

APPORT DE LA RT-PCR POUR LA DETECTION DES ENTEROVIRUS DANS LES EAUX USEES A ABIDJAN (CÔTE D'IVOIRE)

Auteurs

BINI J.C. ^{1*}
EKAZA E.¹
GNAGNE T.²
BORGET A.M.Y.³
VEH K.A.¹
AKRAN AV.¹ COULIBALY
N.D.¹
FAYE-KETTE H.¹
SESS E.D.⁴
DOSSO M.¹

Services

- 1- Unité de Microbiologie Moléculaire, Département de Bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire (IPCI) 01 BP 490 Abidjan 01
- 2- Centre Régional pour l'Eau Potable et l'Assainissement section Côte d'Ivoire (CREPA-CI) 18 BP 80 Abidjan 18
- 3- RETROCI CHU Treichville, 01 BP 1712 Abidjan 01 République de Côte d'Ivoire.
- 4- Laboratoire de Biochimie UFR des Sciences Médicales d'Abidjan. Université de Cocody BPV 166.

Correspondance

*22 BP 823 Abidjan 22
République de Côte d'Ivoire
Tel : 00 225 07866081
- jcbini@yahoo.fr

RESUME

Les entérovirus sont des virus entériques humains pouvant provoquer des maladies invalidantes chez les enfants. Ils sont éliminés dans les selles et contaminent de cette manière le milieu hydrique et les fruits de mer. Les maladies dues aux Entérovirus constituent un important problème de santé publique. Pour lutter contre ces maladies provoquées par ces virus, il est donc nécessaire de disposer d'une méthodologie permettant le contrôle et la surveillance virologique des milieux hydriques.

L'objectif de cette étude était de détecter les entérovirus dans les échantillons environnementaux.

Un total de 22 échantillons d'eaux usées provenant de 8 sites différents de 6 quartiers de la ville d'Abidjan ont été analysés. Tous les échantillons ont été concentrés puis précipités par le Polyéthylène glycol 6000. Les acides nucléiques ont été extraits selon la méthode de Boom. Les ARN extraits ont été amplifiés par RT-PCR en utilisant des amorces spécifiques de la région 5' non codante (5'RNC) du génome des Entérovirus.

L'analyse par RT-PCR a permis de détecter des Entérovirus à un taux de 31,8% (7/22) sur l'ensemble des échantillons testés.

Cette étude a permis d'une part d'appliquer une méthode de biologie moléculaire rapide et simple (RT-PCR) pour la détection des Entérovirus dans les eaux usées, palliant ainsi aux difficultés liées à la culture cellulaire à partir de ce type d'échantillons et d'autre part de montrer le risque infectieux que constituent les eaux usées non traitées à Abidjan.

Mots-clés : Eaux usées, Enterovirus, RT-PCR, Abidjan.

SUMMARY

Among the human enteric viruses, the classic Enteroviruses in most of the time unapparent provoke invalidating illnesses at the children. Eliminated in the stools, these Enteroviruses contaminate the environment water and the seafood. This constitutes an important problem of public health. It is therefore necessary to have a methodology permitting the control and the virology surveillance of the environment water.

To detect the Enteroviruses in the environmental samples.

A total of 22 sewage samples coming from 8 sites different from 6 districts of the city of Abidjan have been analyzed. All the samples have been concentrated and precipitated by Polyethylene glycol 6000. The nucleic acids have been extracted according to Boom's method. The extracted RNA has been amplified by RT-PCR while using specific primers of the 5' untranslated region (5'UTR) of the Enteroviruses's genome.

The RT-PCR analyzed samples revealed the presence of Enteroviruses with a rate of 31,8% (7/22) of the set of the samples tested.

This survey permitted to apply a fast and simple molecular biology method (RT-PCR) for the detection of the Enteroviruses in sewage, palliating thus to the difficulties bound to the cellular culture method from this type of samples and on the other hand to show the infectious risk that the sewage non treated in Abidjan constitute.

Key words : *Sewage, Enterovirus, RT-PCR, Abidjan.*

INTRODUCTION

Il existe plus de 150 espèces de virus entériques humains pathogènes (NICAND E. et al., 1998). Parmi ces virus, les Entérovirus occupent une place importante. Ce sont des virus à ARN, résistants dans le milieu extérieur et capables de persister longtemps dans l'environnement. Ils sont pour la plupart responsables d'affections souvent inapparentes dont la plus redoutable est la Poliomyélite (SCHWARTZBROD L., 1991). Leur transmission se fait de manière directe ou de manière indirecte par des eaux souillées ou des aliments contaminés (SCHWARTZBROD L., 1991). La transmission indirecte est certainement à la base de nombreuses épidémies dans les pays en développement. Selon HEJKAL T.W. et al. (1982), LIPPY and WALTRIP (1984), CLIVER D. O. (1984), plusieurs épidémies dues aux Entérovirus ont été décrites suite à la consommation d'eau contaminée. Éliminés dans les selles, ces virus se retrouvent dans les eaux usées qui constituent le premier maillon d'un cycle au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau (SCHWARTZBROD L., 1991). Dans les pays industrialisés, ces eaux usées sont traitées avant d'être rejetées dans le milieu naturel. Cela n'est pas le cas pour les pays en développement. Les Entérovirus contenus dans ces eaux usées sont susceptibles de contaminer les nappes souterraines ainsi que les eaux de surface. Ils représentent un danger lorsque ces eaux sont utilisées pour la consommation ou pour irriguer des cultures vivrières ou pour les baignades. Chaque année 1,7 million de jeunes enfants meurent de diarrhées dont l'origine est une mauvaise qualité des eaux de boisson, un assainissement inexistant et une hygiène défectueuse (SANDY C. et al., 2003). Le risque est omniprésent bien que la concentration virale dans les eaux usées soit sujette à des variations géographiques, socio-économiques et saisonnières. En outre l'importante quantité d'Entérovirus retrouvée dans les eaux usées est associée à un faible niveau d'hygiène et à une grande proportion d'enfants dans la communauté (DAHLING D.R. et al., 1989). La détection des Entérovirus dans les eaux usées est un bon indicateur de

contamination virale et permet de prévenir toute possibilité d'épidémie. L'amélioration des techniques d'analyse virologique par utilisation de méthodes de biologie moléculaire permet d'augmenter les chances de détection rapide et de façon sensible et spécifique des virus, pour lesquels il n'existe pas de méthode rapide ou facile de culture.

Le but de cette étude est de détecter par RT-PCR le génome des Entérovirus circulant dans l'environnement Abidjanais à partir des eaux usées.

MATERIEL ET METHODES

***Sites d'échantillonnage et collecte des eaux usées :** au cours des mois d'août, septembre et décembre 2005, 3 sorties ont permis d'échantillonner 8 sites d'eaux usées à travers la ville d'Abidjan. Les différentes sorties pour les prélèvements ont été effectuées entre 09 h et 12 h en dehors de toutes fluctuations rythmiques des eaux. Ces sites ont été retenus pour la précarité des conditions de vie et d'hygiène des habitants. Ce sont :

Site A (quartier Nord Est II) et Site B (quartier Progrès), tous deux dans la commune de Koumassi entourés au Nord et au Sud par la lagune Ebrié. Les eaux usées recueillies au niveau du site B sont issues de l'abondante pluie qui a entraîné une augmentation des volumes d'eaux parasites dans le réseau d'assainissement. Ces eaux usées sont rejetées dans la nature en des lieux non aménagés pour cet usage. La particularité de ce site B est sa localisation à l'entrée d'une habitation à forte densité humaine.

Site C (quartier Sebroko), situé dans la commune d'Attécoubé, au Nord et en bordure de la lagune Ebrié. Les eaux usées provenant de la commune d'Adjamé traversent certaines habitations de ce site avant de se déverser dans la lagune Ebrié.

Site D (quartier Sagbé Sud zone non assainie) et Site E (quartier Sabgé Sud zone assainie), tous deux dans la commune d'Abobo à l'extrême Nord de la lagune Ebrié. Le site E est dit assaini parce que le Centre Régional pour l'Eau Potable et l'Assainissement en Côte d'Ivoire (CREPA-CI) a favorisé dans cette zone la construction de latrines, l'accès en eau potable et l'assainissement.

Site F (quartier Williamsville I), situé dans la commune d'Adjamé au Nord de la lagune Ebrié.

Site G (quartier Sideci Sicogi Location Vente L.) situé dans la commune de Yopougon à l'Ouest de la lagune Ebrié. Les eaux usées de ce site stagnent et servent aussi de dépotoir des ordures ménagères.

Site H (CHU bas fond) situé dans la commune de Cocody, à l'Est de la lagune Ebrié (Figure 1).

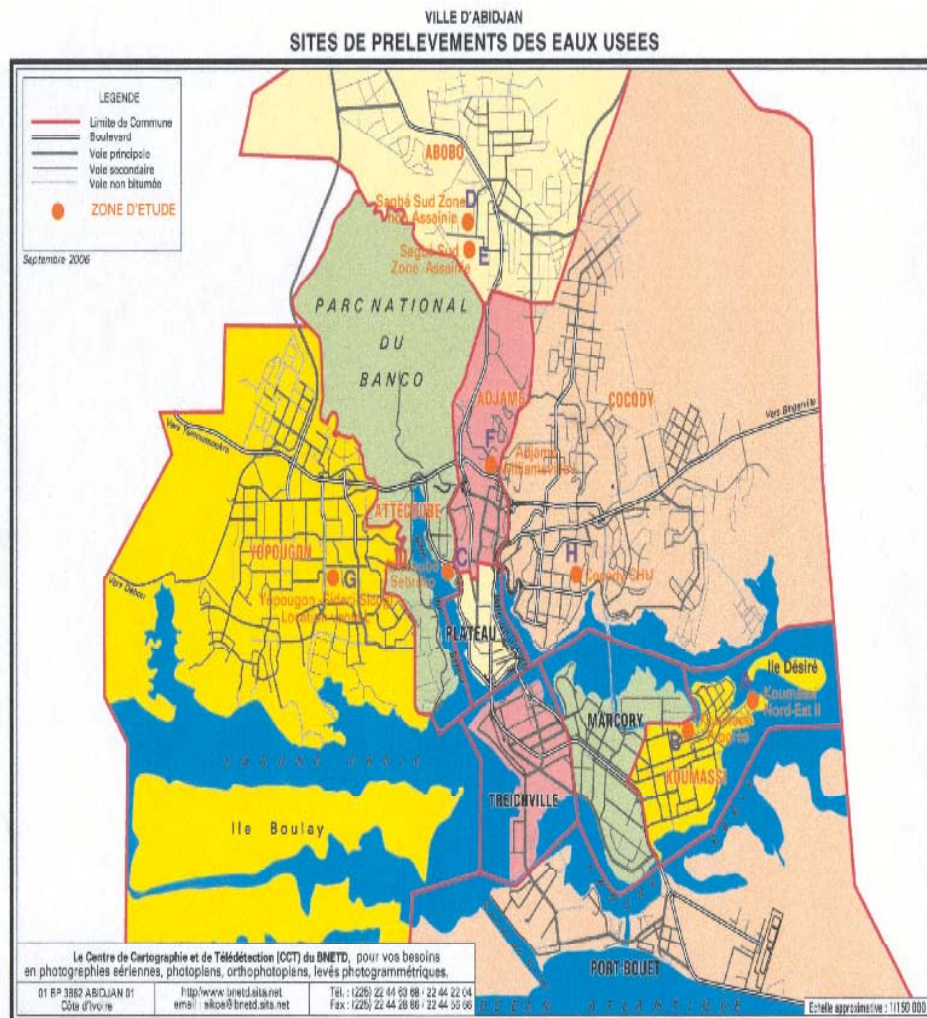


Figure 1 : Carte de la ville d'Abidjan contenant les différents sites de prélèvement (A, B, C, D, E, F, G, H)

Les eaux usées du district d'Abidjan sont pour la plupart recueillies dans des caniveaux à ciel ouvert qui convergent vers la lagune Ebrié.

Ces eaux très insalubres et très contaminées sont rejetées dans la lagune Ebrié sans traitement préalable, ce qui favorise la contamination de la lagune avec des conséquences sur la qualité sanitaire des poissons et des crustacés.

Les caniveaux visités sont construits de matériaux divers :

Les caniveaux des sites A, B, D, F et H sont faits de matériaux de construction qui facilitent l'écoulement des eaux usées.

Le caniveau du site C est fait de matériaux de construction très vétuste. Les eaux usées du site C côtoient les habitations et s'infiltrèrent pratiquement dans les chambres à coucher.

Les caniveaux des sites E et G sont en terre battue et sont utilisées comme dépotoir des ordures ménagères par les populations. Les eaux usées contenues dans ces caniveaux s'infiltrèrent dans le sol et peuvent contaminer les nappes souterraines.

Tous ces caniveaux présentent un inconvénient, celui de retenir la boue qui obstrue le passage des eaux usées. Les caniveaux des sites visités sont des lieux très insalubres.

Les échantillons d'eaux ont été collectés à raison de 3 prélèvements par site. Un seul prélèvement a été réalisé au Site B. Cinquante millilitres (50) d'eaux usées ont été prélevés dans des flacons stériles et acheminés à + 4°C au laboratoire.

Ces échantillons ont été concentrés dans un délai maximal de 12 H après le prélèvement.

***Concentration des virus :** la concentration des virus a été réalisée selon la méthodologie recommandée par l'OMS et modifiée par l'unité de Microbiologie Moléculaire du département de Bactériologie Virologie de l'Institut Pasteur de Côte d'Ivoire. Après centrifugation des eaux usées à +4°C pendant 30 min à 5000 xg, le surnageant a été conservé et au culot, a été ajouté 5 volumes de tampon d'élution (Glycine 0,05 M pH 9,5) et 1/2 volume de chloroforme. Ce mélange a été à nouveau centrifugé et la phase aqueuse ajoutée au précédent surnageant. Une troisième élution a été réalisée sur la phase organique comme décrit précédemment et le surnageant a été ajouté aux deux autres. Ces surnageants ont été par la suite précipités dans du polyéthylène glycol (PEG 6000) à 50 % dans un rapport de 1 V : 4 V (1 ml de PEG pour 4 ml de surnageant) toute une nuit à +4°C sous agitation. Après une centrifugation de 60min à 5000xg à +4°C, le culot obtenu a été repris par 2 ml d'eau pour préparation injectable stérile, puis 1 volume de chloroforme avant une nouvelle centrifugation à + 4°C pendant 30 min à la même vitesse.

Le surnageant obtenu, a été filtré sur un filtre de 0,22 µm et le filtrat conservé à - 20°C.

***Extraction de l'ARN viral :** l'extraction de l'ARN viral a été réalisée selon la méthode de BOOM R. et al., (1990). Trois cent microlitres de filtrat ont été ajoutés à 900µl de tampon de lyse (5M Guanidine de Thiocyanate, 0,1M Tris-HCl pH 6,4 ; 0,2M EDTA pH 8 et 2,6% Triton X-100) et 50µl de suspension de silice. Après une incubation de 10min à température ambiante, le mélange a été centrifugé pendant 2 min à 14000 xg. Le culot a été lavé avec 1ml de tampon de lavage (5M Guanidine de Thiocyanate, 0,1M Tris-HCl pH 6,4) suivi d'une centrifugation à 14000xg pendant 2min à +4°C. Un second lavage à la guanidine a été réalisé sur le culot obtenu, suivi de deux lavages à l'éthanol 70% froid et un lavage par de l'acétone pur. Le culot séché, a été élué dans 70 µl de tampon T.E (10 mM Tris-HCl et 1 mM EDTA pH 8). Après une centrifugation à 14000xg pendant 5min à +4°C, le surnageant contenant les ARN a été transféré dans un tube stérile. L'extrait des ARN obtenus, a été conservé à -20°C jusqu'à son utilisation.

***Transcription reverse et amplification par PCR (RT-PCR) :** La transcription de l'ARN en ADNc a été réalisée selon la méthode de PAPAVENTSIS D. et al., (2005). Neuf microlitres d'extrait d'ARN ont été ajoutés à 50pmol/µl d'amorce antisens K1 (5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3') et 20 U de RNase inhibitor (Applied Biosystems). Après chauffage à 70°C

pendant 5 min et refroidissement rapide sur glace, la réaction de transcription inverse a été effectuée dans un volume final de 25 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 5 mM MgCl₂, 1 mM de chaque dNTP, 50 U Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Applied Biosystems). Le mélange a été incubé pendant 60 min à 42°C et chauffé pendant 5min à 95°C pour l'inactivation de la Reverse Transcriptase.

L'ADNc synthétisé, a été amplifié par PCR en utilisant les amorces ciblant la région 5' non codante du génome viral. Les amorces utilisées sont K1 l'antisens et K2 l'amorce sens : 5'- CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG-3'. Ces amorces permettent d'amplifier un fragment de 434 pb. La PCR a été effectuée dans un volume final de 50 µl contenant 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3 ; 2 mM MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP 20 pmol/µl de chaque amorce, 1 U d'ampli Taq DNA polymérase (Applied Biosystems) et 5 µl d'ADNc.

Les conditions d'amplification comprennent une dénaturation initiale pendant 5 min à 94°C, une étape cyclique répétée 40 fois dont une phase de dénaturation 30 sec à 94°C, une phase de fixation des amorces 30 sec à 50°C et une phase d'élongation 30 sec à 72°C ; suivi d'une élongation finale pendant 7min à 72°C. Les produits d'amplification ont été identifiés par électrophorèse après migration en gel d'agarose à 1% contenant 0,5µg/ml de bromure d'éthidium. L'observation des produits d'amplification a été faite sous une lampe à UV (fig.2)

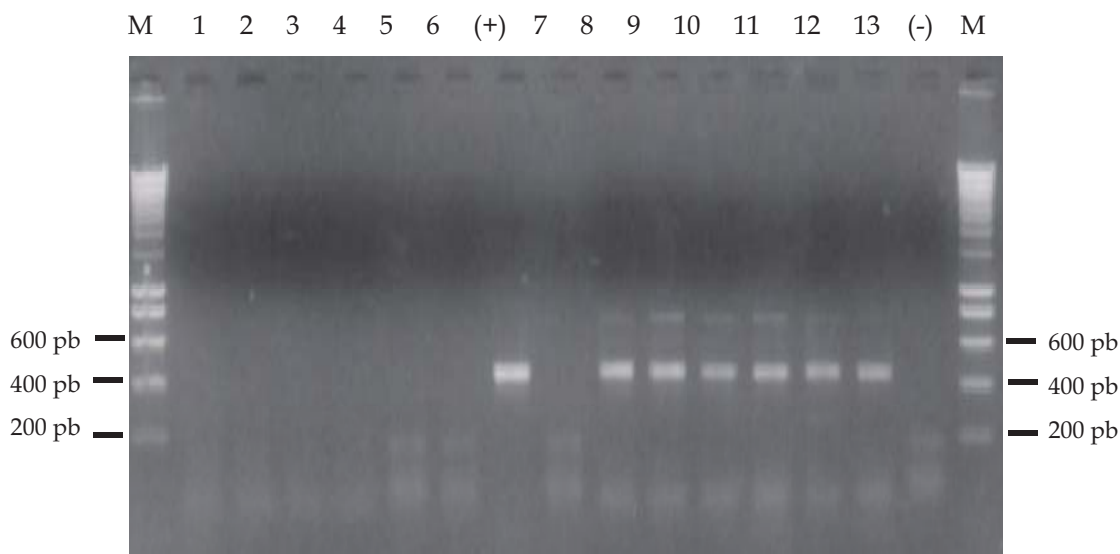


Figure 2 : Électrophorèse en gel d'agarose à 1 % contenant du bromure d'éthidium à 0.5 µg/ml, des produits d'amplification par RT-PCR du gène 5'NC des Entérovirus à partir d'échantillons d'eaux usées analysées. Pistes M : marqueur de poids moléculaire «SmartLadder» (Eurogentec) ; pistes 1, 2, 3 : prélèvements d'eaux usées effectués au mois d'août respectivement aux sites A, C, D ; pistes 4, 5, 6 : prélèvements d'eaux usées effectués au mois de septembre respectivement aux sites E, F, G ; pistes 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 : prélèvements d'eaux usées effectués au mois de décembre respectivement aux sites A, B, C, D, E, F, H ; piste (+) : Surnageant de culture de souche de Poliovirus servant de contrôle positif et piste (-) : Contrôle négatif (eau distillée stérile).

RESULTATS

Au cours de cette étude un total de 22 échantillons d'eaux usées ont été collectés durant les mois d'août, septembre et décembre 2005 dans 6 quartiers de la ville d'Abidjan. Pendant cette période, la pluviométrie enregistrée selon la SODEXAM était de 7,1mm d'eau en août, 60,9mm d'eau en septembre et 31,3mm d'eau en décembre (Tableau II). Aux mois d'août et de septembre, l'échantillonnage a été effectué en dehors des pluies sur les sites A, C, D, E, F, G et H. Au mois de décembre par contre, l'échantillonnage a été effectué au lendemain des pluies enregistrées sur la ville d'Abidjan. Ainsi en plus des sites A, C, D, E, F, G et H échantillonnés, le site B a été ajouté du fait de la découverte tardive des eaux usées stagnantes à l'entrée d'une cour commune fortement peuplée à Koumassi Progrès. En définitive durant les mois d'août et de septembre 14 échantillons ont été collectés aux sites A, C, D, E, F, G et H et au mois de décembre 8 échantillons aux sites A, B, C, D, E, F, G et H (Tableau I).

L'utilisation de la RT-PCR a permis de détecter les Entérovirus dans 7 échantillons d'eaux usées soit un taux de détection de 31,8% (7/22).

Dans l'ensemble des 8 sites analysés au mois de décembre, les Entérovirus ont été détectés dans 7 sites (B, C, D, E, F, G et H) soit un taux de détection de 87,5% (7/8) (Tableau II). Aucun Entérovirus n'a été détecté au site A. L'analyse des 3 échantillons par site a montré que 1 échantillon sur 3 était positif pour les sites C, D, E, F, G et H. Pour le site B, le seul échantillon analysé s'est avéré positif.

Les 14 échantillons analysés en août et en septembre se sont avérés négatifs sur les sites A, C, D, E, F, G et H (Tableau I).

Tableau I : Présence des Entérovirus par rapport aux sites et aux mois

Mois	SITE A	SITE B	SITE C	SITE D	SITE E	SITE F	SITE G	SITE H
Août	-	NC	-	-	-	-	-	-
Septembre	-	NC	-	-	-	-	-	-
Décembre	-	+	+	+	+	+	+	+

(-) Négatif

(+) Positif

(NC) Non Collecté

Les Entérovirus ont été détecté sur tous les sites au mois de décembre sauf au site A.

Tableau II : Pourcentage de Positivité par rapport aux mois et à la pluviométrie

Mois	Août	Septembre	Décembre
Pluviométrie (mm)	7,1	60,9	31,3
Positivité (%)	0	0	87,5

Le taux de positivité est très élevé au mois de décembre avec une pluviométrie de 31,3 mm d'eau.

DISCUSSION

Les résultats de l'analyse virologique des eaux usées de la ville d'Abidjan par la RT-PCR ont mis en évidence la présence de l'ARN des Entérovirus avec un taux de détection de 31,8% (7/22). Au cours de cette étude, le taux de détection des Entérovirus était de 33,3% (1/3) pour les sites C, D, E, F, G et H. Au site A, il n'a pas été détecté d'Entérovirus et le seul échantillon prélevé au site B s'est avéré positif. Ces deux différents résultats ont été enregistrés dans la commune de Koumassi (site A et site B). L'absence d'Entérovirus au site A est probablement due à la promiscuité de la lagune Ebrié qui a dilué les virus contenus dans les eaux usées. La présence d'Entérovirus au site B est probablement due aux excréta humains déversés dans les eaux usées.

Les sites C, D, E, F, G et H étant très éloignés de la Lagune Ebrié, vont être utilisés par les populations comme réceptacle des excréta humains. Ces excréta seront transportés par les eaux usées et rejetés dans la lagune Ebrié.

Au cours des mois d'août et de septembre 2005, il n'a pas été détecté d'Entérovirus dans les eaux usées non traitées. Le risque d'infection par ces virus était le plus élevé au mois de décembre 2005, puisque tous les échantillons prélevés étaient positifs. La détection des Entérovirus enregistrée au mois de décembre se situe dans la période de la petite saison des pluies (octobre, novembre, décembre). La contamination virale par les Entérovirus est probablement liée aux pluies exceptionnelles du mois de décembre qui ont entraîné un débordement du réseau de collecte des eaux usées avec rejet direct dans le milieu naturel. La période des pluies est le moment idéal pour certains ménages pour déverser le contenu de leurs latrines dans les caniveaux à ciel ouvert. La vidange des fosses septiques se fait lorsque la pluviométrie est importante ce qui entraîne une remise en circulation des virus et augmente le risque sanitaire pour les populations.

Les Entérovirus présents dans les selles sont caractérisés par leur persistance dans l'environnement. Ainsi à la faveur de la pluie, ceux ci vont contaminer les eaux de surface, les eaux souterraines, les aliments et l'eau de consommation. Ces déchets constituent donc une menace potentielle pour la population vulnérable, en particulier les enfants. En outre la recherche des Entérovirus a permis d'apprécier la répartition spatiale et temporelle de la contamination virale des eaux usées.

La présence des Entérovirus dans l'environnement avait déjà été décrite par GERSHY DAMET G.M. et *al.*, (1987). Ce dernier après avoir utilisé la culture cellulaire, l'ELISA et l'Immunofluorescence a détecté les Entérovirus à un taux de 56,7% (93/164) parmi lesquels 72,05% (67/93) de Poliovirus et 27,95% (26/93) de Coxsackievirus. Selon PINA S., et *al.* (1998), le nombre d'Entérovirus détecté a considérablement chuté voir disparu ces dernières années en Espagne. Dans ce pays, il a été mis en place des systèmes d'assainissement qui permettent de traiter les eaux usées avant leur rejet dans la nature. Or cela n'est pas le cas en Côte d'Ivoire ce qui expliquerait la persistance des Entérovirus dans la nature. Ces eaux usées non traitées à la faveur de la pluie constituent un danger pour les enfants issus de milieux à niveau socio économique faible car ceux-ci utilisent les eaux de pluie comme eaux de loisir. L'idée selon laquelle plus la proportion d'enfant est grande et plus la quantité d'Entérovirus est importante a été soutenue par DAHLING D.R. et *al.*, (1989). Ces derniers ont constaté que la contamination par les Entérovirus est beaucoup plus élevée à Porto Rico, région à forte densité humaine et à niveau socio-économique bas que les USA.

Par ailleurs, les eaux usées contenant les Entérovirus peuvent transmettre de nombreuses maladies dont la poliomyélite. Pour venir à bout de cette maladie invalidante, l'OMS a mis en place depuis 1988 un programme d'éradication de la poliomyélite (maladie à infirmité motrice) par la vaccination.

Ainsi depuis la mise en place de ce programme et l'assainissement, aucun cas n'a été déclaré sur le continent américain. En France aucun nouveau cas n'a été déclaré depuis 1989 à l'exception d'un cas importé en 1995 de la Côte d'Ivoire. C'est une affection qui est endémique en Afrique et en Inde (REY M., 2000). Cette endémicité des Entérovirus en Afrique et en Inde peut s'expliquer par la défaillance du système d'assainissement, la mauvaise qualité de l'eau, l'inexistence de l'hygiène et le sous équipement en infrastructures sanitaires. Ce qui n'est pas le cas en Amérique et en Europe. Pour la plupart des pays en développement, l'élimination des excréta des enfants et de certains adultes se fait dans la nature ou dans les égouts par manque de latrines. Dans les pays industrialisés, l'élimination des excréta des adultes se fait dans des latrines et celle des enfants dans des couches. Ces couches sont par la suite détruites par incinération. L'assainissement, les campagnes de vaccination, la surveillance sanitaire de l'environnement et le traitement des eaux usées s'avèrent donc nécessaire afin de réduire le risque de contamination entérovirale. Cette étude nous a permis de constater que les eaux usées en Côte d'Ivoire constituent une source de contamination par les Entérovirus. La technique de biologie moléculaire mise au point pour la détection des Entérovirus, nous permet de pallier aux difficultés liées à la culture cellulaire. De plus, l'utilisation de la RT-PCR dans la détection des Entérovirus est plus rapide, plus sensible, plus spécifique et peu coûteuse que la culture cellulaire. Afin de prévenir tout risque de contamination virale, il est nécessaire de mener à la fois la sensibilisation de la population, l'approvisionnement des ménages en eau potable, l'amélioration de l'assainissement, la protection des points d'eau par rapport aux sources de contamination et la promotion de l'hygiène individuelle et collective des personnes. Aussi la détection moléculaire du génome viral des Entérovirus peut-il être utilisé comme indicateur de la qualité sanitaire des eaux.

Des études futures devraient être menées pour évaluer si la détection du génome viral dans les eaux usées est liée à la présence de virus infectieux et d'envisager la mise en place d'une politique de surveillance des Entérovirus circulant dans la population par le contrôle des eaux usées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. BOOM R., SOL C. J.A., SALIMANS M. M. M., JANSEN C. L., WERTHEIM-VAN DILLEN P. M. E. AND VAN DER NOORDAA J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of clinical microbiology*. 28 : 495-503.
2. CLIVER D. O. (1984) Significance of water and the environment in the transmission of virus disease in enteric viruses in water, Melnick J. L., Monog. Virol. 15, 30-42.
3. DAHLING D. R., SAFFERMANN R. S. AND WRIGHT B. A. (1989) Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 503-506.
4. GERSHY DAMET G.M., LANUSSE A., DOSSO M. (1987) Surveillance des entérovirus dans les eaux usées en Côte d'Ivoire. Bulletin de la société de pathologie exotique. ISSN 0037-9085 ; coden BSPEAM, FRAM ; vol. 80, N°2, pp. 180-186 ; ABS ENG ; 1987. Bibl. 9 ref.

5. HEJKAL T. W., KESWICK B., LA BELLE R., GERBA C. P., SANCHEZ Y., DREESMAN G., HAFKIN B. AND MELNICK J. L. (1982) Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J. Am. Water works Assoc.* 74, 318-321.
6. LIPPY E.C. AND WALTRIP S.C. (1984) Waterborne disease outbreaks 1946-1980 : a thirty five year perspective *J. Am. Water works Assoc.* 60-67.
7. NICAND E., TEYSSOU R., BUISSON Y. (1998) Le risque fécal viral. *Virologie*. Vol. 2 N°2, 103-16.
8. PAPAVENTSIS D., SIAFAKAS N., MARKOULATOS P., PAPAGEORGIOU G.T., KOURTIS C., CHATZICHRISTON E., ECONOMOU C. and LEVIDIOTOU S. (2005) Membrane adsorption with direct cell culture combined with reverse transcription PCR as a fast method for identifying enteroviruses from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 72-79.
9. SANDY C., DOMINIC O., ANNE Mc C., DINESH S. (2003) La santé, l'environnement et le fardeau des maladies. Traduit en Français en Juin 2004. Department for International Development (DFID), 60 p.
10. SCHWARTZBROD Louis (1991) *Virologie des milieux hydriques*. Tec & Doc Lavoisier. 304 p.
11. PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J. and GIRONES R. (1998) Viral pollution in the environment and in shellfish: Human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 : 3376-3382.
12. REY M. (2000) Vers l'éradication mondiale de la Poliomyélite. *Médecine/Sciences* 2000 ; 16 : 926-8.