

Imprimé avec le périodique *Bulletin de la Société de Pathologie exotique*.
Extrait du tome 62, n° 1, Janvier-Février 1969 (pages 112 à 118).

**ISOLEMENT D'UNE SOUCHE DE VIRUS MIDDELBURG
A PARTIR D'UN LOT D'*Aedes (A.) CUMMINSI*
RÉCOLTÉS A BANDIA (SÉNÉGAL)**

Par Y. ROBIN (**), M. CORNET (***), P. BRES (**), G. HERY (**)
et R. CHATEAU (***) (*)

Le virus Middelburg a été isolé pour la première fois à partir d'un lot d'*Aedes caballus* et d'un lot d'*Aedes (Neomelanicion)* spp. récoltés dans une ferme située dans le district de Middelburg, Province du Cap, Union Sud-Africaine (6). Par la suite, toujours en

(*) Séance du 8 janvier 1969.

(**) Institut Pasteur, B. P. 220, Dakar.

(***) O. R. S. T. O. M., Dakar.

30 JUL. 1969

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

Collection de Référence

n°/3298 ex 1

Union Sud-Africaine, le virus est isolé d'*A. (A.) albocephalus* et *A. (N.) circumluteolus* (14), d'un lot d'*Aedes (A.) dentatus* et *Aedes (A.) lesoni* et d'*Aedes (A.) cumminsi* (10). BROTTES *et al.* (1966) le retrouvent à Yaoundé (Cameroun) chez *Mansonia (M.) africana* (1).

Les études sérologiques dont la plupart concernent l'Afrique du Sud montrent la présence relativement fréquente d'anticorps neutralisants dans le sérum de bétail, de chèvre et de mouton et leur rareté dans les sérums humains. Chez l'homme, une fois sur 264 au Natal (13), 3 sur 302 au Mozambique (7), 0 sur 602 au Bechuanaland et Caprivi Strip (9), 6 sur 492 en Angola (5), 0 sur 861 dans les régions Sud-Ouest et Nord-Ouest de la Province du Cap (4) et 0 sur 1.347 dans les Provinces de Natal et du Cap (11-12). Au Cameroun, les études faites en utilisant l'inhibition de l'héماغglutination montrent 7 0/0 de réactions positives (1).

Chez l'animal (mouton, chèvre, bovidés), on trouve des anticorps neutralisants 95 fois sur 1.019 examens dans les Provinces de Natal et du Cap (11-12), 26 sur 456 dans les régions Sud-Ouest et Nord-Ouest de la Province du Cap (4) et 62 sur 364 au Tongaland (8).

Le présent article rapporte l'isolement d'une souche de virus Middelburg à partir d'*Aedes (A.) cumminsi* capturés à Bandia (Sénégal).

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Depuis 1965, la forêt de Bandia (14°35 N-17°01 W) a été choisie pour y surveiller l'activité des virus et pour y étudier l'écologie des espèces animales susceptibles d'avoir une importance dans l'entretien des cycles des arbovirus.

La forêt de Bandia est constituée par une savane arbustive à *Acacia*, avec un cours d'eau permanent, encaissé et bordé d'une étroite galerie forestière. Le climat est du type tropical avec une seule saison des pluies, de juillet à septembre.

Les captures sont essentiellement faites sur appât humain, cette technique étant celle qui, jusqu'à présent, a donné les meilleurs résultats. Les moustiques sont ensuite anesthésiés au froid (environ + 4° C) identifiés, groupés par espèces en lots de 50 individus et conservés à - 60° C en attendant le broyage et l'inoculation.

Chaque lot est broyé séparément dans un mortier refroidi et mis en suspension dans 4 ml. de diluant consistant en un tampon phosphaté à 10 0/0 de sérum de lapin normal, pH 7,4. Après centrifugation de la suspension à 2.500 g pendant 15 minutes dans une centrifugeuse à + 4° C, le surnageant auquel on ajoute des antibiotiques est dilué au demi avec le diluant, puis inoculé par voie

intracérébrale (ic) et intrapéritonéale (ip) au souriceau de la nuit à la dose de 0 ml. 02 par chaque voie. Une dilution au 1 : 10 est inoculée à une autre portée de souriceaux du même âge.

L'inhibition de l'hémagglutination (IH) est pratiquée selon la technique de CLARKE et CASALS (1968) (3) et la fixation du complément (FC) selon la technique dite LBCF adaptée à la micro-méthode du centre des maladies transmissibles d'Atlanta (2). La réaction de neutralisation (N) est exécutée en mettant en présence pendant une heure au bain-marie à 37° C, avant de les inoculer au souriceau par voie intracérébrale, les sérums purs et le virus en dilutions progressives de raison 10.

RÉSULTATS

Les captures atteignent leur maximum entre septembre et novembre, c'est-à-dire en fin de saison pluvieuse, la plupart des espèces disparaissant très vite en décembre avec l'apparition des « alizés » qui amènent une chute importante de la température et de l'hygrométrie.

La liste des espèces capturées en octobre 1967 figure sur le tableau I.

Aedes (Aedimorphus) cumminsi mediopunctatus est un moustique rencontré exclusivement en fin de saison des pluies, entre le début de septembre et décembre. Il est particulièrement abondant dans la forêt de Bandia où il forme un volume important des captures.

Des identifications de repas sanguins ont montré que ce moustique se nourrissait sur le bétail (bovins et ovins).

Au cours des années 1965 à 1967, 4.398 moustiques de cette espèce, dont 2.228 en 1967, ont été inoculés en 94 lots.

Un seul des 20 lots d'*Aedes (A.) cumminsi*, récoltés les 18 et 19 octobre 1967 s'est montré positif et a permis l'isolement d'une souche qui a été dénommée PM 3913. Il s'agissait d'un lot contenant 50 moustiques. À l'isolement sur 5 souriceaux inoculés avec la dilution $10^{-2,3}$, deux étaient trouvés morts le 3^e jour, alors que les trois autres étaient malades à des degrés divers. Deux étaient sacrifiés pour passage. Après 3 passages, la période d'incubation s'établissait à 3 jours ; le virus se montrait pathogène pour le souriceau de 4 jours par voie intracérébrale et intrapéritonéale, mais non pathogène quelle que soit la voie pour des souriceaux de 10 jours et des souris de 21 jours.

L'étude anatomo-pathologique montrait : « au niveau du cerveau, altérations neuronales diffuses ou en petits foyers, avec neuronolyse totale ou hyperchromie ou caryorrhaxis des neurones. Les lésions les plus notables se voient au niveau du thalamus » (Professeur R. CAMAIN).

TABLEAU I

Moustiques capturés en octobre 1967.

| | 3 et 4 octobre 1967 | | 18-19 octobre 1967 | | Total | |
|---|------------------------|--------|-----------------------|--------|-------|--------|
| | Lots | Nombre | Lots | Nombre | Lots | Nombre |
| <i>Anopheles</i> | | | | | | |
| <i>gambiae</i> (s. l.) | 23 | 1.142 | 8 | 410 | 31 | 1.552 |
| <i>funestus</i> | 1 | 4 | 4 | 8 | 2 | 12 |
| <i>Aedes</i> | | | | | | |
| (M.) <i>scatophagoides</i> | 2 | 42 | 1 | 12 | 3 | 54 |
| (St.) <i>aegypti</i> | 1 | 5 | 1 | 38 | 2 | 43 |
| <i>unilineatus</i> | | | 1 | 2 | 1 | 2 |
| <i>metallicus</i> | 1 | 4 | 1 | 10 | 2 | 14 |
| <i>luteocephalus</i> | 1 | 22 | 1 | 57 | 2 | 79 |
| (Aed.) <i>argenteopunctatus</i> | 1 | 5 | | | 1 | 5 |
| <i>albocephalus</i> | 1 | 2 | 2 | 63 | 3 | 65 |
| <i>abnormalis</i> | | | 2 | 118 | 2 | 118 |
| <i>irritans</i> | 2 | 28 | 12 | 589 | 14 | 617 |
| <i>dalzieli</i> | 1 | 21 | | | 1 | 21 |
| <i>cumminsi mediopunctatus</i> | 2 | 38 | 20 | 974 | 22 | 1.012 |
| (Neo.) <i>lineatopennis</i> | 1 | 3 | | | 1 | 3 |
| (Dic.) <i>furcifera-taylori</i> | 1 | 26 | 1 | 7 | 2 | 33 |
| <i>Mansonia</i> (M.) | | | | | | |
| <i>uniformis</i> | 1 | 3 | 1 | 3 | 2 | 6 |
| <i>africana</i> | 1 | 6 | 1 | 27 | 2 | 33 |
| <i>Culex</i> (C.) | | | | | | |
| <i>thalassius</i> | 2 | 65 | 12 | 532 | 14 | 597 |
| <i>tritaeniorhynchus</i> | 1 | 37 | | | 1 | 37 |
| | 43 | 1.453 | 65 | 2.850 | 108 | 4.303 |

La souche a été facilement réisolée 20 jours après l'isolement initial à partir du matériel d'origine conservé à -60°C .

Dès que le virus a été établi, un antigène a été préparé au saccharose-acétone. On observait une hémagglutination qui, à la température du laboratoire, atteignait 1 : 640, pH 6,0. En criblage, cet antigène ne réagissait qu'avec un immunsérum de groupe A au titre 1 : 80 et avec l'immunsérum Middelburg à 1 : 20. En fixation du complément seul le sérum anti-Middelburg se montrait positif jusqu'à 1 : 32.

L'identification sérologique de ce virus est résumée dans le tableau II.

TABLEAU II

Identification de la souche PM 3913.

Antigène

| Sérum | PM 3913 | | | Middelburg | | |
|---------------------|---------|-------|-----|------------|-------|-----|
| | IH | FC | N | IH | FC | N |
| PM 3913 | 2,560 | 512/8 | — | 2,560 | 256/8 | — |
| Middelburg. | 40 | 128/8 | 4,4 | 80 | 128/8 | 4,0 |

IH = inhibition de l'hémagglutination. Les titres sont exprimés par l'inverse de la dernière dilution du sérum inhibant complètement l'hémagglutination.
 FC = fixation du complément. Inverse du titre du sérum sur inverse du titre de l'antigène.
 N = neutralisation. Les nombres représentant le logarithme de l'indice de neutralisation.

Ces résultats démontrent clairement que la souche PM 3913 est très voisine sinon identique au virus Middelburg.

Pour essayer de préciser l'incidence du virus Middelburg au Sénégal, 575 sérums de moutons prélevés en 1966-1967-1968 ont été examinés en inhibition de l'hémagglutination. Dans 59 cas (10 0/0) on a trouvé une réponse positive, la moyenne géométrique des titres observés étant de 1 : 63.

COMMENTAIRE

Il a été démontré (6) que le mouton présentait les caractères d'un excellent réservoir de virus : après inoculation expérimentale, on observe une virémie de titre suffisamment élevé pour infecter le moustique. En dehors d'une augmentation rapide de la température qui peut atteindre 41° C, le mouton ne présente aucun signe clinique, guérit rapidement et développe des anticorps neutralisants de haut titre.

Il semble qu'au Sénégal, les moutons participent à un cycle d'entretien du virus Middelburg dont *Aedes (A.) cumminsi* serait un (sinon le) vecteur.

D'autres études virologiques et sérologiques sont nécessaires qui doivent permettre de préciser la diffusion de ce virus dans les populations humaine et animale.

RÉSUMÉ

Le virus Middelburg a été isolé d'un lot d'*Aedes (A.) cumminsi* capturés en octobre 1967 dans la forêt de Bandia (Sénégal). Les moutons semblent intervenir dans le cycle d'entretien ou de diffusion du virus car on trouve chez eux 10 0/0 de réactions sérologiques positives.

SUMMARY

Isolation of a strain Middelburg virus in Senegal.

The Middelburg virus is an African virus, which was first discovered in South African Union, but which is spread in whole Africa. In Senegal, sheep seem to play a part in the maintenance and diffusion of the virus, and the mosquito *Aedes (A.) cumminsi* seems to be the vector. The Middelburg virus seems to be relatively rare in man; it is mainly found in cattle.

Institut Pasteur de Dakar (Directeur :
Docteur L. CHAMBON) et Office de
la Recherche Scientifique et Technique
d'Outre-Mer.

BIBLIOGRAPHIE

1. BROTTES (H.), RICKENBACH (A.), BRÈS (P.), SALAUN (J. J.) et FERRARA (L.). — Les arbovirus au Cameroun : isolements à partir des moustiques. *Bull. O. M. S.*, 1966, 35, 811-825.
2. CASEY (H. L.). — Adaptation of LBCF method to micro technique; in *Standardized diagnostic complement fixation method and adaptation to micro test*. Washington, DC; US Government Printing Office. Public Health Monograph, 1965, n° 74, 31-34.
3. CLARKE (D. H.) et CASALS (J.). — Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. and Hyg.*, 1958, 7, 561-573.
4. DICKINSON (D. B.), MCGILLIVRAY (G. M.), MCINTOSH (B. M.) et WINTER (P. A. D.). — Antibodies against certain arboviruses in sera from human beings and domestic animals from the South-Western and North-Western regions of the Cape Province of South Africa. *South-African J. Med. Sci.*, 1965, 30, 11-18.
5. KOKERNOT (R. H.), CASACA (V. M.), WEINBREN (M. P.) et MCINTOSH (B. M.). — Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of Angola. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1965, 59, 563-570.

6. KOKERNOT (R. H.), DE MEILLON (B.), PATTERSON (H. E.), HEYMANN (C. S.) et SMITHBURN (K. C.). — Middelburg virus, a hitherto unknown agent isolated from *Aedes* mosquitoes during an epizootic in sheep in the eastern Cape Province. *South African J. Med. Sci.*, 1957, 22, 145-153.
7. KOKERNOT (R. H.), SMITHBURN (K. C.), GANDARA (A. F.), McINTOSH (B. M.) et HEYMANN (C. S.). — Provas de neutralizaçao com seros de individuos residentes en Moçambique contra determinados virus isolados en Africa transmitidos por arthropod es. *Anais. Inst. Med. Trop. Lisbon*, 1960, 17, 201-230.
8. KOKERNOT (R. H.), SMITHBURN (K. C.) et KLUGE (E.). — Neutralizing antibodies against arthropod borne viruses in the sera of domestic quadrupedes ranging in Tongaland, Union of South-Africa. *Ann. Trop. Méd. et Parasit.*, 1961, 55, 73-85.
9. KOKERNOT (R. H.), SZLAMP (E. L.), LEVITT (J.) et McINTOSH (B. M.). — Survey for antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of indigenous residents of the Caprivi Strip and Bechuanaland protectorate. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 1965, 59, 553-561.
10. McINTOSH (B. M.). — *Arbovirus Research Unit*, Johannesburg, South Africa, 1963. Unpublished results.
11. McINTOSH (B. M.), DICKINSON (D. B.), SERAFINI (E. T.) et DE SOUSA (J.). — Antibodies against certain arboriviruses in sera of human beings and domestic animals from the South African Highveld. *South African J. Med. Sci.*, 1962, 27, 87-94.
12. McINTOSH (B. M.), SERAFINI (E. T.), DICKINSON (D. B.) et WEINBREN (M. P.). — Antibodies against certain arboviruses in sera of human beings resident in the coastal areas of Southern Natal and Eastern Cape Province of South-Africa. *South African J. Med. Sci.*, 1962, 27, 77-86.
13. SMITHBURN (K. C.), KOKERNOT (R. H.), HEYMANN (C. S.), WEINBREN (M. P.) et ZENTKOWSKY (D.). — Neutralizing antibodies for certain viruses in the sera of human beings residing in Northern Natal. *South African Med. J.*, 1961, 33, 555-561.
14. WORTH (C. B.), PATTERSON (H. E.) et DE MEILLON (B.). — The incidence of arthropod borne viruses in a population of culicine mosquitoes in Tongaland, Union of South Africa (January 1956 through April 1960). *Amer. J. Trop. Med. and Hyg.*, 1961, 10, 583-592.