 subtype, extreme ages (the elderly and infants) and major comorbidities such as diabetes, asthma or chronic respiratory disease, chronic renal failure, chronic neurological disease and pregnancy are strongly associated with hospitalization for SARI due to influenza virus in the multivariable analysis. Having chronic heart disease was strongly associated with hospitalization for influenza in the bivariate analysis (OR = 3.18) but this association became non-significant in the multivariable analysis by logistic regression

Figure 1 Number of positive influenza samples (severe acute respiratory illness and influenza-like illness) by type and subtype, Morocco, 2014–2019



(Table 2). A confounding effect could explain this since chronic heart disease and age ≥ 65 years are strongly associated. The presence of cases in the surrounding area (OR = 0.21) was found statistically significantly associated with mild influenza seen in outpatient settings due probably to the predominance of transmission at younger ages in schools and workplaces as well as within the family and among friends (Table 2).

Our study had some limitations. We could not authenticate the quality of the data since the International Classification of Diseases is still not used in Morocco. The analytical study design with a comparative group recruited from primary health centres may be less scientifically robust than studies carried out in hospitals in developed countries with well-established severity scores. Sentinel influenza surveillance is based on an urban environment in Morocco. Thus, our results cannot be generalized to the whole country, especially the rural

and Saharan regions. In spite of these limitations, we were able to provide reasonable estimates of risk factors for influenza-associated SARI hospitalization, thus enabling the appreciation of influenza as an important public health concern in Morocco in the context of limited information as well as low vaccination uptake and antiviral medicine use.

Conclusion

The evaluation in Morocco of the risk factors for hospitalization of severe influenza over 5 seasons once again provides epidemiological evidence regarding the expected benefits of an influenza vaccination strategy for the high risk groups as recommended by the WHO. The observed severity of influenza during the seasons, where the A (H1N1) subtype was predominant, reinforces this recommendation.

Acknowledgement

We wish to acknowledge the vital support we received from all active members of the virological influenza surveillance network of the epidemiology, laboratory, clinical and administrative staff at both hospital and ambulatory sentinel sites. We extend our gratitude to the Pandemic Influenza Preparedness (PIP) Framework for laboratory and surveillance strengthening and the US CDC Influenza Reagent Resource for their support for the influenza surveillance in Morocco

Funding: This study was supported by the US CDC Influenza Reagent Resource under grant No. U5IP000848-05.

Competing interests: None declared.

Facteurs associés aux cas d'hospitalisation pour la grippe saisonnière au Maroc

Résumé

Contexte : Le Maroc s'emploie activement à élargir sa politique de vaccination antigrippale afin d'inclure les groupes à haut risque, conformément aux recommandations de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS).

Objectifs : Nous avons évalué les facteurs de risque d'hospitalisation liée à la grippe pour les infections respiratoires aiguës sévères (IRAS) survenues au cours des cinq dernières saisons.

Méthodes : Nous avons mené une étude analytique rétrospective auprès de patients recrutés dans les sites ambulatoires et les hôpitaux faisant partie du système de surveillance sentinelle de la grippe au Maroc entre 2014 et 2019. À l'aide de la régression logistique multiple, nous avons comparé les caractéristiques des patients positifs à la grippe et atteints d'une IRAS à celles des patients ayant un syndrome de type grippal (STG) afin d'identifier les facteurs associés à une forme grave de la maladie.

Résultats : Nous avons inclus 1323 patients positifs à la grippe présentant soit une IRAS (41,7 %) soit un diagnostic de STG (58,3 %). Les virus de la grippe A(H1N1)pdm09, A(H3N2) et B, représentaient respectivement 49,2 %, 29,5 % et 20,6 % des cas. Les principaux facteurs de risque pris en compte dans l'analyse bivariée se sont avérés, dans l'analyse multivariée, être significativement associés aux cas d'hospitalisation liés à la grippe (IRAS) : âge < 2 ans (ORa = 7,08, $p < 0,001$) ; âge ≥ 65 ans (ORa = 3,59, $p < 0,001$) ; diabète (ORa = 1,98, $p = 0,017$) ; obésité (ORa = 2,94, $p = 0,034$) ; asthme ou maladie respiratoire chronique (ORa = 4,99, $p < 0,001$) ; insuffisance rénale chronique (ORa = 4,74, $p = 0,005$) ; grossesse (ORa = 7,49, $p < 0,001$) ; et sous-type A(H1N1)pdm09 (ORa = 1,82, $p < 0,001$).

Conclusion : La présente étude fournit des données épidémiologiques sur les avantages escomptés d'une stratégie de vaccination antigrippale destinée aux groupes à haut risque, conformément aux recommandations de l'OMS.

العوامل المرتبطة بالإدخال إلى المستشفى بسبب الإنفلونزا الموسمية في المغرب

هند الزين، زكية زركاكي، عماد الشراوي، مريم الناصري، عبد الكريم الفيلاي-ملطوف، أحمد ركيك، سمية تريكي، أمجد الخولي، عبد الرحمن بيموهان، فاطمة فلكي، حسن إيهاماد، تورية بن عمار، هشام أومزيل، محمد يوي

الخلاصة

الخلفية: يعمل المغرب بفعالية على توسيع نطاق سياسته المعنية بلقاح الإنفلونزا ليغطي الفئات المعرضة لخطر شديد، على النحو الذي أوصت به منظمة الصحة العالمية.

الأهداف: هدفت هذه الدراسة إلى تقييم عوامل خطر الإدخال إلى المستشفى المرتبط بالإنفلونزا بالنسبة لحالات العدوى التنفسية الحادة الوخيمة التي حدثت خلال المواسم الخمسة الماضية.

طرق البحث: أجرينا دراسة استيعادية تحليلية بين المرضى في المواقع الإسعافية والمستشفيات التابعة لنظام الترصد المخفري للإنفلونزا في المغرب في الفترة بين عامي 2014 و2019. وباستخدام الانحدار اللوجستي المتعدد، عقدنا مقارنة بين خصائص المرضى الإيجابيين للإنفلونزا المصابين بالعدوى التنفسية الحادة الوخيمة، وأولئك المصابين باعتلال شبيه بالإنفلونزا، لتحديد العوامل المرتبطة بالمرض الوخيم.

النتائج: أدرجنا 1323 مريضاً إيجابياً للإنفلونزا من المصابين إما بعدوى تنفسية حادة وخيمة (41.7%) أو اعتلال شبيه بالإنفلونزا (58.3%). وساهمت أنماط الإنفلونزا pdm09 (A(H3N2)، A(H1N1))، و B بنسبة 49.2%، و 29.5%، و 20.6% من الحالات، على التوالي. وتبين في التحليل المتعدد المتغيرات أن عوامل الخطر الرئيسية التي أخذت بعين الاعتبار في التحليل ذي المتغيرين كانت مرتبطة ارتباطاً كبيراً بالإدخال إلى المستشفى المرتبط بالإنفلونزا (العدوى التنفسية الحادة الوخيمة): العمر > عامين (نسبة الأرجحية المعدلة = 7.08، القيمة الاحتمالية > 0.001)؛ العمر ≤ 65 عاماً (نسبة الأرجحية المعدلة = 3.59، القيمة الاحتمالية > 0.001)؛ السكرى (نسبة الأرجحية المعدلة = 1.98، القيمة الاحتمالية = 0.017)؛ السمنة (نسبة الأرجحية المعدلة = 2.94، القيمة الاحتمالية = 0.034)؛ الربو أو مرض تنفسي مزمن (نسبة الأرجحية المعدلة = 4.99، القيمة الاحتمالية > 0.001)؛ الفشل الكلوي المزمن (نسبة الأرجحية المعدلة = 4.74، القيمة الاحتمالية = 0.005)؛ الحمل (نسبة الأرجحية المعدلة = 7.49، القيمة الاحتمالية > 0.001)؛ والنمط الفرعي A(H1N1)pdm09 (نسبة الأرجحية المعدلة = 1.82، القيمة الاحتمالية > 0.001).

الاستنتاجات: تقدم هذه الدراسة دلائل وبائية عن المنافع المتوقعة من استراتيجية التطعيم ضد الإنفلونزا للفئات المعرضة لخطر شديد، على النحو الذي أوصت به منظمة الصحة العالمية.

References

1. Influenza (Seasonal) fact sheet. Geneva: World Health Organization; 2018 ([https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)), accessed 30 March 2023).
2. Influenza seasonal. Geneva: World Health Organization; 2023 (https://www.who.int/ith/diseases/si_iAh1n1/en/, accessed 30 March 2023).
3. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018 Mar 31;391(10127):1285–300. doi:10.1016/S0140-6736(17)33293-2
4. Keech M, Scott AJ, Ryan PJ. The impact of influenza and influenza-like illness on productivity and health care resource utilization in a working population. *Occup Med (Lond)*. 1998 Feb;48(2):85–90. doi:10.1093/occmed/48.2.85
5. Twenty-second World Health Assembly: Boston, Massachusetts, 8–25 July 1969: Part I: Resolutions and decisions: annexes. Geneva: World Health Organization; 1969.
6. Forty-eighth World Health Assembly Geneva, 1–12 May 1995. Resolutions and decisions annexes. Geneva: World Health Organization; 1995.
7. Prevention and control of influenza pandemics and annual epidemics WHA56.19. Geneva: World Health Organization; 2003.
8. World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2012—conclusions and recommendations. *Weekly Epidemiological Record (WER)*. 2012; 87(21):201–16.
9. Kurinczuk JJ, Nicholson KG. Uptake of influenza vaccination by patients with serious cardiac disease. *BMJ*. 1989 Aug 5;299(6695):367. doi:10.1136/bmj.299.6695.367
10. Nicholson KG, Wiselka MJ, May A. Influenza vaccination of the elderly: perceptions and policies of general practitioners and outcome of the 1985–86 immunization program in Trent, UK. *Vaccine*. 1987 Dec;5(4):302–6. doi:10.1016/0264-410x(87)90156-3
11. Lennox IM, Macphee GJA, Mc Alpine CH, Cameron SO, Leask BGS, Somerville RG. Use of influenza vaccine in long-stay geriatric units. *Age Ageing*. 1990; 19(3):169–72. doi:10.1093/ageing/19.3.169

12. Barakat A, Ithazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M, El Aouad R. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996–2009. *PLoS One*. 2011; 6(9):1–7. doi:10.1371/journal.pone.0024579
13. Rguig A, Cherkaoui I, McCarron M, Oumzil H et al. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco. *BMC Public Health*. 2020; 20(1029): 1–11. doi:10.1186/s12889-020-09145-y
14. WHO surveillance case definitions for ILI and SARI. Geneva: World Health Organization; 2014 (https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/who_ili_sari_case_definitions_2014.pdf, accessed 27 March 2023).
15. Ministerial circular no.°24/DELM/SSE and no.°25/DELM/SSE. Rabat: Ministry of Health; 2019.
16. Dendane T, Cherkaoui I, Elmassaoudi I, Oumzil H, Belayachi J, Madani N, et al. Severe acute respiratory infections of viral origin in Moroccan medical ICU: incidence and prognostic factors. In: Proceedings of Réanimation 2018, the French Intensive Care Society International Congress. *Ann Intensive Care*. 2018;8(Suppl. 1):P-51
17. Elhakim M, Rasooly MH, Fahim M, Sheikh Ali S, Haddad N, Cherkaoui I, et al. Epidemiology of severe cases of influenza and other acute respiratory infections in the Eastern Mediterranean Region, July 2016 to June 2018. *J Infect Public Health*. 2020; 13(3):423–9. doi:10.1016/j.jiph.2019.06.009
18. Reed C, Chaves SS, Perez A, D'Mello T, Daily Kirley P, Aragon D, et al. Complications among adults hospitalized with influenza: a comparison of seasonal influenza and the 2009 H1N1 pandemic. *Clin Infect Dis*. 2014 Jul 15;59(2):166–74. doi:10.1093/cid/ciu28
19. Bonmarin I, Belchior E, Bergounioux J, Brun-Buisson C, Mégarbane B, Chappert JL, et al. Intensive care unit surveillance of influenza infection in France: the 2009/10 pandemic and the three subsequent seasons. *Euro Surveill*. 2015; 20(46):1–10. doi:10.2807/1560-7917.ES.2015.20.46.30066
20. Boddington NL, Verlander NQ, Pebody RG. Developing a system to estimate the severity of influenza infection in England: findings from a hospital-based surveillance system between 2010/2011 and 2014/2015. *Epidemiol Infect*. 2017; 145(7):1461–70. doi:10.1017/S095026881700005X
21. Gutiérrez-Pizarra A, Pérez-Romero P, Alvarez R, Aydllo TA, Osorio-Gómez G, Milara-Ibáñez C, et al. Unexpected severity of cases of influenza B infection in patients that required hospitalization during the first postpandemic wave. *J Infect*. 2012; 65(5):423–30. doi:10.1016/j.jinf.2012.07.004
22. Gubbels S, Krause TG, Bragstad K, Perner A, Mølbak K, Glismann S. Burden and characteristics of influenza A and B in Danish intensive care units during the 2009/10 and 2010/11 influenza seasons. *Epidemiol Infect*. 2012; 141(4):1–9. doi:10.1017/S0950268812001471
23. Kaji M, Watanabe A, Aizawa H. Differences in clinical features between influenza A H1N1, A H3N2, and B in adult patients. *Respirology*. 2003; 8(2):231–3. doi:10.1046/j.1440-1843.2003.00457.x
24. Esposito S, Molteni CG, Daleno C, Valzano A, Fossali E, Da Dalt L, et al. Clinical and socioeconomic impact of different types and subtypes of seasonal influenza viruses in children during influenza seasons 2007/2008 and 2008/2009. *BMC Infect Dis*. 2011; 11(271):1–9. doi:10.1186/1471-2334-11-271
25. Thomas RE. Do we have enough evidence how seasonal influenza is transmitted and can be prevented in hospitals to implement a comprehensive policy? *Vaccine*. 2016; 34(27):3014–21. doi:10.1016/j.vaccine.2016.04.096
26. Kurai D, Saraya T, Ishii H and Takizawa H. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. *Front Microbiol*. 2013 Oct 14;4:293. doi:10.3389/fmicb.2013.00293
27. Donaldson GC, Wedzicha JA. The causes and consequences of seasonal variation in COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014; 9: 1101–10. doi:10.2147/COPD.S54475
28. Yende S, van der Poll T, Lee M, Huang DT, Newman AB, Kong L, et al. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicenter cohort studies. *Thorax*. 2010 October; 65(10): 870–7. doi:10.1136/thx.2010.136317
29. Boari B, Mari E, Gallerani M, Fabbian F, Pala M, Tiseo R et al. Temporal variation of heart failure hospitalization: does it exist? *Rev Cardiovasc Med*. 2011;12(4):211–8. doi:10.3909/ricm0579
30. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med*. 2008; 121(4):258–64. doi:10.1016/j.amjmed.2007.10.040
31. Fiore AE, Uyeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA, et al. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendation of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) 2010. *MMWR Recomm Rep*. 2010 Aug 6;59(RR-8):1–62. Erratum in: *MMWR Recomm Rep*. 2010 Aug 13;59(31):993. Erratum in: *MMWR Recomm Rep*. 2010 Sep 10;59(35):1147
32. Anselem O, Floret D, Tsatsaris V, Goffinet F, Launay O. Grippe au cours de la grossesse [Influenza infection and pregnancy]. *Presse Med*. 2013 Nov;42(11):1453–60. French. doi:10.1016/j.lpm.2013.01.064
33. Ono S, Ono Y, Matsui H and Yasunaga H. Factors associated with hospitalization for seasonal influenza in a Japanese nonelderly cohort. *BMC Public Health*. 2016; 16(922):1–8. doi:10.1186/s12889-016-3602-z
34. Zou Q, Zheng S, Wang X, Liu S, Bao J, Yu F, et al. Influenza A-associated severe pneumonia in hospitalized patients: Risk factors and NAI treatments. *Int J Infect Dis*. 2020 Mar;92:208–13. doi:10.1016/j.ijid.2020.01.017

Research



Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons

Hind Ezzine, Imad Cherkaoui, Ahmed Rguig, Hicham Oumzil, Mouad Mrabet, Abderrahman Bimouhen, Fatima El Falaki, Zakia Regragui, Zineb Tarhda, Mohammed Youbi, Mariam Naciri

Corresponding author: Hind Ezzine, Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco. hindezzine3@gmail.com

Received: 09 Dec 2019 - **Accepted:** 02 Feb 2020 - **Published:** 07 Jul 2020

Keywords: Influenza positivity rate, influenza risk factor, influenza-like illness, severe acute respiratory infections, co-morbidity

Copyright: Hind Ezzine et al. Pan African Medical Journal (ISSN: 1937-8688). This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution International 4.0 License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this article: Hind Ezzine et al. Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. Pan African Medical Journal. 2020;36(159). 10.11604/pamj.2020.36.159.21239

Available online at: <https://www.panafrican-med-journal.com//content/article/36/159/full>

Influenza epidemiology and risk factors for severe acute respiratory infection in Morocco during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons

Hind Ezzine^{1,2,&}, Imad Cherkaoui¹, Ahmed Rguig¹, Hicham Oumzil³, Mouad Mrabet¹, Abderrahman Bimouhen³, Fatima El Falaki³, Zakia Regragui³, Zineb Tarhda¹, Mohammed Youbi¹, Mariam Naciri²

¹Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco, ²Research Center (BIOBIO), Laboratory of Biodiversity, Ecology and Genome, Faculty of Sciences, University Mohammed V of Rabat, Morocco, ³National Influenza Center, National Institute of Hygiene, Ministry of Health, Morocco

&Corresponding author

Hind Ezzine, Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, Morocco

Abstract

Introduction: in order to implement an influenza vaccination program for high-risk-groups in Morocco, as recommended by the World Health Organization, an epidemiological study indicating the influenza virus effect in the development of complicated influenza for subjects with co-morbidity was required. The present study aims to evaluate the risk factors for severe acute respiratory infections caused by influenza in risk groups. **Methods:** this research is based on the epidemiological and virological surveillance data of severe acute respiratory infections and influenza-like illness during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. It was realized using a retrospective series study with a descriptive and analytical purpose. **Results:** the over-recruitment of pediatric cases with a severe acute respiratory infection has been significantly rectified because cases of severe acute respiratory infections under 15 years old in the 2017/2018 season represent only 57.9%, whereas they represented 75.9% of the total cases of severe acute respiratory infections during the 2016/2017 season. The influenza positivity rate has increased globally and specifically by age group, clinical service and co-morbidity. The risk factors considered were significantly associated with hospitalization for influenza-associated severe acute respiratory infections. The multivariate logistic regression analysis considers male sex (OR=2.1), age ≥ 65 years (OR=5.4), presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1), diabetes (OR=7.5) and chronic respiratory disease (OR=10.9) as risk factors influenza-associated severe acute respiratory infections. **Conclusion:** the risk assessment of influenza-associated severe acute respiratory infections in high-risk groups revealed national epidemiological findings, particularly for diabetics and the elderly. An influenza vaccination program for these high-risk-groups becomes much recommended in Morocco.

Introduction

The seasonal influenza is an acute viral infection of the respiratory tract with high contagious effects. Both type A and B influenza viruses are responsible for seasonal epidemics of clinical influenza [1] which progress as Influenza-like illness (ILI), generally benign. Hence, in terms of morbidity, mortality and social costs, they impose a huge burden [2]. Hospitalization and deaths mainly occur in high-risk-groups due to severe acute respiratory infections (SARI). The seasonal epidemics affect about 9% of the world population each year [3] and cause about 3 to 5 million cases of serious diseases. Six hundred and fifty thousand deaths annually are associated with respiratory diseases caused by seasonal influenza [4]. Since the 1960s, the World Health Organization (WHO) has produced numerous resolutions and recommendations to take into account the morbidity and mortality burden of seasonal influenza epidemics. It also invited the member states to strengthen active influenza surveillance and vaccination programs, particularly for specific risk groups [5-8]. However, many countries around the world continue to have low immunization rates due to skepticism about the vaccine's efficacy [9-11]. The Moroccan sentinel system for epidemiological and virological surveillance of SARI and ILI was implemented in 2007 as part of the pandemic influenza response with the support of the Centers for Disease Control and Prevention of Atlanta, United States of America (US-CDC) [12].

Then, in 2014, it was redeployed in eight hospital and ambulatory sentinel sites. In 2013, the Moroccan Ministry of Health, responding to the recommendations of the WHO-SAGE committee concerning the influenza vaccination of risk groups [8], established a cooperation agreement with the US-CDC in order to extend the influenza vaccination to other risk groups in addition to health personnel. This project aims to conduct epidemiological and operational studies in order to demonstrate, to the national immunization technical advisory group (national technical and

scientific advisory vaccination committee), the relevance of the influenza vaccination strategy [13]. Thus, the Moroccan Ministry of Health established in 2015 a prevention and control program for SARI and ILI, which expressed its information and monitoring needs. The evaluation of the surveillance system data collected during the 2015/2016 season revealed an over-recruitment bias in cases of pediatric SARI at sentinel hospital sites. 59.3% of the total cases of SARI recruited during this season are less than 4 years old [14]. Hence, many activities have been planned and carried out during the 2017/2018 season to rectify the recruitment bias observed at sentinel hospital sites in the previous season. In the present study, the results of epidemiological and virological surveillance of SARI and ILI in the 2016/2017 season were compared with those of the 2017/2018 season and the risk factors for influenza-associated SARI hospitalization were evaluated whatever the type of influenza viruses identified in confirmed influenza cases during the two seasons.

Methods

Type of study: in this research, we have used a retrospective case series study with descriptive and analytical purpose.

Study sample: the case series includes cases of SARI and ILI collected as part of the epidemiological and virological surveillance that was implemented by the Moroccan Ministry of Health during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons. The definition of ILI and SARI cases is the same as that used in the surveillance system which was updated in 2014 by the Ministry of Health [15] according to WHO's definitions [16].

Severe acute respiratory infection: this is a person suffering from an acute respiratory infection that includes: fever or a history of fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; beginning of the disease in the last ten days; and which requires hospitalization. According to clinicians in sentinel hospitals, some patients may not develop a fever even if they have a viral infection due to metabolic and immune disorders.

Therefore, some cases of SARI with co-morbidity were considered for recruitment purposes as meeting the case definition despite the absence of fever.

Cases of ILI: it is an acute respiratory infection that includes: measured fever $\geq 38^{\circ}\text{C}$; cough; and the beginning of the disease in the last ten days.

Study sites: eight public ambulatory and hospital sentinel sites: Rabat, Tangiers, Fez, Marrakech, Meknes, Beni Mellal, Oujda and Agadir and the private ambulatory network of medical practitioners were included in this study.

Data collection: the cases of SARI were collected by realizing a nasal and pharyngeal sampling immediately after admission to pediatric, pulmonary, medical and emergency wards or intensive care units as well as to the maternity wards of the sentinel hospital sites. The cases of ILI were collected in sentinel health centers. A questionnaire was successfully completed with patient identification data, clinical data, epidemiological data including vaccination, notion of travel and similar cases in the surroundings; results of virological analysis and information on the patient's evolution, particularly his death during hospitalization.

Sample analysis: the samples were sent to the National Influenza Center at the National Institute of Hygiene (CNR-INH) and analyzed on the same day using the real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) method. A dynamic web application has been implemented for entering data from questionnaires of SARI and ILI cases, managing these data and reporting results back to sentinel sites.

Statistical analysis: data collected from the questionnaires of SARI and ILI cases were extracted as an Excel file from the web application. The statistical analysis was carried out using the Epi-Info 7 and SPSS software in 2 phases: 1°) a descriptive phase of epidemiological and virological surveillance data of SARI and ILI cases; 2°) an

analytical phase (bivariate and multivariate analysis by logistic regression) in order to identify the risk factors of influenza-associated SARI whatever the type of influenza viruses identified. Only the cases of influenza confirmed by the laboratory during the two influenza seasons 2016/2017 and 2017/2018 were included in this analysis. The variable of interest in this study was the hospitalization due to the development of an influenza-associated SARI. The explicative variables studied were the potential risk factors related to personal socio-demographic characteristics, epidemiological context and the presence of co-morbidity. The statistical significance level was fixed at 5%.

Results

A total of 2622 patients were recruited during the two seasons. In 2016/2017 season, 1359 samples were collected and 1263 samples in 2017/2018 season (Figure 1). The proportion of SARI increased from one season to the other from 51.8% (n=704) to 64.8% (n=819). As shown in Figure 2, the proportion of SARI under 15 years old in the 2017/2018 season was 57.9%, while it represented 75.9% of the total number of SARI recruited during the 2016/2017 season. In Table 1, it is noted that the increase in recruitment of non-pediatric SARI cases has mainly concerned pulmonology, medicine and emergency wards as well as intensive care units. Similarly, the recruitment of SARI with co-morbidity has also increased from one season to the other, as shown in Table 2. According to the case definition used for recruitment, fever, cough and the beginning of signs within ten days were found in respectively 89.1%, 91.5% and 90.7% of SARI cases and in respectively 98.0%, 95.6% and 98.0% of ILI cases when both seasons' cases were considered. The overall positivity rate is statistically higher during the 2017/2018 season compared to the 2016/2017 season (respectively 20.1% versus 10.4%, $p < 10^{-6}$). This increase is also individually observed for ILI and SARI as illustrated in Figure 1. The specific positivity rate per co-morbidity has also increased significantly, reaching values higher than 6% of the global positivity during the 2017/2018

season, particularly for diabetes, asthma and chronic respiratory disease.

The participation of pregnant women remained very low during both seasons, as shown in Table 2, with recruitment of 9 and 5 pregnancy cases respectively. Figure 3 and Figure 4 illustrate that during the two seasons, the age range of 65 years and over in SARI cases and 5-15 years in ILI cases had the highest positivity rates with 20.7% and 36.0% respectively. The analysis of hospitalization risk factors for influenza-associated SARI was conducted on a sample of 381 influenza positive cases whatever clinical syndrome during the two seasons (except for pregnancy where only 198 female cases were considered). The risk factors considered in the bivariate analysis as shown in Table 3 and found significantly associated with hospitalization caused by influenza-associated SARI, included male sex (OR=2.2), age >65 years (OR=10.6), presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1), diabetes (OR=8.8), asthma (OR=10.1), chronic respiratory disease (OR=17.7), chronic heart disease (OR=4.2), chronic renal failure (OR=12.2) and chronic hematological disease (OR indeterminate). The multivariate analysis by logistic regression after adjustment for all previous risk factors, retained in the final model the male sex (OR=2.1 with CI 95%=[1.3-3.5] and $p=0.005$), age ≥ 65 years (OR=5.4 with CI 95%=[1.9-15.6] and $p=0.002$), the presence of influenza cases in the surroundings (OR=0.1 with CI 95%=[0.05-0.3] and $p < 10^{-3}$), diabetes (OR=7.5 with CI 95%=[1.7-32.8] and $p=0.007$) and chronic respiratory disease (OR=10.9 with CI 95%=[2.0-58.4] and $p=0.005$). These results are summarized in Table 4.

Discussion

Since 2006, in response to the pandemic risk, several international and governmental institutions, such as WHO and US-CDC, have invested in partnership with African countries to develop their epidemiological surveillance and laboratory diagnostic capacities in the field of influenza. In 2009, the African network for influenza surveillance and epidemiology (ANISE),

involving more than 30 African countries, was deployed to generate and disseminate data on influenza morbidity and mortality in Africa [17]. Influenza surveillance data from 2006 to 2010 obtained in 15 African countries, including two North African countries, Morocco and Egypt [18], showed that 21.7% of ILI cases (5165/69860) and 10.1% of SARI cases (4427/43620) were tested positive for influenza [19]. Similar to our case series, influenza is therefore detected consistently with a higher proportion for ILI cases compared to SARI cases, which probably reflects the higher sensibility of the ILI case definition compared to the SARI case definition. However, these results are slightly higher than those reported by other resource-limited countries outside Africa such as Bangladesh where the positivity rate is only 10% for ILI cases and 6% for SARI cases [20] as well as Cambodia and Indonesia with similar results [21,22]. In the African multicenter study, the burden of respiratory diseases and influenza was highest among children less than 5 years of age, which is consistent with other studies conducted in the region [23,24].

The children are probably over-represented, which explains the low proportions of influenza infection in the older age range. The efforts made at the start and during the 2017/2018 influenza season to reactivate the sentinel system of epidemiological and virological surveillance in Morocco have successfully limited the recruitment bias of cases of pediatric, while the recruitment of ILI cases was adequately represented in each age range from one season to the other. The influenza positivity rate results obtained in 2017/2018 season, with 11.9% for SARI cases, were very close to the average of 15 African countries. However, the influenza positivity rate was 34.8% for ILI cases, which is much higher, indicating a better recruitment of ILI cases in Morocco. The risk assessment of influenza infection according to age group in the two seasons 2016/2017 and 2017/2018 has revealed that influenza infection in Morocco mainly affects SARI cases over the age of 65 with an influenza positivity rate of 20.7%. The influenza positivity rate in SARI cases under 2 years of age remains relatively low in

Morocco during the study period with 4.4%, which is consistent with the results of international [25-28] and national [29] studies showing the preponderance of other viruses such as rhinovirus and RSV in children with bronchoalveolitis.

In contrast, the 5-15 age range has the highest influenza positivity rate in ILI cases, with 36.0%, probably due to school exposure. Despite the progress in the management of serious infectious diseases, community pneumonia, which is the major clinical presentation of SARI cases, remains the primary cause of hospitalization and death in developed countries [30, 31]. The influenza virus causes about 6.5% of all cases of pneumonia [32] and up to 64% of their viral cause [33]. Available studies on the impact of influenza virus infection on morbidity and mortality in low-income countries are particularly limited, although this impact may be amplified by specific factors such as overpopulation and inadequate access to health services. However, if the vast majority of patients have benign influenza during seasonal peaks, other patients with specific risk factors will develop a severe acute respiratory infection [34]. Hence, an increase in the number of cases of acute asthma [35], acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [36], decompensating of metabolic diseases (diabetes) [37], cardiac diseases [38] or other [39-41] and an increase in hospitalizations for extreme ages (children and elderly people) [42] as well as pregnant women [43] are usually observed. This leads rapidly to an overload of admission capacities of emergency wards and intensive care units (ICUs) [44], where clinical management of this type of infection will depend mainly on the patient's condition rather than the virulence of the virus.

In bivariate analysis of our study for both seasons, the majority of co-morbidities recommended by WHO for influenza vaccination are strongly associated with the hospitalization for influenza-associated SARI whatever the type of virus identified (age ≥ 65 years, diabetes, asthma, chronic respiratory disease, chronic heart disease, chronic kidney failure and hematologic disease). The other

factors such as pregnancy and neurological disease recruited in very small numbers did not have sufficient statistical power to assess their risk. Thus, the multivariate logistic regression model retains only three risk factors after adjustment, namely age ≥ 65 years, diabetes and chronic respiratory disease. The risk associated with chronic renal failure remains at the limit of statistical significance where $p=7\%$ whereas the risk of chronic heart disease is certainly the subject of a confounding effect due to the statistical association with the presence of diabetes. It should be noted that the last two diseases are often associated in current clinical practice. These risk factors are usually found associated with hospitalization for influenza-associated SARI cases in several studies carried out in both low-income and developed countries in particular for extremes of age, diabetes, chronic respiratory diseases as asthma and HIV when the prevalence is high [45-49]. In addition, male sex is statistically strongly associated with the hospitalization for influenza-associated SARI due to the over-recruitment of women with ILI at sentinel health centers. Moreover, the presence of influenza cases in the surroundings appears to have a protective effect on the risk of hospitalization for SARI due to the fact that ambulatory subjects recruited from sentinel health centers are more exposed to the dissemination of the virus than subjects with SARI recruited in a closed hospital environment.

Conclusion

In this study, the analysis of epidemiological and virological sentinel surveillance data collected during the 2016/2017 and 2017/2018 seasons allowed us to assess the risk of hospitalization due to the occurrence of influenza-associated SARI. Consequently, this evaluation provides national epidemiological evidence, particularly for diabetics and elderly persons. As recommended by the WHO, an influenza vaccination program for these high-risk-groups is therefore highly appropriate in Morocco. Finally, in order to assess other risk

factors, particularly pregnancy, further studies should be conducted with larger samples.

What is known about this topic

- *Following a comprehensive review of the influenza disease burden, vaccine performance and safety in populations of all ages and at-risk groups, incorporating available data from low and middle-income country settings, the WHO strategic advisory group of experts (SAGE) on immunization met on 10-12 April 2012 in Geneva, Switzerland and recommended pregnant women as the most important risk group for inactivated seasonal influenza vaccination. Other risk groups to be considered, in no specific priority order were: health-care workers; children aged 6-59 months; the elderly and those with high risk conditions (Reference: WER No. 21, 2012, 87, 201-216).*

What this study adds

- *At the request of the Morocco national immunization technical advisory group (NITAG) and before the implementing of the Morocco influenza vaccination strategy targeting high risk groups as recommended by WHO, the influenza surveillance team carried out epidemiological studies based on data provided by the influenza surveillance system to produce the evidence in Morocco of the influenza vaccination benefit as done by WHO at international level.*

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Authors' contributions

EH, CI and MM designed the study, performed data analysis and interpretation of results; CI helped with data collection; OH, BA, FF, RZ assisted with access to laboratory data and interpretation of laboratory results; YM assisted with study implementation; EH, CI and TZ wrote the paper; TZ

assisted with editing of the manuscript; NM provided pedagogic support, corrected the manuscript and has given approval of the final version to be published. All the authors have read and agreed to the final manuscript.

Acknowledgments

We acknowledge support from the National Influenza Center at the National Institute of Hygiene and the Directorate of Epidemiology and Disease Control, Ministry of Health, of Morocco. We also thank Professor Maaroufi Aberrahmane for his contribution.

Tables and figures

Table 1: number of SARI cases recruited and their influenza positivity rates per clinical ward (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 2: number of SARI cases with co-morbidities sampled and their influenza positivity rate (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 3: bi-variate analysis for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Table 4: multivariate logistic regression model for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 1: influenza positivity rate by clinical syndrome (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 2: SARI cases per age range (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 3: positive rate per age range of SARI cases, all-season combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

Figure 4: positive rate per age range of ILI cases, all seasons combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

References

1. World Health Organization. **Influenza (Seasonal)**. 2018. Accessed on December 09 2019.
2. Keech M, Scott AJ, Ryan PJ. The impact of influenza and influenza-like illness on productivity and health care resource utilization in a working population. *Occup Med*. 1998;48(2): 85-90. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
3. Ghendon Y. Influenza- its impact and control. *Rapp Trimestr Statist Sanit Mond*. 1992;45(2-3): 306-311. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
4. Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, Muscatello DJ, Palekar R, Tempia S *et al*. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *The Lancet*. 2018;391(10127): 1285-1300. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
5. World Health Organization. Twenty-second World Health Assembly: Boston, Massachusetts, 8-25 July 1969: part I: resolutions and decisions: annexes. WHO. 1969. [Google Scholar](#)
6. World Health Organization. Forty-eighth World Health Assembly Geneva, 1-12 MAY 1995 resolutions and decisions annexes. WHO. 1995.
7. World Health Organization. Prevention and control of influenza pandemics and annual epidemics WHA56.19. WHO. 2003.
8. World Health Organization. Meeting of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization, April 2012--conclusions and Recommendations. *Weekly Epidemiological Record (WER)*. 2012: 87(21): 201-216. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
9. Kurinczuk JJ, Nicholson KG. Uptake of influenza vaccination by patients with serious cardiac disease. *BMJ*. 1989;299(6695): 367. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
10. Nicholson KG, Wiselka MJ, May A. Influenza vaccination of the elderly: perceptions and policies of general practitioners and outcome of the 1985-86 immunisation program in Trent, UK. *Vaccine*. 1987;5(4): 302-6. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

11. Lennox IM, Macphee GJA, Mc Alpine CH, Cameron SO, Leask BGS, Somerville RG. Use of influenza vaccine in long-stay geriatric units. *Age Ageing*. 1990;19(3): 169-72. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
12. Barakat A, Ihazmad H, Benkaroum S, Cherkaoui I, Benmamoun A, Youbi M *et al*. Influenza surveillance among outpatients and inpatients in Morocco, 1996-2009. *PLoS ONE*. 2011;6(9): e24579. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
13. Ministry of Health. Decision of the Ministry of Health No. 12536 of 6 July 2015 establishing a National Technical and Scientific Advisory Committee on Immunization. 2015. Accessed on December 09 2019.
14. Sakhri N. Rapport: analyse des données et évaluation du système de surveillance épidémiologique et virologique de la grippe au Maroc. Cycle de Mastère en Administration Sanitaire et Santé Publique Promotion: 2015-2017- Filière: Epidémiologie de Santé Publique. Ecole Nationale de Santé Publique (Maroc). (Internal document of the National Public Health School of Morocco).
15. Manuel de procédures du système de surveillance de la grippe au Maroc (2014). Ministère de la santé, Direction de l'Epidémiologie et de la Lutte contre les Maladies. (Internal document of the Ministry of Health of Morocco).
16. World Health Organization. **WHO surveillance case definitions for ILI and SARI**. 2014. Accessed on December 09 2019.
17. Centers for Disease Control and Prevention. **The African Network for Influenza Surveillance and Epidemiology (ANISE)**. Accessed on December 09 2019.
18. Elhakim M, Rasooly MH, Fahim M, Ali SS, Haddad N, Cherkaoui I *et al*. Epidemiology of severe cases of influenza and other acute respiratory infections in the Eastern Mediterranean Region, July 2016 to June 20. *J Infect Public Health*. 2020 Mar;13(3): 423-429. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
19. Radin JM, Katz MA, Tempia S, Nzussouo NT, Davis R, Duque J *et al*. Influenza surveillance in 15 countries in Africa, 2006-2010. *JID*. 2012;206(Suppl 1): S14-S21. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
20. Zaman RU, Alamgir AS, Rahman M, Azziz-Baumgartner E, Gurley ES, Sharker MAY *et al*. Influenza in outpatient ILI case-patients in national hospital-based surveillance, Bangladesh, 2007-2008. *PLoS One*. 2009;4(12): e8452. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
21. Mardy S, Ly S, Heng S, Vong S, Huch C, Nora C *et al*. Influenza activity in Cambodia during 2006-2008. *BMC Infect Dis*. 2009;9: 168. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
22. Beckett CG, Kosasih H, Ma'roef C, Listiyaningsih E, Elyazar IR, Wuryadi S *et al*. Influenza surveillance in Indonesia: 1999-2003. *Clin Infect Dis*. 2004;39(4): 443-9. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
23. Nair H, Brooks WA, Katz M, Roca A, Berkley JA, Madhi SA *et al*. Global burden of respiratory infections due to seasonal influenza in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2011;378(9807): 1917-30. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
24. Razanajatovo NH, Richard V, Hoffmann J, Reynes J, Razafitrimo GM, Randremanana RV *et al*. Viral etiology of influenza-like illnesses in Antananarivo, Madagascar, July 2008 to June 2009. *PLoS One*. 2011;6(3): e17579. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
25. Demers AM, Morency P, Mberyo-Yaah F, Jaffar S, Blais C, Somse P *et al*. Risk factors for mortality among children hospitalized because of acute respiratory infections in Bangui, Central African Republic. *Pediatr Infect Dis J*. 2000;19(5): 424-32. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
26. Djelantik IG, Gessner BD, Sutanto A, Steinhoff M, Linehan M, Moulton LH *et al*. Case fatality proportions and predictive factors for mortality among children hospitalized with severe pneumonia in a rural developing country setting. *J Trop Pediatr*. 2003;49(6): 327-32. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

27. Suwanjutha S, Ruangkanhasetr S, Chantarojanasiri T, Hotrakitya S. Risk factors associated with morbidity and mortality of pneumonia in Thai children under 5 years, Southeast Asian. *J Trop Med Public Health*. 1994;25(1): 60-6. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
28. Tiewsoh K, Lodha R, Pandey RM, Broor S, Kalaivani M, Kabra SK. Factors determining the outcome of children hospitalized with severe pneumonia. *BMC Pediatr*. 2009;9: 15. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
29. Jroundi I, Mahraoui C, Benmessaoud R, Moraleda C, Tligui H, Seffar M *et al*. Risk factors for a poor outcome among children admitted with clinically severe pneumonia to a university hospital in Rabat, Morocco. *International Journal of Infectious Diseases*. 2014;28: 164-170. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
30. Marrie TH, Durant H, Yates L. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization: 5-year prospective study. *Rev Infect Dis*. 1989;11(4): 86-99. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
31. Torres A, Serra-Batllés J, Ferrer A, Jiménez P, Celis R, Cobo E *et al*. Severe community acquired pneumonia: epidemiology and prognostic factors. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144(2): 312-318. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
32. Lauderdale TL, Chang FY, Ben RJ, Yin HC, Ni YH, Tsai JW *et al*. Etiology of community acquired pneumonia among adult patients requiring hospitalization in Taiwan. *Respiratory Medicine*. 2005;99(9): 1079-86. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
33. De Roux A, Marcos MA, Garcia E, Mensa J, Ewig S, Lode H *et al*. Viral community-acquired pneumonia in non-immuno-compromised adults. *Chest*. 2004;125(4): 1343-51. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
34. Thomas RE. Do we have enough evidence how seasonal influenza is transmitted and can be prevented in hospitals to implement a comprehensive policy. *Vaccine*. 2016;34(27): 3014-21. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
35. Kurai D, Saraya T, Ishii H, Takizawa H. Virus-induced exacerbations in asthma and COPD. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4: 293. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
36. Donaldson GC, Wedzicha JA. The causes and consequences of seasonal variation in COPD exacerbations. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9: 1101-10. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
37. Yende S, van der Poll T, Lee M, Huang DT, Newman AB, Kong L *et al*. The influence of pre-existing diabetes mellitus on the host immune response and outcome of pneumonia: analysis of two multicenter cohort studies. *Thorax*. 2010 October;65(10): 870-877. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
38. Boari B, Mari E, Gallerani M, Fabbian F, Pala M, Tiseo R *et al*. Temporal variation of heart failure hospitalization: does it exist. *Rev Cardio Vasc Med*. 2011;12(4): 211-8. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
39. Rothberg MB, Haessler SD, Brown RB. Complications of viral influenza. *Am J Med*. 2008; 121(4): 258-64. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
40. Walter ND, Taylor TH, Shay DK, Thompson WW, Brammer L, Dowell SF *et al*. Influenza Circulation and the Burden of Invasive Pneumococcal Pneumonia During a Non-Pandemic Period in the United States. *Clin Infect Dis*. 2010;50(2): 175-83. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
41. Brundage JF. Interactions between influenza and bacterial respiratory pathogens: implications for pandemic preparedness. *Lancet Infect Dis*. 2006;6(5): 303-12. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
42. Fiore AE, Ujeki TM, Broder K, Finelli L, Euler GL, Singleton JA *et al*. Prevention and control of influenza with vaccines: recommendation of the advisory committee on immunization practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*. 2010;59(RR-8): 1-62. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
43. Anselem O, Floret D, Tsatsaris V, Goffinet F, Launay O. Grippe au cours de la grossesse. *Presse Med*. 2013;42(11): 1453-1460. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

44. Schanzer DL, Schwartz B. Impact of seasonal and pandemic influenza on emergency department visits, 2003-2010, Ontario, Canada. *Acad Emerg Med.* 2013 Apr;20(4): 388-97. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
45. Tempia S, Walaza S, Moyes J, Cohen AL, von Mollendorf C, Treurnicht FK *et al.* Risk factors for influenza-associated severe acute respiratory illness hospitalization in South Africa, 2012-2015. *OFID.* 2017;4(1): ofw262. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
46. Abadom TR, Smith AD, Tempia S, Madhi SA, Cohen C, Cohen AL. Risk factors associated with hospitalization for influenza associated severe acute respiratory illness in South Africa: a case-population study. *Vaccine.* 2016 November 04;34(46): 5649-5655. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
47. Ho A, Mallewa J, Peterson I, SanJoaquin M, Garg S, Bar-Zeev N *et al.* Epidemiology of severe acute respiratory illness and risk factors for influenza infection and clinical severity among adults in Malawi, 2011-2013. *Am J Trop Med Hyg.* 2018;99(3): 772-779. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
48. Durigon GS, Oliveira DBL, Felicio MCC, Finelli C, Pereira MFB, Storni JG *et al.* Poor outcome of acute respiratory infection in young children with underlying health condition in Brazil. *Int J of Inf Disease.* 2015;34: 3-7. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)
49. Launes C, Garcia-Garcia JJ, Martínez-Planas A, Moraga F, Soldevila N, Astigarraga I *et al.* Clinical features of influenza disease in admitted children during the first post pandemic season and risk factors for hospitalization: a multicentre Spanish experience. *Clinical Microbiology and Infection, European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, CMI.* 2012;19(3): E157-E162. [PubMed](#) | [Google Scholar](#)

Table 1: number of SARI cases recruited and their influenza positivity rates per clinical ward (2016/2017 and 2017/2018 season)

| Clinical service | 2016-2017 season | 2017-2018 season |
|----------------------|------------------|------------------|
| Pediatrics | 527 0,4% | 434 7,6% |
| Pulmonology | 89 3,4% | 142 7,6% |
| Medicine | 1 0,0% | 40 22,5% |
| Intensive Care Unit | 66 9,1% | 87 20,7% |
| Emergencies | 7 0,0% | 33 9,4% |
| (*) Source : NIC-INH | | |

Table 2: number of SARI cases with co-morbidities sampled and their influenza positivity rate (2016/2017 and 2017/2018 season)

| Risk factor (or comorbidity) | | 2016-2017 season | 2017-2018 season | Both seasons |
|-------------------------------|-----------------------------|------------------|------------------|--------------|
| Diabetes | Number | 19 | 56 | 75 |
| | Risk factor proportion | 2,7% | 6,8% | 4,9% |
| | Risk factor positivity rate | 5,3% | 32,6% | 24,6% |
| Obesity | Number | 10 | 9 | 19 |
| | Risk factor proportion | 1,4% | 1,1% | 1,2% |
| | Risk factor positivity rate | 10,0% | 37,5% | 22,2% |
| Asthma | Number | 39 | 68 | 107 |
| | Risk factor proportion | 5,5% | 8,3% | 7,0% |
| | Risk factor positivity rate | 15,4% | 11,9% | 13,2% |
| Chronic Respiratory Disease | Number | 40 | 75 | 115 |
| | Risk factor proportion | 5,7% | 9,2% | 7,6% |
| | Risk factor positivity rate | 7,5% | 18,3% | 14,4% |
| Chronic Heart Disease | Number | 24 | 35 | 59 |
| | Risk factor proportion | 3,4% | 4,3% | 3,9% |
| | Risk factor positivity rate | 0,0% | 32,3% | 18,2% |
| Chronic Renal Failure | Number | 6 | 23 | 29 |
| | Risk factor proportion | 0,9% | 2,8% | 1,9% |
| | Risk factor positivity rate | 0,0% | 27,3% | 21,4% |
| Chronic Neurological Disease | Number | 2 | 4 | 6 |
| | Risk factor proportion | 0,3% | 0,5% | 0,4% |
| | Risk factor positivity rate | 0,0% | 25,0% | 16,7% |
| Chronic Hematological Disease | Number | 13 | 13 | 26 |
| | Risk factor proportion | 1,8% | 1,6% | 1,7% |
| | Risk factor positivity rate | 7,7% | 25,0% | 16,0% |
| Pregnancy (**) | Number | 9 | 5 | 14 |
| | Risk factor proportion | 3,10% | 1,80% | 2,40% |
| | Risk factor positivity rate | 11,1% | 40,0% | 21,4% |

(*) Source : NIC-INH (**) Only females

Table 3: bi-variate analysis for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

| Variable | | SARI Positive n (%) | ILI Positive n (%) | OR Crude | CI95% | P Value |
|---|-----|---------------------|--------------------|----------|-------------|----------|
| Socio-demographic characteristics | | | | | | |
| Male sex | Yes | 79 (61.2%) | 105 (41.7%) | 2.2 | [1.4-3.4] | <0.001 |
| | No | 50 (38.8%) | 147 (58.3%) | | | |
| Age > 65 years | Yes | 30 (23.3%) | 7 (2.8%) | 10.6 | [4.5-24.9] | <10-11 |
| | No | 99 (76.7%) | 245 (97.2%) | | | |
| Context | | | | | | |
| Influenza vaccination during the current season | Yes | 2 (1.6%) | 7 (2.8%) | 0.6 | [0.1-2.7] | 0.36(*) |
| | No | 127 (98.4%) | 245 (97.2%) | | | |
| Existence of cases in the surroundings | Yes | 9 (7.0%) | 95 (37.3%) | 0.1 | [0.06-0.3] | <10-11 |
| | No | 120 (93.0%) | 157 (62.3%) | | | |
| Co-morbidities | | | | | | |
| Diabetes | Yes | 16 (12.4%) | 4 (1.6%) | 8.8 | [2.9-26.9] | <10-5 |
| | No | 113 (87.6%) | 248 (98.4%) | | | |
| Asthma | Yes | 14 (10.9%) | 3 (1.2%) | 10.1 | [2.8-35.9] | <10-4 |
| | No | 115 (89.1%) | 249 (98.8%) | | | |
| Chronic Respiratory Disease | Yes | 16 (12.4%) | 2 (0.8%) | 17.7 | [4.0-78.3] | <10-5 |
| | No | 113 (87.6%) | 250 (99.2%) | | | |
| Chronic Heart Disease | Yes | 10 (7.8%) | 5 (2.0%) | 4.2 | [1.4-12.4] | 0.006 |
| | No | 119 (92.2%) | 247 (98.0%) | | | |
| Chronic Renal Failure | Yes | 6 (4.7%) | 1 (0.4%) | 12.2 | [1.5-102.8] | 0.007(*) |
| | No | 123 (95.3%) | 251 (99.6%) | | | |
| Chronic Neurological Disease | Yes | 1 (0.8%) | 0 (0.0%) | Ind. | Ind. | 0.33(*) |
| | No | 128 (99.2%) | 252 (100.0%) | | | |
| Chronic Hematological Disease | Yes | 4 (3.1%) | 0 (0.0%) | Ind. | Ind. | 0.01(*) |
| | No | 125 (96.9%) | 252 (100.0%) | | | |
| Pregnancy | Yes | 3 (5.9%) | 2 (1.4%) | 4.5 | [0.7-27.9] | 0.11(*) |
| | No | 48 (94.1%) | 145 (98.6%) | | | |
| Obesity | Yes | 4 (3.1%) | 2 (0.8%) | 4.0 | [0.7-22.1] | 0.10 (*) |
| | No | 125 (96.9%) | 250 (99.2%) | | | |

(*) Use of the exact Fisher test because of the too small number in cells. (**) Only females

Table 4: multivariate logistic regression model for evaluating the risk factors of influenza-associated SARI with a sample of 381 influenza-positive cases (2016/2017 and 2017/2018 season)

| Variable | OR adjusted | CI 95% | | P-Value |
|---|-------------|--------|------|---------|
| Male sex (Yes/No) | 2.1 | 1.3 | 3.5 | 0.005 |
| Age >=65 years (Yes/No) | 5.4 | 1.9 | 15.6 | 0.002 |
| Existence of cases in the surroundings (Yes/No) | 0.1 | 0.05 | 0.3 | <0.001 |
| Diabetes (Yes/No) | 7.5 | 1.7 | 32.8 | 0.007 |
| Asthma (Yes/No) | 2.9 | 0.7 | 12.2 | 0.15 |
| Chronic Respiratory Disease (Yes/No) | 10.9 | 2.0 | 58.4 | 0.005 |
| Chronic Heart Disease (Yes/No) | 2.3 | 0.5 | 10.5 | 0.29 |
| Chronic Renal Failure (Yes/No) | 8.2 | 0.8 | 79.7 | 0.07 |

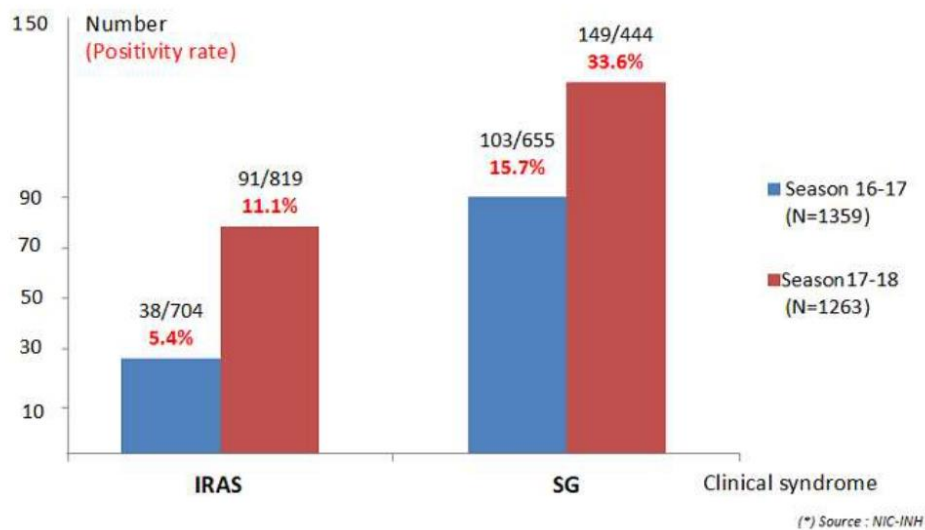


Figure 1: influenza positivity rate by clinical syndrome (2016/2017 and 2017/2018 season)

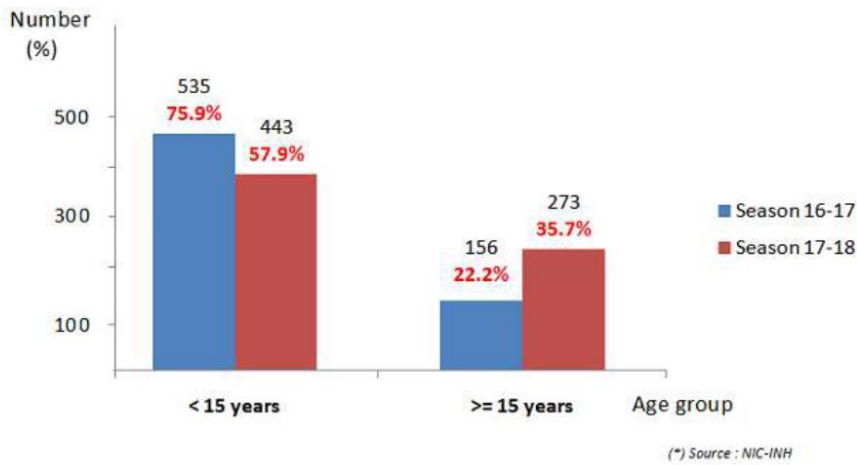


Figure 2: SARI cases per age range (2016/2017 and 2017/2018 season)

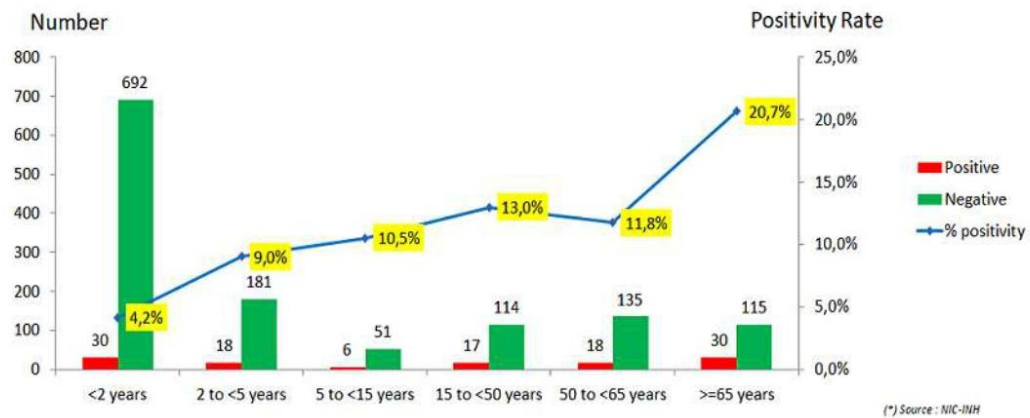


Figure 3: positive rate per age range of SARI cases, all-season combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

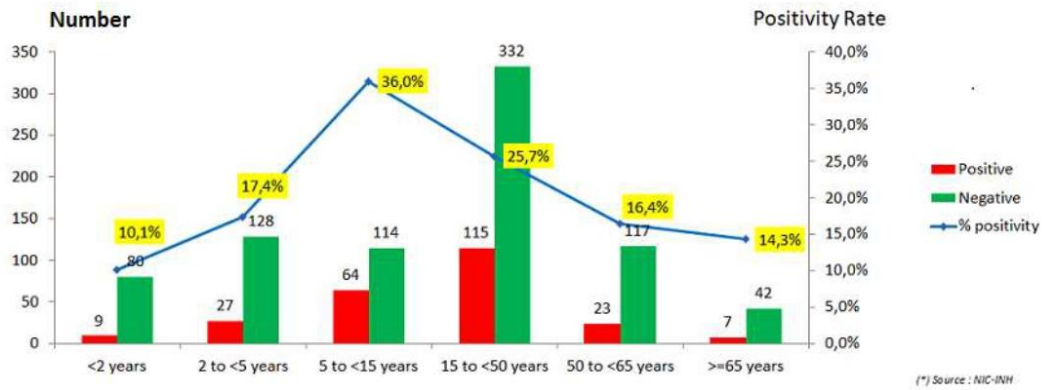


Figure 4: positive rate per age range of ILI cases, all seasons combined (2016/2017 and 2017/2018 season)

**Research article****Respiratory pathogens circulation among non-reactive sars-cov2 patients during the covid-19 pandemic in morocco**

Zakia Regragui^{1,2}, Abderrahman Bimouhen¹, Fatima El Falaki¹, Hassan Ihazmade¹, Rokaya Aithhaj Mhand¹, Chaimae Remz¹, Abdelkarim Filali Maltouf², Leila Medraoui², Hicham Oumzil^{1,3}

¹National Influenza Center, Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health. RABAT, Morocco.

² Microbiology and Molecular Biology Team, Research Center for Plant and Microbial Biotechnology, Biodiversity and Environment, Faculty of Sciences, Mohammed V University in RABAT, Morocco.

³. Pedagogy and Research Unit of Microbiology, and Genomic Center of Human Pathologies, School of Medicine and Pharmacy, Mohammed V University in Rabat, Morocco

Corresponding author: Zakia Regragui ✉ zakia.regragui@yahoo.com, **Orcid Id:** 0000-0003-2639-7563

National Influenza Center, Virology Department, National Institute of Hygiene, Ministry of Health. RABAT, Morocco

© The author(s). This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>). See <https://jmpas.com/reprints-and-permissions> for full terms and conditions.

Received - 12-09-2023, **Revised** - 02-11-2023, **Accepted** - 25-11-2023 (DD-MM-YYYY)

Refer This Article

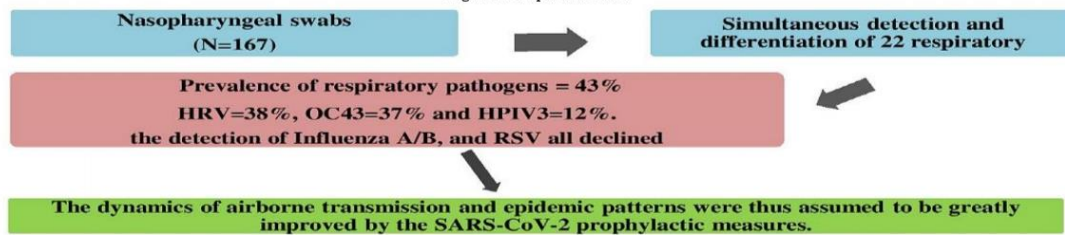
Zakia Regragui, abderrahman bimouhen, fatima el falaki, hassan ihazmade, rokaya aithhaj-mhand, chaimae remz, abdelkarim filali-maltouf, leila medraoui, hicham oumzil, 2023. Respiratory Pathogens Circulation among Non-Reactive Sars-Cov2 Patients during the Covid-19 Pandemic in Morocco. Journal of medical pharmaceutical and allied sciences, V 12 - I 6, Pages - 6209 – 6214. Doi: 10.55522/jmpas.V12I6.5666.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 pandemic has prompted the implementation of stringent measures to curb viral transmission, including mask mandates, hand hygiene practices, and social distancing. These interventions may also have a substantial impact on the prevalence of other respiratory infections, such as influenza and severe acute respiratory illness. This study aimed to assess the incidence of respiratory pathogens among SARS-CoV-2 negative patients admitted to healthcare facilities during the COVID-19 outbreak. From February to July 2021, nasopharyngeal swabs from 167 adults presenting with COVID-19 syndrome symptoms and negative SARS-CoV-2 tests were collected from seven regional sites across Morocco. Multiplexed nucleic acid testing was employed to simultaneously detect and differentiate 22 respiratory pathogens. Our findings revealed a 43% (n=72) overall prevalence of respiratory pathogens, with Human Rhinovirus (HRV) accounting for 38%, Human Coronavirus OC43 HCoV OC43) for 37%, and Human Parainfluenza3 (HPIV3) for 12%. In contrast to the decline in Influenza A/B, Respiratory Syncytial Virus (RSV) and Human Metapneumovirus (HMPV) detection, a significant increase was observed in HRV and HCoV OC43 prevalence. These observations suggest that SARS-CoV-2 prophylactic measures have significantly altered the dynamics of airborne transmission and epidemic patterns for respiratory pathogens. Our findings provide valuable insights into the impact of COVID-19 containment strategies on respiratory infection epidemiology and can inform future prevention and management strategies.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, Respiratory viruses, Respiratory bacteria, Acute respiratory infections.

Figure 1: Graphical abstract



INTRODUCTION

Viral acute respiratory infections (ARI) pose a substantial public health concern, particularly among the adult population. Research has consistently demonstrated that viruses play a major role in the etiology of ARI, accounting for a significant proportion of these infections^[1]. The impact of viral ARIs on adult health is multifaceted, encompassing both mortality and morbidity^[2]. This is particularly evident in elderly individuals and those with underlying comorbidities, who are at an increased risk of severe complications^[3]. Moreover, viral ARIs incur substantial annual economic costs worldwide, further highlighting their significant impact on healthcare systems.^[4]

While viruses are the primary culprits behind ARIs, bacterial infections can also play a role, depending on patient exposure and underlying risk factors^[5]. Despite advancements in diagnostic techniques, differentiating between viral and bacterial ARIs remains a formidable clinical challenge^[4]. This difficulty stems from the overlapping clinical presentation of these infections, with both often manifesting with similar symptoms such as cough, fever, headache, and complications like pneumonia, bronchitis, and acute respiratory failure^[3]. This diagnostic ambiguity can lead to inappropriate antibiotic prescriptions, contributing to antimicrobial resistance and escalating healthcare costs^[3].

The first cases of the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) were discovered in Wuhan in China in December 2019^[6]. But in March 2020, the illness was officially declared a pandemic due to its quick global spread. Within the Moroccan context, the first case of COVID-19 was confirmed on March 2nd, 2020, concomitant with the end of the annual influenza epidemic^[7].

Like the majority of other SARS-CoV-2-affected nations, the Moroccan government encouraged the deployment of serious epidemiological controls to prevent the virus dissemination, such as facemask use, social distancing, hand washing, and surface disinfection. Additionally, a nationwide lockdown was implemented by the Moroccan Ministry of Health, which was successful in stopping the spread of the initial pandemic wave^[8]. However, new outbreaks struck several countries, and the epidemic continued to spread fast and globally^[9] generating a real public health issue and impacting the mental health of healthcare workers with many experiencing symptoms of anxiety, depression, and post-traumatic stress disorder^[10,11].

The illness is characterized by a broad spectrum of clinical symptoms that can range from asymptomatic or mild symptoms like fever, coughing, myalgia, and headache) to serious illnesses like pneumonia, acute respiratory distress, multiple organ failure, and death^[9,12]. Meanwhile, COVID-19 symptoms have been stated in several respiratory viral and bacterial diseases, not just SARS-CoV-2^[12].

Thus, the ability to recognize which microorganism causes ARI is essential for patient monitoring and recovery as well as defining therapeutic decisions so as to develop appropriate public health strategies^[13].

At the beginning of the COVID-19 pandemic, reductions in respiratory infections, especially those caused by the influenza virus and respiratory syncytial virus, were particularly noticeable, and they persisted to variable degrees through succeeding waves of SARS-CoV-2 infections^[14]. Worldwide variations in respiratory virus infections caused by different virus strains have been linked to the COVID-19 pandemic preventive measures^[15]. Additionally, the Moroccan government's preventive measures, such as mandated mask use, social withdrawal, and the cessation of schools to stop the spread of SARS-CoV-2, might significantly impact the incidence and epidemiology of respiratory pathogens^[16]. There is a lack of information on the spread of respiratory pathogens during the COVID-19 epidemic in Morocco. Therefore, in this study we aimed to estimate the prevalence of respiratory viruses: Influenza A (Inf A), Influenza A H1N1pdm09 (AH1N1pdm09), Influenza A H1N1(AH1N1), influenza AH3N2 (AH3N2), Influenza B (Inf B), human Adenovirus (HadV), Respiratory Syncytial Virus (RSV), human Parainfluenza Virus (HPIV 1, 2, 3 and 4), Human Rhinovirus/Enterovirus (HHRV), human Metapneumovirus (HMPV), Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) and human Coronavirus (HCoV NL63, 229E, OC43 and HKU1) as well as respiratory bacterial pathogens (Bordetella parapertussis, Bordetella pertussis, Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae) in samples investigated for SARS-CoV-2 during the COVID-19 pandemic among adults. The data obtained may be important to understand the dynamic of other respiratory pathogens outside the main epidemic area of COVID19.

MATERIAL AND METHODS

Study setting, patient's characteristics and specimens

The study was conducted at the National Influenza Center (NIC), located at the National Institute of Hygiene in Morocco.

The samples were collected as part of the influenza surveillance system approved by the Moroccan Ministry of Health. Patient confidentiality is respected, and verbal consent was obtained from patients. Therefore, formal ethical review was not required for the study.

Patients aged over 18 years old were recruited from seven geographically distinct Moroccan sites: Rabat, Salé, Kenitra, Sidi Kacem, Sidi Slimane, Oujda, and Berkane.

From February to July 2021, 167 nasopharyngeal swabs were collected and shipped to the NIC. They were received for SARS-CoV2 inquiry in the context of managing COVID-19 at healthcare facilities. Eligible samples for the study were non-reactive to nucleic acid testing for SARS-CoV2 and consistent with the following case definition:

- Acute onset of fever and cough or acute onset of any three or more of the following signs or symptoms: Fever, cough, general weakness, headache, myalgia, sore throat, coryza, dyspnea, anorexia, nausea, vomiting, diarrhea, and impaired mental status [17].
- A patient responding to a case definition of severe acute respiratory illness (SARI): ARI with a history of fever or fever > 38°C, cough, onset of symptoms within the last 10 days; and requiring hospitalization [17].

Samples were stored in the laboratory refrigerator at +4 within a period not exceeding 48 hours before processing. The biosafety measures in force were highly respected.

Methods

RNA extraction

Nucleic acid extraction was performed on Gene pure Pro nucleic acid purification system NPA-32P using a Maga-Bio plus Virus RNA Purification Kit II (HangzhouBioertehchnology, China) from 200ul of respiratory specimens according to the manufacturer's instructions.

SARS-CoV2 RNA detection

The purified viral RNA is reverse transcribed into cDNA and amplified according to the manufacturer's instructions using the TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-PCR Kit, and run on the QuantStudio™ 5 Real-Time PCR Instrument (Thermofisher, USA).

In the process, probes anneal to three target sequences specific to SARS-CoV-2:ORF1ab, N and S genes. Non-reactive samples are sorted and tested for other respiratory viruses and bacteria.

Respiratory pathogens detection

All SARS-CoV2 negative samples (n = 167) were tested using the molecular multiplex assay, namely FilmArray Respiratory Panel 2 (RP2) (Biomerieux, USA), targeting 22 pathogens including 18 viruses: Inf A, Inf AH1N1pdm09, Inf H1N1, inf AH3N2, Inf B, HadV, RSV, HPIV (1, 2, 3, 4), HRV, HMPV, MERS-CoV and HCoV (NL63, 229E, OC43 and HKU1) and 4 bacteria (Bordetella parapertussis, Bordetella pertussis, Chlamydia pneumoniae and Mycoplasma pneumoniae).

The testing was performed on approximately 300 ul of specimen per the manufacturers instructions [18]. The FilmArray RP2 test takes about 45 minutes and includes automated nucleic acid extraction, reverse transcription, nucleic acid amplification, and result interpretation. For accuracy, each target tested is recorded as "detected" or "not detected" by the FilmArray software, which performs automatic result analysis. The FilmArray software aims at controlling the device and interpreting the results [19]. Accordingly, when internal control fails, the software generates an "invalid" result for all panel analytes.

All sample processing was conducted in accordance with a biosafety cabinet class II, and appropriate protective equipment. For

this reason, samples were processed one at a time, and the work areas cleaned per the manufacturer's recommendations [18].

Statistical analysis

The laboratory information system (Kalisil), which creates an Excel file, was used to record clinical, virological, and demographic data. The results were analyzed by the CDC's Epi-info version 7.1 software (CDC; Atlanta, USA). When appropriate, the Fisher exact test or the Pearson Chi-square tests were used to estimate group comparisons. P-values for interactions below 0.05 were considered statistically significant. The same program was used to perform all statistical analyses, including proportions and means.

RESULTS

Table 1. Demographic characteristics of patients investigated for respiratory pathogens, Morocco, February to July 2021.

| Age groups (years) | Total N = 167 n (100%) | Positives N = 73 n (43.71%) | Negatives N = 94n (56.29%) | P-value |
|--------------------|------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|---------|
| 18-39 | 91 (54.49) | 42 (57.53) | 49 (52.13) | <0.01 |
| 40-59 | 51 (30.54) | 21 (28.77) | 30 (31.91) | |
| >60 | 25 (14.97) | 10 (13.70) | 15 (15.96) | |
| Gender | | | | 0.563 |
| Female | 37 (50.68) | 58 (61.70) | | |
| Male | | | 0.015 | |
| Town | | | | NA |
| Rabat | 14 (8.38) | 7 (9.58) | 7 (9.58) | |
| Sale | 38 (22.75) | 18 (24.66) | 20 (21.28) | |
| Kenitra | 37 (22.15) | 15 (20.55) | 22 (23.40) | |
| Sidi Slimane | 4 (2.40) | 3 (4.11) | 1 (1.06) | |
| Sidi Kacem | 13 (7.78) | 1 (1.37) | 12 (12.77) | |
| Oujda | 60 (35.93) | 29 (39.73) | 31 (32.98) | |
| Berkane | 1 (0.60) | 0 (0) | 1 (1.06) | |

Demographic characteristics

From February to July 2021, a total of 167 specimens collected from 7 geographically distinct sentinel hospitals in Morocco were analyzed in this study. The notification forms were reviewed, and all patients met the World Health Organisation's (WHO) case definition of COVID-19 syndrome and were negative for SARS-CoV-2. Overall, the study included more male than female specimens. The sex ratio (male/female) was 1.35 (96/71). The age of the enrolled patients ranged from 18 to 80 years (median age 37 years). Most specimens were from adults aged 18 to 39 (55%); 31% were from the age group between 40 and 60 years, and 15% were from adults aged above 60 years. Among the seven sentinel sites, the largest number of specimens collected was 36%, 23%, and 22%, in Oujda, Sale, and Kenitra, respectively (Table 1).

Three simultaneous infections with two pathogens were detected in this study. Of the 167 samples, 5 (3%) cases were co-infected with other respiratory pathogens. The most prevalent co-infectious agents were HRV/Entero and Bordetella parapertussis, HRV/Entero and HCoV OC43, then HRV/ Entero and RSV with frequencies of 2%(3/167), 0,6% (1/167) and 0,6% (1/167) respectively (Table 3).

During our study period, the largest number of positive cases was observed in March, with a predominance of HCoV OC43,

followed by the HRV/Entero. Thereafter, these positive cases decreased and still with the predominance of HRV and HCoV OC43 that continued to circulate until the end of July (Figure 2).

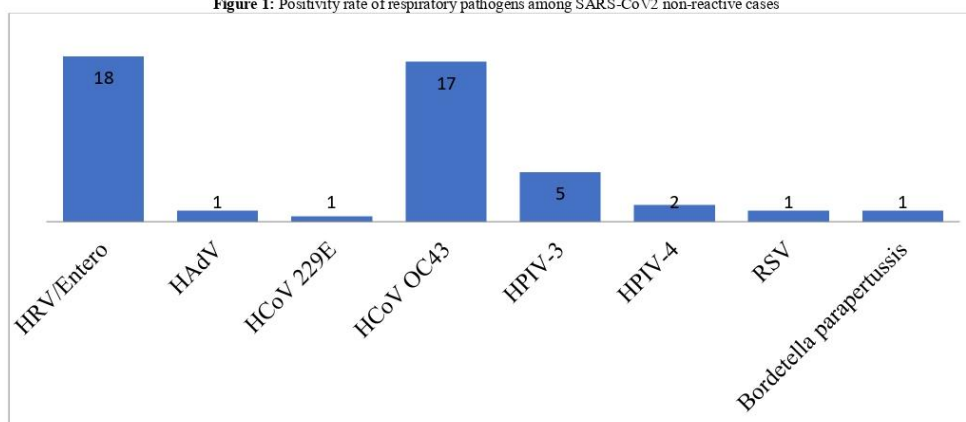
Table 3: Co-infections detected in samples enrolled. Morocco, Feb. to July 2021.

| Pathogens | Co-Infectious Pathogens | Number of cases (%) |
|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
| HRV/Entero + HCoV OC43 | 2 | 1 (0.6%) |
| HRV/Entero + Bordetella parapertussis | 2 | 3 (2%) |
| HRV/Entero + RSV | 2 | 1 (0.6%) |

Table 2: Distribution of respiratory pathogens detected by age group. Morocco, February to July 2021.

| Pathogens | Age group | | |
|--------------------------|-----------|-----------|----------|
| | 18-39 (%) | 40-59 (%) | ≥ 60 (%) |
| HAdV | 1 (0.6) | 1 (0.6) | 0 |
| HCoV 229E | 1 (0.6) | 0 | 0 |
| CoV OC43 | 18 (11) | 8 (5) | 3 (2) |
| HRV/Entero | 15 (9) | 10 (6) | 5 (3) |
| HPIV-3 | 5 (3) | 1 (0.6) | 3 (2) |
| HPIV-4 | 2 (1) | 1 (0.6) | 0 |
| RSV | 1 (0.6) | 1 (0.6) | 0 |
| Bordetella parapertussis | 0 | 1 (0.6) | 1 (0.6) |
| Total of detection | 43 (26) | 23 (14) | 12 (7) |

Figure 1: Positivity rate of respiratory pathogens among SARS-CoV2 non-reactive cases



*Percentage of viruses detected equals the number of detection of each virus /total number of specimen (n=167).

DISCUSSION

In China's Wuhan, the COVID-19 virus was discovered for the first time in late December 2019. The virus outbreak initially moved slowly across the country, but suddenly it began to spread quickly across numerous other countries [20]. Due to their severe clinical symptoms and transmission patterns, respiratory infections substantially risk human health during the influenza seasonal peak [21]. Accordingly, clinicians must urgently and properly identify the cases affected by COVID-19 so as to treat them effectively. However, patients with ARIs and COVID-19 are difficult to distinguish from one another, mostly because of the similarity of their first clinical symptoms[9]. Meanwhile, some common respiratory pathogens have been identified as the primary causes of ARIs, despite the disease's complex etiology [22].

This study assessed the prevalence of common respiratory pathogens, the leading causes of ARIs [1] among adults who had

performed a nasopharyngeal swab for suspected Covid-19 infection using the Biofilm Array assay method. The results show that a total of 73 patients

were confirmed to have respiratory infections, with a positive detection rate of 46.70%. These findings suggest that, even during the COVID-19 outbreak, we should also pay close attention to ARIs patients affected by respiratory pathogens along with SARS-CoV-2 [24]. Among the 22 types of common respiratory pathogens, the most prevalent was HRV/Entero (18%, 30/167), which also represents one of the most significant etiological pathogens for respiratory tract infection [22]. Additionally, HRV/Entero accounts for 38.46 % of detected respiratory pathogens among the positive cases.

This finding matches with the overall patterns described in other studies, which showed that the positive rate of HRV/Entero was the most prevalent virus circulating during the COVID-19

pandemic [24]. However, RSV was one of the least detected viruses in our study (2.56%), while Inf A and B were not detected. Although it was observed that before the pandemic, these two pathogens were among the most prevalent viruses causing respiratory infections during the winter season [25,26]. In fact, several studies reported that during the COVID-19 pandemic, the prevalence of influenza and other respiratory viruses, including the HMPV, HPIV as well as HCoV were considerably decreased [15,27,28]. It is worth noting that HRV are unique pathogens whose circulation is not affected by cataclysms such as epidemics and pandemics [29]. Although over 100 serotypes of HRV exist, there is little immunological protection provided to humans by their prior infection [29]. This accounts for the high incidence of subsequent infections [29]. However, a study revealed that the Influenza viruses A, Influenza B and RSV circulated at very low levels and only a few cases were detected in 2021 season [30]. The positivity rate sharply dropped during the lockdown and remained low throughout the interseason circulation [31–33].

The decrease of respiratory pathogens activity which was transmitted in a similar route to SARS-CoV-2 during the 2020 and 2021 seasons resulted from strict control such as social distancing, wearing face masks and increased hand hygiene that were established to mitigate the spread of COVID-19 [34]. It has not been proved yet whether the non-pharmaceutical measures implemented to limit the spread of SARS-CoV-2 will have a long-term effect on decreasing the circulation of other respiratory pathogens. However, the low levels of some pathogens' circulation, like Influenza viruses and RSV, after the COVID-19 outbreak may impact the severity of respiratory infections. This is due to a decreased population immunity as a result of the absence of natural exposure to those respiratory pathogens [35].

Our study results necessitate consideration within the context of several limitations. Firstly, the absence of comprehensive epidemiological and clinical data regarding patients posed challenges in the implementation of evidence-based therapeutic and preventive strategies. Additionally, the sample population lacked representativeness at the national level, and the constrained sample size precluded an in-depth exploration of the interconnections between clinical, epidemiological, and risk factors concerning the identified pathogens. Nevertheless, notwithstanding these limitations, the findings remain valuable for informing public health interventions in the context of respiratory infections.

CONCLUSION

The COVID-19 pandemic has shed new light on the effectiveness of non-pharmaceutical interventions (NPIs) in curbing the spread of respiratory viruses. Our research findings suggest that NPIs, such as mask-wearing, social distancing, and hand hygiene, have exerted a discernable impact on the seasonal circulation of predominant viral patterns, including RSV and Influenza viruses.

However, it was observed that these interventions did not exhibit any significant influence on HRV circulation during the COVID-19 pandemic. These findings highlight the need for a more nuanced understanding of the differential effects of NPIs on various respiratory viruses.

Despite the observed lack of impact on HRV circulation, the overall effectiveness of NPIs in reducing respiratory virus transmission is undeniable. Consequently, it is imperative to implement and maintain these measures as cornerstones of public health strategies, particularly during public health emergencies and pandemics. Additionally, the burgeoning public health burden associated with respiratory viruses underscores the importance of ongoing surveillance and characterization of their epidemiology. This will enable the development of more targeted and effective prevention and control strategies. The expanding utility of multiplex molecular respiratory virus tests holds great promise for enhancing our understanding of the epidemiology of respiratory viruses. By simultaneously detecting and differentiating multiple viruses from a single clinical sample, these tests can provide valuable insights into viral co-infections and seasonal circulation patterns. This enhanced knowledge can inform the development of more comprehensive and effective public health interventions.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to express our sincere gratitude to the medical doctors, nurses, and laboratory technicians in the public network for their kind support in clinical sample collection.

REFERENCES

1. Templeton KE, Scheltinga SA, van den Eeden WCJFM et al, 2005. Improved diagnosis of the etiology of community-acquired pneumonia with real-time polymerase chain reaction. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 41(3), Pages-345-351. Doi: 10.1086/431588.
2. Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017 *The Lancet.* 10;392(10159), Pages-1736-1788. Doi: 10.1016/S0140-6736(18)32203-7.
3. Milucky J, Pondo T, Gregory CJ, et al, 2020. The epidemiology and estimated etiology of pathogens detected from the upper respiratory tract of adults with severe acute respiratory infections in multiple countries, 2014–2015. *PLoS ONE.* 15(10), Pages-e0240309. Doi:10.1371/journal.pone.0240309.
4. Fendrick AM, Monto AS, Nightengale B et al, 2003. The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Arch Intern Med.* 163(4), Pages-487-494. Doi:10.1001/archinte.163.4.487.
5. Zumla A, Al-Tawfiq JA, Enne VI, et al, 2014. Rapid point of care diagnostic tests for viral and bacterial respiratory tract infections—needs, advances, and future prospects. *Lancet Infect Dis.* 14(11), Pages-1123-1135. Doi:10.1016/S1473-3099(14)70827-8.

6. Li Q, Guan X, Wu P, et al, 2020. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. *N Engl J Med.* 382(13), Pages-1199-1207. Doi: 10.1056/NEJMoa2001316.
9. Bordi L, Nicastrì E, Scorzolini L, et al, 2020. Differential diagnosis of illness in patients under investigation for the novel coronavirus (SARS-CoV-2), Italy, February 2020. *Eurosurveillance.* 25(8), Pages-2000170. Doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.8.2000170.
12. Wu Q, Xing Y, Shi L, et al, 2020. Coinfection and Other Clinical Characteristics of COVID-19 in Children. *Pediatrics.* 146(1), Pages-e20200961. Doi:10.1542/peds.2020-0961.
13. Bouzid D, Mullaert J, Le Hingrat Q, et al, 2020. Characteristics associated with COVID-19 or other respiratory viruses' infections at a single-center emergency department. *PLoS ONE.* 15(12), Pages-e0243261. Doi:10.1371/journal.pone.0243261.
14. Partridge E, McCleery E, Cheema R, et al. Evaluation of Seasonal Respiratory Virus Activity Before and After the Statewide COVID-19 Shelter-in-Place Order in Northern California. *JAMA Netw Open.* 2021;4(1), Pages-e2035281. Doi: 10.1001/jamanetworkopen.2020.35281.
15. Park JY, Kim HI, Kim JH, et al, 2021. Changes in respiratory virus infection trends during the COVID-19 pandemic in South Korea: the effectiveness of public health measures. *Korean J Intern Med.* 36(5), Pages-1157-1168. Doi: 10.3904/kjim.2021.026.
16. Ippolito G, La Vecchia A, Umbrello G, et al, 2021. Disappearance of Seasonal Respiratory Viruses in Children Under Two Years Old During COVID-19 Pandemic: A Monocentric Retrospective Study in Milan, Italy. *Front Pediatr.* 9, Pages-721005. Doi:10.3389/fped.2021.721005.
17. WHO COVID-19 Case definition. Accessed December 10, 2021. https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-2019-nCoV_Surveillance_Case_Definition-2020.2.
18. Poritz MA, Blaschke AJ, Byington CL, et al, 2011. FilmArray, an automated nested multiplex PCR system for multipathogen detection: development and application to respiratory tract infection. *PLoS One.* 6(10), Pages-e26047. Doi:10.1371/journal.pone.0026047.
20. Dhama K, Khan S, Tiwari R, et al, 2020. Coronavirus Disease 2019–COVID-19. *Clin Microbiol Rev.* 33(4), Pages-e00028-20. Doi:10.1128/CMR.00028-20.
21. Rath B, Conrad T, Myles P, et al, 2017. Influenza and other respiratory viruses: standardizing disease severity in surveillance and clinical trials. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 15(6), Pages-545-568. Doi:10.1080/14787210.2017.1295847.
22. De Francesco MA, Pollara C, Gargiulo F et al, 2021. Circulation of Respiratory Viruses in Hospitalized Adults before and during the COVID-19 Pandemic in Brescia, Italy: A Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health.* 18(18), Pages-9525. Doi: 10.3390/ijerph18189525.
23. Costanza G, Paba P, Ciotti M, et al, 2022. Infection Rate of Respiratory Viruses in the Pandemic SARS-CoV-2 Period Considering Symptomatic Patients: Two Years of Ongoing Observations. *Biomolecules.* 12(7), Pages-987. Doi: 10.3390/biom12070987.
24. Kim D, Quinn J, Pinsky B et al, 2020. Rates of Co-infection Between SARS-CoV-2 and Other Respiratory Pathogens. *JAMA.* 323(20), Pages-2085-2086. Doi:10.1001/jama.2020.6266.
25. Kiseleva I, Ksenafontov A, 2021. COVID-19 Shuts Doors to Flu but Keeps Them Open to Rhinoviruses. *Biology.* 10(8), Pages-733. Doi:10.3390/biology10080733.
26. Getzgz. Viral aetiology of influenza-like illnesses and severe acute respiratory illnesses in Morocco, September 2014 to December 2016. *JOGH.* Published July 23, 2022. Accessed February 21, 2023. <https://jogh.org/2022/jogh-12-04062/>.
27. De Francesco MA, Pollara C, Gargiulo F et al, 2021. Circulation of Respiratory Viruses in Hospitalized Adults before and during the COVID-19 Pandemic in Brescia, Italy: A Retrospective Study. *Int J Environ Res Public Health.* 18(18), Pages-9525. Doi:10.3390/ijerph18189525.
28. Kurskaya OG, Prokopyeva EA, Sobolev IA, et al, 2023. Changes in the Etiology of Acute Respiratory Infections among Children in Novosibirsk, Russia, between 2019 and 2022: The Impact of the SARS-CoV-2 Virus. *Viruses.* 15(4), Pages-934. Doi:10.3390/v15040934.
29. Kiseleva I, Ksenafontov A, 2021. COVID-19 Shuts Doors to Flu but Keeps Them Open to Rhinoviruses. *Biology.* 10(8), Pages-733. Doi:10.3390/biology10080733.
30. Jones N, 2020. How coronavirus lockdowns stopped flu in its tracks. *Nature.* Published online May 21, 2020. Doi: 10.1038/d41586-020-01538-8.
31. Varela FH, Scotta MC, Polese-Bonatto M, et al, 2021. Absence of detection of RSV and influenza during the COVID-19 pandemic in a Brazilian cohort: Likely role of lower transmission in the community. *J Glob Health.* 11, Pages-05007. Doi: 10.7189/jogh.11.05007.
32. Olsen SJ, Azziz-Baumgartner E, Budd AP, et al, 2020. Decreased influenza activity during the COVID-19 pandemic—United States, Australia, Chile, and South Africa, 2020. *Am J Transplant.* 20(12), Pages-3681-3685. Doi:10.1111/ajt.16381.
33. Soo RJJ, Chiew CJ, Ma S et al, 2020. Decreased Influenza Incidence under COVID-19 Control Measures, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 26(8), Pages-1933-1935. Doi: 10.3201/eid2608.201229.
34. Wu D, Lu J, Liu Y et al, 2020. Positive effects of COVID-19 control measures on influenza prevention. *Int J Infect Dis.* 95, Pages-345-346. Doi:10.1016/j.ijid.2020.04.009.
35. Baker RE, Park SW, Yang W et al, 2020. The impact of COVID-19 nonpharmaceutical interventions on the future dynamics of endemic infections. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 117(48), Pages-30547-30553. Doi:10.1073/pnas.2013182117.



Références Bibliographiques



- Aamir, U.B., Alam, M.M., Sadia, H., Zaidi, S.S.Z., Kazi, B.M., 2013. Molecular Characterization of Circulating Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotypes in Gilgit Baltistan Province of Pakistan during 2011-2012 Winter Season. *PLOS ONE* 8, e74018. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074018>
- Agoti, C.N., Otieno, J.R., Gitahi, C.W., Cane, P.A., Nokes, D.J., 2014. Rapid Spread and Diversification of Respiratory Syncytial Virus Genotype ON1, Kenya. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 950–959. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131438>
- Agut, H., 2022. Une histoire de la virologie. *médecine/sciences* 38, 979–989. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022162>
- Allander, T., 2008. Human bocavirus. *J. Clin. Virol., Respiratory Viruses Special Issue* 41, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2007.10.026>
- Allander, T., Tammi, M.T., Eriksson, M., Bjerkner, A., Tiveljung-Lindell, A., Andersson, B., 2005. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12891–12896. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504666102>
- Al-Romaihi, H.E., Smatti, M.K., Ganesan, N., Nadeem, S., Farag, E., Coyle, P.V., Nader, J.D., Al-Khatib, H.A., Elmagboul, E.B., Al Dhahry, S., Al-Marri, S.A., Al Thani, A.A., Al Khal, A., Al Maslamani, M.A., Yassine, H.M., 2019. Epidemiology of respiratory infections among adults in Qatar (2012-2017). *PloS One* 14, e0218097. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218097>
- Al-Tawfiq, J.A., Zumla, A., Gautret, P., Gray, G.C., Hui, D.S., Al-Rabeeah, A.A., Memish, Z.A., 2014. Surveillance for emerging respiratory viruses. *Lancet Infect. Dis.* 14, 992–1000. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70840-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70840-0)
- Ampuero, J.S., Ocaña, V., Gómez, J., Gamero, M.E., Garcia, J., Halsey, E.S., Laguna-Torres, V.A., 2012. Adenovirus respiratory tract infections in Peru. *PloS One* 7, e46898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0046898>
- Andersen, K.G., Rambaut, A., Lipkin, W.I., Holmes, E.C., Garry, R.F., 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nat. Med.* 26, 450–452. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0820-9>
- Anderson, L.J., 2013. Respiratory syncytial virus vaccine development. *Semin. Immunol.* 25, 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2013.04.011>
- Anderson, L.J., Hierholzer, J.C., Tsou, C., Hendry, R.M., Fernie, B.F., Stone, Y., McIntosh, K., 1985. Antigenic characterization of respiratory syncytial virus strains with monoclonal antibodies. *J. Infect. Dis.* 151, 626–633. <https://doi.org/10.1093/infdis/151.4.626>
- Antillón, M., Li, X., Willem, L., Bilcke, J., Investigators, R., Jit, M., Beutels, P., 2023. The age profile of respiratory syncytial virus burden in preschool children of low- and middle-income countries: A semi-parametric, meta-regression approach. *PLOS Med.* 20, e1004250. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1004250>
- Aoki, K., Benkö, M., Davison, A.J., Echavarría, M., Erdman, D.D., Harrach, B., Kajon, A.E., Schnurr, D., Wadell, G., 2011. Toward an Integrated Human Adenovirus Designation System That Utilizes Molecular and Serological Data and Serves both Clinical and Fundamental Virology[▽]. *J. Virol.* 85, 5703–5704. <https://doi.org/10.1128/JVI.00491-11>
- Apetrei, C., Hahn, B., Rambaut, A., et al., 2021. HIV Sequence Compendium 2021. *ElimDupes*. Published by Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory, NM, LA-UR-23-22840. Published [10/08/2016]. Updated [31/10/2022]. [WWW Document]. URL <https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/elimdupesv2/elimdupes.html> (accessed 1.5.23).
- Arbiza, J., Delfraro, A., Frabasile, S., 2005. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus in Uruguay: 1985-2001—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 221–230. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000300001>
- Arruda, E., Pitkäranta, A., Witek, T.J., Doyle, C.A., Hayden, F.G., 1997. Frequency and natural history of rhinovirus infections in adults during autumn. *J. Clin. Microbiol.* 35, 2864–2868.
- Artika, I.M., Dewantari, A.K., Wiyatno, A., 2020. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon* 6, e04743. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04743>

- Asha, K., Kumar, B., 2019. Emerging Influenza D Virus Threat: What We Know so Far! *J. Clin. Med.* 8, 192. <https://doi.org/10.3390/jcm8020192>
- Aubin, I., Coblenz, L., Cixous, B., 2003. La bronchiolite aiguë du nourrisson : des recommandations à la pratique. *la revue exercer.*
- Baber, R., 2020. Pandemics: learning from the past. *Climacteric* 23, 211–212. <https://doi.org/10.1080/13697137.2020.1756586>
- Bajaj, S., Dey, D., Bhukar, R., Kumar, M., Banerjee, M., 2016. Non-Enveloped Virus Entry: Structural Determinants and Mechanism of Functioning of a Viral Lytic Peptide. *J. Mol. Biol.* 428, 3540–3556. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.06.006>
- Baltimore, D., 1971. Expression of animal virus genomes. *Bacteriol. Rev.* 35, 235–241. <https://doi.org/10.1128/br.35.3.235-241.1971>
- Barakat, A., Ihazmad, H., Benkaroum, S., Cherkaoui, I., Benmamoun, A., Youbi, M., Aouad, R.E., 2011. Influenza Surveillance among Outpatients and Inpatients in Morocco, 1996–2009. *PLOS ONE* 6, e24579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024579>
- Barik, S., 2012. New treatments for influenza. *BMC Med.* 10, 104. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-104>
- Baron, S. (Ed.), 1996. *Medical Microbiology*, 4th ed. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Barr, I.G., Williams, T.C., Salimi, V., Buchholz, U.J., 2022. Addendum to Proposal for Human Respiratory Syncytial Virus Nomenclature below the Species Level. *Emerg. Infect. Dis.* 28, 764. <https://doi.org/10.3201/eid2803.212438>
- Bates, J.T., Keefer, C.J., Slaughter, J.C., Kulp, D.W., Schief, W.R., Crowe, J.E., 2014. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology* 454–455, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.010>
- Beeler, J.A., van Wyke Coelingh, K., 1989. Neutralization epitopes of the F glycoprotein of respiratory syncytial virus: effect of mutation upon fusion function. *J. Virol.* 63, 2941–2950.
- Beeraka, N.M., Tulimilli, S.V., Karnik, M., Sadhu, S.P., Pragada, R.R., Aliev, G., Madhunapantula, S.V., 2021. The Current Status and Challenges in the Development of Vaccines and Drugs against Severe Acute Respiratory Syndrome-Corona Virus-2 (SARS-CoV-2). *BioMed Res. Int.* 2021, 8160860. <https://doi.org/10.1155/2021/8160860>
- Beigel, J.H., Farrar, J., Han, A.M., Hayden, F.G., Hyer, R., de Jong, M.D., Lochindarat, S., Nguyen, T.K.T., Nguyen, T.H., Tran, T.H., Nicoll, A., Touch, S., Yuen, K.-Y., Writing Committee of the World Health Organization (WHO) Consultation on Human Influenza A/H5, 2005. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N. Engl. J. Med.* 353, 1374–1385. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052211>
- Bellon, G., 2001. Bronchiolite aiguë du nourrisson. Définition. *Arch Pédiatr* 25–30.
- Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), 2015. Front Matter, in: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. i–ii. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00325-8>
- Berciaud, S., Rayne, F., Kassab, S., Jubert, C., Faure-Della Corte, M., Salin, F., Wodrich, H., Lafon, M.E., Typadeno Study Members, 2012. Adenovirus infections in Bordeaux University Hospital 2008–2010: clinical and virological features. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* 54, 302–307. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.04.009>
- Berry, G.J., Babady, N.E., 2023. Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus, in: *Manual of Clinical Microbiology*. ASM Press, Washington, DC.
- Boncrisiani, H.F., Criado, M.F., Arruda, E., 2009. Respiratory Viruses. *Encycl. Microbiol.* 500–518. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00314-X>
- Bose, M.E., He, J., Shrivastava, S., Nelson, M.I., Bera, J., Halpin, R.A., Town, C.D., Lorenzi, H.A., Noyola, D.E., Falcone, V., Gerna, G., De Beenhouwer, H., Videla, C., Kok, T., Venter, M., Williams, J.V., Henrickson, K.J., 2015. Sequencing and analysis of globally obtained human respiratory

- syncytial virus A and B genomes. *PloS One* 10, e0120098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120098>
- Botosso, V.F., Zanotto, P.M. de A., Ueda, M., Arruda, E., Gilio, A.E., Vieira, S.E., Stewien, K.E., Peret, T.C.T., Jamal, L.F., Pardini, M.I. de M.C., Pinho, J.R.R., Massad, E., Sant'Anna, O.A., Holmes, E.C., Durigon, E.L., Consortium, and the V., 2009. Positive Selection Results in Frequent Reversible Amino Acid Replacements in the G Protein Gene of Human Respiratory Syncytial Virus. *PLOS Pathog.* 5, e1000254. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000254>
- Bouvier, N.M., Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26 Suppl 4, D49-53. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.07.039>
- Bower, J., McBride, J.T., 2015. Bronchiolitis, in: Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*, W.B. Saunders. pp. 818-822.e1.
- Branche, A.R., Falsey, A.R., 2016. Parainfluenza Virus Infection. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 538–554. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584798>
- Bridges, C.B., Kuehnert, M.J., Hall, C.B., 2003. Transmission of influenza: implications for control in health care settings. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 37, 1094–1101. <https://doi.org/10.1086/378292>
- Bright, R.A., Shay, D.K., Shu, B., Cox, N.J., Klimov, A.I., 2006. Adamantane resistance among influenza A viruses isolated early during the 2005–2006 influenza season in the United States. *JAMA* 295, 891–894. <https://doi.org/10.1001/jama.295.8.joc60020>
- Britton, P.N., Dale, R.C., Blyth, C.C., Clark, J.E., Crawford, N., Marshall, H., Elliott, E.J., Macartney, K., Booy, R., Jones, C.A., for the Australian Childhood Encephalitis Study Investigators and the Paediatric Active Enhanced Disease Surveillance Network, 2020. Causes and Clinical Features of Childhood Encephalitis: A Multicenter, Prospective Cohort Study. *Clin. Infect. Dis.* 70, 2517–2526. <https://doi.org/10.1093/cid/ciz685>
- Broor, S., Campbell, H., Hirve, S., Hague, S., Jackson, S., Moen, A., Nair, H., Palekar, R., Rajatonirina, S., Smith, P.G., Venter, M., Wairagkar, N., Zambon, M., Ziegler, T., Zhang, W., 2020. Leveraging the Global Influenza Surveillance and Response System for global respiratory syncytial virus surveillance-opportunities and challenges. *Influenza Other Respir. Viruses* 14, 622–629. <https://doi.org/10.1111/irv.12672>
- Brouard, J., Flammang, A., Tran, L., Dina, J., Vabret, A., 2018. Infections respiratoires aiguës virales des voies aériennes inférieures. *EMC - Pédiatrie*, Elsevier Masson 13.
- Brümmer, L.E., Katzenschlager, S., Gaedert, M., Erdmann, C., Schmitz, S., Bota, M., Grilli, M., Larmann, J., Weigand, M.A., Pollock, N.R., Macé, A., Carmona, S., Ongarello, S., Sacks, J.A., Denking, C.M., 2021. Accuracy of novel antigen rapid diagnostics for SARS-CoV-2: A living systematic review and meta-analysis. *PLoS Med.* 18, e1003735. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003735>
- Cacciabue, M., Goya, S., 2020. Molecular classification of Respiratory Syncytial Virus sequences.
- Cane, P.A., 2001. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus. *Rev. Med. Virol.* 11, 103–116. <https://doi.org/10.1002/rmv.305>
- Carman, K.B., Calik, M., Karal, Y., Isikay, S., Kocak, O., Ozcelik, A., Yazar, A.S., Nuhoglu, C., Sag, C., Kilic, O., Dinleyici, M., Lacinel Gurlevik, S., Yimenicioglu, S., Ekici, A., Perk, P., Tosun, A., Isik, I., Yarar, C., Arslantas, D., Dinleyici, E.C., 2019. Viral etiological causes of febrile seizures for respiratory pathogens (EFES Study). *Hum. Vaccines Immunother.* 15, 496–502. <https://doi.org/10.1080/21645515.2018.1526588>
- Carroll, K.C., Adams, L.L., 2016. Lower Respiratory Tract Infections. *Microbiol. Spectr.* 4. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.DMIH2-0029-2016>
- Cavallieri, F., Sellner, J., Zedde, M., Moro, E., 2022. Neurologic complications of coronavirus and other respiratory viral infections. *Handb. Clin. Neurol.* 189, 331–358. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91532-8.00004-5>

- Chang, J., 2011. Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine. *BMB Rep.* 44, 232–237. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2011.44.4.232>
- Chanock, R., Roizman, B., Myers, R., 1957. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). I. Isolation, properties and characterization. *Am. J. Hyg.* 66, 281–290. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119901>
- Chappell, J.D., Dermody, T.S., 2015. *Biology of Viruses and Viral Diseases*, in: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier, pp. 1681-1693.e4. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00134-X>
- Chen, M., Zhu, Z., Huang, F., Liu, D., Zhang, T., Ying, D., Wu, J., Xu, W., 2015. Adenoviruses Associated with Acute Respiratory Diseases Reported in Beijing from 2011 to 2013. *PLOS ONE* 10, e0121375. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121375>
- Chen, W., Calvo, P.A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J.R., Yewdell, J.W., 2001. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat. Med.* 7, 1306–1312. <https://doi.org/10.1038/nm1201-1306>
- Cherry, J., Newman, A., 1998. Sinusitis, in: Feigin RD, Cherry JD, Eds. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. WB Saunders, Philadelphia, PA., pp. 183–192.
- Cheung, T.K.W., Poon, L.L.M., 2007. *Biology of Influenza A Virus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1102, 1–25. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>
- Chikhaoui, A., Nzoyikorera, N., Diawara, I., Jouhadi, Z., Zerouali, K., 2022. Burden of invasive pneumococcal disease in children in Casablanca, Morocco four years after the introduction of pneumococcal vaccination. *Pan Afr. Med. J.* 41, 2. <https://doi.org/10.11604/pamj.2022.41.2.29449>
- Chirkova, T., Lin, S., Oomens, A.G.P., Gaston, K.A., Boyoglu-Barnum, S., Meng, J., Stobart, C.C., Cotton, C.U., Hartert, T.V., Moore, M.L., Ziady, A.G., Anderson, L.J., 2015. CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J. Gen. Virol.* 96, 2543–2556. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000218>
- Cho, H.J., Shim, S.-Y., Son, D.W., Sun, Y.H., Tchah, H., Jeon, I.-S., 2013. Respiratory viruses in neonates hospitalized with acute lower respiratory tract infections. *Pediatr. Int.* 55, 49–53. <https://doi.org/10.1111/j.1442-200X.2012.03727.x>
- Chughtai, A.A., WANG, Q., DUNG, T.C., MACINTYRE, C.R., 2017. The presence of fever in adults with influenza and other viral respiratory infections. *Epidemiol. Infect.* 145, 148–155. <https://doi.org/10.1017/S0950268816002181>
- Çiçek, C., Arslan, A., Karakuş, H.S., Yalaz, M., Saz, E.U., Pullukçu, H., Çok, G., 2015. [Prevalence and seasonal distribution of respiratory viruses in patients with acute respiratory tract infections, 2002-2014]. *Mikrobiyol. Bul.* 49, 188–200. <https://doi.org/10.5578/mb.9024>
- Clements, D.A., Langdon, L., Bland, C., Walter, E., 1995. Influenza A vaccine decreases the incidence of otitis media in 6- to 30-month-old children in day care. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.* 149, 1113–1117. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1995.02170230067009>
- Collins, P.L., Karron, R.A., 2013. Respiratory syncytial virus and metapneumovirus, in: *Fields Virology: Sixth Edition*. Wolters Kluwer Health Adis (ESP).
- Collins, P.L., Melero, J.A., 2011. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. *Virus Res.* 162, 80–99. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.020>
- Costa, C., Sidoti, F., Cavallo, R., 2014. Clinical and Laboratory Diagnosis of Human Respiratory Viral Infections, in: *Human Respiratory Viral Infections*. CRC Press, Boca Raton, pp. 163–176.
- Covalciuc, K.A., Webb, K.H., Carlson, C.A., 1999. Comparison of Four Clinical Specimen Types for Detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (FLU OIA Test) and Cell Culture Methods. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3971–3974. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.12.3971-3974.1999>

- Cowling, B.J., Lau, E.H.Y., Lam, C.L.H., Cheng, C.K.Y., Kovar, J., Chan, K.H., Peiris, J.S.M., Leung, G.M., 2008. Effects of School Closures, 2008 Winter Influenza Season, Hong Kong. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 1660–1662. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080646>
- Cox, R.G., Livesay, S.B., Johnson, M., Ohi, M.D., Williams, J.V., 2012. The human metapneumovirus fusion protein mediates entry via an interaction with RGD-binding integrins. *J. Virol.* 86, 12148–12160. <https://doi.org/10.1128/JVI.01133-12>
- Crosby, A.W., 1976. *Epidemic and Peace, 1918*. Bloomsbury Academic.
- Crowe, J.E., Williams, J.V., 2014. Paramyxoviruses: Respiratory Syncytial Virus and Human Metapneumovirus. *Viral Infect. Hum.* 601–627. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7448-8_26
- Cui, J., Li, F., Shi, Z.-L., 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 181–192. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>
- Dapat, I.C., Shobugawa, Y., Sano, Y., Saito, R., Sasaki, A., Suzuki, Y., Kumaki, A., Zaraket, H., Dapat, C., Oguma, T., Yamaguchi, M., Suzuki, H., 2010. New Genotypes within Respiratory Syncytial Virus Group B Genotype BA in Niigata, Japan. *J. Clin. Microbiol.* 48, 3423–3427. <https://doi.org/10.1128/JCM.00646-10>
- Dasaraju, P.V., Liu, C., 1996. Infections of the Respiratory System, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology*. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).
- Davis, W., Duque, J., Huang, Q.S., Olson, N., Grant, C.C., Newbern, E.C., Thompson, M., Waite, B., Prasad, N., Trenholme, A., Azziz-Baumgartner, E., 2022. Sensitivity and specificity of surveillance case definitions in detection of influenza and respiratory syncytial virus among hospitalized patients, New Zealand, 2012–2016. *J. Infect.* 84, 216–226. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2021.12.012>
- Dawood, F.S., Fiore, A., Kamimoto, L., Bramley, A., Reingold, A., Gershman, K., Meek, J., Hadler, J., Arnold, K.E., Ryan, P., Lynfield, R., Morin, C., Mueller, M., Baumbach, J., Zansky, S., Bennett, N.M., Thomas, A., Schaffner, W., Kirschke, D., Finelli, L., Emerging Infections Program Network, 2010. Burden of seasonal influenza hospitalization in children, United States, 2003 to 2008. *J. Pediatr.* 157, 808–814. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2010.05.012>
- de Graaf, M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Holmes, E.C., 2008. Evolutionary dynamics of human and avian metapneumoviruses. *J. Gen. Virol.* 89, 2933–2942. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/006957-0>
- de-Paris, F., Beck, C., de Souza Nunes, L., Pinheiro, A.M., Paiva, R.M., da Silva Menezes, D., Pires, M.R., dos Santos, R.P., de Souza Kuchenbecker, R., Barth, A.L., 2014. Evaluation of respiratory syncytial virus group A and B genotypes among nosocomial and community-acquired pediatric infections in southern Brazil. *Virol. J.* 11, 36. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-36>
- de-Paris, F., Beck, C., Machado, A.B.M.P., Paiva, R.M., da Silva Menezes, D., de Souza Nunes, L., Kuchenbecker, R., Barth, A.L., 2012. Optimization of one-step duplex real-time RT-PCR for detection of influenza and respiratory syncytial virus in nasopharyngeal aspirates. *J. Virol. Methods* 186, 189–192. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.07.008>
- De Paulis, M., Gilio, A.E., Ferraro, A.A., Ferronato, A.E., do Sacramento, P.R., Botosso, V.F., Oliveira, D.B.L. de, Marinheiro, J.C., Hársi, C.M., Durigon, E.L., Vieira, S.E., 2011. Severity of viral coinfection in hospitalized infants with respiratory syncytial virus infection. *J. Pediatr. (Rio J.)* 87, 307–313. <https://doi.org/10.2223/JPED.2100>
- Denny, F.W., Murphy, T.F., Clyde, W.A., Collier, A.M., Henderson, F.W., 1983. Croup: an 11-year study in a pediatric practice. *Pediatrics* 71, 871–876.
- Di Giallonardo, F., Kok, J., Fernandez, M., Carter, I., Geoghegan, J.L., Dwyer, D.E., Holmes, E.C., Eden, J.-S., 2018. Evolution of Human Respiratory Syncytial Virus (RSV) over Multiple Seasons in New South Wales, Australia. *Viruses* 10, 476. <https://doi.org/10.3390/v10090476>
- Dimmock, N.J., Easton, A.J., Leppard, K.N., 2008. *Introduction to modern virology*, 6. ed., [Nachdr.]. ed. Blackwell Publ, Malden, MA.

- Doiron, O.A., 1983. Febrile Seizures: Controversy and Consensus. *Can. Fam. Physician* 29, 94–97.
- Donaldson, G.C., 2006. Climate change and the end of the respiratory syncytial virus season. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 42, 677–679. <https://doi.org/10.1086/500208>
- Dotan, M., Ashkenazi-Hoffnung, L., Samra, Z., Livni, G., Yarden-Bilavsky, H., Amir, J., Bilavsky, E., 2013. Hospitalization for respiratory syncytial virus bronchiolitis and disease severity in twins. *Isr. Med. Assoc. J. IMAJ* 15, 701–704.
- Drews, A.L., Atmar, R.L., Glezen, W.P., Baxter, B.D., Piedra, P.A., Greenberg, S.B., 1997. Dual Respiratory Virus Infections. *Clin. Infect. Dis.* 25, 1421–1429. <https://doi.org/10.1086/516137>
- Drieux, L., 2010. Caractéristiques des infections respiratoires basses chez les sujets âgés. *Antibiot. Paris Fr.* 1999 12, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.antib.2010.05.002>
- Duppenthaler, A., Gorgievski-Hrisoho, M., Frey, U., Aebi, C., 2003. Two-year periodicity of respiratory syncytial virus epidemics in Switzerland. *Infection* 31, 75–80. <https://doi.org/10.1007/s15010-002-3124-8>
- Duwe, S., 2017. Influenza viruses – antiviral therapy and resistance. *GMS Infect. Dis.* 5, Doc04. <https://doi.org/10.3205/id000030>
- Edinger, T.O., Pohl, M.O., Stertz, S., 2014. Entry of influenza A virus: host factors and antiviral targets. *J. Gen. Virol.* 95, 263–277. <https://doi.org/10.1099/vir.0.059477-0>
- Edwards, K.M., Zhu, Y., Griffin, M.R., Weinberg, G.A., Hall, C.B., Szilagyi, P.G., Staat, M.A., Iwane, M., Prill, M.M., Williams, J.V., New Vaccine Surveillance Network, 2013. Burden of human metapneumovirus infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 368, 633–643. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1204630>
- El Ramahi, R., Freifeld, A., 2019. Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention of Influenza Infection in Oncology Patients. *J. Oncol. Pract.* 15, 177–184. <https://doi.org/10.1200/JOP.18.00567>
- Ellison, R.T., Donowitz, G.R., 2015. Acute Pneumonia, in: Bennett, J.E., Dolin, R., Blaser, M.J. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (Eighth Edition), W.B. Saunders. pp. 823-846.e5.
- Empey, K.M., Peebles, R.S., Kolls, J.K., 2010. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 50, 1258–1267. <https://doi.org/10.1086/651603>
- Englund, J.A., Boeckh, M., Kuypers, J., Nichols, W.G., Hackman, R.C., Morrow, R.A., Fredricks, D.N., Corey, L., 2006. Brief Communication: Fatal Human Metapneumovirus Infection in Stem-Cell Transplant Recipients. *Ann. Intern. Med.* 144, 344–349. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-144-5-200603070-00010>
- Enjuanes, L., Zuñiga, S., Castaño-Rodríguez, C., Gutierrez-Alvarez, J., Canton, J., Sola, I., 2016. Molecular Basis of Coronavirus Virulence and Vaccine Development. *Adv. Virus Res.* 96, 245–286. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.003>
- Eriksson, M., Nilsson, A., Bennet, R., 2017. Changing diagnosis coding routines may confound the results of longitudinal childhood pneumonia studies. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 106, 1825–1829. <https://doi.org/10.1111/apa.13923>
- Eshaghi, A., Duvvuri, V.R., Lai, R., Nadarajah, J.T., Li, A., Patel, S.N., Low, D.E., Gubbay, J.B., 2012. Genetic Variability of Human Respiratory Syncytial Virus A Strains Circulating in Ontario: A Novel Genotype with a 72 Nucleotide G Gene Duplication. *PLoS ONE* 7, e32807. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032807>
- Fall, A., Dia, N., Cisse, E.H.A.K., Kiori, D.E., Sarr, F.D., Sy, S., Goudiaby, D., Richard, V., Niang, M.N., 2016. Epidemiology and Molecular Characterization of Human Respiratory Syncytial Virus in Senegal after Four Consecutive Years of Surveillance, 2012-2015. *PLoS One* 11, e0157163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157163>
- Falsey, A.R., 2012. Current management of parainfluenza pneumonitis in immunocompromised patients: a review. *Infect. Drug Resist.* 5, 121–127. <https://doi.org/10.2147/IDR.S25874>

- Falsey, A.R., Walsh, E.E., 2005. Respiratory Syncytial Virus Infection in Elderly Adults. *Drugs Aging* 22, 577–587. <https://doi.org/10.2165/00002512-200522070-00004>
- Fitzner, J., Qasmieh, S., Mounts, A.W., Alexander, B., Besselaar, T., Briand, S., Brown, C., Clark, S., Dueger, E., Gross, D., Hauge, S., Hirve, S., Jorgensen, P., Katz, M.A., Mafi, A., Malik, M., McCarron, M., Meerhoff, T., Mori, Y., Mott, J., Olivera, M.T. da C., Ortiz, J.R., Palekar, R., Rebelo-de-Andrade, H., Soetens, L., Yahaya, A.A., Zhang, W., Vandemaele, K., 2018. Revision of clinical case definitions: influenza-like illness and severe acute respiratory infection. *Bull. World Health Organ.* 96, 122–128. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.194514>
- FLEMING, D.M., ELLIOT, A.J., CROSS, K.W., 2007. Morbidity profiles of patients consulting during influenza and respiratory syncytial virus active periods. *Epidemiol. Infect.* 135, 1099–1108. <https://doi.org/10.1017/S0950268807007881>
- Fontana, J.M., Eiras, D.P., Salvatore, M., 2014. Human Influenza Virus Infections, in: Singh, S.K. (Ed.), *Human Respiratory Viral Infections*. CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 403–425.
- Foulongne, V., 2015. Le virome humain. *Rev. Francoph. Lab.* 2015, 59–65. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(15\)72822-4](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(15)72822-4)
- Foulongne, V., Rodière, M., Segondy, M., 2006. Human Bocavirus in Children. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 862–863. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051523>
- Foulongne, V., Segondy, M., 2009. Le bocavirus humain (HBoV). *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 197–202. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.01.001>
- Fox, J.D., 2007. Respiratory virus surveillance and outbreak investigation. *J. Clin. Virol.* 40, S24–S30. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(07\)70006-9](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(07)70006-9)
- Freytmuth, F., 2004. Virus respiratoire syncytial et virus para-influenza humains : clinique. *EMC - Pédiatrie* 1, 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.emcped.2003.06.003>
- Freytmuth, F., Vabret, A., Dina, J., Cuvillon-Nimal, D., Lubin, C., Vaudecrane, A., Guillois, B., Gouarin, S., Petitjean, J., Lafaix-Delaire, F., Brouard, J., 2010. Les virus des bronchiolites aiguës. *Arch. Pediatr.* 17, 1192–1201. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2010.05.006>
- Freytmuth, F., Vabret, A., Dina, J., Daubin, C., Gouarin, S., Petitjean, J., Charbonneau, P., 2007. Techniques actuelles de diagnostic des infections virales respiratoires en réanimation. *Réanimation* 16, 200–209. <https://doi.org/10.1016/j.reaurg.2007.02.018>
- Fung, T.S., Liu, D.X., 2019. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction. *Annu. Rev. Microbiol.* 73, 529–557. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115759>
- Gasparini, R., Amicizia, D., Lai, P.L., Panatto, D., 2012. Clinical and socioeconomic impact of seasonal and pandemic influenza in adults and the elderly. *Hum. Vaccines Immunother.* 8, 21–28. <https://doi.org/10.4161/hv.8.1.17622>
- Gaymard, A., Bouscambert-Duchamp, M., Pichon, M., Frobert, E., Vallee, J., Lina, B., Casalegno, J.-S., Morfin, F., 2018. Genetic characterization of respiratory syncytial virus highlights a new BA genotype and emergence of the ON1 genotype in Lyon, France, between 2010 and 2014. *J. Clin. Virol.* 102, 12–18. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2018.02.004>
- Geberetsadik, A., Worku, A., Berhane, Y., 2015. Factors associated with acute respiratory infection in children under the age of 5 years: evidence from the 2011 Ethiopia Demographic and Health Survey. *Pediatr. Health Med. Ther.* 6, 9–13. <https://doi.org/10.2147/PHMT.S77915>
- Géhanno, P., 2004. Otorrhée purulente chez l'enfant : conduite à tenir. *J. Pédiatrie Puériculture* 17, 405–407. <https://doi.org/10.1016/j.jpp.2004.06.001>
- Giannelli, F.R., 2017. Antibiotic-associated diarrhea. *JAAPA* 30, 46. <https://doi.org/10.1097/01.JAA.0000524721.01579.c9>
- Giebink, G.S., 1994. Childhood sinusitis: pathophysiology, diagnosis and treatment. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13, S55-58; discussion S63-65.
- Gill, P.J., Ashdown, H.F., Wang, K., Heneghan, C., Roberts, N.W., Harnden, A., Mallett, S., 2015. Identification of children at risk of influenza-related complications in primary and ambulatory

- care: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* 3, 139–149. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(14\)70252-8](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(14)70252-8)
- Gimenez, H.B., Hardman, N., Keir, H.M., Cash, P., 1986. Antigenic variation between human respiratory syncytial virus isolates. *J. Gen. Virol.* 67 (Pt 5), 863–870. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-67-5-863>
- Gíria, M.T., Rebelo de Andrade, H., Santos, L.A., Correia, V.M., Pedro, S.V., Santos, M.A., 2012. Genomic signatures and antiviral drug susceptibility profile of A(H1N1)pdm09. *J. Clin. Virol.* 53, 140–144. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2011.11.002>
- Glanville, A.R., Scott, A.I.R., Morton, J.M., Aboyoun, C.L., Plit, M.L., Carter, I.W., Malouf, M.A., 2005. Intravenous ribavirin is a safe and cost-effective treatment for respiratory syncytial virus infection after lung transplantation. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* 24, 2114–2119. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2005.06.027>
- Gómez, S., Prieto, C., Vera, C., R Otero, J., Folgueira, L., 2016. Evaluation of a new rapid diagnostic test for the detection of influenza and RSV. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 34, 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2015.05.007>
- Goya, S., Galiano, M., Nauwelaers, I., Trento, A., Openshaw, P.J., Mistchenko, A.S., Zambon, M., Viegas, M., 2020. Toward unified molecular surveillance of RSV: A proposal for genotype definition. *Influenza Other Respir. Viruses* 14, 274–285. <https://doi.org/10.1111/irv.12715>
- Greenberg, S.B., 2016. Update on Human Rhinovirus and Coronavirus Infections. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 555–571. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584797>
- Griffiths, C., Drews, S.J., Marchant, D.J., 2017. Respiratory Syncytial Virus: Infection, Detection, and New Options for Prevention and Treatment. *Clin. Microbiol. Rev.* 30, 277–319. <https://doi.org/10.1128/CMR.00010-16>
- Groothuis, J.R., Fryzek, J.P., Makari, D., Steffey, D., Martone, W.J., 2011. Respiratory syncytial virus hospitalization trends in infants with chronic lung disease of infancy, 1998-2008. *Clin. Epidemiol.* 3, 245–250. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S17189>
- Guarner, J., 2020. Three Emerging Coronaviruses in Two Decades. *Am. J. Clin. Pathol.* 153, 420–421. <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqaa029>
- Guido, M., Tumolo, M.R., Verri, T., Romano, A., Serio, F., De Giorgi, M., De Donno, A., Bagordo, F., Zizza, A., 2016. Human bocavirus: Current knowledge and future challenges. *World J. Gastroenterol.* 22, 8684–8697. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i39.8684>
- Gupta, R., Brunak, S., 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pac. Symp. Biocomput. Pac. Symp. Biocomput.* 310–322.
- Gupta, S., Gupta, T., Gupta, N., 2022. Global respiratory virus surveillance: strengths, gaps, and way forward. *Int. J. Infect. Dis.* 121, 184–189. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.05.032>
- Haerskjold, A., Kristensen, K., Kamper-Jørgensen, M., Nybo Andersen, A.-M., Ravn, H., Graff Stensballe, L., 2016. Risk Factors for Hospitalization for Respiratory Syncytial Virus Infection: A Population-based Cohort Study of Danish Children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 35, 61–65. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000000924>
- Hall, C.B., 2010. Respiratory syncytial virus in young children. *Lancet Lond. Engl.* 375, 1500–1502. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60401-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60401-1)
- Hall, C.B., 2001. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N. Engl. J. Med.* 344, 1917–1928. <https://doi.org/10.1056/NEJM200106213442507>
- Hall, C.B., McBride, J.T., Walsh, E.E., Bell, D.M., Gala, C.L., Hildreth, S., Ten Eyck, L.G., Hall, W.J., 1983. Aerosolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. A randomized double-blind study. *N. Engl. J. Med.* 308, 1443–1447. <https://doi.org/10.1056/NEJM198306163082403>
- Hall, C.B., Weinberg, G.A., Iwane, M.K., Blumkin, A.K., Edwards, K.M., Staat, M.A., Auinger, P., Griffin, M.R., Poehling, K.A., Erdman, D., Grijalva, C.G., Zhu, Y., Szilagyi, P., 2009. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N. Engl. J. Med.* 360, 588–598. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0804877>

- Hamilton, B.S., Whittaker, G.R., Daniel, S., 2012. Influenza Virus-Mediated Membrane Fusion: Determinants of Hemagglutinin Fusogenic Activity and Experimental Approaches for Assessing Virus Fusion. *Viruses* 4, 1144–1168. <https://doi.org/10.3390/v4071144>
- Hamre, D., Procknow, J.J., 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 121, 190–193. <https://doi.org/10.3181/00379727-121-30734>
- Hamza, A., Shafat, Z., Parray, Z.A., Hisamuddin, M., Khan, W.H., Ahmed, A., Almajhdi, F.N., Farrag, M.A., Mohammed, A.A., Islam, A., Parveen, S., 2021. Structural Characterization and Binding Studies of the Ectodomain G Protein of Respiratory Syncytial Virus Reveal the Crucial Role of pH with Possible Implications in Host–Pathogen Interactions. *ACS Omega* 6, 10403–10414. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c00800>
- Harper, S.A., Bradley, J.S., Englund, J.A., File, T.M., Gravenstein, S., Hayden, F.G., McGeer, A.J., Neuzil, K.M., Pavia, A.T., Tapper, M.L., Uyeki, T.M., Zimmerman, R.K., 2009. Influenza estacional en adultos y niños—Diagnóstico, tratamiento, quimioprofilaxis y control de brotes institucionales: Guías de práctica clínica de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de Estados Unidos de América. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 48, 1003–1034. <https://doi.org/10.1086/604670>
- Harris, A., Cardone, G., Winkler, D.C., Heymann, J.B., Brecher, M., White, J.M., Steven, A.C., 2006. Influenza virus pleiomorphy characterized by cryoelectron tomography. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 19123–19127. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607614103>
- Hazelton, B., Gray, T., Ho, J., Ratnamohan, V.M., Dwyer, D.E., Kok, J., 2015. Detection of influenza A and B with the Alere™ i Influenza A & B: a novel isothermal nucleic acid amplification assay. *Influenza Other Respir. Viruses* 9, 151–154. <https://doi.org/10.1111/irv.12303>
- Heikkinen, T., Ruuskanen, O., Waris, M., Ziegler, T., Arola, M., Halonen, P., 1991. Influenza vaccination in the prevention of acute otitis media in children. *Am. J. Dis. Child.* 1960 145, 445–448. <https://doi.org/10.1001/archpedi.1991.02160040103017>
- Henrickson, K.J., 2003. Parainfluenza Viruses. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 242–264. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.242-264.2003>
- Hibino, A., Saito, R., Taniguchi, K., Zaraket, H., Shobugawa, Y., Matsui, T., Suzuki, H., Japanese HRSV Collaborative Study Group, 2018. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus among children in Japan during three seasons and hospitalization risk of genotype ON1. *PloS One* 13, e0192085. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192085>
- Hilleman, M.R., Werner, J.H., 1954. Recovery of new agent from patients with acute respiratory illness. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med. Soc. Exp. Biol. Med. N. Y. N* 85, 183–188. <https://doi.org/10.3181/00379727-85-20825>
- Hirve, S., Crawford, N., Palekar, R., Zhang, W., 2020. Clinical characteristics, predictors, and performance of case definition—Interim results from the WHO global respiratory syncytial virus surveillance pilot. *Influenza Other Respir. Viruses* 14, 647–657. <https://doi.org/10.1111/irv.12688>
- Hotard, A.L., Laikhter, E., Brooks, K., Hartert, T.V., Moore, M.L., 2015. Functional Analysis of the 60-Nucleotide Duplication in the Respiratory Syncytial Virus Buenos Aires Strain Attachment Glycoprotein. *J. Virol.* 89, 8258–8266. <https://doi.org/10.1128/JVI.01045-15>
- Houldcroft, C.J., Beale, M.A., Breuer, J., 2017. Clinical and biological insights from viral genome sequencing. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 183–192. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.182>
- Hu, A., Colella, M., Tam, J.S., Rappaport, R., Cheng, S.-M., 2003. Simultaneous detection, subgrouping, and quantitation of respiratory syncytial virus A and B by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 41, 149–154. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.1.149-154.2003>
- Hurax, J.-M., Nicolas, J.-C., Agut, H., Peigue-Lafeuille, H., 2003. *Traité de virologie médicale*. Editions Estem.
- Ison, M.G., 2006. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 43, 331–339. <https://doi.org/10.1086/505498>

- Iuliano, A.D., Roguski, K.M., Chang, H.H., Muscatello, D.J., Palekar, R., Tempia, S., Cohen, C., Gran, J.M., Schanzer, D., Cowling, B.J., Wu, P., Kyncl, J., Ang, L.W., Park, M., Redlberger-Fritz, M., Yu, H., Espenhain, L., Krishnan, A., Emukule, G., van Asten, L., Pereira da Silva, S., Aungkulanon, S., Buchholz, U., Widdowson, M.-A., Bresee, J.S., Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator Network, 2018. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet Lond. Engl.* 391, 1285–1300. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)33293-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)33293-2)
- Ivancic-Jelecki, J., Slovic, A., Ljubin-Sternak, S., Mlinarić Galinović, G., Forcic, D., 2018. Variability analysis and inter-genotype comparison of human respiratory syncytial virus small hydrophobic gene. *Virol. J.* 15, 109. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-1020-9>
- Jain, N., Lodha, R., Kabra, S.K., 2001. Upper respiratory tract infections. *Indian J. Pediatr.* 68, 1135–1138. <https://doi.org/10.1007/BF02722930>
- Jain, S., Williams, D.J., Arnold, S.R., Ampofo, K., Bramley, A.M., Reed, C., Stockmann, C., Anderson, E.J., Grijalva, C.G., Self, W.H., Zhu, Y., Patel, A., Hymas, W., Chappell, J.D., Kaufman, R.A., Kan, J.H., Dansie, D., Lenny, N., Hillyard, D.R., Haynes, L.M., Levine, M., Lindstrom, S., Winchell, J.M., Katz, J.M., Erdman, D.D., Schneider, E., Hicks, L.A., Wunderink, R.G., Edwards, K.M., Pavia, A.T., McCullers, J.A., Finelli, D.L., Team, for the C. for D.C. and P. (CDC) E. of P. in the C. (EPIC) S., 2015. Community-Acquired Pneumonia Requiring Hospitalization among U.S. Children. *N. Engl. J. Med.* 372, 835. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1405870>
- Jankowski, R., 2020. Virus et épidémies virales dans la théorie métabolique de l'évolution. *Ann. Fr. Oto-Rhino-Laryngol. Pathol. Cervico-Faciale* 137, 275–279. <https://doi.org/10.1016/j.aforl.2020.04.017>
- Jin, Y., Zhang, R.-F., Xie, Z.-P., Yan, K.-L., Gao, H.-C., Song, J.-R., Yuan, X.-H., Cheng, W.-X., Hou, Y.-D., Duan, Z.-J., 2012. Newly identified respiratory viruses associated with acute lower respiratory tract infections in children in Lanzou, China, from 2006 to 2009. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 74–80. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03541.x>
- Johnson, F.B., 1990. Transport of viral specimens. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 120–131. <https://doi.org/10.1128/cmr.3.2.120>
- Johnson, P R, Olmsted, R.A., Prince, G.A., Murphy, B.R., Alling, D.W., Walsh, E.E., Collins, P.L., 1987. Antigenic relatedness between glycoproteins of human respiratory syncytial virus subgroups A and B: evaluation of the contributions of F and G glycoproteins to immunity. *J. Virol.* 61, 3163–3166.
- Johnson, P. R., Spriggs, M.K., Olmsted, R.A., Collins, P.L., 1987. The G glycoprotein of human respiratory syncytial viruses of subgroups A and B: extensive sequence divergence between antigenically related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84, 5625–5629. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.16.5625>
- Jroundi, I., Mahraoui, C., Benmessaoud, R., Moraleda, C., Benjelloun, B., Bassat, Q., 2015. Knowledge gaps on paediatric respiratory infections in Morocco, Northern Africa. *Arch. Public Health* 73, 28. <https://doi.org/10.1186/s13690-015-0076-x>
- Jroundi, I., Mahraoui, C., Benmessaoud, R., Moraleda, C., Tligui, H., Seffar, M., Kettani, S.C., Benjelloun, B.S., Chaacho, S., Maaroufi, A., Hayes, E.B., Álvarez-Martínez, M.J., Muñoz-Almagro, C., Ruiz, J., Alonso, P.L., Bassat, Q., 2014. The Epidemiology and Aetiology of Infections in Children Admitted with Clinical Severe Pneumonia to a University Hospital in Rabat, Morocco. *J. Trop. Pediatr.* 60, 270–278. <https://doi.org/10.1093/tropej/fmu010>
- Juvé, T., Mertsola, J., Waris, M., Leinonen, M., Meurman, O., Roivainen, M., Eskola, J., Saikku, P., Ruuskanen, O., 2000. Etiology of community-acquired pneumonia in 254 hospitalized children. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 19, 293–298. <https://doi.org/10.1097/00006454-200004000-00006>
- Kahn, J., 2008. Human bocavirus: clinical significance and implications. *Curr. Opin. Pediatr.* 20, 62–66. <https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3282f3f518>

- Kajon, A.E., Lu, X., Erdman, D.D., Louie, J., Schnurr, D., St George, K., Koopmans, M.P., Allibhai, T., Metzgar, D., 2010. Molecular Epidemiology and Brief History of Emerging Adenovirus 14—Associated Respiratory Disease in the United States. *J. Infect. Dis.* 202, 93–103. <https://doi.org/10.1086/653083>
- Kang, M., Chippa, V., An, J., 2023. Viral Myocarditis, in: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kantola, K., Hedman, L., Allander, T., Jartti, T., Lehtinen, P., Ruuskanen, O., Hedman, K., Söderlund-Venermo, M., 2008. Serodiagnosis of Human Bocavirus Infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 46, 540–546. <https://doi.org/10.1086/526532>
- Kennedy, J.L., Turner, R.B., Braciale, T., Heymann, P.W., Borish, L., 2012. Pathogenesis of rhinovirus infection. *Curr. Opin. Virol., Viral pathogenesis/Vaccines* 2, 287–293. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.03.008>
- Keren, R., Zaoutis, T.E., Bridges, C.B., Herrera, G., Watson, B.M., Wheeler, A.B., Licht, D.J., Luan, X.Q., Coffin, S.E., 2005. Neurological and neuromuscular disease as a risk factor for respiratory failure in children hospitalized with influenza infection. *JAMA* 294, 2188–2194. <https://doi.org/10.1001/jama.294.17.2188>
- Kesson, A.M., 2007. Respiratory virus infections. *Paediatr. Respir. Rev.* 8, 240–248. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2007.07.003>
- Kieninger, E., Fuchs, O., Latzin, P., Frey, U., Regamey, N., 2013. Rhinovirus infections in infancy and early childhood. *Eur. Respir. J.* 41, 443–452. <https://doi.org/10.1183/09031936.00203511>
- Kim, H.W., Canchola, J.G., Brandt, C.D., Pyles, G., Chanock, R.M., Jensen, K., Parrott, R.H., 1969. Respiratory syncytial virus disease in infants despite prior administration of antigenic inactivated vaccine. *Am. J. Epidemiol.* 89, 422–434. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a120955>
- Kim, J.K., Jeon, J.-S., Kim, J.W., Rheem, I., 2013. Epidemiology of respiratory viral infection using multiplex rt-PCR in Cheonan, Korea (2006–2010). *J. Microbiol. Biotechnol.* 23, 267–273. <https://doi.org/10.4014/jmb.1212.12050>
- Kimura, K., Ishioka, K., Hashimoto, K., Mori, S., Suzutani, T., Bowlin, T.L., Shigeta, S., 2004. Isolation and characterization of NMSO3-resistant mutants of respiratory syncytial virus. *Antiviral Res.* 61, 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2003.09.008>
- Klein, J.O., 2015. Otitis Externa, Otitis Media, and Mastoiditis, in: Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Elsevier, pp. 767–773.e1. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00062-X>
- Kubo, Y., Hayashi, H., Matsuyama, T., Sato, H., Yamamoto, N., 2012. Retrovirus Entry by Endocytosis and Cathepsin Proteases. *Adv. Virol.* 2012, e640894. <https://doi.org/10.1155/2012/640894>
- Kutter, J.S., Spronken, M.I., Fraaij, P.L., Fouchier, R.A., Herfst, S., 2018. Transmission routes of respiratory viruses among humans. *Curr. Opin. Virol., Emerging viruses: intraspecies transmission • Viral Immunology* 28, 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.001>
- Kwofie, T.B., Anane, Y.A., Nkrumah, B., Annan, A., Nguah, S.B., Owusu, M., 2012. Respiratory viruses in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection in Ghana. *Virol. J.* 9, 78. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-9-78>
- Lamb, R.A., Krug, R.M., 1996. Orthomyxoviridae: The viruses and their replication, in: Knipe, D.M., Howley, P.M., Fields, B.N. (Eds.), *Fields Virology*. Lippincott-Raven Press, Philadelphia.
- Lanari, M., Silvestri, M., Rossi, G.A., 2013. Clinical and pharmacological aspects of immunoprophylaxis for respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Curr. Drug Metab.* 14, 216–225.
- Lansing M. Prescott, 2002. *Microbiology*. 5th Edition.
- Larsen, J.W.W., Sørensen, A.F., Jensen, A.K.G., Poulsen, A., Gehrt, L., Benn, C.S., Sørup, S., 2020. Hospitalizations for infections by age and sex: register-based study of Danish children 1977–2014. *Infect. Dis. Lond. Engl.* 52, 97–106. <https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1682657>
- Le Gall, O., Christian, P., Fauquet, C.M., King, A.M.Q., Knowles, N.J., Nakashima, N., Stanway, G., Gorbalenya, A.E., 2008. Picornavirales, a proposed order of positive-sense single-stranded

- RNA viruses with a pseudo-T = 3 virion architecture. *Arch. Virol.* 153, 715–727. <https://doi.org/10.1007/s00705-008-0041-x>
- le Roux, D.M., Zar, H.J., 2017. Community-acquired pneumonia in children — a changing spectrum of disease. *Pediatr. Radiol.* 47, 1392–1398. <https://doi.org/10.1007/s00247-017-3827-8>
- Leemans, A., Boeren, M., Van der Gucht, W., Martinet, W., Caljon, G., Maes, L., Cos, P., Delputte, P., 2019. Characterization of the role of N-glycosylation sites in the respiratory syncytial virus fusion protein in virus replication, syncytium formation and antigenicity. *Virus Res.* 266, 58–68. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.04.006>
- Leland, D.S., Ginocchio, C.C., 2007. Role of cell culture for virus detection in the age of technology. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 49–78. <https://doi.org/10.1128/CMR.00002-06>
- Leruez-Ville, M., 2007. Diagnostic virologique des infections respiratoires☆. *Arch. Pediatr.* 14, 404–409. <https://doi.org/10.1016/j.arcped.2007.02.004>
- Lessler, J., Reich, N.G., Brookmeyer, R., Perl, T.M., Nelson, K.E., Cummings, D.A.T., 2009. Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review. *Lancet Infect. Dis.* 9, 291–300. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70069-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70069-6)
- Leung, N.H.L., 2021. Transmissibility and transmission of respiratory viruses. *Nat. Rev. Microbiol.* 19, 528–545. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00535-6>
- Lewis, H.M., Parry, J.V., Parry, R.P., Davies, H.A., Sanderson, P.J., Tyrrell, D.A., Valman, H.B., 1979. Role of viruses in febrile convulsions. *Arch. Dis. Child.* 54, 869–876.
- Lion, T., 2014. Adenovirus infections in immunocompetent and immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 27, 441–462. <https://doi.org/10.1128/CMR.00116-13>
- Louca, S., 2021. SARS-CoV-2 infections in 165 countries over time. *Int. J. Infect. Dis.* 111, 336–346. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.08.067>
- Louie, J.K., Kajon, A.E., Holodniy, M., Guardia-LaBar, L., Lee, B., Petru, A.M., Hacker, J.K., Schnurr, D.P., 2008. Severe Pneumonia Due to Adenovirus Serotype 14: A New Respiratory Threat? *Clin. Infect. Dis.* 46, 421–425. <https://doi.org/10.1086/525261>
- Luo, H., Huang, X., Zhong, H., Ye, C., Tan, X., Zhou, K., Yuan, L., Zhang, S., Zhu, X., Lin, C., Wang, W., Xu, L., Cao, K., 2020. Epidemiological characteristics and phylogenetic analysis of human respiratory syncytial virus in patients with respiratory infections during 2011–2016 in southern China. *Int. J. Infect. Dis.* 90, 5–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.10.009>
- Lüsebrink, J., Wiese, C., Thiel, A., Tillmann, R.-L., Ditt, V., Müller, A., Schildgen, O., Schildgen, V., 2010. High Seroprevalence of Neutralizing Capacity against Human Metapneumovirus in All Age Groups Studied in Bonn, Germany. *Clin. Vaccine Immunol.* CVI 17, 481–484. <https://doi.org/10.1128/CVI.00398-09>
- Lwoff, A., Horne, R., Tournier, P., 1962. A system of viruses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 27, 51–55. <https://doi.org/10.1101/sqb.1962.027.001.008>
- Lynch III, J.P., E. Kajon, A., Echavarría, M., 2014. Human Adenovirus: A Respiratory Virus Causing Systemic Disease, in: Singh, S.K. (Ed.), *Human Respiratory Viral Infections*, Ebsco Publishing. CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 325–352.
- Lynch, J., Fishbein, M., Echavarría, M., 2011. Adenovirus. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 32, 494–511. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283287>
- Lynch, J.P., Kajon, A.E., 2016. Adenovirus: Epidemiology, Global Spread of Novel Serotypes, and Advances in Treatment and Prevention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 37, 586–602. <https://doi.org/10.1055/s-0036-1584923>
- Ma, X., Conrad, T., Alchikh, M., Reiche, J., Schweiger, B., Rath, B., 2018. Can we distinguish respiratory viral infections based on clinical features? A prospective pediatric cohort compared to systematic literature review. *Rev. Med. Virol.* 28, e1997. <https://doi.org/10.1002/rmv.1997>
- Mackay, I.M., 2008. Human rhinoviruses: The cold wars resume. *J. Clin. Virol.* 42, 297–320. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2008.04.002>

- Mackay, I.M., Arden, K.E., Nitsche, A., 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 30, 1292–1305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Madeley, C.R., Peiris, J.S.M., 2002. Methods in virus diagnosis: immunofluorescence revisited. *J. Clin. Virol.* 25, 121–134. [https://doi.org/10.1016/S1386-6532\(02\)00039-2](https://doi.org/10.1016/S1386-6532(02)00039-2)
- Magro, M., Mas, V., Chappell, K., Vázquez, M., Cano, O., Luque, D., Terrón, M.C., Melero, J.A., Palomo, C., 2012. Neutralizing antibodies against the preactive form of respiratory syncytial virus fusion protein offer unique possibilities for clinical intervention. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 3089–3094. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115941109>
- Mahony, J.B., Petrich, A., Smieja, M., 2011. Molecular diagnosis of respiratory virus infections. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 48, 217–249. <https://doi.org/10.3109/10408363.2011.640976>
- Mahowald, M., Shahan, B., Forbes, D., 2019. Respiratory Conditions: Lower Respiratory Tract Infections. *FP Essent.* 486, 19–25.
- Mak, G.C., Wong, A.H., Ho, W.Y.Y., Lim, W., 2012. The impact of pandemic influenza A (H1N1) 2009 on the circulation of respiratory viruses 2009–2011. *Influenza Other Respir. Viruses* 6, e6–e10. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2011.00323.x>
- Mäkelä, M.J., Puhakka, T., Ruuskanen, O., Leinonen, M., Saikku, P., Kimpimäki, M., Blomqvist, S., Hyypiä, T., Arstila, P., 1998. Viruses and Bacteria in the Etiology of the Common Cold. *J. Clin. Microbiol.* 36, 539–542.
- Makoni, M., 2023. Launch of genomic surveillance system for respiratory viruses. *Lancet Microbe* 4, e214. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00073-3](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00073-3)
- Mammas, I.N., Drysdale, S.B., Theodoridou, M., Greenough, A., Spandidos, D.A., 2020. [Comment] Viruses, vaccinations and RSV: Exploring terminology in paediatric virology. *Exp. Ther. Med.* 20, 1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9430>
- Mandelia, Y., Procop, G.W., Richter, S.S., Worley, S., Liu, W., Esper, F., 2021. Dynamics and predisposition of respiratory viral co-infections in children and adults. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 631.e1-631.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.05.042>
- Manuguerra, C., Hannoun, C., 1999. Grippe et autres viroses respiratoires, surveillance et diagnostic au laboratoire. LAMASSOURE. Collection des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur. 286 Pages. ISBN: 978-2-901320-28-9.
- Marcil, S., Kabbaj, H., Jroundi, I., Barakat, A., Mahraoui, C., Kettani, S., & Zeggwagh, A. (2018). Epidemiology and diagnosis of the severe acute viral respiratory infections in patients admitted at IBN Sina University Hospital Rabat-Morocco. *Dis. Disord.* 2(1), 1-6. <https://doi.org/10.15761/JDD.1000112>
- McErlean, P., Shackelton, L.A., Andrews, E., Webster, D.R., Lambert, S.B., Nissen, M.D., Sloots, T.P., Mackay, I.M., 2008. Distinguishing Molecular Features and Clinical Characteristics of a Putative New Rhinovirus Species, Human Rhinovirus C (HRV C). *PLoS ONE* 3, e1847. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001847>
- McEvoy, C.T., Spindel, E.R., 2017. Pulmonary Effects of Maternal Smoking on the Fetus and Child: Effects on Lung Development, Respiratory Morbidities, and Life Long Lung Health. *Paediatr. Respir. Rev.* 21, 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.prrv.2016.08.005>
- McLean, H.Q., Hanson, K.E., Foster, A.D., Olson, S.C., Kemble, S.K., Belongia, E.A., 2020. Serious outcomes of medically attended, laboratory-confirmed influenza illness among school-aged children with and without asthma, 2007-2018. *Influenza Other Respir. Viruses* 14, 173–181. <https://doi.org/10.1111/irv.12710>
- Meissner, H.C., Long, S.S., American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases and Committee on Fetus and Newborn, 2003. Revised indications for the use of palivizumab and respiratory syncytial virus immune globulin intravenous for the prevention of respiratory syncytial virus infections. *Pediatrics* 112, 1447–1452. <https://doi.org/10.1542/peds.112.6.1447>

- Melero, J.A., 2006. Molecular Biology of Human Respiratory Syncytial Virus. *Perspect. Med. Virol.* 14, 1–42. [https://doi.org/10.1016/S0168-7069\(06\)14001-X](https://doi.org/10.1016/S0168-7069(06)14001-X)
- Melero, J.A., García-Barreno, B., Martínez, I., Pringle, C.R., Cane, P.A., 1997. Antigenic structure, evolution and immunobiology of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein. *J. Gen. Virol.* 78, 2411–2418. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-10-2411>
- Melero, J.A., Mas, V., McLellan, J.S., 2017. Structural, antigenic and immunogenic features of respiratory syncytial virus glycoproteins relevant for vaccine development. *Vaccine* 35, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.045>
- Miller, E.K., Lu, X., Erdman, D.D., Poehling, K.A., Zhu, Y., Griffin, M.R., Hartert, T.V., Anderson, L.J., Weinberg, G.A., Hall, C.B., Iwane, M.K., Edwards, K.M., New Vaccine Surveillance Network, 2007. Rhinovirus-associated hospitalizations in young children. *J. Infect. Dis.* 195, 773–781. <https://doi.org/10.1086/511821>
- Minodier, L., Masse, S., Capai, L., Blanchon, T., Ceccaldi, P.-E., van der Werf, S., Hanslik, T., Charrel, R., Falchi, A., 2017. Clinical and virological factors associated with gastrointestinal symptoms in patients with acute respiratory infection: a two-year prospective study in general practice medicine. *BMC Infect. Dis.* 17, 729. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2823-9>
- Moe, N., Krokstad, S., Stenseng, I.H., Christensen, A., Skanke, L.H., Risnes, K.R., Nordbø, S.A., Døllner, H., 2017. Comparing Human Metapneumovirus and Respiratory Syncytial Virus: Viral Co-Detections, Genotypes and Risk Factors for Severe Disease. *PLOS ONE* 12, e0170200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170200>
- Mohn, K.G.-I., Smith, I., Sjursen, H., Cox, R.J., 2018. Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Hum. Vaccines Immunother.* 14, 571–578. <https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1377376>
- Molina, B., Pogossian, A., De Moreuil, C., Rouvière, B., Le Berre, R., 2020. Myosites infectieuses. *Rev. Médecine Interne* 41, 241–249. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2020.02.006>
- Moriceau, J., 2019. Étude moléculaire du gène G complet du virus respiratoire syncytial humain (HRSV) groupe A circulant en Normandie : quinze ans d'évolution 90.
- Moriyama, M., Hugentobler, W.J., Iwasaki, A., 2020. Seasonality of Respiratory Viral Infections. *Annu. Rev. Virol.* 7, 83–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-012420-022445>
- Morris, J.A., Blount, R.E., Savage, R.E., 1956. Recovery of Cytopathogenic Agent from Chimpanzees with Goryza. *Exp. Biol. Med.* 92, 544–549. <https://doi.org/10.3181/00379727-92-22538>
- Muenchhoff, M., Goulder, P.J.R., 2014. Sex differences in pediatric infectious diseases. *J. Infect. Dis.* 209 Suppl 3, S120-126. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiu232>
- Mufson, M.A., Orvell, C., Rafnar, B., Norrby, E., 1985. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 66 (Pt 10), 2111–2124. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-66-10-2111>
- Murray, E.L., Klein, M., Brondi, L., McGowan, J.E., van Mels, C., Brooks, W.A., Kleinbaum, D., Goswami, D., Ryan, P.B., Bridges, C.B., 2012. Rainfall, household crowding, and acute respiratory infections in the tropics. *Epidemiol. Infect.* 140, 78–86. <https://doi.org/10.1017/S0950268811000252>
- Ngwuta, J.O., Chen, M., Modjarrad, K., Joyce, M.G., Kanekiyo, M., Kumar, A., Yassine, H.M., Moin, S.M., Killikelly, A.M., Chuang, G.-Y., Druz, A., Georgiev, I.S., Rundlet, E.J., Sastry, M., Stewart-Jones, G.B.E., Yang, Y., Zhang, B., Nason, M.C., Capella, C., Peeples, M.E., Ledgerwood, J.E., McLellan, J.S., Kwong, P.D., Graham, B.S., 2015. Prefusion F-specific antibodies determine the magnitude of RSV neutralizing activity in human sera. *Sci. Transl. Med.* 7, 309ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aac4241>
- Nhung, N.T.T., Amini, H., Schindler, C., Kutlar Joss, M., Dien, T.M., Probst-Hensch, N., Perez, L., Künzli, N., 2017. Short-term association between ambient air pollution and pneumonia in children: A systematic review and meta-analysis of time-series and case-crossover studies. *Environ. Pollut. Barking Essex* 1987 230, 1000–1008. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.07.063>

- Nichol, S.T., Arikawa, J., Kawaoka, Y., 2000. Emerging viral diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 12411–12412. <https://doi.org/10.1073/pnas.210382297>
- Nichols, W.G., Peck Campbell, A.J., Boeckh, M., 2008. Respiratory viruses other than influenza virus: impact and therapeutic advances. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 274–290, table of contents. <https://doi.org/10.1128/CMR.00045-07>
- Nicolai, A., Frassanito, A., Nenna, R., Cangiano, G., Petrarca, L., Papoff, P., Pierangeli, A., Scagnolari, C., Moretti, C., Midulla, F., 2017. Risk Factors for Virus-induced Acute Respiratory Tract Infections in Children Younger Than 3 Years and Recurrent Wheezing at 36 Months Follow-Up After Discharge. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 36, 179–183. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001385>
- Njouom, R., Yekwa, E.L., Cappy, P., Vabret, A., Boisier, P., Rousset, D., 2012. Viral Etiology of Influenza-Like Illnesses in Cameroon, January–December 2009. *J. Infect. Dis.* 206, S29–S35. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis573>
- Nyawanda, B.O., Mott, J.A., Njuguna, H.N., Mayieka, L., Khagayi, S., Onkoba, R., Makokha, C., Otieno, N.A., Bigogo, G.M., Katz, M.A., Feikin, D.R., Verani, J.R., 2016. Evaluation of case definitions to detect respiratory syncytial virus infection in hospitalized children below 5 years in Rural Western Kenya, 2009–2013. *BMC Infect. Dis.* 16, 218. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1532-0>
- Obodai, E., Odoom, J.K., Adiku, T., Goka, B., Wolff, T., Biere, B., Schweiger, B., Reiche, J., 2018. The significance of human respiratory syncytial virus (HRSV) in children from Ghana with acute lower respiratory tract infection: A molecular epidemiological analysis, 2006 and 2013-2014. *PLOS ONE* 13, e0203788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0203788>
- OHEA, U., 1992. Respiratory Health Effects of Passive Smoking: Lung Cancer And Other Disorders. Major funding for this report has been provided by the Indoor Air Division, Office of Atmospheric and Indoor Air Programs. USA.
- Olofsson, S., Brittain-Long, R., Andersson, L.M., Westin, J., Lindh, M., 2014. PCR for detection of respiratory viruses: seasonal variations of virus infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 9, 615–626. <https://doi.org/10.1586/eri.11.75>
- OMS, 2022. World Health Organization, National Influenza Centers of World Health Organization. [WWW Document]. URL <https://www.who.int/initiatives/global-influenza-surveillance-and-response-system/national-influenza-centres> (accessed 11.15.23).
- OMS, 2020. Global Health Estimates 2020: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva.
- OMS, 2019a. Global influenza strategy 2019-2030. World Health Organization.
- OMS, 2019b. WHO Strategy for the Global Respiratory Syncytial Virus Surveillance based on Influenza Surveillance.
- OMS, 2011. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.
- Ono, T., Hashimoto, K., Kume, Y., Chishiki, M., Okabe, H., Sato, M., Norito, S., Aso, J., Sada, M., Mochizuki, I., Mashiyama, F., Ishibashi, N., Suzuki, S., Sakuma, H., Suwa, R., Kawase, M., Takeda, M., Shirato, K., Kimura, H., Hosoya, M., 2023. Molecular Diversity of Human Respiratory Syncytial Virus before and during the COVID-19 Pandemic in Two Neighboring Japanese Cities. *Microbiol. Spectr.* 11, e02606-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.02606-22>
- Orimadegun, A.E., Adepoju, A.A., Myer, L., 2020. A Systematic Review and Meta-analysis of Sex Differences in Morbidity and Mortality of Acute Lower Respiratory Tract Infections Among African Children. *J. Pediatr. Rev.* 8, 65–78. <https://doi.org/10.32598/jpr.8.2.65>
- Otieno, J.R., Kamau, E.M., Agoti, C.N., Lewa, C., Otieno, G., Bett, A., Ngama, M., Cane, P.A., Nokes, D.J., 2017. Spread and Evolution of Respiratory Syncytial Virus A Genotype ON1, Coastal Kenya, 2010–2015. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 264–271. <https://doi.org/10.3201/eid2302.161149>

- Ottolini, M.G., Porter, D.D., Blanco, J.C.G., Prince, G.A., 2002. A Cotton Rat Model of Human Parainfluenza 3 Laryngotracheitis: Virus Growth, Pathology, and Therapy. *J. Infect. Dis.* 186, 1713–1717. <https://doi.org/10.1086/345834>
- Panayiotou, C., Richter, J., Koliou, M., Kalogirou, N., Georgiou, E., Christodoulou, C., 2014. Epidemiology of respiratory syncytial virus in children in Cyprus during three consecutive winter seasons (2010-2013): age distribution, seasonality and association between prevalent genotypes and disease severity. *Epidemiol. Infect.* 142, 2406–2411. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000028>
- Panitch, H.B., 2017. Respiratory Implications of Pediatric Neuromuscular Disease. *Respir. Care* 62, 826–848. <https://doi.org/10.4187/respcare.05250>
- Pavia, A.T., 2011. Viral Infections of the Lower Respiratory Tract: Old Viruses, New Viruses, and the Role of Diagnosis. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52, S284–S289. <https://doi.org/10.1093/cid/cir043>
- Peat, J.K., Keena, V., Harakeh, Z., Marks, G., 2001. Parental smoking and respiratory tract infections in children. *Paediatr. Respir. Rev.* 2, 207–213. <https://doi.org/10.1053/prrv.2001.0142>
- Perdue, M.L., Arnold, F., Li, S., Donabedian, A., Cioce, V., Warf, T., Huebner, R., 2011. The future of cell culture-based influenza vaccine production. *Expert Rev. Vaccines* 10, 1183–1194. <https://doi.org/10.1586/erv.11.82>
- Peret, T.C., Hall, C.B., Schnabel, K.C., Golub, J.A., Anderson, L.J., 1998. Circulation patterns of genetically distinct group A and B strains of human respiratory syncytial virus in a community. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 9), 2221–2229. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-79-9-2221>
- Peret, T.C.T., Hall, C.B., Hammond, G.W., Piedra, P.A., Storch, G.A., Sullender, W.M., Tsou, C., Anderson, L.J., 2000. Circulation Patterns of Group A and B Human Respiratory Syncytial Virus Genotypes in 5 Communities in North America. *J. Infect. Dis.* 181, 1891–1896. <https://doi.org/10.1086/315508>
- Petric, M., Comanor, L., Petti, C.A., 2006. Role of the laboratory in diagnosis of influenza during seasonal epidemics and potential pandemics. *J. Infect. Dis.* 194 Suppl 2, S98-110. <https://doi.org/10.1086/507554>
- Poitras, E., Houde, A., 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews Biol. Biotechnol.* 2, 2–11.
- Puzelli, S., Valdarchi, C., Ciotti, M., Dorrucchi, M., Farchi, F., Babakir-Mina, M., Perno, C.F., Donatelli, I., Rezza, G., for the Italian ARI Study Group, 2009. Viral causes of influenza-like illness: Insight from a study during the winters 2004-2007. *J. Med. Virol.* 81, 2066–2071. <https://doi.org/10.1002/jmv.21610>
- Raj, R.S., Bonney, E.A., Phillippe, M., 2014. Influenza, Immune System, and Pregnancy. *Reprod. Sci.* 21, 1434–1451. <https://doi.org/10.1177/1933719114537720>
- Rantala, H., Uhari, M., Tuokko, H., 1990. Viral infections and recurrences of febrile convulsions. *J. Pediatr.* 116, 195–199. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(05\)82874-4](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(05)82874-4)
- Razanajatovo, N.H., Richard, V., Hoffmann, J., Reynes, J.-M., Razafitrimo, G.M., Randremanana, R.V., Heraud, J.-M., 2011. Viral etiology of influenza-like illnesses in Antananarivo, Madagascar, July 2008 to June 2009. *PloS One* 6, e17579. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017579>
- Reiche, J., Schweiger, B., 2009. Genetic variability of group A human respiratory syncytial virus strains circulating in Germany from 1998 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 47, 1800–1810. <https://doi.org/10.1128/JCM.02286-08>
- Rguig, A., Cherkaoui, I., McCarron, M., Oumzil, H., Triki, S., Elmbarki, H., Bimouhen, A., El Falaki, F., Regragui, Z., Ihazmad, H., Nejari, C., Youbi, M., 2020. Establishing seasonal and alert influenza thresholds in Morocco. *BMC Public Health* 20, 1029. <https://doi.org/10.1186/s12889-020-09145-y>
- Richard, N., Komurian-Pradel, F., Javouhey, E., Perret, M., Rajoharison, A., Bagnaud, A., Billaud, G., Vernet, G., Lina, B., Floret, D., Paranhos-Baccalà, G., 2008. The Impact of Dual Viral Infection

- in Infants Admitted to a Pediatric Intensive Care Unit Associated with Severe Bronchiolitis. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 27, 213. <https://doi.org/10.1097/INF.0b013e31815b4935>
- Richter, J., Panayiotou, C., Tryfonos, C., Koptides, D., Koliou, M., Kalogirou, N., Georgiou, E., Christodoulou, C., 2016. Aetiology of Acute Respiratory Tract Infections in Hospitalised Children in Cyprus. *PloS One* 11, e0147041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147041>
- Riedel, S., Hobden, J.A., Miller, S., Morse, S.A., Mietzner, T.A., Detrick, B., Mitchell, T.G., Sakanari, J.A., Hotez, P., Mejia, R., 2019. *Jawetz Melnick & Adelbergs Medical Microbiology, Twenty-Eighth Edition.*
- Robinson, C., Echavarría, M., 2007. Adenoviruses, in: Murray BE, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, and Tenover FC, Editors. *Washington: ASM Press*, pp. 1589–1600.
- Roizman, B., 1996. Multiplication, in: Baron, S. (Ed.), *Medical Microbiology. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston (TX).*
- Romieu, I., Samet, J.M., Smith, K.R., Bruce, N., 2002. Outdoor air pollution and acute respiratory infections among children in developing countries. *J. Occup. Environ. Med.* 44, 640–649. <https://doi.org/10.1097/00043764-200207000-00010>
- Rossman, J.S., Jing, X., Leser, G.P., Lamb, R.A., 2010. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission. *Cell* 142, 902–913. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.08.029>
- Rowe, W.P., Huebner, R.J., Gilmore, L.K., Parrott, R.H., Ward, T.G., 1953. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. *Exp. Biol. Med.* 84, 570–573. <https://doi.org/10.3181/00379727-84-20714>
- Roy, A., Post, C.B., 2012. Long-distance correlations of rhinovirus capsid dynamics contribute to uncoating and antiviral activity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 5271–5276. <https://doi.org/10.1073/pnas.1119174109>
- Ruuskanen, O., Lahti, E., Jennings, L.C., Murdoch, D.R., 2011. Viral pneumonia. *Lancet Lond. Engl.* 377, 1264–1275. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61459-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61459-6)
- Saha, S., Pandey, B.G., Choudekar, A., Krishnan, A., Gerber, S.I., Rai, S.K., Singh, P., Chadha, M., Lal, R.B., Broor, S., 2015. Evaluation of case definitions for estimation of respiratory syncytial virus associated hospitalizations among children in a rural community of northern India. *J. Glob. Health* 5, 010419. <https://doi.org/10.7189/jogh.05.020419>
- Salimi, V., Viegas, M., Trento, A., Agoti, C.N., Anderson, L.J., Avadhanula, V., Bahl, J., Bont, L., Brister, J.R., Cane, P.A., Galiano, M., Graham, B.S., Hatcher, E.L., Hellferscee, O., Henke, D.M., Hirve, S., Jackson, S., Keyaerts, E., Kragten-Tabatabaie, L., Lindstrom, S., Nauwelaers, I., Nokes, D.J., Openshaw, P.J., Peret, T.C., Piedra, P.A., Ramaekers, K., Rector, A., Trovão, N.S., von Gottberg, A., Zambon, M., Zhang, W., Williams, T.C., Barr, I.G., Buchholz, U.J., 2021. Proposal for Human Respiratory Syncytial Virus Nomenclature below the Species Level. *Emerg. Infect. Dis.* 27, e204608. <https://doi.org/10.3201/eid2706.204608>
- Samson, M., Pizzorno, A., Abed, Y., Boivin, G., 2013. Influenza virus resistance to neuraminidase inhibitors. *Antiviral Res.* 98, 174–185. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.014>
- Schildgen, O., Echavarría, M., 2014. Human Bocavirus Infections, in: Singh, S.K. (Ed.), *Human Respiratory Viral Infections*, Ebsco Publishing. CRC Press/ Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida, pp. 583–592.
- Schrader, C., Süß, J., 2003. Genetic Characterization of a Porcine H1N2 Influenza Virus Strain Isolated in Germany. *Intervirology* 46, 66–70. <https://doi.org/10.1159/000068124>
- Schuman, S.H., Miller, L.J., 1966. Febrile convulsions in families: findings in an epidemiologic survey. *Clin. Pediatr. (Phila.)* 5, 604–608. <https://doi.org/10.1177/000992286600501007>
- Scott, P.D., Ochola, R., Ngama, M., Okiro, E.A., Nokes, D.J., Medley, G.F., Cane, P.A., 2004. Molecular epidemiology of respiratory syncytial virus in Kilifi district, Kenya. *J. Med. Virol.* 74, 344–354. <https://doi.org/10.1002/jmv.20183>
- Semal, J., 1996. La saga des molécules infectieuses. *Cah. Agric.* 5, 345-351 (1).

- Sentilhes, A., Choumlivong, K., Celhay, O., Sisouk, T., Phonekeo, D., Vongphrachanh, P., Brey, P., Buchy, P., 2013. Respiratory virus infections in hospitalized children and adults in Lao PDR. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 1070–1078. <https://doi.org/10.1111/irv.12135>
- Shah, J.N., Chemaly, R.F., 2011. Management of RSV infections in adult recipients of hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 117, 2755–2763. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-08-263400>
- Shaman, J., Goldstein, E., Lipsitch, M., 2011. Absolute humidity and pandemic versus epidemic influenza. *Am. J. Epidemiol.* 173, 127–135. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq347>
- Shi, T., Balsells, E., Wastnedge, E., Singleton, R., Rasmussen, Z.A., Zar, H.J., Rath, B.A., Madhi, S.A., Campbell, S., Vaccari, L.C., Bulkow, L.R., Thomas, E.D., Barnett, W., Hoppe, C., Campbell, H., Nair, H., 2015. Risk factors for respiratory syncytial virus associated with acute lower respiratory infection in children under five years: Systematic review and meta-analysis. *J. Glob. Health* 5, 020416. <https://doi.org/10.7189/jogh.05.020416>
- Shobugawa, Y., Saito, R., Sano, Y., Zaraket, H., Suzuki, Y., Kumaki, A., Dapat, I., Oguma, T., Yamaguchi, M., Suzuki, H., 2009. Emerging Genotypes of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A among Patients in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2475–2482. <https://doi.org/10.1128/JCM.00115-09>
- Simoes, E.A., Groothuis, J.R., Tristram, D.A., Alessi, K., Lehr, M.V., Siber, G.R., Welliver, R.C., 1996. Respiratory syncytial virus-enriched globulin for the prevention of acute otitis media in high risk children. *J. Pediatr.* 129, 214–219. [https://doi.org/10.1016/s0022-3476\(96\)70245-7](https://doi.org/10.1016/s0022-3476(96)70245-7)
- Simon, A., Prusseit, J., Müller, A., 2011. Respiratory syncytial virus infection in children with neuromuscular impairment. *Open Microbiol. J.* 5, 155–158. <https://doi.org/10.2174/1874285801105010155>
- Sivan, A.V., Lee, T., Binn, L.N., Gaydos, J.C., 2007. Adenovirus-associated acute respiratory disease in healthy adolescents and adults: a literature review. *Mil. Med.* 172, 1198–1203. <https://doi.org/10.7205/milmed.172.11.1198>
- Smith, S.M., Schroeder, K., Fahey, T., 2008. Over-the-counter medications for acute cough in children and adults in ambulatory settings. *Cochrane Database Syst. Rev.* CD001831. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001831.pub3>
- Solís-García, G., Chacón-Pascual, A., González Martínez, F., Miranda Herrero, M.C., Hernández-Sampelayo, T., Catalán Alonso, P., Rodríguez-Fernández, R., 2020. Neurologic Complications in Children Hospitalized With Influenza Infections: Prevalence, Risk Factors and Impact on Disease Severity. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 39, 789–793. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000002686>
- Soudani, S., Mafi, A., Al Mayahi, Z., Al Balushi, S., Dbaibo, G., Al Awaidy, S., Amiche, A., 2022. A Systematic Review of Influenza Epidemiology and Surveillance in the Eastern Mediterranean and North African Region. *Infect. Dis. Ther.* 11, 15–52. <https://doi.org/10.1007/s40121-021-00534-3>
- Sridhar, S., Brokstad, K.A., Cox, R.J., 2015. Influenza Vaccination Strategies: Comparing Inactivated and Live Attenuated Influenza Vaccines. *Vaccines* 3, 373–389. <https://doi.org/10.3390/vaccines3020373>
- Stankova, J., Carret, A.-S., Moore, D., McCusker, C., Mitchell, D., Davis, M., Mazer, B., Jabado, N., 2007. Long-term therapy with aerosolized ribavirin for parainfluenza 3 virus respiratory tract infection in an infant with severe combined immunodeficiency. *Pediatr. Transplant.* 11. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3046.2006.00607.x>
- Steentoft, C., Vakhrushev, S.Y., Joshi, H.J., Kong, Y., Vester-Christensen, M.B., Schjoldager, K.T.-B.G., Lavrsen, K., Dabelsteen, S., Pedersen, N.B., Marcos-Silva, L., Gupta, R., Paul Bennett, E., Mandel, U., Brunak, S., Wandall, H.H., Levery, S.B., Clausen, H., 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology. *EMBO J.* 32, 1478–1488. <https://doi.org/10.1038/emboj.2013.79>

- Strauss, J.H., Strauss, E.G., 2008. *Viruses and Human Disease*, 2nd edition. ed. Academic Press, London. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373741-0.50004-0>
- Su, G., Iwagami, M., Qin, X., McDonald, H., Liu, X., Carrero, J.J., Stålsby Lundborg, C., Nitsch, D., 2020. Kidney disease and mortality in patients with respiratory tract infections: a systematic review and meta-analysis. *Clin. Kidney J.* 14, 602–611. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfz188>
- Sullender, W.M., 2000. Respiratory Syncytial Virus Genetic and Antigenic Diversity. *Clin. Microbiol. Rev.* 13, 1–15. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.1>
- Tabatabai, J., Prifert, C., Pfeil, J., Grulich-Henn, J., Schnitzler, P., 2014. Novel Respiratory Syncytial Virus (RSV) Genotype ON1 Predominates in Germany during Winter Season 2012–13. *PLOS ONE* 9, e109191. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109191>
- Taleb, S.A., Al Thani, A.A., Al Ansari, K., Yassine, H.M., 2018. Human respiratory syncytial virus: pathogenesis, immune responses, and current vaccine approaches. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 1817–1827. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3289-4>
- Tan, L., Coenjaerts, F.E.J., Houspie, L., Viveen, M.C., van Bleek, G.M., Wiertz, E.J.H.J., Martin, D.P., Lemey, P., 2013. The Comparative Genomics of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroups A and B: Genetic Variability and Molecular Evolutionary Dynamics. *J. Virol.* 87, 8213–8226. <https://doi.org/10.1128/jvi.03278-12>
- Tang, L.F., Wang, T.L., Tang, H.F., Chen, Z.M., 2008. Viral pathogens of acute lower respiratory tract infection in China. *Indian Pediatr.* 45, 971–975.
- Taubenberger, J.K., Morens, D.M., 2008. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 3, 499–522. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.154316>
- Tg, F., Jc, C., 2014. Influenza and parainfluenza viral infections in children. *Pediatr. Rev.* 35. <https://doi.org/10.1542/pir.35-6-217>
- Thammawat, S., Sadlon, T.A., Hallsworth, P.G., Gordon, D.L., 2008. Role of cellular glycosaminoglycans and charged regions of viral G protein in human metapneumovirus infection. *J. Virol.* 82, 11767–11774. <https://doi.org/10.1128/JVI.01208-08>
- Thompson, W.W., Shay, D.K., Weintraub, E., Brammer, L., Cox, N., Anderson, L.J., Fukuda, K., 2003. Mortality associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States. *JAMA* 289, 179–186. <https://doi.org/10.1001/jama.289.2.179>
- Thorburn, K., Harigopal, S., Reddy, V., Taylor, N., van Saene, H.K.F., 2006. High incidence of pulmonary bacterial co-infection in children with severe respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis. *Thorax* 61, 611–615. <https://doi.org/10.1136/thx.2005.048397>
- Thorburn, K., Kerr, S., Taylor, N., van Saene, H.K.F., 2004. RSV outbreak in a paediatric intensive care unit. *J. Hosp. Infect.* 57, 194–201. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2004.03.013>
- Treanor, J.J., Hayden, F.G., Vrooman, P.S., Barbarash, R., Bettis, R., Riff, D., Singh, S., Kinnersley, N., Ward, P., Mills, R.G., for the US Oral Neuraminidase Study Group, 2000. Efficacy and Safety of the Oral Neuraminidase Inhibitor Oseltamivir in Treating Acute InfluenzaA Randomized Controlled Trial. *JAMA* 283, 1016–1024. <https://doi.org/10.1001/jama.283.8.1016>
- Trento, A., Galiano, M., Videla, C., Carballal, G., García-Barreno, B., Melero, J.A., Palomo, C., 2003. Major changes in the G protein of human respiratory syncytial virus isolates introduced by a duplication of 60 nucleotides. *J. Gen. Virol.* 84, 3115–3120. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19357-0>
- Troeger, C., Blacker, B., Khalil, I.A., GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators, 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* 18, 1191–1210. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30310-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30310-4)
- Tse, C., Capeau, J., 2003. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 61, 279–293.

- Tyrrell, D.A., Bynoe, M.L., 1965. CULTIVATION OF A NOVEL TYPE OF COMMON-COLD VIRUS IN ORGAN CULTURES. *Br. Med. J.* 1, 1467–1470. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5448.1467>
- Uduman, S.A., Ijaz, M.K., Kochiyil, J., Mathew, T., Hossam, M.K., 1996. Respiratory syncytial virus infection among hospitalized young children with acute lower respiratory illnesses in Al Ain, UAE. *J. Commun. Dis.* 28, 245–252.
- Vabret, A., Dina, J., Brison, E., Brouard, J., Freymuth, F., 2009. Coronavirus humains (HCoV). *Pathol. Biol. (Paris)* 57, 149–160. <https://doi.org/10.1016/j.patbio.2008.02.018>
- Van Benten, I., Koopman, L., Niesters, B., Hop, W., Van Middelkoop, B., De Waal, L., Van Drunen, K., Osterhaus, A., Neijens, H., Fokkens, W., 2003. Predominance of rhinovirus in the nose of symptomatic and asymptomatic infants. *Pediatr. Allergy Immunol.* 14, 363–370. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3038.2003.00064.x>
- van den Hoogen, B.G., de Jong, J.C., Groen, J., Kuiken, T., de Groot, R., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., 2001. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat. Med.* 7, 719–724. <https://doi.org/10.1038/89098>
- Van der Berg, B.J., Yerushalmy, J., 1969. Studies on convulsive disorders in young children. I. Incidence of febrile and nonfebrile convulsions by age and other factors. *Pediatr. Res.* 3, 298–304. <https://doi.org/10.1203/00006450-196907000-00005>
- van der Hoek, L., Pyrc, K., Jebbink, M.F., Vermeulen-Oost, W., Berkhout, R.J.M., Wolthers, K.C., Wertheim-van Dillen, P.M.E., Kaandorp, J., Spaargaren, J., Berkhout, B., 2004. Identification of a new human coronavirus. *Nat. Med.* 10, 368–373. <https://doi.org/10.1038/nm1024>
- Venter, M., Madhi, S.A., Tiemessen, C.T., Schoub, B.D., 2001. Genetic diversity and molecular epidemiology of respiratory syncytial virus over four consecutive seasons in South Africa: identification of new subgroup A and B genotypes. *J. Gen. Virol.* 82, 2117–2124. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-82-9-2117>
- Verbeke, V., Reynders, M., Floré, K., Vandewal, W., Debulpaep, S., Sauer, K., Cardoen, F., Padalko, E., 2019. Human bocavirus infection in Belgian children with respiratory tract disease. *Arch. Virol.* 164, 2919–2930. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04396-6>
- Vianna, L.A., Siqueira, M.M., Volpini, L.P.B., Louro, I.D., Resende, P.C., 2021. Seasonality, molecular epidemiology, and virulence of Respiratory Syncytial Virus (RSV): A perspective into the Brazilian Influenza Surveillance Program. *PLOS ONE* 16, e0251361. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251361>
- Wallace, S.J., Zealley, H., 1970. Neurological, Electroencephalographic, and Virological Findings in Febrile Children. *Arch. Dis. Child.* 45, 611–623.
- Walsh, E.E., 2015. Acute Bronchitis, in: Dolin, R., Blaser, M.J., Bennett, J.E. (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (Eighth Edition)*. W.B. Saunders, Philadelphia, pp. 806–809. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00066-7>
- Waris, M.E., 1991. Pattern of respiratory syncytial virus epidemics in Finland: two-year cycles with alternating prevalence of groups A and B. *J. Infect. Dis.* 163, 464–469. <https://doi.org/10.1093/INFDIS/163.3.464>
- White, L.J., Waris, M., Cane, P.A., Nokes, D.J., Medley, G.F., 2005. The transmission dynamics of groups A and B human respiratory syncytial virus (hRSV) in England & Wales and Finland: seasonality and cross-protection. *Epidemiol. Infect.* 133, 279–289. <https://doi.org/10.1017/s0950268804003450>
- WHO, 2017. WHO strategy to pilot Global Respiratory Syncytial Virus surveillance based on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS).
- WHO, 2015. Meeting report WHO Informal Consultation on Surveillance of RSV on the Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS) platform, 25–27 March 2015, Starling Hotel & Conference Centre, Geneva, Switzerland (No. WHO/HSE/PED/GIP/RSV/2015.01). World Health Organization.

- WHO, 2006. Collecting, preserving and shipping specimens for the diagnosis of avian influenza A(H5N1) virus infection : guide for field operations.
- Wilhelm, N., Fevrier, F., Le Coustumier, A., Grasmick, C., 2005. Biologie moléculaire automatisée en microbiologie: quoi de neuf? *BioTribune Mag.* 16, 41–48. <https://doi.org/10.1007/BF03013618>
- Williams, J.V., Harris, P.A., Tollefson, S.J., Halburnt-Rush, L.L., Pingsterhaus, J.M., Edwards, K.M., Wright, P.F., Crowe, J.E., 2004. Human metapneumovirus and lower respiratory tract disease in otherwise healthy infants and children. *N. Engl. J. Med.* 350, 443–450. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa025472>
- Williams, J.V., Martino, R., Rabella, N., Otegui, M., Parody, R., Heck, J.M., Crowe, J.E., 2005. A Prospective Study Comparing Human Metapneumovirus with Other Respiratory Viruses in Adults with Hematologic Malignancies and Respiratory Tract Infections. *J. Infect. Dis.* 192, 1061–1065. <https://doi.org/10.1086/432732>
- Winther, B., 2011. Rhinovirus infections in the upper airway. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 8, 79–89. <https://doi.org/10.1513/pats.201006-039RN>
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Chu, C., Chan, K., Tsoi, H., Huang, Y., Wong, B.H.L., Poon, R.W.S., Cai, J.J., Luk, W., Poon, L.L.M., Wong, S.S.Y., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Yuen, K., 2005. Characterization and complete genome sequence of a novel coronavirus, coronavirus HKU1, from patients with pneumonia. *J. Virol.* 79, 884–895. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.2.884-895.2005>
- Wright, P., Webster, R.G., 2001. Orthomyxoviruses, in: D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, M. A. Martin, R. A. Lamb, B. Roizman, and S. E. Straus (Ed.), *Fields Virology*, Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, Pa, pp. 1533–1579.
- Wu, X., Wang, Q., Wang, M., Su, X., Xing, Z., Zhang, W., Shi, Y., 2015. Incidence of Respiratory Viral Infections Detected by PCR and Real-Time PCR in Adult Patients with Community-Acquired Pneumonia: A Meta-Analysis. *Respiration* 89, 343–352. <https://doi.org/10.1159/000369561>
- Yajima T, Knowlton KU. Viral myocarditis: from the perspective of the virus. *Circulation.* 2009 May 19;119(19):2615-24. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.766022. PMID: 19451363.
- Yan, X.-L., Li, Y.-N., Tang, Y.-J., Xie, Z.-P., Gao, H.-C., Yang, X.-M., Li, Y.-M., Liu, L.-J., Duan, Z.-J., 2017. Clinical characteristics and viral load of respiratory syncytial virus and human metapneumovirus in children hospitalized for acute lower respiratory tract infection. *J. Med. Virol.* 89, 589–597. <https://doi.org/10.1002/jmv.24687>
- Yassine, H.M., Sohail, M.U., Younes, N., Nasrallah, G.K., 2020. Systematic Review of the Respiratory Syncytial Virus (RSV) Prevalence, Genotype Distribution, and Seasonality in Children from the Middle East and North Africa (MENA) Region. *Microorganisms* 8, 713. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050713>
- Zar, H.J., Barnett, W., Stadler, A., Gardner-Lubbe, S., Myer, L., Nicol, M.P., 2016. Aetiology of childhood pneumonia in a well vaccinated South African birth cohort: a nested case-control study of the Drakenstein Child Health Study. *Lancet Respir. Med.* 4, 463–472. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(16\)00096-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(16)00096-5)
- Zhang, C., Zhu, N., Xie, Z., Lu, R., He, B., Liu, C., Ma, X., Tan, W., 2013. Viral Etiology and Clinical Profiles of Children with Severe Acute Respiratory Infections in China. *PLoS ONE* 8, e72606. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072606>
- Zhang, N., Wang, L., Deng, X., Liang, R., Su, M., He, C., Hu, L., Su, Y., Ren, J., Yu, F., Du, L., Jiang, S., 2020. Recent advances in the detection of respiratory virus infection in humans. *J. Med. Virol.* 92, 408–417. <https://doi.org/10.1002/jmv.25674>
- Zhang, Z., Du, L., Chen, X., Zhao, Y., Liu, E., Yang, X., Zhao, X., 2010. Genetic Variability of Respiratory Syncytial Viruses (RSV) Prevalent in Southwestern China from 2006 to 2009: Emergence of Subgroup B and A RSV as Dominant Strains. *J. Clin. Microbiol.* 48, 1201–1207. <https://doi.org/10.1128/JCM.02258-09>

- Ziegler, T., Mamahit, A., Cox, N.J., 2018. 65 years of influenza surveillance by a World Health Organization-coordinated global network. *Influenza Other Respir. Viruses* 12, 558–565. <https://doi.org/10.1111/irv.12570>
- Zlateva, K.T., Lemey, P., Vandamme, A.-M., Van Ranst, M., 2004. Molecular Evolution and Circulation Patterns of Human Respiratory Syncytial Virus Subgroup A: Positively Selected Sites in the Attachment G Glycoprotein. *J. Virol.* 78, 4675–4683. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.9.4675-4683.2004>



Annexes



Annexe 2 :

Amorces et Sondes pour la détection du la grippe par RT-PCR temps réel (OMS., 2009)

| Primers and Probes | Sequence (5'>3') | Working Concentration |
|--------------------|--|-----------------------|
| InfA Forward | GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C | 40 μM |
| InfA Reverse | AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA | 40 μM |
| InfA Probe | TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG | 10 μM |
| SW InfA Forward | GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG | 40 μM |
| SW InfA Reverse | GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC | 40 μM |
| SW InfA Probe | CYA CTG CAA GCC CA"'" ACA CAC AAG CAG GCA | 10 μM |
| SW H1 Forward | GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA | 40 μM |
| SW H1 Reverse | CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC | 40 μM |

Les sondes TaqMan® sont marquées à l'extrémité 5' avec la molécule rapporteur (FAM) et avec Quencher 1, Blackhole (BHQ1) à l'extrémité 3'.

Annexe 3 :

Amorces et Sondes pour la détection des autres virus respiratoires par qRT-PCR temps réel (CDC,2012)

| Assay | Primer/probes | Sequence (5' > 3') |
|---|--------------------|--|
| Human metapneumovirus (ver. 1) | For | CAA GTG TGA CAT TGC TGA YCT RAA |
| | Rev | ACT GCC GCA CAA CAT TTA GRA A |
| | Probe ^b | TGG CYG TYA GCT TCA GTC AAT TCA ACA GA |
| Respiratory syncytial virus (ver. 1) | For | GGC AAA TAT GGA AAC ATA CGT GAA |
| | Rev | TCT TTT TCT AGG ACA TTG TAY TGA ACA G |
| | Probe ^b | CTG TGT ATG TGG AGC CTT CGT GAA GCT |
| Parainfluenza virus 1 (ver. 2) | For | ACA AGT TGT CAA YGT CTT AAT TCR TAT |
| | Rev | TCG GCA CCT AAG TAR TTY TGA GTT |
| | Probe ^c | ATA GGC CAA AGA "T"TG TTG TCG AGA CTA TTC CAA |
| Parainfluenza virus 2 (ver. 1) | For | GCA TTT CCA ATC TAC AGG ACT ATG A |
| | Rev | ACC TCC TGG TAT AGC AGT GAC TGA AC |
| | Probe ^c | CCA TTT ACC "T"AA GTG ATG GAA TCA ATC GCA AA |
| Parainfluenza virus 3 (ver. 1) | For | TGG YTC AAT CTC AAC AAC AAG ATT TAA G |
| | Rev | TAC CCG AGA AAT ATT ATT TTG CC |
| | Probe ^c | CCC RTC TG" T" TGG ACC AGG GAT ATA CTA CAA A |
| Parainfluenza virus 4 (ver. 1) | For | CTG CCA AAT CGG CAA TTA AAC |
| | Rev | CTG GCA GCA ATC ATA AGR TGA TTC |
| | Probe ^c | CA TTA TTA TCT CTG C" T" TCC TTA CAG GCC ACA TCA |
| Human coronavirus 229E (ver. 1) | For | CAG TCA AAT GGG CTG ATG CA |
| | Rev | AAA GGG CTA TAA AGA GAA TAA GGT ATT CT |
| | Probe ^b | CCC TGA CGA CCA CGT TGT GGT TCA |
| Human coronavirus OC43 (ver. 1) | For | CGA TGA GGC TAT TCC GAC TAG GT |
| | Rev | CCT TCC TGA GCC TTC AAT ATA GTA ACC |
| | Probe ^b | TCC GCC TGG CAC GGT ACT CCC T |
| Human coronavirus NL63 (ver. 1) | For | GAC CAA AGC ACT GAA TAA CAT TTT CC |
| | Rev | ACC TAA TAA GCC TCT TTC TCA ACC C |
| | Probe ^c | AAC ACG CT" T" CCA ACG AGG TTT CTT CAA CTG AG |
| Human coronavirus HKU1 (ver. 1) | For | CCT TGC GAA TGA ATG TGC T |
| | Rev | TTG CAT CAC CAC TGC TAG TAC CAC |
| | Probe ^b | TGT GTG GCG GTT GCT ATT ATG TTA AGC CTG |
| Adenovirus (ver. 1) ^c | For | GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C |
| | Rev | GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT |
| | Probe ^b | TG CAC CAG ACC CGG GCT CAG GTA CTC CGA |
| Rhinovirus (ver. 3) ^c | For 1 ^d | CY[A] GCC [T]GC GTG GC |
| | For 2 ^d | CY[A] GCC [T]GC GTG GT |
| | Rev | GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA |
| | Probe ^b | TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C |
| Respiratory enterovirus (ver. 1) ^c | For | GGT GGC TGC GTT GGC |
| | Rev | GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA |
| | Probe ^b | TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C |
| Human bocavirus (ver. 1) ^c | For | TGC AGA CAA CGC YTA GTT GTT T |
| | Rev | CTG TCC CGC CCA AGA TAC A |
| | Probe ^b | CCA GGA TTG GGT GGA ACC TGC AAA |
| Human RNase P control (RNP3) | For | CCA AGT GTG AGG GCT GAA AAG |
| | Rev | TGT TGT GGC TGA TGA ACT ATA AAA GG |
| | Probe ^b | CC CCA GTC TCT GTC AGC ACT CCC TTC |

Annexe 4 :

Séquences de références HRSV-A et HRSV-B

| HRSV A strains | | | HRSV B strains | | | |
|-----------------------|--------------------|----------|-----------------------|-------------------|-----------|--|
| GenBank accession No. | Strain | Genotype | GenBank accession No. | Strain | Genotype | |
| KT992094 | A2 | GA1 | M17213 | CH18537 | Prototype | |
| JN257693 | ON67-1210A | ON1 | KJ939926 | VN-338-5/10 | BA10 | |
| KX858754 | 13-005275 | ON1 | OK649699 | Brazil/38221/2009 | BA10 | |
| KC858200 | 1251-051AN | ON1 | KJ939920 | VN-135-8/09 | BA9 | |
| KC297260 | BJ_28170 | NA3 | KX858755 | 13-001273 | BA9 | |
| KC297292 | BJ_30318 | NA3 | AY327815 | B/Q/5/00 | SAB2 | |
| KJ939936 | VN_120_7_09 | NA1 | JF704216 | SA98V192 | SAB3 | |
| KJ939947 | VN_390_7_10 | NA1 | AF065252 | CH93-18b | GB3 | |
| JX015486 | 05_000417 | SAA2 | DQ270231 | H1958 | SAB4 | |
| KP317950 | Kilifi_10899_38_09 | SAA2 | KC297430 | BJ/20462 | SAB4 | |
| JQ901452 | 01_031282 | NA2 | OK649745 | CH43II | GB4 | |
| KJ627352 | PER_FLU5725 | NA2 | AF065251 | CH93-9b | GB2 | |
| KC297324 | BJ_33852 | NA4 | JF704213 | SA98D1656 | SAB1 | |
| KC297381 | BJ_F5166 | NA4 | AF013254 | B1 | GB1 | |
| OK649590 | AL19365-1 | GA2 | AF065250 | CH10b | GB1 | |
| OK649659 | CAN2234 | GA2 | AY333364 | BA4128/99B | BA1 | |
| OK649672 | CH45II | GA3 | HM459886 | NG-077-07 | BA10 | |
| OK649669 | MO02 | GA7 | AB603467 | NG-102-06 | BA9 | |
| OK649678 | TX79303 | GA7 | HM459876 | NG-022-06 | BA9 | |
| KP258723 | 86E_007_01 | GA6 | | | | |
| OK649671 | MO37 | GA5 | | | | |
| OK649677 | TX79219 | GA5 | | | | |
| KP258696 | 86E_155_01 | SAA1 | | | | |
| AF065254 | CH09 | GA4 | | | | |
| KP258704 | 94I_009A_01 | GA4 | | | | |
| OK649670 | MO32 | GA1 | | | | |

Annexe 5 :

Liste des références des séquences du génome complet du HRSV, isolées lors de l'étude 2012/2017 et disponibles publiquement sur GISAID™

| Accession ID | Identifiant de la séquence | Sous-type | Date du prélèvement | Lieu de collecte |
|------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| EPI_ISL_15004433 | hRSV/A/Morocco/59-13/2012 | A | 26/11/2012 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15004435 | hRSV/A/Morocco/57H-13/2012 | A | 13/11/2012 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120665 | hRSV/A/Morocco/27H-14/2014 | A | 14/02/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120666 | hRSV/A/Morocco/29H-14/2014 | A | 14/02/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120667 | hRSV/A/Morocco/30H-14/2014 | A | 14/02/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120668 | hRSV/A/Morocco/36H-14/2014 | A | 14/02/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120669 | hRSV/A/Morocco/53H-14/2014 | A | 12/03/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120670 | hRSV/A/Morocco/58H-14/2014 | A | 18/03/2014 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120671 | hRSV/A/Morocco/66H-14/2014 | A | 25/03/2014 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120672 | hRSV/A/Morocco/67H-14/2014 | A | 25/03/2014 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120673 | hRSV/A/Morocco/68H-14/2014 | A | 25/03/2014 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120674 | hRSV/A/Morocco/37H-14/2014 | A | 15/02/2014 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120675 | hRSV/A/Morocco/64H-15/2014 | A | 25/12/2014 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120676 | hRSV/A/Morocco/88H-15/2014 | A | 31/12/2014 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120677 | hRSV/A/Morocco/20-15/2014 | A | 17/11/2014 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120678 | hRSV/A/Morocco/119H-15/2015 | A | 07/01/2015 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120679 | hRSV/A/Morocco/160H-15/2015 | A | 03/02/2015 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120680 | hRSV/A/Morocco/169H-15/2015 | A | 10/02/2015 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120681 | hRSV/A/Morocco/194H-15/2015 | A | 25/02/2015 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120682 | hRSV/A/Morocco/197H-15/2015 | A | 27/02/2015 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120683 | hRSV/A/Morocco/199H-15/2015 | A | 03/03/2015 | Africa / Morocco / Sale |
| EPI_ISL_15120688 | hRSV/A/Morocco/143-16/2015 | A | 18/12/2015 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120689 | hRSV/A/Morocco/196-15/2015 | A | 13/04/2015 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120690 | hRSV/A/Morocco/192H-15/2015 | A | 26/02/2015 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120692 | hRSV/A/Morocco/188-16/2016 | A | 07/01/2016 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120694 | hRSV/A/Morocco/267-16/2016 | A | 20/01/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120703 | hRSV/A/Morocco/497-16/2016 | A | 11/02/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120706 | hRSV/A/Morocco/534-16/2016 | A | 29/01/2016 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120713 | hRSV/A/Morocco/718-16/2016 | A | 29/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120715 | hRSV/A/Morocco/779-16/2016 | A | 02/03/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120716 | hRSV/A/Morocco/857-16/2016 | A | 13/03/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120717 | hRSV/A/Morocco/888-16/2016 | A | 15/03/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120719 | hRSV/A/Morocco/85-17/2016 | A | 09/11/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120721 | hRSV/A/Morocco/242-17/2016 | A | 14/12/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120723 | hRSV/A/Morocco/275-17/2016 | A | 26/12/2016 | Africa / Morocco / Fes |

| Accession ID | Identifiant de la séquence | Sous-type | Date du prélèvement | Lieu de collecte |
|------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| EPI_ISL_15120726 | hRSV/A/Morocco/366-17/2016 | A | 29/12/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120727 | hRSV/A/Morocco/875-16/2016 | A | 14/03/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120728 | hRSV/A/Morocco/599-16/2016 | A | 16/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120729 | hRSV/A/Morocco/868-16/2016 | A | 14/03/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120730 | hRSV/A/Morocco/296-16/2016 | A | 21/01/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120738 | hRSV/A/Morocco/434-17/2017 | A | 01/01/2017 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120739 | hRSV/A/Morocco/551-17/2017 | A | 12/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120743 | hRSV/A/Morocco/614-17/2017 | A | 12/01/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120745 | hRSV/A/Morocco/643-17/2017 | A | 18/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120770 | hRSV/A/Morocco/693-17/2017 | A | 24/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120771 | hRSV/A/Morocco/696-17/2017 | A | 23/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120772 | hRSV/A/Morocco/648-17/2017 | A | 19/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120773 | hRSV/A/Morocco/701-17/2017 | A | 25/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120774 | hRSV/A/Morocco/900-17/2017 | A | 09/02/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120775 | hRSV/A/Morocco/965-17/2017 | A | 14/02/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120776 | hRSV/A/Morocco/1068-17/2017 | A | 21/02/2017 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120777 | hRSV/A/Morocco/1174-17/2017 | A | 02/03/2017 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120778 | hRSV/A/Morocco/1256-17/2017 | A | 06/03/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_16905445 | hRSV/A/Morocco/700-17/2017 | A | 23/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_16905447 | hRSV/A/Morocco/716-16/2016 | A | 29/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_16905448 | hRSV/A/Morocco/152-17/2016 | A | 22/11/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15004431 | hRSV/B/Morocco/51-13/2012 | B | 26/11/2012 | Africa / Morocco / Casablanca |
| EPI_ISL_15004432 | hRSV/B/Morocco/15H-13/2012 | B | 23/10/2012 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15004434 | hRSV/B/Morocco/64-13/2012 | B | 03/12/2012 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15004436 | hRSV/B/Morocco/59H-13/2012 | B | 13/11/2012 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15004437 | hRSV/B/Morocco/62H-13/2012 | B | 20/11/2012 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120684 | hRSV/B/Morocco/130H-15/2015 | B | 21/01/2015 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120685 | hRSV/B/Morocco/183H-15/2015 | B | 17/02/2015 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120686 | hRSV/B/Morocco/98-16/2015 | B | 02/12/2015 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120687 | hRSV/B/Morocco/119-16/2015 | B | 15/12/2015 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120691 | hRSV/B/Morocco/167-16/2016 | B | 07/01/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120693 | hRSV/B/Morocco/245-16/2016 | B | 19/01/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120695 | hRSV/B/Morocco/271-16/2016 | B | 21/01/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120696 | hRSV/B/Morocco/275-16/2016 | B | 17/01/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120697 | hRSV/B/Morocco/288-16/2016 | B | 21/01/2016 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120698 | hRSV/B/Morocco/292-16/2016 | B | 20/01/2016 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120699 | hRSV/B/Morocco/295-16/2016 | B | 20/01/2016 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120700 | hRSV/B/Morocco/311-16/2016 | B | 25/01/2016 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120701 | hRSV/B/Morocco/321-16/2016 | B | 22/01/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120702 | hRSV/B/Morocco/492-16/2016 | B | 11/02/2016 | Africa / Morocco / Sale |
| EPI_ISL_15120704 | hRSV/B/Morocco/501-16/2016 | B | 11/02/2016 | Africa / Morocco / Meknes |

| Accession ID | Identifiant de la séquence | Sous-type | Date du prélèvement | Lieu de collecte |
|------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|--------------------------------|
| EPI_ISL_15120705 | hRSV/B/Morocco/514-16/2016 | B | 11/02/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120707 | hRSV/B/Morocco/584-16/2016 | B | 17/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120708 | hRSV/B/Morocco/594-16/2016 | B | 18/02/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120709 | hRSV/B/Morocco/619-16/2016 | B | 19/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120710 | hRSV/B/Morocco/639-16/2016 | B | 22/02/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120711 | hRSV/B/Morocco/676-16/2016 | B | 23/02/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120712 | hRSV/B/Morocco/706-16/2016 | B | 25/02/2016 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120714 | hRSV/B/Morocco/728-16/2016 | B | 01/03/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120718 | hRSV/B/Morocco/36-17/2016 | B | 01/11/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120720 | hRSV/B/Morocco/176-17/2016 | B | 29/11/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120722 | hRSV/B/Morocco/260-17/2016 | B | 22/12/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120724 | hRSV/B/Morocco/304-17/2016 | B | 23/12/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120725 | hRSV/B/Morocco/341-17/2016 | B | 28/12/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120732 | hRSV/B/Morocco/836-16/2016 | B | 10/03/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120733 | hRSV/B/Morocco/721-16/2016 | B | 28/02/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120734 | hRSV/B/Morocco/715-16/2016 | B | 29/02/2016 | Africa / Morocco / Beni mellal |
| EPI_ISL_15120735 | hRSV/B/Morocco/651-16/2016 | B | 22/02/2016 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120736 | hRSV/B/Morocco/299-16/2016 | B | 21/01/2016 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120737 | hRSV/B/Morocco/387-17/2017 | B | 02/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120740 | hRSV/B/Morocco/558-17/2017 | B | 12/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120741 | hRSV/B/Morocco/584-17/2017 | B | 13/01/2017 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120742 | hRSV/B/Morocco/610-17/2017 | B | 17/01/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120744 | hRSV/B/Morocco/641-17/2017 | B | 18/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120746 | hRSV/B/Morocco/650-17/2017 | B | 19/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120747 | hRSV/B/Morocco/683-17/2017 | B | 19/01/2017 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120748 | hRSV/B/Morocco/694-17/2017 | B | 24/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120749 | hRSV/B/Morocco/389-17/2017 | B | 02/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120750 | hRSV/B/Morocco/617-17/2017 | B | 14/01/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120751 | hRSV/B/Morocco/692-17/2017 | B | 19/01/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120752 | hRSV/B/Morocco/983-17/2017 | B | 14/02/2017 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120753 | hRSV/B/Morocco/991-17/2017 | B | 10/02/2017 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120754 | hRSV/B/Morocco/1030-17/2017 | B | 12/02/2017 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120755 | hRSV/B/Morocco/1112-17/2017 | B | 17/02/2017 | Africa / Morocco / Tanger |
| EPI_ISL_15120756 | hRSV/B/Morocco/1119-17/2017 | B | 28/02/2017 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120757 | hRSV/B/Morocco/1122-17/2017 | B | 28/02/2017 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120758 | hRSV/B/Morocco/1136-17/2017 | B | 27/02/2017 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120759 | hRSV/B/Morocco/1144-17/2017 | B | 01/03/2017 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120760 | hRSV/B/Morocco/759-17/2017 | B | 17/01/2017 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120761 | hRSV/B/Morocco/767-17/2017 | B | 15/01/2017 | Africa / Morocco / Oujda |
| EPI_ISL_15120762 | hRSV/B/Morocco/794-17/2017 | B | 20/01/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120763 | hRSV/B/Morocco/1017-17/2017 | B | 12/02/2017 | Africa / Morocco / Tanger |

| Accession ID | Identifiant de la séquence | Sous-type | Date du prélèvement | Lieu de collecte |
|------------------|-----------------------------|-----------|---------------------|------------------------------|
| EPI_ISL_15120764 | hRSV/B/Morocco/1023-17/2017 | B | 11/02/2017 | Africa / Morocco / Marrakech |
| EPI_ISL_15120765 | hRSV/B/Morocco/1118-17/2017 | B | 28/02/2017 | Africa / Morocco / Meknes |
| EPI_ISL_15120766 | hRSV/B/Morocco/1379-17/2017 | B | 28/03/2017 | Africa / Morocco / Fes |
| EPI_ISL_15120767 | hRSV/B/Morocco/1231-17/2017 | B | 09/03/2017 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_15120768 | hRSV/B/Morocco/1327-17/2017 | B | 20/03/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120769 | hRSV/B/Morocco/1330-17/2017 | B | 21/03/2017 | Africa / Morocco / Agadir |
| EPI_ISL_15120779 | hRSV/B/Morocco/841-17/2017 | B | 19/01/2017 | Africa / Morocco / Tanger |
| EPI_ISL_16905446 | hRSV/B/Morocco/729-17/2017 | B | 26/01/2017 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_16905449 | hRSV/B/Morocco/856-16/2016 | B | 10/03/2016 | Africa / Morocco / Rabat |
| EPI_ISL_16905450 | hRSV/B/Morocco/511-16/2016 | B | 11/02/2016 | Africa / Morocco / Meknes |

CENTRE D'ETUDES DOCTORALES - SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Résumé

Les infections aiguës des voies respiratoires (IRAs) représentent une préoccupation majeure pour la santé publique, entraînant un taux de morbidité et de mortalité élevé au niveau mondiale. Au Maroc, les données concernant l'étiologie virale des IRAs demeurent rarissimes.

Dans le cadre du réseau national de surveillance de la grippe, des prélèvements respiratoires ont été collectés sur les sites sentinelles auprès de patients de tous âges présentant un syndrome grippal (SG) ou une infection respiratoire aiguë sévère (IRAS) durant 3 saisons grippales (Septembre 2014 à Décembre 2016). Ces échantillons ont été investigués moyennant la réaction de polymérisation en chaîne pour détecter 16 virus respiratoires les plus courants. La détection virale et le sous-typage du virus respiratoire syncytial (HRSV) ont été étendus sur 5 années épidémiques (Septembre 2012 à Aout 2017), et la saisonnalité du HRSV dans le pays a été examinée. Un échantillonnage représentatif des prélèvements positifs pour le HRSV a été séquencé grâce aux techniques de séquençage nouvelle génération (NGS). L'analyse phylogénétique a été réalisée sur la deuxième partie hypervariable du gène G (HVR-2), et les génotypes ont été confirmés. De septembre 2014 à décembre 2016, un total de 2009 échantillons ont été collectés. Un virus respiratoire au moins a été détecté dans 1423 (70,8%) de ces échantillons. Le virus de la grippe était le plus fréquemment détecté dans 612 (30,4%) des échantillons positifs, suivi du virus respiratoire syncytial (HRSV) dans 359 (17,9%), des rhinovirus (HRV) dans 263 (13,1%), et de l'adénovirus (HAdV) dans 124 (6,2%) échantillons. Le virus influenza prédominait chez les adultes 15-49 ans, avec une prévalence de 43,3%. En revanche, chez les enfants <5 ans, le HRSV était le virus le plus prévalent (37,6%). Le virus influenza, le HRSV et le métapneumovirus humain (HMPV) circulaient essentiellement pendant la saison froide, tandis que les autres virus étaient détectables tout au long de l'année. L'étude des 3679 échantillons collectés durant la période 2012/2017 confirme la prévalence du HRSV parmi les enfants marocains hospitalisés. La proportion d'infections respiratoires attribuables au HRSV parmi les nourrissons âgés de 0 à 6 mois était de 53% (303/572). La tendance saisonnière du HRSV a également été confirmée. En analysant phylogénétiquement les séquences, les génotypes HRSVA-ON1 et HRSVB-BA ont été les seuls détectés.

La présente étude suggère qu'environ 79% des infections respiratoires aiguës enregistrées chez des enfants < 5 ans au Maroc étaient dues à des infections virales, dont le HRSV représentait la part la plus importante, notamment chez les nourrissons. Cette étude constitue également le premier rapport sur la variabilité génétique du HRSV au Maroc basée sur une analyse partielle du gène G. Les résultats de ce travail permettront une meilleure compréhension de l'évolution des génotypes du HRSV et de leur circulation globale.

Mots clés : virus respiratoires, Infections respiratoires aiguës, variabilité génétique, épidémiologie moléculaire, virus respiratoire syncytial, gène G, Maroc.

Abstract

Acute respiratory tract infections (ARIs) represent a major public health concern, leading to high morbidity and mortality rates globally. In Morocco, data concerning the viral etiology of ARIs remains extremely rare.

As part of the national influenza surveillance network, respiratory samples were collected at sentinel sites from patients of all ages presenting with influenza-like illness (ILI) or severe acute respiratory infection (SARI) during 3 influenza seasons (September 2014 to December 2016). These samples were investigated using polymerase chain reaction to detect 16 most common respiratory viruses. Viral detection and subtyping of the Human respiratory syncytial virus (HRSV) were extended over 5 epidemic years (September 2012 to August 2017), and the seasonality of HRSV in the country was examined. A representative sampling of HRSV-positive samples was sequenced using next generation sequencing (NGS) techniques. Phylogenetic analysis was carried out on the second hypervariable part of the G gene, and the genotypes were confirmed. From September 2014 to December 2016, a total of 2009 samples were collected. At least one respiratory virus was detected in 1423 (70.8%) of these samples. Influenza virus was most frequently detected in 612 (30.4%) of the positive samples, followed by (HRSV) in 359 (17.9%), rhinovirus (HRV) in 263 (13.1%), and Human adenovirus (HAdV) in 124 (6.2%) samples. The influenza virus predominated among adults 15-49 years old, with a prevalence of 43.3%. On the other hand, in children <5 years old, HRSV was the most prevalent virus (37.6%). The influenza virus, HRSV and Human metapneumovirus (HMPV) circulated mainly during the cold season, while the other viruses were detectable throughout the year. The study of 3679 samples collected during the period 2012/2017 confirms the prevalence of HRSV among hospitalized Moroccan children. The proportion of respiratory infections attributable to HRSV in infants aged 0 to 6 months was 53% (303/572). The seasonal trend of HRSV was also confirmed. By phylogenetically analyzing the sequences, the HRSVA-ON1 and HRSVB-BA genotypes were the only ones detected.

The present study suggests that approximately 79% of acute respiratory infections recorded in children <5 years in Morocco were due to viral infections, of which HRSV represented the largest share, particularly in infants. This study also constitutes the first report on the genetic variability of HRSV in Morocco based on a partial analysis of the G gene. The results of this work will allow a better understanding of the evolution of HRSV genotypes and their overall circulation.

Key words: respiratory viruses, acute respiratory infections, genetic variability, molecular epidemiology, respiratory syncytial virus, G gene, Morocco.