



Etude écologique et nosologique des arbovirus transmis par les tiques au Sénégal

II (*) Etude expérimentale du pouvoir pathogène du virus Bhanja pour les petits ruminants domestiques

par J. L. CAMICAS (1), V. DEUBEL (2), G. HEME (2), Y. ROBIN (3)

- (1) Laboratoire d'Entomologie médicale. ORSTOM, B.P. 1386, Dakar, Sénégal.
(2) Laboratoires de Virologie, Institut Pasteur, B.P. 220, Dakar, Sénégal.
(3) Institut Pasteur, Cayenne, Guyane Française.

RÉSUMÉ

Les auteurs testent expérimentalement le pouvoir pathogène du virus Bhanja (BHA) pour les petits ruminants. L'inoculation intraveineuse d'une suspension de cerveaux de souris infectés par du virus BHA à 4 chèvres, 1 bouc et 1 mouton n'a entraîné ni virémie, ni signe clinique, ni modification significative des constantes sanguines. Deux boucs inoculés avec une suspension de tiques *Amblyomma variegatum* infectées ont, eux, fait une virémie fugace d'une demi-journée à une journée, les deuxième et troisième jours après l'inoculation, mais sans manifester le moindre signe clinique. Le virus BHA peut être considéré comme généralement pas ou peu pathogène pour les petits ruminants domestiques. Un hérisson (*Aterix albiventris*) et un écureuil terrestre (*Xerus erythropus*) inoculés avec un broyat de tiques infectées n'ont pas fait de virémie prolongée et ne peuvent donc pas être considérés comme des hôtes d'entretien du virus BHA.

Le virus Bhanja (BHA), Bunyaviridae non groupé, a été isolé pour la première fois en 1955, en Inde (état d'Orissa) d'un lot de tiques *Haemaphysalis (Interphysalis) intermedia* Warburton et Nuttall, 1909 (*Acarida, Ixodida, Amblyommidae*) récoltées sur une chèvre de race Beetal souffrant d'une affection aiguë avec paralysie lombaire (SHAH and WORK (21)).

Il semble être très répandu dans les régions biogéographiques orientale (Inde) et paléarctique (Espagne : CHASTEL et collab. (7); France : ROGUES et collab. (17); Italie continentale : VERANI et collab. (23, 24); Sicile : CASTRO et collab. (5); Yougoslavie : VESEN-

JAK-HIRJAN et collab. (26); Bulgarie : PAVLOV et collab. (15); Arménie : SEMASHKO et collab. (19); Azerbaïdjan : MIRZOEVA (13); Kirghizie : KARAS' et collab. (10) et Kazakhstan : SEMASHKO et collab. (20)). On l'observe aussi, couramment, en région afrotropicale (Nigeria : CAUSEY et collab. (6); KEMP et collab. (11); WILLIAMS et collab. (29); Cameroun : VINOGRAD et collab. (28); République Centrafricaine : SUREAU et collab. (22); Sénégal : ROBIN et collab. (16) et Somalie : BUTENKO et collab. (2)).

Il paraît toucher essentiellement les petits ruminants comme l'attestent les résultats de diverses enquêtes sérologiques (SHAH et WORK (21); VERANI et collab. (23); VERANI et collab. (24, 25); VESENJAK-HIRJAN et collab. (26)).

O.R.S.T.O.M.

(*) Le premier de cette série d'articles a été publié in : Cah. ORSTOM Sér. Ent. Méd. Parasit., 1978, 16 (2) : 95-98.

On connaît son pouvoir pathogène expérimental chez le singe *Macaca mulatta* dont il entraîne généralement la mort, après inoculation intrathalamique il est vrai (BALDUCCI et collab. (1)). On a signalé une infection humaine de laboratoire se manifestant par une affection fébrile bénigne durant moins de 48 h avec des myalgies, des arthralgies, des céphalées frontales modérées et une légère photophobie (CALISHER et GOODPASTURE (3)).

Par contre, malgré la manifestation de troubles neurologiques graves chez la chèvre hôte des tiques ayant donné lieu à l'isolement princeps, la mort d'une chèvre infectée expérimentalement 40 jours après l'inoculation du virus (VERANI et collab. (25)) et la fréquence des stigmates de l'infection observée lors de toutes les enquêtes sérologiques, le pouvoir pathogène réel de ce virus pour les petits ruminants domestiques restait en fait à évaluer. C'est ce à quoi nous nous sommes efforcés dans les essais relatés ci-après.

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.1. Virus

Nous avons utilisé une souche de virus BHA (ArD 9540) isolée d'un lot de 20 nymphes d'*Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794) récoltées le 29 décembre 1969 sur des dépouilles de zébus aux abattoirs de Dakar.

Le titre du virus, soit dans l'inoculum soit dans le sang des animaux virémiques, est toujours exprimé en dose léthale 50 p. 100 (DL50) pour 0,02 ml de matériel infecté inoculé par voie intracérébrale à des souriceaux de 1 à 4 jours.

Dans les six premières expériences, on utilise le contenu d'une ampoule de 0,5 ml de suspension virale, lyophilisée sous vide, contenant 10 p. 100 de broyat de cerveaux de souriceaux infectés dans un mélange à parts égales de solution tampon phosphatée (*) et de sérum de lapin. Le lyophilisat est réhydraté dans 2 à 3 ml d'eau physiologique stérile, laissé 20 min à la température du laboratoire pour diffusion puis dans la glace jusqu'à l'inoculation à la chèvre pratiquée environ 10 min après. La suspension virale est alors titrée par inoculation intracérébrale au

souriceau, les titres variant de 10^6 à $10^{6,6}$ DL50 pour 0,02 ml.

Dans les trois dernières expériences, on inocule au ruminant un broyat de trois, six et huit *A. variegatum* imagos d'élevage à chacun desquels avait été inoculé, 15 à 16 jours auparavant, 0,5 à 1 μ l de la suspension virale. Suivant les cas, il y a eu 1, 2 ou 4 passages successifs sur tiques avant l'inoculation au vertébré. L'inoculation de la suspension virale aux tiques se faisait suivant la technique de ROSEN et GUBLER (18) adaptée par COZ, VALADE, CORNET *et al.* (8). Il est à noter que dans l'expérience n° 8, où nous avons tenté de faire 4 passages successifs sur tiques avant l'inoculation au vertébré, le virus a été perdu au cours du quatrième passage. Les broyats de tiques inoculés aux vertébrés d'expérience titraient $10^{3,9}$, 0 et plus de 10^2 DL50 pour 0,02 ml.

1.2. Petits ruminants

Les animaux utilisés ont été un mouton de race Touabire, âgé d'environ 9 mois, provenant des environs de Dakar, et 8 caprins de race locale (5 chèvres de 4 à 5 mois et demi et 3 boucs de 5 à 7 mois) tous issus d'un troupeau de chèvres sentinelles en place à Bandia (50 km SE de Dakar) depuis 1976 et dans lequel, malgré un examen sérologique pratiqué chaque mois, on n'a jamais mis en évidence une quelconque activité du virus BHA.

1.3. Protocole expérimental

Au jour J-O, on fait une prise de sang à l'animal, une partie permettant de vérifier qu'il ne possède pas d'anticorps fixant le complément contre le virus BHA, l'autre partie étant adressée au laboratoire pour numération des globules blancs et étude de la formule leucocytaire ainsi que de la vitesse de sédimentation (lecture à 1 h, 2 h et 24 h) (1). Ensuite, il reçoit à la jugulaire une injection intraveineuse d'environ 3 ml de suspension de cerveaux de souriceaux ou de tiques infectés à la dose de :

- 10^8 DL50 dans la première expérience,
- $10^{8,68}$ DL50 dans les deuxième, troisième, cinquième et sixième,

(*) Formule p. 165 in : Rapport sur le Fonctionnement technique de l'Institut Pasteur de Dakar, années 1969 et 1970. Laval. Imp. Barnéoud, 1972, p. 1-250.

(1) Les valeurs observées pour la numération globulaire, la formule leucocytaire et la vitesse de sédimentation ont été comparées à celles qui sont données comme normales dans : SCHALM (O. W.), Veterinary hematology. 2nd ed. Philadelphia, Lea and Febiger, 1965, 664 p.

- $10^{8.78}$ DL50 dans la quatrième,
- $10^{5.9}$ DL50 après un unique passage sur tiques dans la septième.
- pas de virus après 4 passages sur tiques dans la huitième,
- plus de 10^4 DL50 après deux passages sur tiques dans la neuvième (ce que l'on peut rapprocher d'une infection après transmission transovarienne chez la tique).

Après cela, l'animal est surveillé quotidiennement et sa température rectale relevée. Jusqu'au dixième jour après inoculation, du sang est prélevé tous les deux jours pour contrôle de la virémie dans les deux premières expériences, puis une fois par jour dans la troisième, et enfin matin et soir du deuxième au cinquième jour dans les six dernières expériences.

La recherche de la virémie se faisait par inoculation intracérébrale au souriceau nouveau-né de 0,02 ml de sang dilué au 1/2 dans l'eau distillée. Cette technique ne permet donc pas de déceler une virémie nettement inférieure à 2 DL50 pour 0,02 ml de sang pur.

Dans toutes les expériences, la formule leucocytaire, la numération des globules blancs et la vitesse de sédimentation ont été étudiées tous les 2 jours.

2. RÉSULTATS

Chez les 9 animaux inoculés, on n'a pu mettre en évidence une virémie que chez les boucs 7 et 9, tous deux inoculés avec un broyat de tiques infectées. Cette observation fait ressortir tout l'intérêt qu'il peut y avoir à repasser sur l'arthropode vecteur un virus présent dans une suspension de cerveaux de souriceaux infectés, si l'on veut étudier son comportement chez ses hôtes vertébrés.

Trois des animaux sont morts, à J36, J21 et J45. Les prélèvements faits sur les animaux agonisants n'ont jamais permis d'isoler le virus BHA par inoculation intra-cérébrale aux souriceaux nouveau-nés, et il semble plus justifié d'incriminer, dans ces trois cas, le virus de la peste des petits ruminants qui sévit à l'état enzootique dans le Cap-Vert et décime les troupeaux non vaccinés. Les 5 autres animaux ayant reçu du virus et ayant tous présenté une conversion sérologique en fixation du complément vers les 15^e-20^e jours, n'ont manifesté aucun signe clinique. La formule leucocytaire n'a pas varié de façon significative, la vitesse de

sédimentation n'a jamais été accélérée et la température rectale n'a jamais dépassé la normale.

3. NOTES D'ÉCOLOGIE VIRALE

Nous fondant sur le fait qu'au Nigeria, KEMP, CAUSEY, SETZER et MOORE (12) ont isolé le virus BHA d'un hérisson *Ateleurix albiventris* Wagner et d'un écureuil terrestre *Xerus erythropus* Geoffroy, nous avons cherché à évaluer la durée de la virémie chez ces vertébrés pour en tirer des conclusions sur leur rôle dans l'écologie du virus.

Une suspension de cerveaux de souriceaux infectés par du virus BHA a été inoculée dans l'hémocèle de 3 mâles et 2 femelles d'*A. variegatum* qui ont été broyés 19 jours après. Le broyat a été divisé en 3 lots de 1 ml dont un a été titré sur souriceaux et a montré un titre de 10^2 DL50 pour 0,02 ml.

Un millilitre du broyat, soit 5 000 DL50, a été inoculé par voie intracardiaque à un *A. albiventris* exempt d'anticorps fixant le complément pour le virus BHA. Tous les 2 jours, de J2 à J20, une prise de sang intracardiaque a été faite pour mettre en évidence une éventuelle virémie. Tous les résultats ont été négatifs. A J21, une dernière prise de sang a mis en évidence une conversion sérologique pour le virus BHA par la réaction de fixation du complément.

Un autre millilitre du broyat a été inoculé de la même façon à un *Xerus erythropus* également exempt d'anticorps fixant le complément pour le virus BHA. Des prises de sang, faites tous les 2 jours de J2 à J12, n'ont pas permis, là non plus, de mettre une virémie en évidence. La non-mise en évidence de virus BHA dans les divers prélèvements de sang chez ces deux mammifères nous incline à penser qu'ils ont fait une virémie brève comme celle des chèvres, ou bien d'un niveau trop faible pour avoir pu être mise en évidence avec les techniques utilisées.

Pour l'instant, on ne connaît donc pas de vertébré faisant une virémie forte et prolongée permettant d'infecter de nombreux vecteurs. On est ainsi tenté de considérer que les chèvres, le hérisson et l'écureuil terrestre ne sont que des hôtes indicateurs (*indicator hosts*) pour les premières et, peut-être, des hôtes accidentels (*incidental hosts*) pour les suivants d'après les définitions présentées dans NOSEK et FOLK (14). Néanmoins, on a peut-être ici

l'illustration d'une différence fondamentale entre l'écologie des virus « à tiques » et celle des virus transmis par les Diptères. En effet, les tiques sont des ectoparasites temporaires qui, par rapport à ces insectes, présentent une double particularité : elles restent fixées un temps assez long sur l'hôte (4 à 12 jours suivant les espèces et les stases), parfois en grand nombre, et prennent un repas d'un volume relativement important. Elles pourraient donc, au cours de ce long et volumineux repas, se trouver nombreuses à être infectées par une virémie de courte durée ou de faible niveau. Dans une expérience ultérieure, on recherchera si un nombre important d'*A. variegatum* est susceptible de s'infecter sur une chèvre virémique à la suite de l'inoculation intraveineuse d'un broyat de tiques infectées. Dans ce cas, les petits ruminants domestiques devraient être considérés comme des hôtes d'entretien du virus (*maintenance hosts* de NOSEK et FOLK (14)).

4. CONCLUSION

On peut raisonnablement conclure que, de façon générale, le virus BHA est peu ou pas

pathogène pour les petits ruminants domestiques. Ceci n'exclut pas que, dans certaines conditions, on puisse à l'avenir observer des syndromes graves isolés : un cas de quadriparésie spastique vient en effet d'être rapporté chez l'homme à Zagreb (VESENJAK, CALISHER et BEUS (27)); HOOGSTRAAL (9)) alors que généralement on classe ce virus dans les agents de syndromes algo-éruptifs mineurs (CAMICAS (4)).

REMERCIEMENTS

1) Nous tenons à remercier les Drs J. L. CARTEL et J. L. STACH, successivement chefs du Service de Biologie clinique à l'Institut Pasteur de Dakar, ainsi que M. FALILOU DIENG, technicien de laboratoire, qui ont bien voulu pratiquer et nous aider à interpréter les divers examens de laboratoire.

2) Nous remercions tout particulièrement le Dr. M. CORNET qui nous a aidés dans la rédaction de cette note, ainsi que les Drs M. GERMAIN et R. TAUFFLIEB qui ont bien voulu faire une lecture critique du manuscrit.

SUMMARY

Ecological and nosological study of tick-borne arboviruses in Senegal. II. Experimental study of the pathogenic power of Bhanja virus for domestic small ruminants

The pathogenicity of Bhanja (BHA) virus for sheep and goats was experimentally studied. The intravenous inoculation of 3 ml of a suspension of brains of suckling mice infected by BHA virus and titrating 10^8 to $10^{8.70}$ suckling mouse LD50 to 4 goats, 1 he-goat and 1 sheep was not followed by any viraemia, clinical symptom, or significative variation of the blood constants. Two he-goats, inoculated with a suspension of infected and grinded *Amb. variegatum* ticks titrating more than 10^4 suckling mouse LD50 and $10^{5.9}$ LD50, developed a transient viraemia lasting from half a day to one day on the second and third days after the inoculation but did not show any clinical symptom or variation in the blood constants. BHA virus can be considered as usually not very or not at all pathogenic for the small domestic ruminants. An hedgehog (*Atelerix albiventris*) and a ground squirrel (*Xerus erythropus*), inoculated with a suspension of infected and grinded ticks titrating 5 000 suckling mouse LD50, did not make a prolonged viraemia and so, cannot be considered as maintenance hosts for the BHA virus.

RESUMEN

Estudio ecológico y nosológico de los arbovirus transmitidos por las garrapatas en Senegal. II. Estudio experimental del poder patógeno del virus Bhanja en los pequeños rumiantes

Los autores comprueban experimentalmente el poder patógeno del virus Bhanja (BHA) en los pequeños rumiantes. La inoculación intravenosa de una suspensión de cerebros de ratoncillos infectados por virus BHA en 4 cabras, 1 macho cabrío y 1 carnero no provocó viremia ni señal clínico ni modificación significativa de las constantes sanguíneas. En cambio, dos machos cabríos inocu-

lados con una suspension de garrapatas *Amblyomma variegatum* infectadas mostraron una viremia fugaz durante medio a día, los segundo y tercero días despues de la inoculacion, pero no manifestaron el menor señal clinico. Se puede considerar el virus BHA como generalmente no o poco patógeno para los pequeños ruminantes domesticos. Un erizo (*Ateletix albiventris*) y una ardilla terrestre (*Sciurus erythropus*) inoculados con una trituración de garrapatas infectadas no mostraron viremia prolongada y no se puede considerarlos como huespedes de mantenimiento del virus BHA.

BIBLIOGRAPHIE SOMMAIRE (*)

1. BALDUCCI (M.), VERANI (P.), LOPES (M. C.), NARDI (F.). Experimental pathogenicity of Bhanja virus for white mice and *Macaca mulatta* monkeys. *Acta virol., Praha*, 1970, **14** : 237-243.
2. BUTENKO (A. M.), GROMASHEVSKY (V. L.), L'VOV (D. K.) and POPOV (V. F.). Isolation of Bhanja virus from *Hyalomma plumbeum impressum* ticks collected in Somalia. *Med. Parazit., Moskva*, 1979, **48** (3) : 37-39 (English translation : NAMRU-3, T 1397).
3. CALISHER (C. H.) and GOODPASTURE (H. C.). Human infection with Bhanja virus. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1975, **24** (6) : 1040-1042.
6. CAUSEY (O. R.), KEMP (G. E.), WILLIAMS (R. W.) and MADBOULY (M. H.). West African tick-borne viruses, in : *Abstr. Rev. 8th int. Congr. trop. Med. Malaria*, Téhéran, 1968, p. 669
8. COZ (J.), VALADE (M.), CORNET (M.) et al. Utilisation du moustique pour la multiplication des arbovirus. *Cah. ORSTOM. sér. Ent. méd. Parasit.*, 1977, **15** (3) : 209-212.
11. KEMP (G. E.), CAUSEY (O. R.), CAUSEY (C. E.). Virus isolations from trade cattle, sheep, goats and swine at Ibadan, Nigeria, 1964-1968. *Bull. epizoot. Dis. Afr.*, 1971, **19** : 131-135.
12. KEMP (G. E.), CAUSEY (O. R.), SETZER (H. W.), MOORE (D. L.). Isolation of viruses from wild mammals in West Africa, 1966-1970. *J. Wildl. Dis.*, 1974, **10** : 279-293.
14. NOSEK (J.), FOLK (C.). Relationships of birds to arboviruses and their vectors. *Acta Scient. naturalium Acad. Scient. bohemoslov., Brno*, 1977, **11** (9) : 1-61.
16. ROBIN (Y.), CAMICAS (J. L.), JAN (C.) et al. Ecology of tick arboviruses in arid areas of Senegal, pp. 209-211, in : CHEREPANOV, A. I. ed., Transcontinental connections of migratory birds and their role in the distribution of arboviruses. Papers of Symposium 1976. Novosibirsk (Akademgorodok). Novosibirsk, Publishing house « Nauka ». Siberian branch, 1978, 325 p.
18. ROSEN (L.), GUBLER (D.). The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, 1974, **23** : 1153-1160.
21. SHAH (K. V.), WORK (T. H.). Bhanja virus : a new arbovirus from ticks *Haemaphysalis intermedia* Warburton and Nuttall, 1909, in Orissa, India. *Ind. J. med. Res.*, 1969, **57** (5) : 793-798.
22. SUREAU (P.), CORNET (J. P.), GERMAIN (M.) et al. Enquête sur les arbovirus transmis par les tiques en République Centrafricaine (1973-1974). Isolement des virus Dugbe, CHF/Congo, Jos et Bhanja. *Bull. Soc. Pathol. exot.*, 1976, **69** (1) : 28-33.
25. VERANI (P.), LOPES (M. C.), BALDUCCI (M.) et al. Arbovirus investigations in southern Italy (Calabria). *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol., Praha*, 1971, **15** (4) : 405-416.
27. VESENJAK (J.), CALISHER (C. H.), BEUS (I.). First natural clinical human Bhanja infection. 6th FEMS Symp. Arboviruses in the mediterranean Countries, Supetar-Brac, Sept. 1978, p. 19 (Abstr.).
28. VINOGRAD (I. A.), KRASOVSKAYA (I. A.), SIDOROVA (G. A.) et al. Isolation of Bhanja arbovirus from *Boophilus decoloratus* ticks in Cameroon. *Vopr. Virusol., Moskva*, 1975, **20** (1) : 63-67.
29. WILLIAMS (R. W.), CAUSEY (O. R.), KEMP (G. E.). Ixodid ticks from domestic livestock in Ibadan, Nigeria, as carriers of viral agents. *J. med. Entomol.*, 1972, **9** (5) : 443-445.

(*) La bibliographie complète (29 réf.) sera communiquée aux personnes qui en feront la demande auprès de la Rédaction de la Revue.