

IFE : UN NOUVEL ORBIVIRUS AFRICAIN ISOLÉ  
CHEZ DES CHAUVES-SOURIS *EIDOLON HELVUM*  
CAPTURÉES AU NIGERIA, AU CAMEROUN  
ET EN RÉPUBLIQUE CENTRAFRICAINE

Par G. E. KEMP (\*), G. LE GONIDEC (\*\*), N. KARABATSOS (\*\*\*),  
A. RICKENBACH (\*\*\*\*) & C. B. CROPP (\*\*\*) (\*\*\*\*\*)

RÉSUMÉ

Huit souches de virus ont été isolées de chauve-souris capturées au Nigeria et au Cameroun en 1971, en République centrafricaine en 1974. Des études ultérieures ont montré que les souches des trois pays étaient semblables et étaient des souches d'un nouveau virus du genre Orbivirus, famille des Reoviridae. Ce nouveau virus est caractérisé par sa sensibilité aux solvants des lipides et au pH, par sa taille et sa morphologie au microscope électronique, par sa pathogénicité à l'égard de la souris inoculée expérimentalement par différentes voies, par l'histopathologie de la souris infectée par le virus, par ses relations antigéniques ou l'absence de relations antigéniques avec d'autres orbivirus connus.

Mots-clés: NOUVEL ORBIVIRUS, CHAUVES-SOURIS, AFRIQUE, DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE.

SUMMARY

IFE : a new african *Orbivirus* from *Eidolon helvum* frugivorous bats collected in Nigeria, Cameroon and the Central African Republic.

Eight viral isolates were recovered from *Eidolon helvum* bats collected in Nigeria and Cameroun in 1971 and from the Central African Republic in 1974. Subsequent studies showed that the agents from the three countries were similar and were strains of a new virus of the *Orbivirus* genus, family *Reoviridae*. This new virus was characterized with respect

(\*) Ancien membre de la Fondation Rockefeller affecté au laboratoire de recherche sur les virus (VRL), université d'Ibadan, ancien membre de la division des maladies dues aux arbovirus, Centre des maladies infectieuses, Center for disease control, Public Health Service, US Department of Health and Human Services, PO Box 2087, Fort-Collins, Colorado 80522, U. S. A.

(\*\*) Ancien chef de laboratoire, division des arbovirus, Institut Pasteur Yaoundé, Cameroun. Actuellement Instituts Pasteur d'outre-mer, 25 et 28, rue du Docteur-Roux, 75724 Paris Cedex 15, France.

(\*\*\*) Division des maladies dues aux arbovirus, Center for disease control, CDC, Public Health Services, US Department of Health and Human Services, PO Box 2087, Fort-Collins, Colorado 80522, U. S. A.

(\*\*\*\*) Ancien chef de la division entomologique, ORSTOM et Institut Pasteur Yaoundé, Cameroun. Actuellement Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer (ORSTOM), 70-74, route d'Aulnay, 93140 Bondy, France.

(\*\*\*\*\*) Séance du 9 décembre 1987.

ORSTOM Fonds Documentaire

M N° : 25550 2x1

b 99 III Cote : B

to its sensitivity to lipid solvents and to pH, its relative size and morphology by electron microscopy, its effect on mice experimentally infected by various routes, the histopathology found in infected mice, and its antigenic relationship or lack of a relationship to other known orbiviruses.

*Key-words* : NEW ORBIVIRUS, BATS, AFRICA, GEOGRAPHIC DISTRIBUTION.

## INTRODUCTION

Des chauves-souris du genre *Eidolon helvum* ont été capturées au Nigeria et au Cameroun en 1971, en République centrafricaine en 1974, pour tentative d'isolement de virus. Des souches de virus ont été isolées dans chacun de ces sites de surveillance. Les tests de base pour la caractérisation du virus, les tests de criblage par fixation du complément (FC) ont été pratiqués dans chacun des laboratoires africains ; plus tard, la « Division of Vector borne Viral Diseases (DVBVD) », Centers for disease control (CDC), Fort-Collins, Colorado U. S. A., a élargi le criblage par fixation du complément vis-à-vis d'autres antigènes, a pratiqué les tests de sensibilité au pH, a examiné le virus au microscope électronique, a comparé les différentes souches isolées au Nigeria, en République centrafricaine.

Une collaboration entre le Virus Research Laboratory (VRL) de l'université d'Ibadan, au Nigeria, les Instituts Pasteur de Bangui, en République centrafricaine, de Yaoundé au Cameroun et de Dakar au Sénégal et le DVBVD a montré que les souches virales en provenance des trois pays étaient semblables et étaient des souches d'un nouveau virus du genre *Orbivirus*, de la famille des *Reoviridae*. Nous avons nommé ce nouveau virus IFE du nom de la ville d'Ile IFE, au Nigeria, où le premier isolat de ce virus a été obtenu.

Ce rapport traite de la capture des chauves-souris, de l'isolement, de l'identification et de la caractérisation de ce nouveau virus.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les techniques de laboratoire, les méthodes employées pour la capture et le traitement des animaux obtenus au Nigeria ont été publiées précédemment (KEMP *et al.*, 1974 ; KEMP, 1975).

La souche de virus prototype a été isolée en 1971 de 68 chauves-souris *E. helvum* capturées au fusil, de jour, dans leur lieu de repos, sur le campus de l'université de Ile IFE (IFE) au Nigeria, les 3 et 7 avril 1971 ; 175 chauves-souris ont aussi été capturées à Abuja dans la zone de savane guinéenne en mai 1971. Les chauves-souris ont été classées en adultes et en jeunes, leur sang a été prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie à l'éther. Les sérums, les cerveaux, les tissus des glandes salivaires prélevés chez ces animaux ont été conservés en azote liquide jusqu'au retour au VRL où ils ont été transférés dans un congélateur à très basse température ( $-70^{\circ}$ ). Les suspensions de tissu et les aliquotes de sérums non dilués ont été inoculés par la voie intra-cérébrale (IC) à des souri-

ceaux blancs âgés de 3 à 4 jours qui ont été examinés chaque jour pour rechercher des signes de maladie (KEMP *et al.*, 1974).

Les tests de sensibilité au chloroforme ont été pratiqués selon la méthode modifiée de FELDMAN et WANG (1961) et les tests de sensibilité au pH ont été pratiqués selon la méthode de HSIUNG (1982).

Les tests de fixation du complément CF ont été pratiqués au VRL par la méthode de WEINBREN (1958) et au DVCVD, Fort-Collins, par la méthode de LBCF (US, Public Health Service, 1965).

Des ascites hyperimmunes ont été préparées selon un procédé décrit précédemment (BRANDT *et al.*, 1967) et les antigènes de cerveaux de souris utilisés dans les tests CF ont été extraits par la méthode au sucrose acétone (CLARKE et CAZALS, 1958). Les antigènes et/ou les réactifs immuns pour Lebombo (Saar 136), Mitchell River (NRM 10434), Warrego (CH 9935), Japanaut (M 6357), reovirus, type 3 (MVM 66-33) et les souches nigériennes en provenance des isolats provenant des chauves-souris *Eidolon* dont la liste figure au tableau I, auxquels s'ajoute l'isolat unique fait chez la chauve-souris *Eidolon* (YV 177) en provenance du Cameroun ont été pris dans la collection du Yale Arbovirus Research Unit. La souche du Nigeria IB An 57245 a été sélectionnée comme souche prototype parce qu'elle tuait la souris de façon régulière et produisait régulièrement un titre plus élevé que les autres souches lorsqu'elle était inoculée par voie intra-cérébrale au souriceau nouveau-né. Les ascites de souris hyperimmunes pour le groupage des arbovirus ont été fournis par le Research Resources Branch, National Institute for allergy and infectious diseases (NIAID), National Institute of Health (NIH), Bethesda, Maryland.

Pour les études en microscopie électronique, la souche Ib An 57245 (SM 10) a subi trois passages sur cellules BHK-21 pour les préparations en sections minces (MONATH *et al.*, 1979). Des techniques additionnelles ont été décrites auparavant (ROSENEAU, 1965). Les coupes ont été examinées au microscope Phillips EM 200 fonctionnant sous 60 kV. Les virions ont été mesurés en utilisant une grille réseau et la mesure directe photométrique.

Pour l'histologie, les souriceaux moribonds infectés par la souche Ib An 57245 ont été euthanasiés par le CO<sub>2</sub> et leurs tissus fixés en solution formol-saline à 5 %. Les tissus ont été inclus dans la paraffine, coupés à 5 µ et colorés à l'hématoxyline éosine (LUNA, 1968).

## RÉSULTATS

Les renseignements concernant huit souches d'IFE trouvées dans trois pays différents figurent au tableau I. Dans quatre cas, le virus a été résolu à partir du matériel d'origine lors d'inoculations ultérieures. La chauve-souris n° 5 de Abuja a été à l'origine de trois isollements du même virus à partir de trois tissus différents : le sérum, le cerveau et une glande salivaire.

Après inoculation intra-cérébrale du matériel d'origine, les souriceaux nouveau-nés de deux à quatre jours qui tombaient malades, montraient les symptômes de maladie entre le 7<sup>e</sup> et le 12<sup>e</sup> jour. Au second passage, les souris tombaient malades entre le 5<sup>e</sup> et le 7<sup>e</sup> jour et avaient un temps moyen de survie (ASI) de 9 jours. Les souris de quatre jours inoculées avec un virus de troisième

TABLEAU I  
Souches de virus IFE isolées de chauves-souris *Eidolon helvum*  
capturées en Afrique.

Pays	Localité	Nb. de captures	Chauves-souris n°	Virus isolés	Tissu ayant lieu à un isolement de virus	Date de capture	Date d'inoculation
Nigéria	Ile Ife	68	15	IbAn57204(1)	Sérum sanguin	05.04.71	10.04.71
			57	IbAn57245(1)	Sérum sanguin	07.04.71	09.04.71
	Abuja	157	5 (2)	IbAn57778(1)	Sérum sanguin	06.05.71	22.05.71
			5 (2)	IbAn57884	Cerveau	06.05.71	24.05.71
			35 -	IbAn57892	Glande salivaire	06.05.71	24.05.71
			5 (2)	IbAn57923	Glande salivaire	06.05.71	27.05.71
Cameroun	Saa (près de Yaoundé)	5	1	YV177 (1)	Pools de cerveau foie, rate	26.05.71	03.06.71
République centrafricaine	Nagblaka	6	1	AnCB537d	Pools de cerveau foie, rate	04.04.74	02.07.75

(1) Tentative de réisolement avec succès.  
(2) La même chauve-souris.

passage mouraient après inoculation par voie intra-péritonéale (IP). Toutes les souris de 10 jours (6/6) inoculées par voie intra-cérébrale sont mortes avec un temps moyen de survie de 10,2 jours tandis qu'aucune d'entre elles (0/6) n'est morte après inoculation intra-péritonéale.

#### *Tests chimiques.*

Le virus Ib An 57245 a montré une faible sensibilité au traitement par le chloroforme. Le titre a subi une chute de  $10^{0,4}$ - $10^{0,8}$  SMICLD 50 par rapport au contrôle. Le virus traversait parfaitement les membranes filtrantes de 220 nm avec une baisse approximative de son titre de dix fois. La sensibilité au pH de la souche Ib An 57245 a été testée au pH 3,0 et pH 7,8. Après trois heures de traitement à pH 3,0, aucun virus ne pouvait être détecté, tandis qu'un virus maintenu à pH 7,8 titrait  $10^{6,6}$  SMICLD 50/0,02 ml.

#### *Relations antigéniques.*

L'antigène sucrose acétone préparé à partir de cerveaux de la souche Ib An 57245 n'hémagglutine pas lorsqu'on le traite avec des érythrocytes d'oie à pH 5,8-7,0 à la température de laboratoire. En fixation du complément, toutes les souches étaient titrables et se présentaient comme apparemment identiques. Par la méthode en échiquier, cet antigène réagissait avec l'ascite homologue de souris hyperimmune avec un titre de 256/64 (titre maximum d'anticorps/titre maximum d'antigène). Deux et huit unités fixant le complément d'antigène ne réagissent pas lorsqu'elles sont testées vis-à-vis de dilutions aux 1/4 des immuns sérums de groupe suivants fournis par le NIH : groupe Kémérovo, polyvalent Palyam (Palyam, Vellore, Kasba, Corriparta, Acado, Eubenangee, Pata, d'Aguilar) et polyvalent n° 8 (bluetongue, epizootic hemorrhagic disease of deer, Changinola, Irituca, Colorado tick fever et Ib An 22619). L'antigène et l'anticorps pour la souche Ib An 57245 ne réagit pas avec les réactifs sérologiques correspondant pour les virus Eyach (256/128), Ib An 39626 (256/128), Mitchell River (32/32), Warrego (256/32), Japanaut (8/2) et Lebombo (32/32). De plus, l'antigène pour le virus Ib An 57245 ne réagissait pas avec l'ascite immune pour le réovirus, type 3 (64). Le virus n'était pas neutralisé par un antisérum de lapin contre le virus Umatilla, ayant un index logarithmique de neutralisation homologue (LNI) de 3,0. Cependant, l'antigène et l'anticorps pour la souche Ib An 57245 ont des réactions croisées avec les antigènes et anticorps de la souche YV 177 (64/32). Les réactifs pour les deux virus ont également été testés vis-à-vis des immuns sérums (32/64 à 256/32) pour cinq virus Orungo, y compris la souche prototype Orungo (UGMP 359), ainsi que vis-à-vis des antigènes pour le virus prototype. Les antigènes pour les deux souches YV 177 et Ib An 57245 ont des réactions variables à titre faible avec seulement les sérums immuns de titre élevé pour le virus Orungo. Comme ces réactions de faible titre n'étaient pas constamment reproductibles dans notre laboratoire et n'ont pas été observées au YARU (Yale Arbovirus Research Unit), ces réactions ont été considérées comme négatives. L'antigène Orungo n'a pas de réactions croisées avec les réactifs immuns pour les souches YV 177 et Ib An 57245. La souche YV 177 a été comparée avec la souche An CB 526 d (Nagblaka) à l'Institut Pasteur de Dakar. Les deux souches ont été trouvées semblables.

*Microscopie électronique.*

Les virions ayant la morphologie type du taxon orbivirus ont été vus isolés ou en grappe dans le cytoplasme des cellules infectées (fig. 1). Il n'a pas été vu de virion dans le noyau. Des structures filamenteuses formant amas ont été vues communément en association étroite avec des grappes de virions (fig. 2). Les virions matures ont un noyau dense au microscope électronique et une capsidie moins dense. Les mesures effectuées montrent que la capsidie et le noyau ont des dimensions de même ordre de grandeur que celles des autres orbivirus connus. Les particules virales mesurées dans deux champs séparés présentaient des diamètres variant de 66 nm à 78 nm pour un champ et de 66 nm à 74 nm pour l'autre champ. En une seule occasion, des virions ont été vus entourés par une membrane (pseudo enveloppe) et se présentaient comme des bourgeons de la membrane cytoplasmique près du noyau cellulaire.

*Histopathologie.*

Les cerveaux de deux souris montraient une tuméfaction prononcée des cellules endothéliales, une légère infiltration périvasculaire à cellules mononuclées, une métaplasie spongiforme focale, avec une prolifération gliale et une infiltration légère de leucocytes polymorphes. La dégénérescence neuronale était minime, une satellitose a été observée occasionnellement. Ces modifications intéressaient

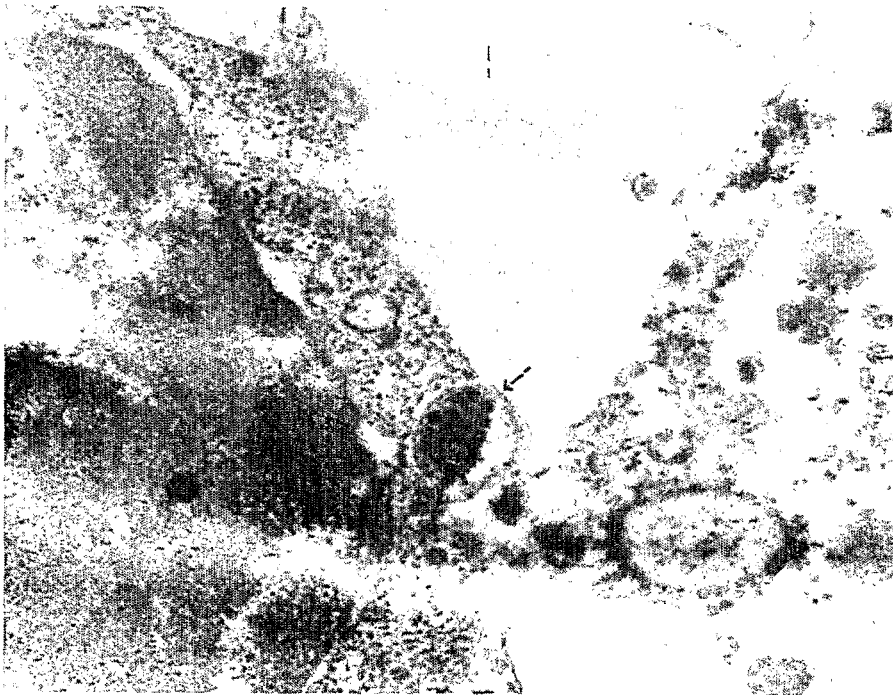


Fig. 1. — Les virions matures ont un noyau dense et une capsidie bien définie.  
Fleche Cellules BHK-21, 94, 150X.

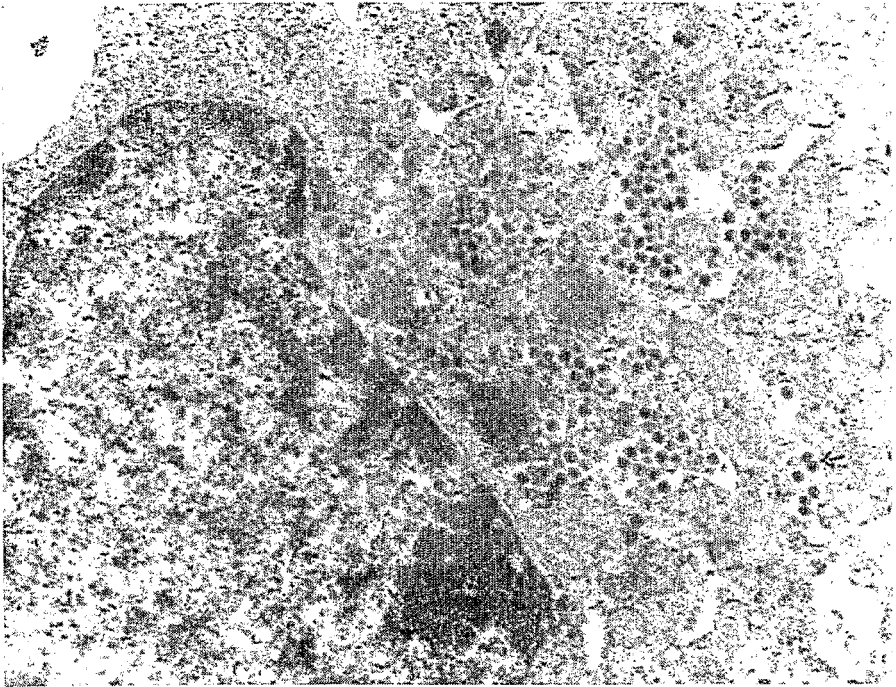


Fig. 2. — Des virions observés en association étroite avec les membranes intracytoplasmiques.  
Cellules BHK-21. 45. 500X.

plus communément les portions basales du cerveau. La moelle épinière ne présentait rien de remarquable et aucune lésion microscopique n'a été observée dans les autres organes examinés.

#### DISCUSSION

Le fait que le virus IFE (souche Ib An 57245) soit identique sérologiquement à la souche YV 177 isolée de chauves-souris *Eidolon helvum* au Cameroun et à la souche An CB 536 d de République centrafricaine, laisse à penser que cet agent est extrêmement répandu en Afrique et peut être limité seulement par la vaste distribution géographique de *Eidolon helvum*. Aucune information n'existe sur la possible existence d'un arthropode vecteur de ce nouvel orbivirus, ni sur un effet pathogène ou léthal chez la chauve-souris. A notre connaissance, seulement un seul autre orbivirus a été décrit chez les chauves-souris. Le virus Japanaut a, en effet, été isolé de chauves-souris *Syconycteris crassa* capturées en Australie. Les virus Japanaut et IFE ne présentent pas de réactions croisées en fixation du complément.

Le virus IFE a présenté une sensibilité marginale au chloroforme solvant des lipides et son pouvoir pathogène a été nettement supprimé par une exposition du virus à pH 3,0.

De plus, l'examen au microscope électronique de virus IFE par des techniques

de coupes ultra-fines a montré la présence de particules virales avec une taille et une morphologie typiques d'orbivirus. La somme de toutes ces observations permet de placer le virus IFE dans le taxon *Orbivirus* de la famille des *Reoviridae*.

L'antigène IFE et/ou les immuns sérums ne réagissent pas avec les sérums monospécifiques ou sérums de groupe pour les orbivirus les plus connus. Seuls quelques orbivirus n'étaient pas disponibles pour être comparés aux antigènes et anticorps du virus IFE. Ainsi, il a été démontré que le virus IFE n'était pas membre des sérogroupes Kemerovo, Bluetongue, Changuinola, Corriparta, EHD, Eubenangee, Palyam, Umatilla, Warrego et CTF et n'avait pas de parenté avec les virus Orungo, Japanaut et Lebonbo. Le virus IFE devrait être considéré comme étant un orbivirus non groupé. Il a été enregistré dans le catalogue international des arbovirus comme un arbovirus non groupé (KEMP et KARABATSOS, 1985).

La chauve-souris frugivore *E. helvum* de couleur paille est une espèce commune et fort répandue en Afrique, au sud du Sahara. On l'a trouvée du Sénégal au Cameroun pour ce qui concerne l'Afrique de l'ouest et de la Somalie jusqu'au 30<sup>e</sup> degré de latitude sud en République sud-africaine. Apparemment, elle ne craint pas l'homme ni le trafic urbain, on a remarqué qu'elle a des gîtes diurnes au centre de nombreuses villes du Nigeria. Ces chauves-souris sont considérées comme un mets de choix au Nigeria et sont capturées en grande quantité pour la consommation humaine.

Comme ces chauves-souris vivent dans les villages et les villes et peuvent contaminer les fruits qu'elles mangent et partagent avec les humains et comme, d'autre part, elles sont mangées par les hommes, une surveillance sérologique des populations humaines et animales devrait être conduite pour évaluer le réservoir de virus de cet orbivirus.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été effectué conjointement avec le Virus Research Laboratory (VRL), université d'Ibadan, dans les Instituts Pasteur de Bangui, République centrafricaine, de Yaoundé au Cameroun, de Dakar au Sénégal et avec la « Division of Vector borne Viral Diseases », Centers for disease control, Fort-Collins, Colorado. Le VRL recevait l'aide de la Fondation Rockefeller pendant l'étude des chauves-souris au Nigeria.

Nos remerciements vont à M. Stanley AKPAN pour son aide pour la capture des chauves-souris, au Docteur Dorothy MOORE et à M. TED O'CONNOR qui ont pratiqué les criblages préliminaires en fixation du complément sur les souches d'Ibadan, au Docteur Francis CHANDLER pour l'histopathologie des souris infectées pratiquée au CDC d'Atlanta, Géorgie, au Docteur Robert SHOPE, Yale University, qui nous a procuré les souches virales du Nigeria et la souche YV 177 de l'Institut Pasteur de Dakar, Sénégal. Nos remerciements vont également au Docteur Max GERMAIN qui a porté à notre connaissance l'isolement plus récent du virus IFE en République centrafricaine.



## RÉFÉRENCES

1. BRANDT (W. E.), BUESCHER (E. L.) & HETRICK (F. M.). — Production and characterization of arbovirus in mouse ascitic fluid. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1967, 16, 339-347.
2. CLARKE (D. H.) & CASALS (J.). — Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 561-573.
3. FELDMAN (H. A.) & WANG (S. S.). — Sensitivity of various viruses to chloroform. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 1961, 106, 736-738.
4. HSUING (G. D.). In collaboration with FONG (C. K. Y.). — Diagnostic Virology Illustrated by Light and Electron Microscopy. Third Edition, Yale University Press, 1982, p. 82.
5. KEMP (G. E.), CAUSEY (O. R.), SETZER (H. W.) & MOORE (D. L.). — Isolation of viruses from wild mammals in West Africa. *J. Wildl. Dis.*, 1974, 10, 279-293.
6. KEMP (G. E.). — Viruses other than arenaviruses from West African wild mammals. *Bull. WHO*, 1975, 52, 615-620.
7. KEMP (G. E.) & KARABATSOS (N.). — *In: International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates*, Third Edition (Karabatsos (N.), ed.), p. 469-470, American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Antonio, Texas, 1985.
8. LUNA (L. E.) (ed.). — Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology, Third Edition, p. 258, McGraw-Hill, New York, 1968.
9. MONATH (T. P.), CROPP (C. B.), FRAZIER (C. L.), MURPHY (F. A.) & WHITFIELD (S. G.). — Viruses isolated from reptiles: Identification of three new members of the family Rhabdoviridae. *Arch. Virol.*, 1979, 60, 1-12.
10. ROSEVEAR (D. R.). — The bats of West Africa. Trustees of the British Museum (Natural History), XVII, 418 p. London, 1965.
11. U. S. PUBLIC HEALTH SERVICE. — Standardized diagnostic complement-fixation method and adaptation to microtest. PHS Pub. 1228 (Public Health Monograph No. 74), U. S. Govt. Printing Office, Washington, DC, 1965.
12. WEINBREN (M. P.). — An improved method for the complement-fixation test using small quantities of reagents. Annual Report (1957, 1958), East African Virus Research Institute, Entebbe Uganda, p. 38-39, 1958.