

INCO-DC / RTD / UE

Research project funded by the European Union

CE/STD-3 / N / TS 3CT94-0286 / DG 12 HSMU)

République Centrafricaine (RCA)

Deutschland

FRANCE

**EPIDEMIOLOGY OF FILOVIRUS INFECTIONS IN THE RÉPUBLIQUE
CENTRAFRICAINE: A RISK STUDY ASSOCIATED WITH SUBSISTENCE ACTIVITIES**

Final Report

Jean Paul Gonzalez, coordinator

Fonds Documentaire ORSTOM

Cote: *A*15987* Ex: *X*

unique

PLAN

Plan	2
Summary	3
1. Introduction	4
1.1. Background	4
1.2. The Filovirus survey in central Africa	4
Figure 1. Ebola virus activity in Africa	6
Figure 2. Ebola virus seroprevalence (IFAT) in RCA	7
1.3. The Filovirus program in RCA	8
Figure 3. Phytogeography and Ebola seroprevalence in RCA ..	9
2. Detailed working program	12
2.1. Presentation of the project	12
2.1.1. Objectives	12
2.1.2. Chronology	13
2.1.3. Strategy and Technical goals	13
3. Populations, material and methods	13
3.1. Populations and study sites	13
3.1.1. Study area	14
Figure 4. Study Area	15
3.1.2. Study population	16
Figure 5. Pygmy populations of Central Africa	18
3.2. The Laboratories and technics	19
4. Results	21
4.1. Retrospective study	21
4.1. Results of the first and second phase	22
4.2. Results of the Third phase project	25
4.3. The question of HIV and Ebola	26
4.4. Prospective for further research	27
4.5. Discussion	28
5. Final analysis	29
5.1. Study on control sites	29
5.2. Clinical surveillance and virus isolation	31
5.3. A new project	32
6. Achievement on the Transfer of technology	32
7. Collaborations	33
8. Expenditures	34
9. References	34
9.1. Publications	34
9.2. Scientific Meeting	34
9.3. Media	34
Conclusions	34
Interview and record forms/	37
Communication and media	41

SUMMARY

With the natural history of the Filovirus family seemingly unknown, filovirus ecology and natural history are still a rudimentary field of research. When the present project started, months before the dramatic and well publicized Kikwit outbreak, filovirus were not of any actuality and our group was one of the few to maintain a filovirus specific field research activity.

In order to investigate the maintenance cycle of filovirus in central Africa, a study was conducted within the rain forest of the République Centrafricaine (RCA). An epidemiological study was directed to determine the frequency and distribution of filovirus seroprevalence in a selected human population. Using an ELISA test, serum samples from pygmy and non-pygmy populations were tested for Ebola-Zaire and Marburg virus reacting antibodies. Positive sera for filovirus were found in all study groups.

Within the Lobaye district, Pygmies appeared to have a higher seroprevalence against Ebola-Zaire (12.8%) and Marburg (4.6%) virus antigens than non-pygmies (respectively 4.3% and 0.0% seropositivity). Pygmy females as an higher Ebola seroprevalence than males. In contrast, Marburg antibody reacting sera were detected more frequently in male (7.6%) than female (1.9%) pygmies. Moreover preliminary retrospective studies done of the wet and dry savannah showed a significantly ($p < 0.04$) higher seroprevalence against Marburg virus ($> 11\%$) than the one observed in the forested area ($< 4\%$).

During our study, a temporal increase of Ebola seroprevalence was observed within the Lobaye area.

No risk factor was clearly identify regarding the use of natural resources of the forest wich include hunting, gathering and fishing. However, some other indicators were notified: Workers of a logging company appeared to have a consistent seroprevalence against the Ebola antigen (39.4%); despite the limited sample tested a variable exposure to the virus seems to correlate with their specific occupations. Filovirus appears to actively circulate in the rain forest of RCA. Human populations from the forest and surrounding area are exposed to infection that increase with specific risk factors mostly of human origin (i.e.: proximity and use of the forest resources).

In the absence of clinical manifestations, we hypothesize that non-pathogenic filovirus strains may circulate in central Africa among humans. Unfortunately the virus reservoir remain a mystery, however the facilities developed by the present project allowed us to establish a permanent observatory for study and an early detection of the emergence of filovirus within the rain forest of the Congo basin.

1. INTRODUCTION

1.1. Background

In 1976, Max Germain, an entomologist from Orstom who worked at the Institut Pasteur de Bangui, IPB, participate actively, as a member of the international scientific team, in investigating the Ebola Outbreak in Yambuku, Zaire. When he left the République Centrafricaine, RCA, in 1978 after witnessing numerous arboviruses isolated at the IPB and that sudden and unexplained burst of a new Ebola virus, he thought that it will be worthy to develop a research programme on viral haemorrhagic fever, VHF, in central Africa. As a collaborative effort between the Orstom laboratory of medical entomology in Bangui and the IPB, such programme began in november 1978.

In 1979, with the help of Karl M. Johnson, chief of the Special Pathogens Branch, SPB, at the Center for Diseases Control, CDC, and soon after him Joseph B. McCormick, we started the first large serological VHF enquiries of RCA.

In the early 1980s, with an active participation of Organisation de Coordination pour la lutte contre les grandes Endémies en Afrique Centrale, OCEAC (The network on public epidemiology for the french speaking countries of central Africa), a serological surveillance was carried out in central Africa (including Cameroon, Chad, Congo, Gabon and Equatorial Guinea) to determine the frequency and distribution of seroprevalence against several VHF: Lassa fever, Crimean-Congo haemorrhagic fever, Rift valley fever, haemorrhagic fever with renal syndrome, Ebola fever and Marburg disease.¹ All the viruses investigated were found to circulate in the region. The Arenavirus, the Hantavirus and the Filovirus were first demonstrated to be present in central.

Based on the results of this surveillance project, a long term survey, focusing on Ebola and Marburg filovirus infection, was conducted. This survey had a major emphasis on RCA populations but also included serologic surveys in Cameroon, Chad, Congo, Gabon, Equatorial Guinea and, RCA. Randomized populations as well as targeted populations were studied. From 1984 to 1988, the US Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, USAMRIID, had funded a 4 years research programme based at the IPB, on Filovirus and other VHF. Cross-sectional and prospective epidemiological surveillance studies were conducted in central Africa. Domestic and wild animals were also sampled to identify potential virus hosts, reservoirs and vectors.

After a 5 years of low activity, it was only in 1994 that the filovirus research programme was resumed in RCA, with the present EU project, anticipating the 1995 Kikwit episode of an Ebola outbreak killing hundreds of peoples.

By that time the maintenance cycle of filovirus was totally unknown.

1.2. The Filovirus survey in central Africa

¹Gonzalez JP, Josse R, Johnson ED, Merlin M, Georges AJ, Abandja J, Danyod M, Delaporte E, Dupont A, Ghogomu A, Kouka-Bemba D, Madelon MC, Sima A, Meunier DMY. Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative central african populations. Res Virol (Ann. Inst. Pasteur) 1989;140:319-331.

The sites of Ebola infection across Africa appear clearly limited to the Congolese rain forest belt (Figure 1). Highest rates of seropositivity are found under the 1,500 isohyet which correspond to the limit of forested savannah south and north to the grassland. The discovery of a new strain in Côte d'Ivoire, distinct from the one of Zaire and Sudan, was consistent on the ecological aspect with the Ivorian forested massif which is part of the Congolese rain forest. This massif became isolated during the last glaciation 16,000 years before present.

In the central African region, serological scars were found among all randomly investigated populations against Ebola fever and Marburg disease (Figure 2).

Because of the proximity of the first Ebola outbreaks in Africa, and the availability of laboratory facilities, the RCA was indicated to be a first choice for filovirus field research.

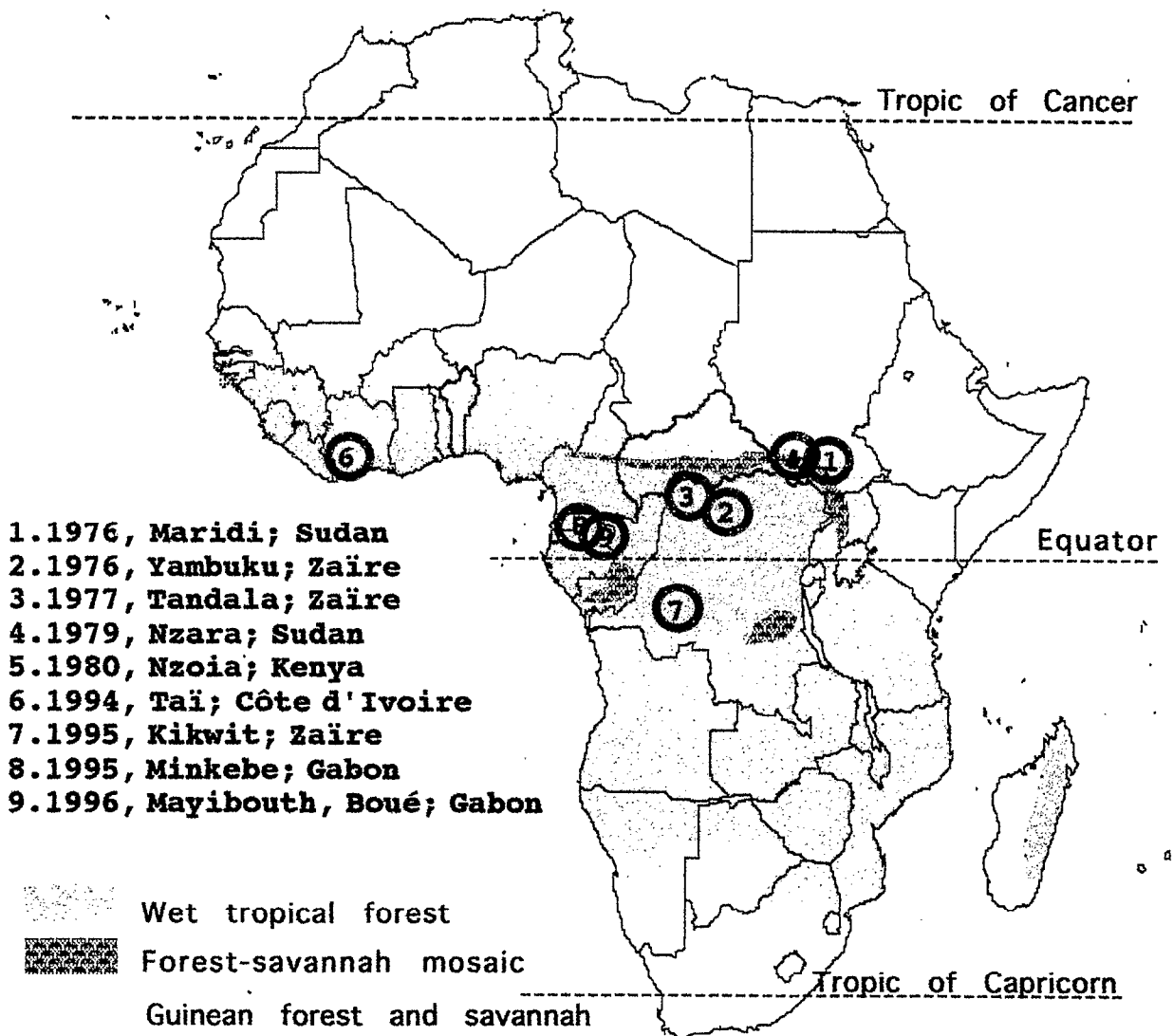


Figure 1. Ebola virus activity in Africa:
 Distribution of the Known Ebola virus infections
 by date and place

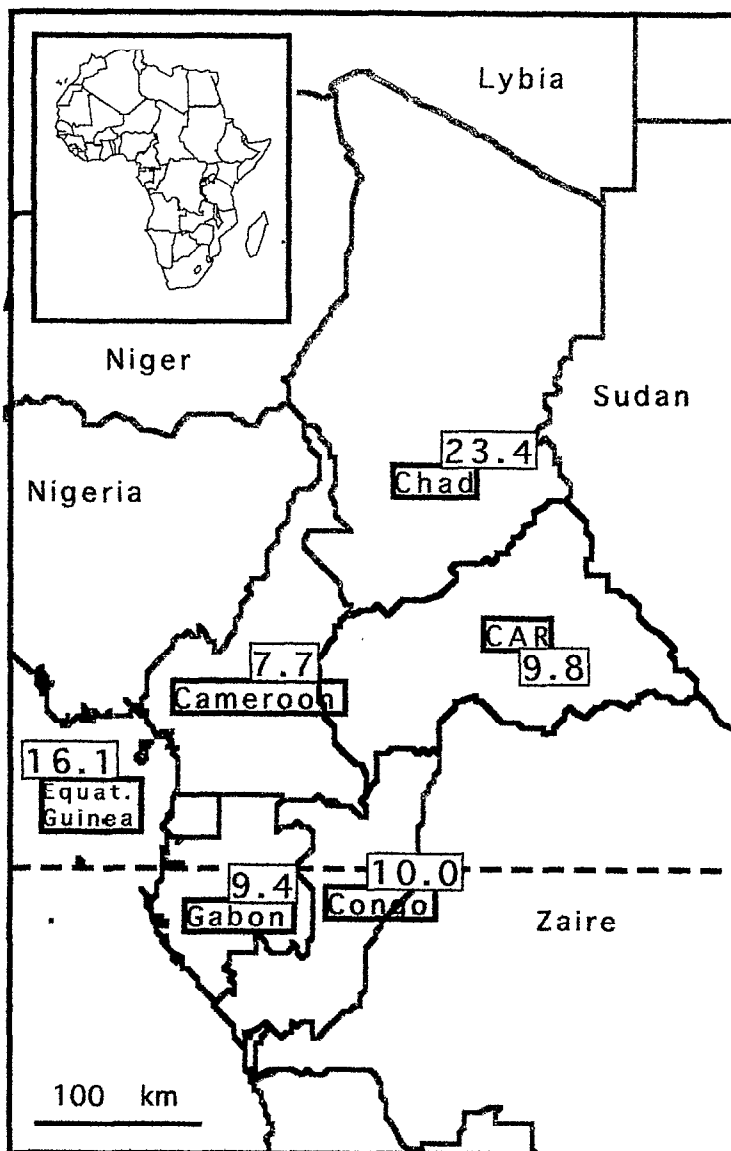


Figure 2. Ebola virus seroprevalence (IFAT) in Central Africa (OCEAC countries) before 1994

1.3. The Filovirus programme in RCA: Pytogeography and seroprevalence

The present project used as a preliminary analysis, all data and information collected during the long term survey done in RCA. It helps focusing on a population and, an area of potential active circulation for filovirus.

Number of filovirus sero-surveys were conducted in Central Africa under the guidance of the IPB since 1979². Several areas were found seropositive for Ebola and we find a high seroprevalence against Ebola in both Dry grassland domain (dry savannah of the Sudanian region) and forested area (Guinean-Congolese rain forest) (figure 3).

Up until 1992 the Indirect Immunofluorescent Antibody (IFA) test was used. More recently as for the present study, ELISA, Western Blot (WB) and polymerase chain reaction (PCR) were used.

IFA results were published with a conservative cut off of a reciprocal titer ≥ 64 for a sera to be positive against Ebola and / or Marburg virus antigens. While the Ebola antibody reacting sera were found with an extensive distribution and somewhat high prevalence among human population of Central Africa, in the absence of epidemic, the question of the specificity of the test raised but no one was able to specifically solve the question and more conservative cu-off were used (≥ 128). Nevertheless, despite the limitation of the test, several observations help to design the present study:

Sex differences (Table 1). In several instances, females presented significant higher Ebola seroprevalence than men. Traditionnally man do the hunting or transaction with bushmeat (if one of the source of infection is there), while women are responsible for prepatating the meat (i.e.: skinning).

Ecological zone	Total Tested F/M	% Positive		
		F	M	Total
Dry grassland	1071/1099	12.0	7.7	9.1
Wooded savannah	99/156	3.0	3.2	3.1
Moist wooded savannah	226/295	7.5	4.4	5.8
Pre-forest Savannah	195/210	3.5	0.5	1.2
Moist Forest	381/418	10.8	7.6	9.1
Total	1972/2178	9.9	6.2	8.0

F=Female; M=Male

Table 1. Sex distribution of Ebola virus seropositives (IFA ≥ 128) by ecological zone of RCA [³]

²Saluzzo JF, Gonzalez JP, Georges AJ, Johnson KM. Note préliminaire sur la présence d'anticorps vis-à-vis du virus Ebola parmi les populations du Sud-Est de la République Centrafricaine. Bull Soc Pathol Exot 1980;73:238-41.

³Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Hemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. Trans Roy Soc Trop Med & Hyg 1993;87:530-5.

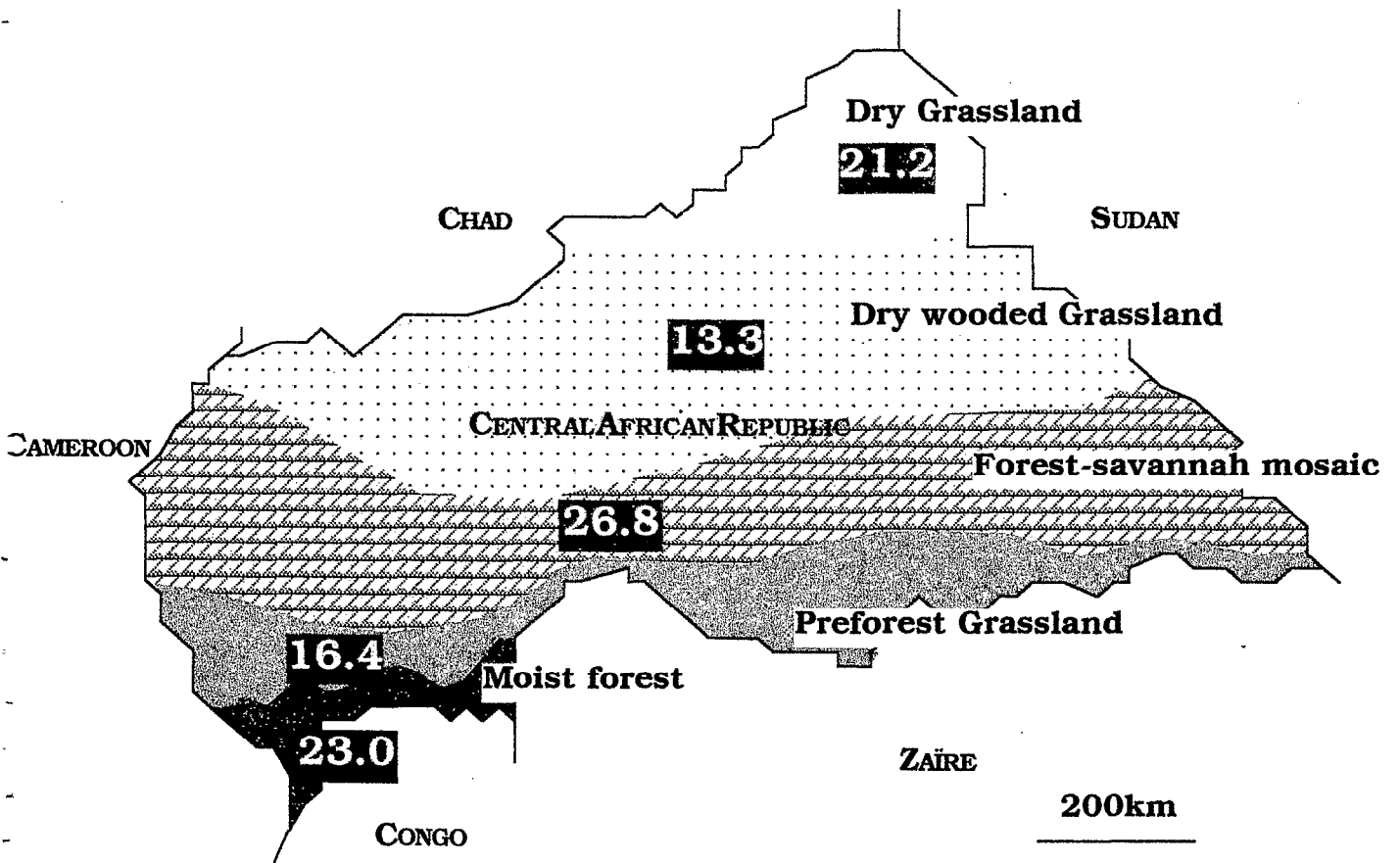


Figure 3: Phytogeographical domains and, Ebola seroprevalence of Republique Centrafricaine

Seroconversions (Table 2). Among 200 subjects under survey in RCA we observe 14 seroconversions (IFA). All sera tested preferentially positive against the Ebola "Sudan" strain than against the Ebola "Zaire" strain. The northern Vakaga District, where Gordil is situated, in the dry grassland domain, (identical as the one for Nzara and Maridi, Sudan) probably belongs to the enzootic-endemic zone of Ebola Sudan or Ebola Sudan like virus⁴. Double reacting sera can be due to either a one way cross-reaction or, a multiple infection of individuals traveling south-north across Oundjia, a village known on the traditional way of exchanges between forest (Bangassou) and dry grassland (Vakaga).

Location	Case Sex, age	Ebola antigen*	
		Eboz	Ebos
Gordil	M, 8	-	128
	F, 8	-	128
	M, 10	-	256
	F, 13	-	128
Ouandjia	F, 10	256	1024
	F, 32	2048	2048
	M, 9	128	128
	M, 10	128	128
	M, 14	512	128
	F, 38	512	128
	M, 70	512	128
	M, 6	256	-
	F, 40	128	-
	F, 45	128	-

*Eboz= Ebola virus "Zaire" strain
Ebos= Ebola virus "Sudan" strain

Table 2. EBOLA SEROCONVERSION (IFA) IN HUMAN POPULATIONS FROM C.A.R., 1983-1986 (UNPUBLISHED DATA, JPG & ED JOHNSON)

Animal surveillance (Table 3). A peridomestic rodent, the multimammate *Mastomys* sp. appeared to have a significant seroprevalence against Ebola virus. Dogs often feed on peridomestic rodents like multimammates and were found seropositive.

The RCA as Ebola virus zone of emergence. Ebola epidemics occurred in Sudan and Zaire in 1976⁵, both countries share the same history of human migration and contemporary life style with their neighboring country, the République Centrafricaine (RCA). Nzara, a village and cotton factory where the first Sudanese Ebola outbreak occurred, lies 150 km from the RCA border, in the savannah-forest mosaic zone that covers one third of RCA⁶.

⁴Heymann DL, Weisfeld JS, Webb PA, Johnson KM, Cairns T, Berquist H. Ebola hemorrhagic fever: Tandala, Zaire, 1977-1978. *J Infect Dis* 1980;142:372-6.

⁵Pattyn SR, ed., Ebola virus haemorrhagic fever. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press 1978.

⁶Boulvert Y. Notice explicative: Carte phytogéographique de la République Centrafricaine. Orstom Edit., Paris, 1987.

ORIGIN	ANIMAL GROUP	Total Tested	IFA % POSITIVE	
			EBOLA	MARBURG
Forest	<i>Praomys sp.</i>	195	0.0	0.5
	<i>Mastomys sp.</i>	91	7.7	0.0
	<i>Mus sp.</i>	54	1.8	1.8
	Dog	133	17.3	3.0
	Pig	80	16.3	nt
	Goat	21	0.0	0.0
	Cattle	98	0.0	0.0
Savannah	<i>Praomys sp.</i>	2	0.0	0.0
	<i>Mastomys sp.</i>	265	4.5	0.0
	<i>Arvicanthis sp.</i>	98	9.2	0.0
	<i>Taterillus sp.</i>	4	0.0	0.0
	Shrew	5	0.0	0.0
	Dogs	29	34.5	0.0
	Goats	75	0.0	0.0
	Cattle	20	10.0	0.0
	Sheep	17	0.0	0.0
	Donkey	13	23.1	0.0
	Chicken	131	10.0	0.0

Table 3. Filovirus antibody reacting sera (IFA) of animals from the RCA (Unpublished data, JPG & ED Johnson, 1985)

Less than 150 km South of the Oubangui river, which is the natural border between Northern Zaïre and RCA, are the villages of Yambuku (at the longitude of Mobaye, a RCA village) and Tandala (100km south of Bangui, the RCA capital), where the first Zairian Ebola infections were recorded and Ebola virus discovered. Both villages are part of the large phytogeographical zone of the Congolese rain forest that extensively covers the southern part of RCA. Cultural, environmental similarities and, the proximity of previous Ebola virus manifestations, favored the choice of RCA as a study site for filovirus ecology. Moreover, similar ecological zones are present in both RCA and Uganda, from where imported monkeys (African green monkey) were found to be the source of the first Marburg virus outbreak in Europe⁷.

⁷Martini GA, Siegert R (eds) Marburg virus disease. Springer, Berlin 1971

2. DETAILED WORKING PROGRAMME

In order to investigate the potential of an active circulation of filovirus in RCA, study sites and study populations were identified in the Lobaye district, where previous high seroprevalence for filovirus was detected⁸⁹¹⁰.

Within the rain forest, a three phase strategy was: 1) to determine

2.1. PRESENTATION OF THE PROJECT

2.1.1. Objectives

General objectives

- To define antibody prevalence in a targeted Study population and, the human population at risk of filovirus infection.
- To identify risk factors of environmental origin.
- To identify the potential risks associated with subsistence activities as hunting, consuming feral monkeys and, gathering products from the forest (risk factors of human behaviour origin).
- To study animal groups as potential host, reservoir and/or vectors of filovirus including non-human primates, rodents, bats and their ectoparasites.
- Attempt to isolate virus strain(s) potentially circulating among the humans and the fauna of the study area (PCR, Antigen capture).
- To establish the potential for a permanent observatory of filovirus activity including a selected field study area, trained personals, specific laboratory technics.

Specific Objectives

- In order to identify risk factors: A differences between villagers and hunter-gatherer clearly will indicate a significant association of filovirus infection with lifestyle and geographical origin.
- Because the complexity of the ecosystem and the total lack of knowledge regarding a potential virus reservoir: The study population and area need to be precisely characterized.

⁸Gonzalez JP, McCormick JB, Saluzzo JF, Georges AJ. Les fièvres hémorragiques africaines d'Origine virale en République Centrafricaine. Cah ORSTOM, Ser Ent Méd et Parasit 1983;21: 119-30.

⁹Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Hemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. Trans Roy Soc Trop Med & Hyg 1993;87:530-5.

¹⁰Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. Trans Roy Soc Trop Med & Hyg 1993;87:532-5.

2.1.2. CHRONOLOGY

Anticipated calendar

Validation of the Interview form	Mai 1994
Report on the preparatory field trip	Septembre 1994
Preliminary report on the first field trip results	Juin 1995
Preliminary reports on the second field trip results	Juin 1996
Final report	Octobre 1996

Because a political instability of the RCA, some action of the project were delayed and the preparatory field trip was immediately followed by a first field study. Finally the project was set up in 3 phases of development:

From July 1994 to October 1995

- . To develop tests and strategy in order to obtain the best of the field study specimens;
- . Evaluate potential in the different partner laboratories and design the field study for the RCA.

From November 1995 to October 1996

- . To set up a first field study and use samples and methodology to implement the Filovirus ecology and epidemiology in RCA
- . Train peoples of RCA and provide the laboratory with reagents and tools to study the specimen in RCA.
- . To apply techniques and strategy on field study and treatment of specimen of various origin.

From November 1996 to July 1997

- . To achieve the transfer of technology and quality control of laboratory tests.
- . To finalise the data analysis
- . To prepare and submit results for publication and reports.

2.1.3. STRATEGY AND TECHNICAL GOALS

The project has been carried out in order to target on three major fields of interest.

1/ To identify a study area that can be used as a long term study site and, to identify the most adapted tests that can be used in the RCA.

2/ To carry on field studies in order to evaluate the adequacy of the tests, methods and the choice of the study sites.

3/ To transfer the technology from the reference laboratory partner to the one of the RCA and, train scientists from that country in the specific field of research on Filovirus ecology and epidemiology.

3. POPULATIONS, MATERIAL AND METHODS

3.1. Populations and study sites

In order to investigate the maintenance cycle of filovirus a study sites were chosen within the domain of the rain forest of the RCA. (Figure 4, Table 4)

Site	Coordonate
Nzondo-Mokpoto	3°40'46 N / 18°14'47 E
Papiyo	3°41'48 N / 18°17'41 E
Mokinda	3°40'49 N / 18°21'21 E
Sakoungbou I	3°40'52 N / 18°23'41 E
Sakoungbou II	3°40'48 N / 18°23'21 E
Village West of Sakoungbou I/dirt road	3°40'39 N / 18°22'44 E
Yassaka (crossroad)	3°41'21 N / 18°26'18 E
Industrie Forestière de Batalimo, IFB	3°40'32 N / 18°27'13 E

Table 4. Study Area and Study Sites of the Project:
Geographical situation

3.1.1. Study area

The Lobaye district is covered by a mixture of preforest grassland and Congolese rain forest.

About 30 min. south of Bangui (RCA capital town) begin the rain forest, partly degraded mostly along the main and unique road. Then after 5 hours of about 250km of dirt road we are on the edge of the congolese rain forest. Pygmies camps are seasonal, permanent, along the road or under the cover of the forest

The study pygmy camps and non-pygmy villages were located in a remote forested area West of the Oubangui river and South of its major tributaries, the Lobaye river. Three groups of pygmy Aka camps (Sangoumbe, Sakoungbou and Mogboto) and a village group (Gouga village) were investigated. Pygmy camps are seasonal (3 to 6 months) but each camp site can be occupied at some interval of time throughout the year. Each primary camp is composed of 3 to 5 secondary camp units, each consisting of 3 to 5 primary families from the same lineage, living in huts made of leaves and lianas. Sangoumbe huts are located in a forest clearing, 3 km North of Gouga. Sakoungbou camps are placed along a logging trail, near the Lobaye river. Mogboto, is situated 10 km West from Sakoungbou in a forest clearing. Less than a kilometer further, the Gouga villages, are typical villages of the Central African forest: 34 primary families (384 individuals) lived in mud huts covered with weaved palm tree leaves. Dwellings are located on both side of a narrow dirt road on the shaded rain forest. The villages are located about two kilometers from the Oubangui river and the Congo border.

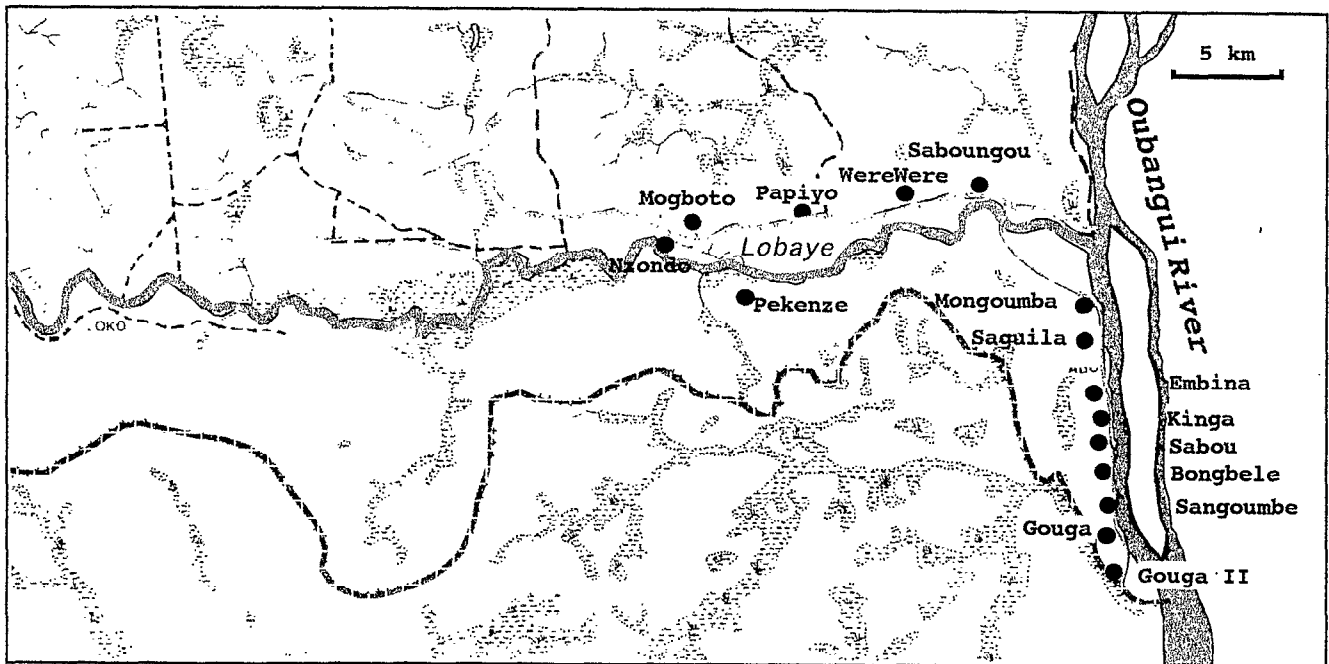
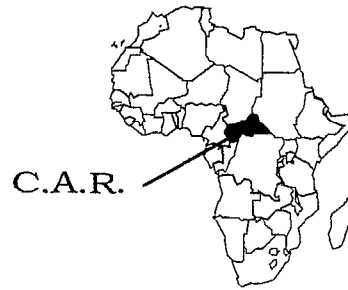


Figure 4. Study Area: The Lobaye river

3.1.2. Study population (Figure 5, Table 4)

Villagers from Gouga belong in majority to Mbatî tribe (Bantu locutors) and, the remaining mostly to the Mbanza, Ngbundu and Monzombo tribes (Banda locutors) and other minorities. They practice subsistence farming (manioc, banana, coffee, yam), hunting (monkeys, duikers, antelope) and limited trapping (rodents, hedgehog) and fishing activity.

Village/site	Main Population Ethnic group	Nb of inhabitants	structure*
Gouga	Mbatî Mbanza, Ngbundu, Bofi, Monzombo	383	
Sangoumbe "The tree that give genuine charcoal"	Pygmy	10	
Bongbele	Pygmy	15	
Sabou "The well under the tree"	Pygmy	10	
Kinga "the hill"	Pygmy	4	2F1M1c
Embima	Pygmy	4	1F1M2c
Saguila Under the Fromager (funded in 1995)	Pygmy Aka	124	23F34M30g37f
Sakoungou "Under the koungou" (funded in 1982)	Pygmy Aka	60	13F19M28c
Welewele "Slowly, slowly = lullwater"	Pygmy Aka	92	28F23M41c
Bata 1, 2 3, = Papiyo	Pygmy Aka	~100	10 families
Mogboto "Water that tastes acid"	Pygmy Aka	53	15F16M31c
Trinidad	Pygmy Aka	35	17F14M36c
Pekenze	Pygmy Aka	62	16M14F13f19g
IFB	Villagers	300	
Nzondo centre	Villagers	~150	
Nzondo croisement	Villagers	~50	
Nzondo fleuve	Villagers	~20	(one lineage)

* M=Male; F=Female, c=Child, g=boy, f=girl

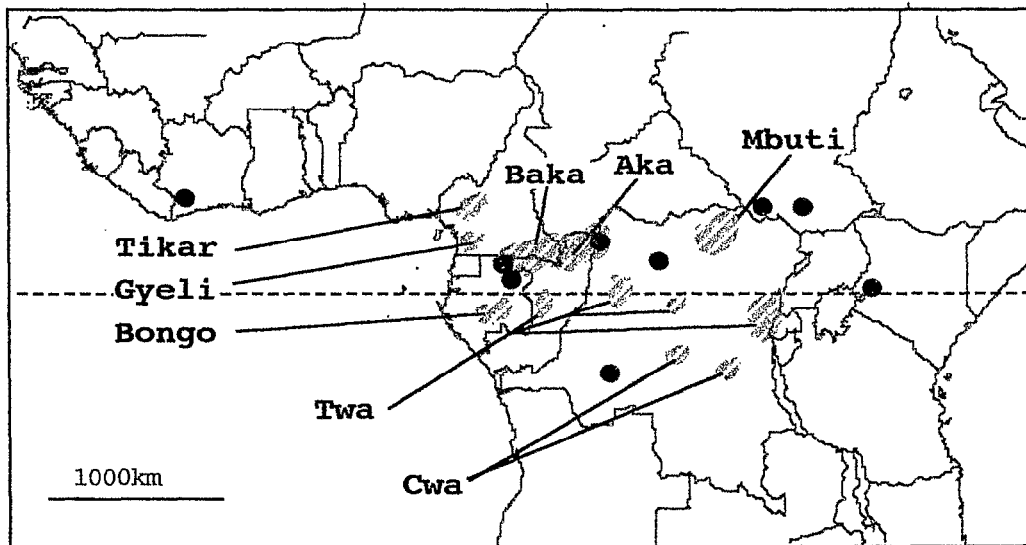
Table 4. Study Sites of the Project:
Distribution of the human populations

Villagers from Nzondo are mostly Monzombo and practice hunting and fishing activities.

Villagers from the IFB are from various origin and are involved as permanent workers at the logging company occupying all position on the field and at the factory including "tree proectors", "cutters", truckers, and, administrative workers.

Pygmies who participated in the study belong to the BaAka group (or Aka). This ethnic group extends across the border of RCA into the northern part of the Congo and partially into southeastern Cameroon¹¹. Despite increased contact with the villagers living in the forest, most of the pygmies from that area have preserved a characteristic semi nomadic lifestyle based on hunting and gathering rain forest natural resources.

¹¹Bahuchet S. Food supply uncertainty among the Aka Pygmies (Lobaye, Central African Republic). In: Coping with uncertainty in food supply, de Garine i and Harrison A (editors) Oxford: Clarendon Press, pp.118-149.



- Sites of Ebola virus emergence
- Rain forest
- ▨ Pygmy

Figure 5. Distribution of the known Pygmies groups of Central Africa (adapted from S. Bahuchet).

3.2. The Laboratories and technics

The Laboratories

The principal laboratories involved were the one from our partners: The Institute für virologie, Marburg and the Laboratoire des Arbovirus et Fièvres hémorragiques, Institut Pasteur de Bangui. Both laboratory performed tests. At first the Institute für virologie prepared the antigens and developpe the ELISA test, shortly after a transfer to the IPB the tests were performed in both laboratory as a quality control system. By the end of the project, the IPB was able to perform all tests including PCR, ELISA, Antigen Capture, Western Blot, IFA.

Other laboratories did collaborate punctually: Le Laboratoire de reference des Fievrres Hemorragiques, Institut Pasteur de Paris (Dr. B. Le Guenno), the Yale Arbovirus Research Unit (where the coordinator of the project was assigned for a while). These two laboratories furnished some specific reagents and participate as a quality control laboratories.

Blood collection

Sera were collected of Lobaye populations in November, 1995 at the beginning of the dry season that lasts for about four months, and in May 1997 at the beginning of the rainy season. Other samples were collected mostly during the dry season. A 10cm³ blood specimen was obtained from each volunteer as previously described¹²¹³. Blood was centrifugated on site and sera kept at -80°C in a liquid nitrogen tank. The interview form was completed which documented individual demographic data (name, estimated age, sex, parents, residence, ethnic group), occupation, and means of subsistence. (ref. to page 38-39)

Records (Fiches 1,2,3/ Village, human, animal. See page 37-40)

The interview form has been extensively used, improved and, was a source of more than 15 parameter for each sample taken, documenting individual's demographic datas (names, estimated age, sex, parents, residence, ethnic group, etc...) and, occupation and means of subsistence. Informations on each village and each animal sampled were recorded in separate sheets.

Filovirus antigen preparation

Antigens were prepared at the Institute für Virologie, Marburg. Virus strains and the techniques were those in use at the Institute für Virologie and described in detail elsewhere¹⁴¹⁵

¹²Gonzalez JP, McCormick JB, Saluzzo JF, Georges AJ. Les fièvres hémorragiques africaines d'Origine virale en République Centrafricaine. Cah ORSTOM, Ser Ent Méd et Parasit 1983;21: 119-30

¹³Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Hemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. Trans Roy Soc Trop Med & Hyg 1993;87:530-5.

¹⁴Becker SH, Feldmann H, Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys. Med Microbiol Immunol 1992;181:43-55

¹⁵Marburg virus (Musoke strain), Ebola-Zaire virus (Mayinga strain), and Ebola-Reston virus strains were grown in E6-Vero cells. Supernatant from infected cells was cleared by centrifugation and filtration. Virus was then concentrated by precipitation and sucrose/tartrate gradient centrifugation. The concentrated virus was then inactivated by B-propionolactone. The final product was sonicated and used as positive antigen after dilution in carbonate buffer for coating microplates. Supernatant from non-infected cells were treated as well as positive antigen.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

A direct ELISA test for immunoglobulin (Ig) G detection previously designed and adapted for filovirus antibody detection was used¹⁶. Tests were performed at Institute für Virologie and at the IPB with some technical adjustment of a previously described technique.¹⁷

Western Blot

The classical technique using a nitro-cellulose paper protein transfert was used and is described in the report of the IPB.

RT-PCR¹⁸

The polymerase chain reaction was used including a preliminary phase of reverse transcription (filovirus are negative stranded viruses) to obtain a cDNA. Primer were designed by the Insiotute fur virologie (nested PCR).

Data analysis

Biostatistic analysis were done at the IPB and at the Laboratory of Epidemiology and Public Health (Yale University; JPG, coordinator) using several software for statistical analysis (Epistat, Epiinfo..).

¹⁶Slenczka W, Rietschel M, Hoffmann C, Sixl W. Seropidemiologische unteersuchungen über das vorkommen von antikörpern gegen Marburg und Ebola virus in Afrika. Mitt Oesterr Ges Tropenmed Parasitol 1984;6:53-60

¹⁷Polystyrene microplates were used (Immulon II, Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia, USA) and directly coated at 4°C overnight with a suspension of inactivated antigen. Sera were tested at a dilution of 1:100, and 4-fold through 1:1,600 in 5% skim milk in PBS-Tween 20 0.1% . IgG binding was revealed by an anti-human sera conjugated to horseradish peroxidase. Optical densities (OD) were recorded for each sample and the net OD value, or differential optical density (DOD) value, was calculated by subtracting the OD of the sample tested in duplicate antigen free well. A cutoff value was defined by using a mean OD units + 2 SD from known positif control sera. Any DOD greater than 0.300 was regarded as positive. A serum was considered positive when the sum of its three dilution DOD was greater than 1,000 and the titer >= 400 with a DOD >= 0.300.

¹⁸Nested PCR. RNA Phenol extraction from infectd Vero E6 cells. Reverse transcription. [5'-TGGGTAATT/CATCCTT/CTTCCA-3'; 5'-ACGACACCTTCAGCG/A-AAAGT-3'] 479 n. Nested time: [5'-GTTTGTTCGT/GGACAAACTGTC-3'; 5'-TGGAAG/AGCA/TAAGTCT/-AC-CGG-3', 308 n.

4. RESULTS

4.1. Retrospective study (Table 6)

In order to assess the validity of the previous data published from the RCA and that help us to design the present project, we decide, as a preliminary study, to retest some of the sera collected and tested a decade ago in CAR from the same study area than the one we use for the present project.

Site and date collection	Total tested	Positive/%	
		1987*	1996
Sangha 1984	296	11/3.7	6/2.0
Lobaye 1987	185	20/10.8	24/12.9
Total	481	31/6.4	30/6.2

* date of test / $p > 0.01$

Table 6. Comparative serology done on sera tested a decade apart against Ebola Zaire antigen by IF (1984-1987) and by Elisa confirmed by IFA (1996). Human sera from C.A.R. tested against Ebola-Zaire antigen by IFA in 1987 and then by Elisa and confirmed by IFA in 1996.

Respectively 185 and 296 sera collected in 1984 and 1987 from the human population of the CAR rain forest were retested at the Institut fur Virology at Marburg, in 1995, using an Elisa Test (Ebola antigen) and two other test of confirmation, Western Blot and/ or IFAT. Incomplete records did not permit to match each sera old and new titer but in term of epidemiological sero-survey, the seroprevalence against Ebola was identical.

No significant differences in prevalence are find between the two series of tests done after a decade using more sophisticated tests. All the sera were tested by Elisa against the Ebola-Reston antigen were negative.¹⁹

Total tested	106
Total positive	7
Percentage positif	6.6
Sex ratio	5M/2F

Table 6.1. Ebola-Reston reactive antibody (IFA>64) in children sera (13-17 y.o.) from Thailand (C.V.D. / Dengue project)

¹⁹We are in the precess to analyse sera positive a decade ago and tested negative today can show the decrease of the antibody and the ones they were negative and are positive can be the consequence of the cut off of > 128 or to the antigenicity of the strains used in the more recent test. Those discripancies are under study.

Another test (Table 6.1) using the Ebola-Reston antigen was performed with sera from Asian population in order to appreciate the reactivity of the antigen-antibody reaction for such antigen: out of 106 sera obtained from suspected cases of haemorrhagic fever from Thailand²⁰ and tested against the Ebola-Reston antigen 7 reacted at a reciprocal titer >125. Such reacting sera will be investigated in a comparative serological analysis with the central-african samples in order to appreciate the homologous specificity of the Ebola reacting antibodies.

Fortunately we were able to identify that the only two sera that tested positive against Marburg antigen were confirmed a decade after. However several other sera originally negative were found positive against the Marburg antigen, those results are presently analysed regarding the sensitivity of the test and the type of antigen tested.

Marburg virus antigen reacting antibodies were tested on the same samples: Serological tests were done by Elisa test with Marburg-"Musoke" antigen and positive samples were confirmed by western blot. Among 481 sera tested, 98 were found positive against Marburg virus antigen: 20.3%. Several sera originally negative by IFA ten years ago were found positive against the Marburg antigen reflecting the highest sensitivity of the Elisa test.

Population of RCA must have been for a long time in contact with an Ebola or an Ebola like virus. A serum reacting against the two tests seems to sign a relative recent infection by an Ebola virus as observed in convalescent sera from Gabon (B.LeGuanno, pers.comm.). Because all the sera tested in the present study were found positive by both ELISA and IFA tests it is possible to infer that the populations from the RCA rain forest were and are in an area of an active filovirus circulation.

4.1. Results of the first and second phase

Introduction to the results

Because of the presumed association between Ebola virus and the congolese rain forest belt we turned our attention to the population which have the most contact and knowledge of the african rain forest: the Pygmies group from central Africa. Preliminary studies clearly showed that Pygmies from the Lobaye District in RCA were at risk for Ebola virus infection²¹.

More than 400 samples have been processed and, tests were performed at the IPB and at the Institute für Virologie in Marburg. In November 1995 human sera were collected, animal samples were obtained by trapping rodents and, monkey sera were obtained from specimen hunted by pygmies for subsistence.

Human samples.

Table 7 present the distribution by sex and location of Ebola virus (Ebola Zaïre) antibody reacting sera from the Lobaye District, Central African Republic, November 1995. As compare to our previous findings, population from the rain forest have an higher seroprevalence against Ebola antigen. Pygmies population have an higher seroprevalence than Bantu.

²⁰Thanks to the Center for Vaccine Development, Mahidol University (Dr. Sutee Yoksan).

²¹Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ., Trans Roy Soc Trop Med & Hyg 1993;87:532-5.

Location	Age				Sexe		Total Population Percentage Positive
	0-20		>21		Total		
	M ⁺	F	M	F	M	F	
Gouga	0/12	2/14	0/11	0/10	0/23	2/24	4.3
Sangoumbe	0/5	1/6	2/20	3/17	2/25	4/27	11.5
Sakoungbou	1/8	2/9	2/24	6/30	3/32	8/39	15.5
Mogboto	0/12	3/17	4/23	1/21	4/35	4/38	11.0
Total	1/38	8/54	8/86	9/87	9/115	18/128	11.1
Percentage Positive	3.8	14.8	9.3	10.4	7.8	14.1	

* Ebola-Zaire strain / ELISA test
= M=Male; F=Female; positive/total tested

Table 7. Sex, age and ethnic distribution of individuals with Ebola virus reacting antibodies* in the Lobaye district (République Centrafricaine, 1995)

Location	Age				Sexe		Total Population Percentage Positive
	0-20		>21		Total		
	M ⁺	F	M	F	M	F	
Gouga	0/12	0/14	0/11	0/10	0/23	0/24	0.0
Sangoumbe	0/5	0/6	2/20	1/21	2/25	1/27	5.8
Sakoungbou	1/8	0/8	2/24	0/30	3/32	0/38	4.3
Mogboto	1/12	1/17	1/23	0/21	2/35	1/38	4.1
Total	2/37	1/45	3/78	1/82	7/115	2/127	
Percentage Positive	5.4	2.2	3.9	1.2	6.1	1.6	3.7

* Marburg-Musoke strain / ELISA test
= Male, Female; positive/total tested

Table 8. Sex, age and ethnic distribution of individuals with Marburg virus reacting antibodies* in the Lobaye District (République Centrafricaine, 1995)

Marburg virus antigen reacting antibodies were tested on the same samples (Table 8): Serological tests were done by Elisa test with Marburg-musoke antigen and positive samples were confirmed by western blot. Among 481 sera tested, 98 were find positive against Marburg virus antigen: 20.3%.

Monkey samples.

The most recent analysis done on serum samples from Monkey from the same ecological zone did not show significant results regarding Ebola infection, however the sample is still small and more needs to be done (table 9).

Origin	Specie	Positive/Tested	
		1988*	1995-7
Forest	<i>Cercopithecus ascanius</i>	5/29	1/1
	<i>Cercopithecus nictitans</i>	4/30	
	<i>Cercopithecus neglectus</i>	1/6	
	<i>Cercopithecus mona</i>	1/14	
	<i>Cercocebus galeritus</i>	2/5	
Savannah	<i>Cercopithecus aethiops</i>	6/35	0/18
	<i>Erythrocebus patas</i>	4/32	1/17
	<i>Papio cynocephalus</i>	4/27	0/1

*From Mathiot et al. 1990

Table 9. EBOLA ANTIBODY REACTING SERA (1988 BY IFAT; 1995-7 BY ELISA) IN THE MONKEYS FROM THE C.A.R.

Marburg: Strong positive specimen were found among the red monkey, *Erythrocebus patas* and raised more questions on an eventual Marburg like virus existing in that part of Africa. Among 18 african green monkey (*Cercopithecus aethiops*), and 12 dancing red monkey (*Erythrocebus patas*), respectively one (5.6%) and 3 (25%) had antibodies against Marburg antigen. All monkey sera tested negative for Ebola-Zaire antigen (Table 10).

Positive	Specie	% Marburg
	Tested	
	<i>Cercopithecus aethiops</i>	1/18
	<i>Erythrocebus patas</i>	3/12

Table 10. MARBURG ANTIBODY REACTING SERA (ELISA) IN MONKEYS FROM THE R.C.A. (1995)

Rodents samples.

We focused on rodents that can have some contact with monkeys either on the ground or in the canopee depending on the species. One of them, *Thamnomys rutilans* nests in the tree and is more readily arboricol. A small sampling done (5 trapped around the pygmies camp) remains negative for both MBG and EBO antigens. All sera from 5 specimens of *Thamnomys rutilans*, a rodent with a potential contact with monkeys, 3 *Mastomys* sp. (multimammate rat) and, one *Rattus frugivorus* trapped around Sangoumbe, tested negative for both antigens. Ectoparasites and organs are under study. From this material 120 samples have been prepared to be tested by PCR and/or antigen capture (cf. IPB report)

DISCUSSION

Pygmy Aka population showed a constant higher antibody prevalence against both Ebola-Zaire and Marburg antigens (18.3% and 13.2%) than non-pygmy villagers (14.2% and 7.6%). Among the Pygmy camps, Sangoumbe, which is situated in a more remote area, presented the highest seroprevalence.

Higher Ebola seroprevalence in female than male was found in some instance and it was significantly after the age of 20 ($p < .005$) [not quite significant for the Marburg antigen ($p = .022$)]. A peak of seroprevalence was observed between 31 to 40 years of age with a 25.4% of seropositivity for Ebola-Zaire antigen.

Among 173 serum samples from sedentary pygmy population (missionary compound of Belemboke, RCA), only two tested positif against Ebola-Zaire (1.2%) and one against Marburg (0.6%). Sera taken from 280 villagers of Nola, RCA, showed a 0.7% seroprevalence against Ebola virus and, a 1.1% against Marburg virus. Among 181 sera from Kikwit, Zaire, 4 (2.2%) tested positive for Ebola-Zaire antigen and, 3 (1.7%) tested positive for Marburg antigen. Each of these sampled populations (control) presented an highly significant ($p < .0001$) lower seroprevalence against both antigens than the one from Lobaye.

No significant differences were find regarding the type of food (mostly bush meat) and the way to obtain and prepare it (Hunting, trapping, trading).

The consistent Marburg antibody reacting sera find in monkeys needs to be investigated, it is the first time that such specific and strong serological reaction was observed in wild animals.

4.2. Results of the Third phase project

Lobaye field study, Mai-June 1997: The entire mission was carried out in a very difficult situation of social and military instability. Thanks to the french army (EFAO)²² present in RCA and other peace keepers of the African forces (AMISAB)²³ we were able to carry on our field investigation and obtain a precious sampling of the human and animal populations from the study area.

Moreover we were able to extend the study to two other sites and a targeted population of the local logging company.

In the absence of dry ice in the country, the use of an helicopters of the french army allowed us to quickly return the samples kept at 4°C (wet ice) from the field to the laboratory at the Pateur Institute in Bangui.

Two missions ordered by the Institut Pasteur went to the study area, one on the ground by truck (4 techniciens and a driver) and, one by air (2 helicopters of the french army (EFAO) with the mission chief (JPG), a partner from RCA (EN) and, a detachment of french soldiers.

New study sites:

- Scierie de Batalimo (Industrie Forestière de Batalimo)
- Village de Nzondo-Mogboto
- Village de Nzondo "croisement"
- Village de Nzondo "centre"

Samples:

²²EFAO: Elements Français d'Assistance Operationnelle, Bangui

²³AMISAB: Assistance Militaire de Soutien aux Accords de Bangui

180 human sera (with for each specimen 2 cryotubes of 1.8ml)
 76 animals including 53 birds, 4 rodents, one monkey, 5 bats,
 ticks and ectoparasites from domestic animals (dog, pig, chicken),
 were captured and bled and their organs separately conditioned
 (total of 385 samples).

Site	Positive	Total. Tested	% posit.
Batalimo IFB**	39	130	32.5
Nzondo-Mogboto	14	46	
Nzondo croist	3	13	
Nzondo centre	3	9	
Total Nzondo	20	68	29.4

* Under progress for anti Marburg serology (IPB)

** Industrie Forestière de Batalimo

Table 11. Ebola virus antibody reacting sera from human
 populations of the Lobaye district (May 1997)*

DISCUSSION

A significant high Ebola prevalence was found in the two new population studied.

The Nzondo population are mostly fisherman and hunters, the village appears to be distant from more than 10 km of the main road, on the border the Lobaye river. The populations of three Nzondo compounds are mostly from the same lineage. The data collected are presently analysed in order to identify specific risk factors as compared with other study sites of Lobaye.

The Ebola seroprevalence observed among the workers of the logging industry was surprisingly high. Interview forms are presently analysed in order to identify specific occupation associated with high Ebola antibody seroprevalence.

Marburg Elisa test and animal specimens (PCR/antigen capture) are processed (September 1997, IPB).

4.3. The question of HIV and Ebola

Central Africa appears to be the crib of most of the strains of both HIVs and Ebola virus groups. Because of an apparent overlapping of filovirus and retrovirus distribution in central Africa, we took the opportunity of the present study to investigate on a potential community of infection between Retrovirus and Filobvirus families.

Can we identify common risk factors? Can the infection by one virus influence the dynamic of infection/circulation of the other (i.e.: favor the spread of the diseases; facilitates double infection, etc)?²⁴

²⁴Several studies have been done by the past: One of the question to be adressed is that possible to compare rural and urban area? Clearly the distinction needs to be made regarding what is know from the ecology of the two viruses.

Moreover the presence of a gene with an immunosuppressive motif in the Ebola genome drew attention to a potential association between the two families.²⁵

The first approach to use retrospectively a study done on a randomized population sampling²⁶ of six countries of central Africa failed to show any significant association between HIV1 and Ebola-Zaire seroprevalence.

	HIV 1*	HTLV1*	Ebola (%)	Marburg (%)
Number of Positive	6	11	4 (2.2)	3 (1.7)

N= Total Tested: 181

*from A. Gessain and P. Garain (personal communication)

Table 14. Serology Ebola/Marburg/HTLV1/HIV1 Kikwit 1990

Serum sample from the Kikwit population situated in a high viral endemic area for retroviruses, did not show any double infection (7 sera tested positive for filovirus, 6 other were positive for HIV1 and, 11 for HTLV1).

4.4. Prospective for further research: Hunter-gatherer, Tick, Mites

The risk associated with subsistence activities related to hunting and gathering products from the rain forest and the different level of relation by processing the product including bushmeat, insects, fruits needs to be investigated in depth including also a strong anthropological and ecological component.

Pygmy population from the Lobaye district in CAR and their natural environment as well as pygmy tribes from the Sangha basin river (in RCA, west of Lobaye, pygmy tribes from the neighboring Cameroon and, pygmy tribes from the Gabon epidemic areas need to be investigated regarding filovirus exposure.

A transversal study along with detailed anthropological knowledge of this population will help to early detect any filovirus activity and identify potential risk factors.

In the search of a potential virus reservoir a focus needs to be made on rodents, bats and their ectoparasites. Tick collection has started with the present programme and PCR will be used to detect any filovirus infection.

Strict herbivorous as guinea pig are investigated de novo at the IPB in order to reactivate an interesting old question on

²⁵ Sanchez A, Trappier SG, Mahy BWJ, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing. Proc Natl Acad USA 1996;93:3602-7.

²⁶ Prevalence rates of Ebola (IFA test with Ebola-Zaire antigen) and HIV 1 (Elisa test confirmed by Western Blot against HIV type 1) antibodies in randomized representative populations of different geographical areas in Central Africa (1985) - Gonzalez JP, et al. 1989. Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative central African populations. Res Virol.;140:319-331.- Merlin M, et al. 1988 Antibody prevalence against HIV1 and HIV2 in randomized representative central African populations. Res Virol.;138.

seropositive guinea pig originally from Tandala, Zaire and Bangui.²⁷

4.5. Discussion

Pygmies population appears to be more at risk than sedentary villagers. A negative trend of seropositivity can be observe from Pygmies leaving in camps in the deep rain forest to the one leaving nearby the road, when local trade with villagers reduce the contact with the forest for subsistence activities.

One of the most unexpected finding was the presence of Marburg antibodies in the populations of RCA in the same ecological zone than Ebola Marburg virus or related unknown strains seem to be present in the western part of Central Africa. Monkeys from RCA can be at risk of infection by a Marburg virus in nature and possibly would carry a filovirus with lower pathogenicity.

Ebola virus strain distribution appears limited to an ecosystem and geographically associated with the extent of the rain forest belt. We hypothesize that the *Filoviridae* family has several members present in Africa in particular pathogenic and non-pathogenic Ebola strains for human and non-human primates.

From previous Ebola virus serosurveys done in Africa, belonging to the geographical distribution of the sites of Ebola infection, and the present data, it appears that Ebola viruses circulate in Africa between the 1,500 isohyet North and South of the equator which correspond to the limits of the rain forest/forested savannah zones. The Ebola strain from the Tai forest of Côte d'Ivoire, has been found in the same ecological zone as its most closely genetically-related Ebola-Zaire strain²⁸. The limited divergence between the two strains and their association within the same forested zone may suggest their common origin, since the Ivorian forested massif was at one time part of the Congolese rain forest and became separated during the last glaciation (16,000 years ago).

One of the most unexpected findings was the presence of significant Marburg antibodies in the population of central Africa. In accordance with previous findings, this observation suggests circulation of Marburg virus or Marburg-like virus of central Africa OF the same ecological zone as the suspected Ugandese origin of the Marburg virus²⁹.

With the newly isolated Ebola-Reston virus from primates, it has become clear that other filoviruses with suspected lower human pathogenicity exist and infect monkeys in a natural environment. Previous observations and studies using different techniques

²⁷Johnson KMV, Scribner CL, McCormick JB. Ecology of ebola virus: a first clue. *J Infect Dis* 1981;143:749-51.

²⁸Le Guenno B, Formenty P, Wyers M, Gounon P, Walker F, Boesch C. Isolation and partial characterization of a new strain of Ebola virus. *Lancett* 1995; 345: 1271-4

²⁹Martini GA, Siebert R (eds) Marburg virus disease. Springer, Berlin 1971.

suggested that unknown filoviruses with variable pathogenicity may exist in different parts of the world.³⁰

Conclusively, we hypothesize that the *Filoviridae* family has several members present in Africa that are pathogenic and non-pathogenic Ebola strains for human and non-human primates. Populations of Central Africa have been in contact with an Ebola virus like antigen for a long period of time. Ebola virus strain distribution in Africa appears limited to a distinct ecosystem geographically associated within the rain forest belt. Epidemics seem to be related more to human behaviour than to the emergence of an highly pathogenic strain. Marburg virus or related unknown filovirus strains also seem to be present in the western part of Central Africa.

5. FINAL ANALYSIS

5.1. Study on control sites for Ebola and Marburg antibody prevalence (Table 12, 13)

Other sites were chosen in order to compare seroprevalence, environment and ethnic group to the one studied in the present project. All the sites belong to the tropical rain forest domain of RCA, South of the 4th parallel.

1/ The Belemboke village, situated in a deforested area of the tropical rain forest. Three series of sera were tested: 361 specimen from Pygmies taken in November 1992 and, 132 sera from Pygmies and 98 sera from villagers taken in December 1994.

2/ The site of Nola: In December 1994, 274 sera were obtained from villagers during a Trypanosomiasis study done by the Service des Grandes Endémies du Ministère de la Santé along two main axes, West to the Cameroun and South to Belemboke.

3/ The Bangassou district of the Southeastern part of the country if included in the rain forest domain is covered mostly by forest galleries along the Ubangui river. It is situated 150 km North of Yambuku.

The two first series of sera were obtained from Belemboke in 1992 and 1994. Seroprevalence were comparable with the one find in Lobaye and no difference was found ($p=0.02$) between Pygmies (12.1%) and villagers (3.06%). Sedentary pygmy populations living nearby in a missionary compound in Belemboke (RCA) and, who seem to have shifted from hunter-gatherer to subsistence farmers presented a 13.1% and 12.1 % of Ebola reacting antibody sera respectively in 1992 and 1994 seroprevalence against Marburg remained low <1%. Agriculturalist living nearby, also tested at the same time, presented 3.1% of Ebola and 2.0% Marburg reacting antibody sera. Interestingly female pygmies had a higher seroprevalence (12.8) than males (11.3). Pygmies from both area, Lobaye and Belemboke appeared to have the same stable seroprevalence over recent years with reference to that observed in Belemboke. Marburg seroprevalence was significantly higher ($p=0.0031$) for the pygmy population of Lobaye than for the one of Belemboke, a situation which remains unexplained.

³⁰Becker SH, Feldmann H, Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys. *Med Microbiol Immunol* 1992;181:43-55.

Nola, a village of the far western part of the RCA had a population of 3.7% Ebola antigen seropositivity and, of 3.3% with Marburg virus reacting antibodies.

Sera collected from inhabitants of the same Congolese forest massif showed a lower Ebola seroprevalence than that observed in Lobaye but similar Marburg seroprevalence: Of 226 sera collected from Bangassou population in the far eastern forested part of the country, 3.6 and 3.9% respectively had Ebola and Marburg antigen reacting antibodies.

Locality	Date	Total Tested Ebo/Mbg	positive (percentage)	
			Ebola	Marburg
PYGMY				
Belemboke	Nov/92	361	25 (13.2)	3 (0.8)
Belemboke	Nov/94	132/130	16 (12.1)	1 (0.7)
Lobaye*	Nov/95	221/204	25 (11.3)	9 (4.4)
VILLAGER				
Belemboke	Nov/94	98	9 (3.1)	2 (2.0)
Bangassou	Mars/95	226	8 (3.6)	9 (3.9)
Kikwit	1990	147/149	5 (3.4)	1 (0.7)
Lobaye*	Nov/95	49/47	2 (4.3)	0 (0.0)
Nola	Dec/95	274	10(3.7)	8 (3.3)
Preliminary results (August 97, IPB)				
Nzondo	Mai 1997	68	20(29.4)	nd
Batalimo IFB	Mai 1997	130	39(32.5)	nd
Bangassou	1986	769	69(9.0)	26(3.4)
Ndele	1985	118	31(26.3)	13(11.0)
Bouar	1989?	284	33(11.6)	46(16.2)
EFAO	1989	130	8(9.0)	

* Total tested against Ebola/Marburg antigens

Table 12. Control sites: Filovirus reacting antibody reacting sera (ELISA test) among selected populations of central Africa (RCA, Congo/Zaire).

Another sampling of sera obtained from a serosurvey (HTLV-1 study³¹) conducted in 1990 in Kikwit, Zaire, and 5 years before the recent outbreak, 2% had positive Ebola-Zaire antigen reacting antibodies and, 2% reacted against the Marburg antigen.

³¹Gessain & Garin

Total tested	202
Females	67
Males	73
Ebola "Zaire" Positif	2% (3F,1M; age 19 - 27)
Marburg Positif	2% (2F, 1M; age 30 - 35)
IFA ≥ 128, Elisa dod ≥ 200	
Nota: Kikwit outbreak, 1995	

Table 13. FILOVIRUS REACTING ANTIBODIES IN KIKWIT POPULATION (1990)

Bangassou, Nola and Kikwit villages are situated in a large deforested area where villagers are mostly involved in subsistence farming and trading activities.

From these observations we conclude that a strong association seems to exist between filovirus seroprevalence in human and the rain forest. Antibodies a higher in pygmies group than villagers living along the river or the roads.

Some interesting questions as been rised fromm the present study results: Why the villagers from Nzondo, mostly fisherman, have such high antibody prevalence. Workers at the logging industry seem to be at risk for Ebola infection, it is associated with their professional occupation or theyr subsitence activty in the forest? The consistent Ebola antibody prevalence find in Ndele a village from the dry northern savannah of RCA does reflect the ciruclationof a Sudanese Ebola like strain?

5.2. Clinical surveillance and virus isolation

Despite a permanent survey and awareness of the local health authorities for reporting haemorrhagic fever syndrome, few patient with a potential viral infection were observed (Hopital Communautaire; Eléments Français d'Assistance Opérationelle) and virus isolation (on Vero E6, AP 61 and C6/36 cell cultures) were unsuccessfully attempted.

	TOTAL	FJ/IgG	FJ/IgM	HTN	RVF/IgG	RVF/IgM
Lobaye 1995	244	16/6.6	0/0.0	13/5.3	123/50.4	0/0.0
Bangassou 1995	225	96/42.67	ND	21/9.3	149/66.2	0/0.0
Belemboke 1992	360	133.6	ND	7/1.9	75/20.8	0/0.0
Belemboke 1994	242	4/1.7	ND	14/5.9	75/31.4	ND
Nola 1995	278	34/12.2	0/0.0	10/3.6	78/28.1	0/0.0

YF=Yellow Fever virus; HTN=Hantavirus;
RVF=Rift valey fever virus.

Table 12. Detail on Haemorrhagic fever virus antibody reacting sera (ELISA test) among selected study sites of RCA.

5.3. A new project in continuation of the present (table 12)

Because the present project and the obtained results, a new research project will emphasizing the strategies used in the past project and an original approach in order to understand the emergence of filovirus and other related virus (by their ecosystem) in the population of the central african forest. It will be an interdisciplinary analysis of wildlife use for assessment of epidemiological risk. Build upon the present project, it will document evolving relationships between humans and wildlife in the forests of central Africa. It will also document seroprevalence of zoonotic viruses associated with hemorrhagic fevers (HF), evaluating potential for transmission of pathogenic agents responsible for emerging viral diseases from infected host virus reservoir and/or vector to humans.

6. ACHIEVEMENT ON THE TRANSFER OF TECHNOLOGY

This chapter is extensively developed in the reports of our two partners.

Briefly, Mr. Emmanuel Nakoune, a responsible of the Laboratoire de recherche sur les Arbovirus et Fièvres hémorragiques at the IPB, was trained at the highly specialized laboratory of the Institute für Virologie, Philipps University, Marburg, RFA (Werner Slenczka) where he was able to learn and develop the ELISA, WB and PCR test and transfer the technology back to the Pasteur Institute in Bangui. Because the IPB purchase a new equipment for safely handling clinical specimens of level 4 agents, virus isolation and antigen capture are presently under development.

It is important to mention that for the first time the Elisa technic was applied for a field study on FILOVIRUS seroprevalence among normal population (before that it was used

only for clinical diagnostic and to detect contact persons during outbreaks).

7 . C O L L A B O R A T I O N S

Partners

J.P. Gonzalez (coordinator)
Institut français pour la recherche scientifique en coopération,
213 rue LaFayette, Paris, 75480 Paris Cedex 10
Te.: 3314807777 / Fax: 33148030829 France
Present address: Research Center for Emerging Viral Diseases
Center for Vaccine Development / Institute of Sciences and
Technology for Development / Mahidol University at Salaya / 25/25
Phutthamonthon 4, Nakhonpathom 73170, THAILAND
Tel. dir. line: (662) 441 0189/ sec.: (662) 441 9337
Fax.: (662) 441 9336 / Email: frjpg@mahidol.ac.th

J.Morvan, Director
Institut Pasteur de Bangui
République Centrafricaine
Fax.: 236 610109 / morvan@intnet.cf

E.Nakoune
The Arbovirus and Haemorrhagic Fever Research Laboratory
Institut Pasteur de Bangui, RCA

W. Slenczka, Professor, Virologist
Intitute für Virologie, Department of Virology
Philipps University, Marburg, Germany
Fax.: 49 6421 28 54 82

Associated Partners

P. Vidal, Anthropologist
Ministère de la Coopération
13b rue de la République, Villers/M, France
Tel./Fax. 33 0298341670

Mr. Jean Marie Diemer, Entomologist
Ministère de la Santé, République Centrafricaine,
c/o Institut Pasteur de Bangui.

Special thanks

Ms Bianca Muench for her excellent work (retrospective serological study).

Ms Marie Lyse Sabrié and Orstom Actualité editors for supporting our project.

Dr. Joel Breman, Fogarty Foundation, and Dr. E.D.Johnson for their advises and constant support.

Drs Benoit Garin and Antoine Guessin from the Institut Pasteur de Paris for sharing sera and results from Kikwit.

Mr. André DeSoza, Industrie Forestière de Batalimo (IFB), Batalimo, RCA, for assisting field work.

The Elements Français d'Assistance Opérationnelle (EFAO) à Bangui (1994-1997), RCA, for their technical assistance on the field.

All personels from the IPB and IFB

8 . EXPENDITURES (See attached document)

9 . REFERENCES (See attached document)

9.1. Publications related to the Project

- Anonymous, 1996. Institut Pasteur de Bangui; CRORA (Centre collaborateur OMS de reference et de recherche pour les arbovirus et les fièvres hémorragiques), Rapport annuel 1996. Institut Pasteur de Dakar Edit.: 19-21.
- Anonymous, 1997. On the Trail of Ebola fever (Engl., Esp., Franç.) Fiche d'Actualité Scientifique, M.L.Sabrié Edit., Orstom Paris, N°26, pp.2
- Gonzalez JP, 1995, Des virus, des rongeurs et des fièvres, Orstom Actualités, 47: 21-31
- Gonzalez, J.P. et Vidal, P. 1996 - Ebola: les arcanes d'un virus mortel. ORSTOM Actualités. N°49;
- Gonzalez JP, Nakoune E, Slenczka W, Vidal P & Morvan J. 1997. Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected population of Central Africa, JID, submitted.
- Nakoune E., Bem Tothy M., Morvan J., Gonzalez JP., Slenczka W. 1997, Recherches sur les virus des fièvres hémorragiques: études des facteurs de risque, in Rapport de l'Institut Pasteur de Bangui 1996, Inst. Past. Bangui Edit., Bangui; 51:54

9.2. Scientific Meeting

- Gonzalez JP, Nakoune E, Slenczka W & Vidal P &. 1996, Filovirus virus antibody prevalence against human and animal populations of Central Africa. International Colloquium on Ebola Virus research, abst. 89, Antwerp, Belgium.
- Nakoune E, P Vidal and Gonzalez JP: Haemorrhagic fever from the rain forest in the RCA. Yale Meeting on the Sangha river Basin. September 1997.

9.3. Media (See attached documents)

The Project and its scientific findings have been cited in several newspapers and journals (American Scientist, Le Figaro, Match, La Presse Medicale, etc...).

The coordinator was interviewed by several agencies and radio broadcasting (AFP, France Culture, Radio Ryadh, CNN, etc...).

CONCLUSIONS

The project objectives: A study population was identified, characterized and showed to be at risk for filovirus infection; risk factors were assume to be associated with the proximity and use of the rain forest resources; we were not able to demonstrate that hunting and consuming feral monkeys were a specific risk factor of infection; among animal group investigated none of them yield for a virus isolation; serological data did not allowed to identify a reservoir even potential hosts were targeted; all the specific technics used for filovirus study as been developed at the Institut Pasteur de Bangui and national scientists trained to carry on field and laboratory studies; A permanent observatory as

been developed in Lobaye and already extended to the Sangha basin river for a future project.

It is more likely that other observatory will be set up on a large programme involving RCA, Congo and Cameroon rain forest of the western Congo basin.³²

Filovirus maintenance cycle: Filovirus appear to be endemo-enzootic in the RCA. They are maintained in a sylvatic (rain forest) cycle that need to be discovered. For one clade (Ebola "Zaire" type specific strains) and related taxa, virus strain distribution appears geographically related to the African rain forest belt which can be inferred as a enzootic area.

In accord with our previous observations and in light of the recent events such as the Ebola manifestations in West and Central Africa and, the isolation of the Reston-Ebola virus from monkeys (none or less pathogenic for humans), we hypothesize that the Filovirus family has several members present in Africa including Ebola pathogenic and non-pathogenic strains for human and non-human primates. Moreover, our findings on Ebola seroprevalence without any disease history versus highly pathogenic strains from Zaire or Gabon are in favor of a focalized distribution of strains to a very specific ecosystem.

Ebola outbreaks:

One can hypothesize, regarding the high pathogenicity of some strain and the rarity but increasing number of outbreaks, that the virus is maintained in a sylvatic cryptic cycle and hit human or non human primate when they come in a rare contact with the cycle. The ecologic disturbance, like logging or surexploiting wild game, increase the chance of contact with the virus.

Animals are rarely infected and humans are exposed to infection as a second sensitive host: Repetitive gabonaise Ebola outbreaks and the Tai forest human Ebola virus infection seem to demonstrate that an infected monkey is often taking place as a index case of the epidemic.

Epidemics seem to be more related to human and non-human primate behavior than to an actual virus circulation.

³²Nakoune E., Bem Tothy M., Morvan J., Gonzalez JP., Slenczka W. 1997, Recherches sur les virus des fièvres hémorragiques: études des facteurs de risque, in Rapport de l'Institut Pasteur de Bangui 1996, Inst. Past. Bangui Edit., Bangui; 51:54

Emergence of human pathogenic strain remains a rare and complex event. The mechanism of emergence appears to be an accidental transmission from the cryptic ecological niche of the reservoir to a sensitive host; such host, uncommon in the virus-reservoir ecosystem will act as intermediate or vector, and transmit the virus to non-human primate. Primate will amplify the virus and make the epidemic visible if basic medical, veterinary and or administrative supports are present.

Interview and record forms/ Fiche Village

FICHE PAR HAMEAU OU VILLAGE

	Nom du lieu	
	Operateur	
	Source/Rem	
Autres nom du lieu (specif. lang. ancien..)		
Situation Exacte	Lat	Long
Relative		
Notion d'origine		
Type (Hameau, Village, Quartier)		
Nom du chef de village		
N° Fiche prélèvement		
Recensement approx.		
Nb de cases		
Nb de familles		
Groupe ethnique dominant		
Autres Groupes		
Types de plantation		
Types d'alimentation		
Communications avec les autres groupes, villages lesquels?		
Saison de chasse		
Saison de culture		
Animaux les plus communs vus dans le village		
Carte de terroir		
Carte du village		
Autre		

Interview and record forms/ Fiche Village

FICHE PAR HAMEAU OU VILLAGE

		Nom du lieu	
		Opérateur	
		Source/Rem	
Autres nom du lieu (specif. lang. ancien..)			
Situation Exacte		Lat	Long
Relative			
Notion d'origine			
Type (Hameau, Village, Quartier)			
Nom du chef de village			
N° Fiche prélèvement			
Recensement approx.			
Nb de cases			
Nb de familles			
Groupe ethnique dominant			
Autres Groupes			
Types de plantation			
Types d'alimentation			
Communications avec les autres groupes, villages lesquels?			
Saison de chasse			
Saison de culture			
Animaux les plus communs vus dans le village			
Carte de terroir			
Carte du village			
Autre			

Fiche Humain
PROJET EBOLA EC/RCA/IPB/ORSTOM

FICHE IDENTIFICATION DU SPECIMEN HUMAIN			Opérateur:	
Lieu de collection:		Numero (Humain Bangui: HB)	HB	
Date de collection:	/ /	Autres Fiches Relatives N°:	/ /	
Type de prélèvement (Sang, Organe, autre)				
IDENTITE				
Nom:		Sexe		
Prénom:				
Age:				
Langue		Groupe ethnique		
HABITAT				
Lieu de résidence		Date début	/ /	
Ville (C) Village (V), Hameau (H) <10 habitations				
Résidence précédente:	Lieu	Date		
Type d'habitation	Toit (Tôle, Paille, Feuille)			
	Mur (ciment, bois, Terre, Feuille)			
	Sol (Ciment, Terre)			
Moustiquaire	Oui/Non		Cuisine	Oui/Non
FAMILLE ELEMENTAIRE				
Nom de la mère/Ethnie			Village d'origine	
Nom du père/Ethnie			Village d'origine	
Epoux (nom(s))		Nombre d'enfants	V/M	
FICHE MEDICALE / Notion de maladie				
Signes cliniques				
Dates / durée	/ /	/ / /	/ /	/ /
Signes séquellaires				
OCCUPATION				
	Type	lieu	fréquence	
Agriculture				
Chasse (Fusil, Arc, Filet, Jet)				
Collecte (Termite, chenille...)				
Piegeage (Vivant, Mort)				
Pêche (poissons filet, rivière...)				
Commerce				
CONTACTS AVEC LES ANIMAUX				
	Sauvages (Tués, Consommé, Captif)		Domestique (chien, Poule...)	

Espèce		
Dépeçage		
Préparation		
Cuisson		
Consommation		
Utilisations des dépouilles:		
Commerce		
DEPLACEMENTS	(le lieu le plus fréquemment visité hors du terroir)	
	Lieu	Fréquence Date approx
Hors terroir (plus d'une nuit)		

Fiche humain suite et fin.

Fiche Animal

PROJET EBOLA CE/RCA/IPB/ORSTOM

N° Arthropode, Rongeur, Cheiroptère, Singe, Autres

CE511

N° autres fiches
associées**FICHE IDENTIFICATION DU SPECIMEN ANIMAL**

Opérateur:

Type de prélèvement (Sang, Organe,
autre)

Cerveau, Peau, Coeur, Foie, Rate, Intestin, Poumon,

IDENTIFICATION

Nom vernaculaire

Nom local

Genre

Espèce

Age (Juvenile, Adulte)

Sexe

TYPE DE CAPTURE

Chasse

Piégeage

Pêche

Collecte

Animal mort

Commerce

LIEU DE CAPTURE

Zone (précis)

Macro habitat

Micro habitat

Devenir du specimen

	Sustrat/prep T° avt conditiont	T°intermediair e	T°Final stock
Organes pools			
Cerveau			
Poumon			
Coeur			
Digestif			
Foie			
Peau			
Ectoparasites			
Commerce			

N° Arthropode, Rongeur, Cheiroptère, Singe, Autres

Substrat: Sec, alcool, formaline,
glycerol....



October 9, 1996

Dr. Jean Paul Gonzalez
Yale University School of Medicine
Department of Epidemiology
60 College Street
P.O. Box 208034
New Haven, CT 06520-8034

Dear Dr. Gonzalez:

On behalf of the organizers of the International Colloquium on Ebola Virus Research held in Antwerp, Belgium, September 4-7, 1996, I would like to thank you for your excellent contributions, in particular your presentation on human and animal filovirus surveillance in Central Africa. The Colloquium was a success because of the efforts made by you and other speakers to focus on the important points that will advance the understanding and control of filoviruses.

We encourage you to submit your manuscript for the proceedings as indicated in the enclosed document which was available at the Colloquium. The revised deadline for receipt is now October 31.

The Colloquium summary, conclusions and recommendations are being written and will be shared with you when assembled.

Sincerely,

for Joel G. Breman, M.D., D.T.P.H.
for the Organizing Committee

Enclosure

cc:

Dr. Guido van der Groen, ITM
Dr. C.J. Peters, CDC

JID
Submitted Sep. 97

Concise communication

Running Title: Filovirus, Central Africa

Title: Ebola and Marburg virus antibody prevalence in
selected population of Central Africa

Authors and affiliations:

Jean-Paul Gonzalez¹, Emmanuel Nakoune², Werner
Slenczka³, Pierre Vidal⁴ and Jacques Morvan²

¹Institut français de recherche scientifique pour le
développement en coopération, Orstom, Paris, France

²Institut Pasteur de Bangui, République Centrafricaine

³Institute für Virologie, Philipps Universität,
Marburg, Germany

⁴Ministère de la Coopération, Paris, France

Footnote

Presented in part:

The International Colloquium on Ebola Virus research;
4-7 September 1996, Antwerp, Belgium; Abstract page 89

Financial support:

European Union Grant # STD-3 /N /TS3CT94-0286.

Current address:

Jean Paul Gonzalez, CVD-Institute of Sciences, Mahidol
Univ. at Salaya, 25/25 Phutthamonthon 4, Nakhonpathom
73170 THAILAND

Pierre Vidal: 13b Avenue de la République, Villers sur
mer, 14640, France.

Abstract

The natural history of the Filovirus family remains hardly known and, filovirus ecology in its natural environment is still a virgin field of research. In order to investigate the maintenance cycle of filovirus in central Africa, a study site was selected within the rain forest domain of the République Centrafricaine. An epidemiological study was conducted to determine the frequency and distribution of filovirus seroprevalence in selected human population and to identify potential risk factors associated with filovirus infection. Pygmy and non-pygmy agriculturalist populations were selected, serum samples were taken and tested for Ebola-Zaire virus and Marburg virus antibody using an ELISA test.

Filovirus antibody reacting sera were found in all population groups studied. Pygmies appeared to have an higher seroprevalence against Ebola-Zaire (12.8%) and Marburg (4.6%) virus antigens than non-pygmy population (respectively 4.3% and 0.0% seropositivity). There is a tendency for young females and particularly pygmies to have an higher Ebola seroprevalence than males. On the opposite more Marburg antibody reacting sera were detected in male (7.6%) than female (1.9%) pygmies. In the absence of clinical manifestations we hypothesize that non-pathogenic filovirus strains may circulate in central Africa among human and non primate populations.

Introduction

Since the discovery of filoviruses more than two decades ago, their natural maintenance cycle remains totally unknown. Ebola epidemics occurred in Sudan and Zaire in 1976 [1]. Both countries share the same history of human migration and contemporary life style with their neighboring country, the République Centrafricaine (RCA). Nzara, a village and cotton factory where the first Sudanese Ebola outbreak occurred, lies 150 km from the RCA border, in the savannah-forest mosaic domain that covers one third of RCA [2]. Less than 150 km South of the Oubangui river, which is the natural border between Northern Zaïre and RCA, are the villages of Yambuku and Tandala, where the first Zairian Ebola infections took place. Both villages are part of the large phytogeographical domain of the congolese rain forest massif that extensively covers the southern part of RCA. Cultural and environmental similarities, along with the proximity of previous Ebola virus manifestations, strongly favor the choice of RCA as a study site for filovirus ecology. Moreover, similar ecological zones are present in both RCA and Uganda, from where imported monkeys were suspected to be the source of the first Marburg virus outbreak in Europe [3]. As early as 1979, Filovirus serological scars were detected by immunofluorescence antibody (IFA) test and radio immuno assay in the human population of RCA [4,5,6]. In the 1980s, several research programs on filovirus epidemiology were carried out in a collaborative effort between the Bangui's Institut Pasteur, the Centers for Disease control, the United States Army Medical Research Institute for Infectious Disases (USAMRIID) and, the Organisation de Coordination pour la lutte contre les grandes Endémies en Afrique Centrale [7,8].

In order to investigate the potential of an active circulation of filovirus in RCA, study sites and study populations were identified in the Lobaye district, where previous high seroprevalence for filovirus was detected [6,8,9]. Antibody and virus detection were performed using

ELISA, IFA test, western blot test and PCR. Within the rain forest, the strategy was: 1) to determine the human population at risk of filovirus infection, 2) to identify the potential risks associated with subsistence activities, such as hunting and gathering products from the forest and, 3) to identify potential reservoir hosts of the virus within the non-human primates, rodents, bats and their ectoparasites. Here we report a first phase of an ongoing research program for filovirus ecology in the RCA, and present our findings on ELISA serosurveys of the Lobaye district human populations.

Materials and methods

Study area (figure 1). The Lobaye district is covered by a mixture of preforest grassland and Congolese rain forest. The study pygmy camps and non-pygmy villages are located in a remote forested area West of the Oubangui river and South of its major tributaries, the Lobaye river. Three groups of pygmy camps (Sangoumbe, Sakoungbou and Mogboto) and a village group (Gouga village) were investigated. Pygmy camps are seasonal (3 to 6 months) but each camp site can be occupied at interval of time throughout the year. Each primary camp is composed of 3 to 5 secondary camp units, each consisting of 3 to 5 primary families from the same lineage, living in huts made of leaves and lianas. Sangoumbe huts are located in a forest clearing, 3 km North of Gouga. Sakoungbou camps are placed along a logging trail, near the Lobaye river. Mogboto, is situated 10 km West from Sakoungbou in a forest clearing. Less than a kilometer further, the Gouga villages, are typical villages of the Central African forest: 34 primary families (384 individuals) lived in mud huts covered with weaved palm tree leaves. Dwellings are located on both side of a narrow dirt road on the shaded rain forest. The villages are located about two kilometers from the Oubangui river and the Congo border.

Study population. Pygmies who participated in the study belong to the BaAka group (or Aka). This ethnic group extends across the border of RCA into the northern part of the Congo and partially into southeastern Cameroon [10]. Despite increased contact with the villagers living in the forest, most of the pygmies from that area have preserved a characteristic semi nomadic lifestyle based on hunting and gathering rain forest natural resources. Villagers from Gouga belong in majority to Mbatî tribe (Bantu locutors) and, the remainder to the Mbanza and Ngbundu tribes (Banda locutors). They practice subsistence farming (manioc, banana, coffee, yam), in hunting (monkeys, duikers,

antelope) and limited trapping (rodents, hedgehog) and fishing activity.

Blood collection. Sera were collected in November, 1995 at the beginning of the short dry season that lasts for about four months. A 10cm³ blood specimen was obtained from each volunteer as previously described [6,8]. Blood was centrifugated on site and sera kept at -80°C in a liquid nitrogen tank. An interview form was completed which documented individual demographic data (name, estimated age, sex, parents, residence, ethnic group), occupation, and means of subsistence.

Filovirus antigen preparation. Antigens were prepared at the Institute für Virologie, in Marburg. Virus strains and the techniques were those in use at the Institute für Virologie and described in detail elsewhere [11]. Briefly, Marburg virus (Musoke strain), Ebola-Zaire virus (Mayinga strain), and Ebola-Reston virus strains were grown in E6-Vero cells. Supernatant from infected cells was cleared by centrifugation and filtration. Virus was then concentrated by precipitation and sucrose/tartrate gradient centrifugation. The concentrated virus was then inactivated by B-propiolactone. The final product was sonicated and used after dilution in carbonate buffer for coating microplates. Supernatant from non-infected cells were treated as well as control antigen

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). A direct ELISA test for immunoglobulin (Ig) G detection previously designed and adapted for filovirus antibody detection was used [12]. Tests were performed at the Institute für Virologie in Marburg using the previously described technic [12] and at the Pasteur Intitute in Bangui with some technical adjustment: Polystyrene microplates were used (Immulon II, Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia, USA) and directly coated at 4°C overnight with a suspension of inactivated antigen. Sera were tested at a dilution of 1:100, and 4-fold through 1:1,600 in 5% skim milk in PBS-Tween 20 0.1% . IgG binding was revealed by an anti-human sera conjugated to horseradish peroxidase. After adding a

chromogenic substrate, the absorbance was measured at 450 nm using a Multiskan reader (LP200 Sanofi Diagnostic Pasteur). Optical densities (OD) were recorded for each sample and the net OD value, or differential optical density (DOD) value, was calculated by subtracting the OD of the sample tested in duplicate antigen free well. A cutoff value was defined by using a mean OD units + 2 SD from known positif control sera. Any DOD greater than 0.300 was regarded as positive. A serum was considered positive when the sum of its three dilution DOD was greater than 1,000 and the titer retained the higher dilution with a DOD \geq 0.300.

Results

Ebola and Marburg-reacting antibodies were detected in each village and camp investigated in the Lobaye district (table 1 and 2). Although the sample sizes were not always sufficient to obtain statistical significance, some trends were still observed. One to eight tenth of the population of each investigated village gave a blood sample. The Pygmy Aka population consistently showed an higher antibody prevalence against both, Ebola-Zaire (12.8%) and Marburg (4.6%) antigens than the non-pygmy villagers (respectively 4.3% and 0.0%).

The highest seroprevalence of Ebola-reacting antibodies is found among the Sakoungbou pygmy camps (15.5%) however it is not significantly different from the other study sites. Ebola virus antigen seroprevalence observed among Gouga, Sangoumbe and Sakoungbou females is two times higher than for males but not quite statistically significant. However, among pygmies, seroprevalence was significantly higher before the age of 20 ($p < 0.05$) than to the older age class and, for the young females regarding young males of the same class of age ($p < 0.05$). A peak of seropositivity was observed between the ages of 21 to 30 with 13.9% seropositivity for Ebola-Zaire antigen (9 positive among 56 tested).

Marburg-reacting antibodies are found exclusively in the pygmy population (4.6%). Among the pygmies, males are more likely to present an higher rate of seroprevalence (7.6%) than females (1.9%).

Discussion

Pygmy populations of RCA living in camps appeared to be more at risk to filovirus infection than sedentary villagers. However no trend of seropositivity was observed for Pygmies living in camps in the deep rain forest (Sangoumbe), as compared to those living near a road (Sakoungbou, Mogboto), where local trade with villagers results in reduced contact with the forest for subsistence activities. Two series of serum samples obtained from Belemboke in 1994 were tested in order to compare similar human populations and environment than of Lobaye. Sedentary pygmy population living nearby in a missionary compound in Belemboke (RCA) and, who seem to have shifted from hunter-gatherer to subsistence farmers presented a 12.1% of Ebola reacting antibody sera (16 positive among 132 tested) and one tested positive against Marburg (0.7%). Agriculturalist leaving nearby, also tested at the same time, presented 3.1% (1/130) of Ebola and 2.0% (2/98) Marburg reacting antibody sera (unpublished data). Interestingly female pygmies had a higher seroprevalence (12.8) than males (11.3).

Three other series of sera collected from inhabitants of the same Congolese forest massif, were also tested by ELISA and gave a similar seroprevalence than the one observed in Lobaye (unpublished data): Of 226 sera collected from Bangassou population (March 1995) in the far eastern forested part of the country, 3.6 and 3.9% respectively had Ebola and Marburg antigen reacting antibodies. Nola, a village of the far western part of the RCA had a population with 3.7% Ebola antigen seropositivity (10 positive among 274 tested; December 1995) and, a 3.3% (8 individual) with Marburg virus reacting antibodies. Finally among sera obtained from a preview serosurvey conducted in 1990 in Kikwit, Zaïre, and before the 1995 outbreak, 3.4% (5 among 147) had positive Ebola-Zaïre antigen reacting antibodies and, 0.7% (1 among 149) reacted against the Marburg antigen. Nola and Kikwit villages are situated in a large deforested area where villagers are mostly involved in subsistence

farming and trading activities. Overall these observations suggest a potential association between filovirus antibody seroprevalence and a lifestyle associated with living in the remote rain forest and its subsistence activities. We are presently working on this hypothesis. Each of the non pygmy sampled population presented a significant ($p < 0.005$) lower Ebola antigen seroprevalence as compared to the Pygmy population of the Lobaye district.

In an effort to verify previous findings on filovirus seroprevalence in Central Africa, 481 sera collected in RCA 10 years ago were retested again by ELISA and IFA, . No significant difference of Ebola antibody prevalence was found between the tests done in the present study (6.2%) and the test (IFA) performed a decade ago (6.4%) (unpublished data). Furthermore, all the sera tested negative by ELISA against the Ebola-Reston antigen. Among them, 185 sera collected in 1985 from the populations of the present Lobaye study area had a 10.5% antibody seroprevalence against Ebola virus. Such observation suggests that populations of Lobaye have been in contact with an Ebola virus like antigen for a long period of time.

From previous Ebola virus serosurveys done in Africa [6,7,8,9], pertaining to the geographical distribution of the sites of Ebola infection [13,14], and the present data, it appears that Ebola viruses circulated in Africa between the 1,500 isohyet North and South of the equator which correspond to the limits of the rain forest/forested savannah domains. The Ebola strain from the Taï forest of Côte d'Ivoire, has been found in the same ecological zone than its most closely genetically-related Ebola-Zaire strain [14]. Such divergence between the two strains and their association within the same forested domain can account for their common origin, since the Ivorian forested massif was at one time part of the Congolese rain forest and became separated during the last glaciation (16,000 years before present).

One of the most unexpected findings was the presence of Marburg antibodies in the population of central Africa. In

accordance with previous findings, [4,11] this observation suggests a circulation of Marburg virus or Marburg-like virus within that part of central Africa situated in the same ecological zone than the suspected Ugandese origin of the Marburg virus [3]. As for Ebola virus, people living in the rain forest appear to have the highest Marburg virus antibody prevalence.

With the newly isolated Ebola-Reston virus from primates, it has become clear that other filoviruses with lower pathogenicity exist and infect monkeys [11]. Previous observations and studies suggested that unknown filoviruses with variable pathogenicity may exist in different part of the world [7,11]. In accordance with our studies in central Africa, we hypothesize that the *Filoviridae* family has several members present in Africa, that are pathogenic and non-pathogenic Ebola strains for human and non-human primates. Ebola virus strain distribution in Africa appears limited to a distinct ecosystem geographically associated with the rain forest belt. Epidemics seem to be related more to human and non-human primate behavior than to a spontaneous circulation of an highly pathogenic strain. Marburg virus or related unknown filovirus strains also seem to be present in the western part of Central Africa.

Acknowledgement

Ms Bianca Muench for her excellent work in processing samples for the retrospective serological study.

Dr. Joel Breman, Fogarty Foundation, and Dr. E.D. Johnson for their advises and constant support.

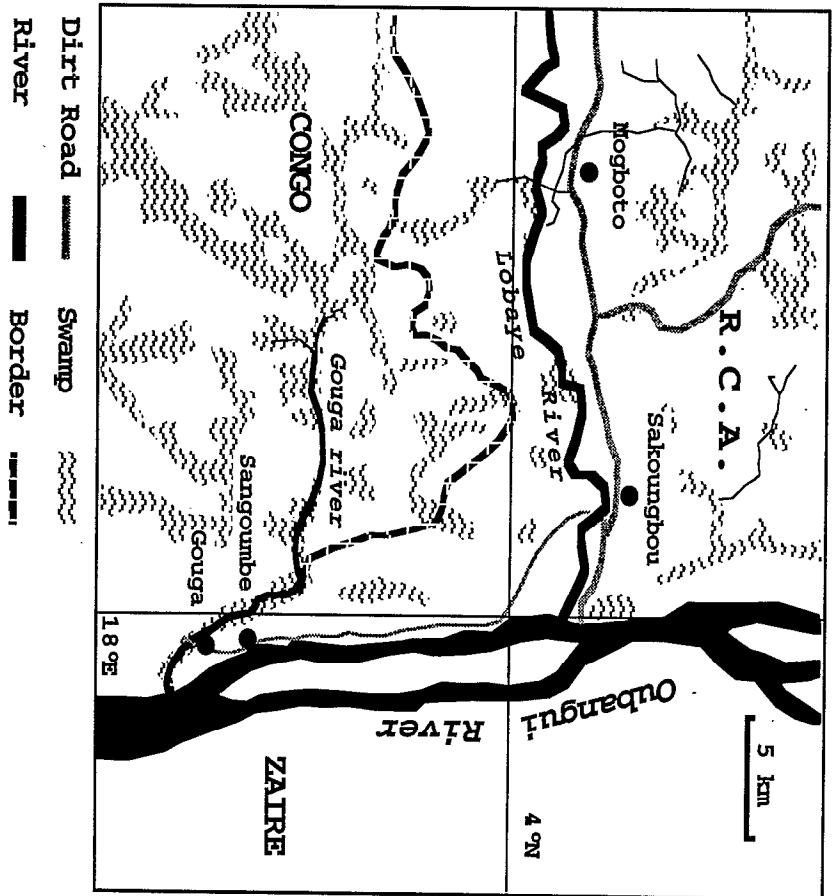
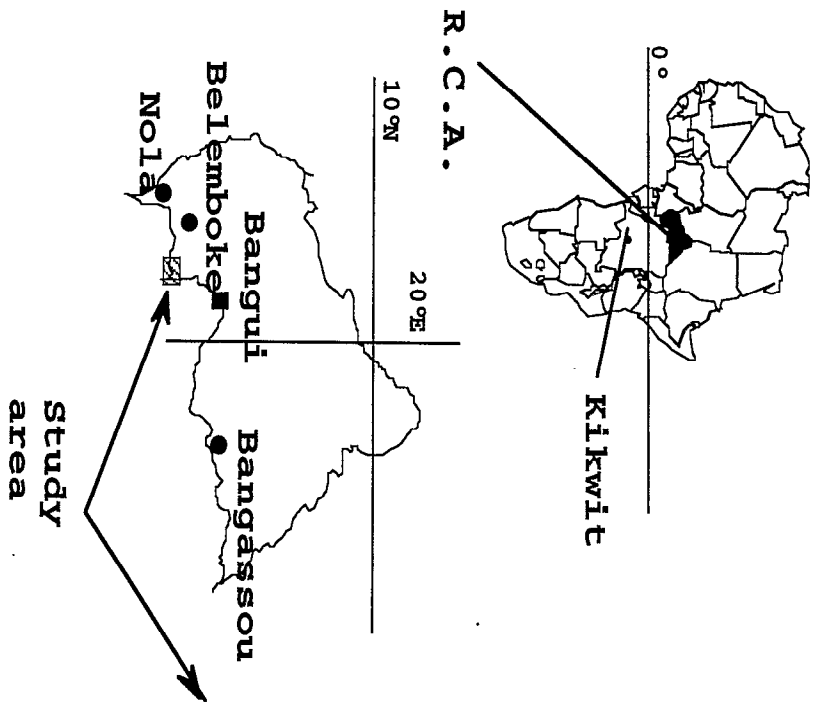
Drs Benoit Garin and Antoine Guessin from the Institut Pasteur de Paris for sharing sera and results from Kikwit.

Mr. Jean Marie Diemer, Ministère de la Santé, République Centrafricaine, for his expertise and collaboration on the field.

References

1. Pattyn SR, ed., Ebola virus haemorrhagic fever. Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical press 1978.
2. Boulvert Y. Notivce explicative: Carte phytogéographique de la République Centrafricaine. Orstom Edit., Paris, 1987.
3. Martini GA, Siegert R (eds) Marburg virus disease. Springer, Berlin 1971.
4. Saluzzo JF, Gonzalez JP, Georges AJ, Johnson KM. Note préliminaire sur la présence d'anticorps vis-à-vis du virus Ebola parmi les populations du Sud-Est de la République Centrafricaine. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique, 1980;73:238-241.
5. Johnson KMV, Scribner CL, McCormick JB. Ecology of ebola virus: a first clue. J.Infect.Dis. 1981;143:749-751.
6. Gonzalez JP, McCormick JB, Saluzzo JF, Georges AJ. Les fièvres hémorragiques africaines d'Origine virale en République Centrafricaine Cah.ORSTOM, Ser.Ent.Méd. et Parasit., 1983;21: 119-130.
7. Gonzalez JP, Josse R, Johnson ED, Merlin M, Georges AJ, Abandja J, Danyod M, Delaporte E, Dupont A, Ghogomu A, Kouka-Bemba D, Madelon MC, Sima A, Meunier DMY. Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative central african populations. Research in Virology (Annales de l'Institut Pasteur) 1989;140:319-331.
8. Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Hemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien 1993;87:530-535.
9. Johnson ED, Gonzalez JP, Georges AJ. Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygien, 1993;87:532-535.
10. Bahuchet S. Food supply uncertainty among the Aka Pygmies (Lobaye, Central African Republic). In: Coping

- with uncertainty in food supply, de Garine i and Harrison A (editors) Oxford: Clarendon Press, pp.118-149.
11. Becker SH, Feldmann H, Slenczka W. Evidence for occurrence of filovirus antibodies in humans and imported monkeys. *Med.Microbiol.Immunol.* 1992;181:43-55.
 12. Slenczka W, Rietschel M, Hoffmann C, Sixl W. Seropidemiologische untersuchungen über das vorkommen von antikörpern gegen Marburg und Ebola virus in Afrika. *Mitt.Oesterr.Ges.Tropenmed.Parasitol* 1984;6;53-60.
 13. WHO. Ebola haemorrhagic fever- Gabon. *Wkly Epidemiol.Rec.* 1996;71:71
 14. Sanchez A, Trappier SG, Mahy BWJ, Peters CJ, Nichol ST. The virion glycoproteins of Ebola viruses are encoded in two reading frames and are expressed through transcriptional editing *Proc.Natl.Acad. USA* 1996;93:3602-3607.



SUR LA PISTE DU VIRUS EBOLA

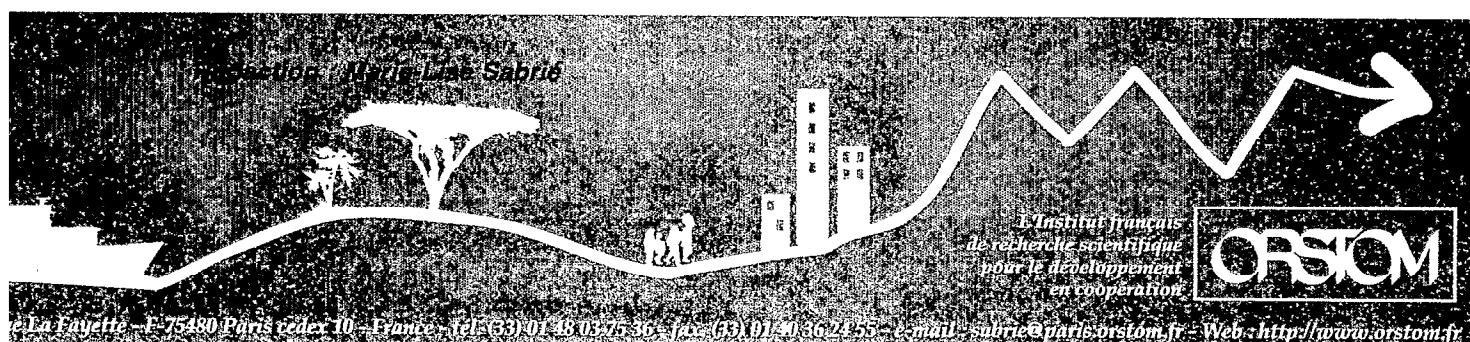
A la fin des années 1970, apparaissaient en Afrique les premières épidémies dues aux filovirus, une famille de virus récemment décrite et à laquelle appartient le virus Ebola. Les souches pathogènes des filovirus provoquent des fièvres hémorragiques qui en quelques jours déciment plus des deux tiers des populations infectées.

Vingt ans après que les filovirus eurent été pour la première fois identifiés, leur cycle naturel (sites d'apparition, vecteurs du virus, modalités de diffusion, etc.) demeure quasi méconnu. Aussi une étude épidémiologique, menée par l'Orstom (Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération) en collaboration avec l'institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine), Der Institute für Virologie Philipps Universität (Allemagne) et l'Union européenne, a-t-elle été lancée en 1995 afin de mesurer, dans une région d'endémie, la prévalence des personnes touchées par des filovirus et les facteurs favorisant l'infection par ces virus. L'étude a été conduite dans le district de la Lobaye, au sud de la République centrafricaine, dans des villages et campements situés dans la forêt tropicale humide et à ses abords. Cette région a été choisie pour sa proximité géographique, ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus Ebola, le nord du Zaïre et l'extrême sud-ouest du Soudan.

En novembre 1995, les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur près de 300 personnes - 200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires - et les ont analysés afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus, le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont été par ailleurs réalisées sur des échantillons sanguins provenant de rongeurs, chauves-souris et singes chassés par les pygmées.

Les résultats de cette étude laissent aujourd'hui apparaître que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de la zone d'étude. Les taux de personnes séropositives lors des tests sont respectivement de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont également identifié deux espèces de singes (*Cercopithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*) porteurs d'anti-

.../...



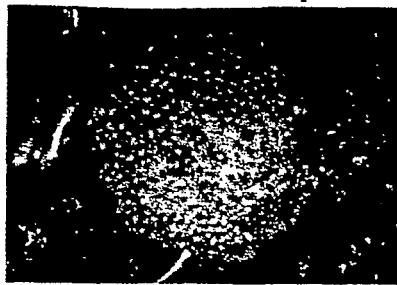
Des éponges à fibres optiques

Leurs «épines» captent la lumière.

On ne reconnaît aux éponges qu'une seule activité, celle qui consiste à filtrer l'eau qui les traverse pour en capter les substances nutritives. R. Cattaneo-Vietti et ses collègues de l'Université de Gênes ont montré qu'une éponge de l'Antarctique utilise ses spicules de silice pour capter la lumière solaire et en faire bénéficier une algue avec qui elle vit en symbiose.

Rossella racovitzæ est une éponge dotée d'une charpente robuste constituée de baguettes de silice qui font saillie, tels des piquants de hérisson. Certains ont la forme d'une épine lisse, d'autres sont ramifiés à leur extrémité. Ces spicules découpent les prédateurs, mais ils servent aussi aux éponges à s'adapter à leur environnement. Les extrémités des spicules de certaines éponges, telle *Rossella antarctica*, servent d'ancre : elles s'accrochent dans le sable ou dans les sédiments, de sorte que l'éponge résiste aux courants.

Rossella racovitzæ vit dans les eaux froides et obscures de l'Antarctique, à 120 mètres de profondeur dans la mer de Ross. On a observé que des algues brunes (des diatomées) adhèrent à la base de ses spicules. Les symbioses entre éponges et bactéries sont très fréquentes, mais celles entre éponges et algues sont rares. Quand une telle symbiose



Éponge dont les spicules canalisent la lumière.

existe, les algues sont des espèces microscopiques unicellulaires ou filamenteuses qui adhèrent à des éponges vivant dans les eaux chaudes des mers tropicales, à proximité de la surface. Comment l'algue symbiotique de *Rossella racovitzæ* survit-elle en eau profonde?

Les chercheurs italiens ont prélevé sur une éponge *Rossella racovitzæ* des spicules longs de dix centimètres. Après les avoir courbés, ils ont suivi la transmission d'un rayon laser émis sous différents angles d'incidence : comme dans une fibre optique, l'intensité lumineuse est transmise quasi intégralement à l'autre extrémité du spicule quand la source lumineuse est perpendiculaire à l'entrée, c'est-à-dire perpendiculaire à la croix qui le termine. En outre, cette croix semble canaliser l'énergie lumineuse : en son absence, moins du tiers de l'intensité lumineuse incidente est transmise. Ces spicules transmettraient à l'éponge et à son algue symbiotique l'énergie lumineuse nécessaire à leur survie. Les fibres optiques ont-elles été découvertes par une éponge, il y a quelques centaines de millions d'années?

Marie-Thérèse LANDOUSY

Avortement régulateur

En Roumanie, la pyramide des âges est modelée par les mesures anti-avortement.

En Roumanie, comme dans la plupart des pays d'Europe centrale et orientale depuis la Seconde Guerre mondiale, l'avortement est le principal mode de régulation des naissances. En 1997, le planning familial et les moyens modernes de contraception y sont encore peu utilisés. Les évolutions de la législation concernant l'avortement ont donc des conséquences directes sur la natalité. La pyramide des âges établie par Cornelia Muresan, de l'Université de Cluj, d'après les chiffres du recensement de 1992 montre que les irrégularités sur les 50 dernières années suivent l'assouplissement

et le durcissement de la réglementation de l'avortement.

Selon le Code pénal promulgué en 1948 par le nouveau régime communiste, l'avortement est un délit. Cette position est toutefois progressivement assouplie : en 1955, un décret annule le caractère délictueux si l'intervention est pratiquée par un médecin et pour certaines catégories de grossesses à risques ; en 1957, l'avortement devient autorisé sans conditions sur simple demande. Pendant les dix années suivantes, la natalité baisse régulièrement.

La situation change brusquement en 1966 : l'avortement est à nouveau presque totalement interdit. L'effet de surprise est complet : la fécondité double entre 1966 et 1967. Le succès de ces mesures natalistes se maintient l'année suivante. Cette interdiction marque le début d'une période volontariste, où le

BRÈVES

Barrage et poissons

Le remplissage de la retenue du barrage hydroélectrique de Petit-Saut, sur le fleuve Sinnamary en Guyane, inonde près de 350 kilomètres carrés de forêt tropicale depuis juin 1995. Selon Bernard de Mérona, de l'ORSTOM, les poissons n'ont, pour l'instant, pas trop souffert des perturbations hydrologiques. En aval, il y a au total autant de poissons qu'auparavant. Toutefois, 12 des 20 espèces les plus abondantes se sont raréfiées. Dans le lac, les captures sont trois à quatre fois plus nombreuses que dans la rivière, et neuf espèces dominent, en alternance, le peuplement.



B. de Mérona/ORSTOM

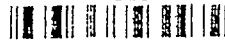
Solutions d'avenir

Pour dissoudre des hydrocarbures dans l'eau, on ajoute du savon, longues chaînes moléculaires dont chaque extrémité se lie soit à l'eau soit aux hydrocarbures. Le savon qui forme un «pont» entre les deux phases solubilise les hydrocarbures. Des chimistes italiens et américains ont synthétisé une famille de molécules analogues au savon qui permettent de dissoudre des produits organiques dans le dioxyde de carbone liquide. Celui-ci, abondant, facile à manipuler et inerte, pourrait donc remplacer de nombreux solvants organiques et halogénés, toxiques, utilisés dans l'industrie.

Vivre avec le virus Ebola

Aucune personne infectée par le virus Ebola ne semblait survivre. Pourtant des analyses de sang réalisées par une équipe de l'ORSTOM sur 200 pygmées vivant dans des campements forestiers en République centrafricaine ont révélé la présence d'anticorps anti-Ebola dans un cinquième de cette population. Ainsi ces personnes ont été contaminées par un virus Ebola qui est inoffensif, contrairement aux virus très pathogènes qui ont déclenché des épidémies au Zaïre. Les pygmées, qui vivent dans la forêt tropicale humide, ont plus souvent des anticorps anti-Ebola que les villageois habitant à la lisière de la forêt.

Suite page 26



Sur la fièvre du virus Ebola

Après s'être fait oublier un temps le revoilà encore plus dangereux. Le virus Ebola est à l'origine d'une décision d'examens aux frontières, de tous les voyageurs en provenance du Gabon. Marie-Lise Sabrié a, dans une fiche d'actualité scientifique de l'Orstom, fait le point.

Selon elle, à la fin des années 1970, apparaissaient en Afrique les premières épidémies dues aux filovirus, une famille de virus récemment décrite et à laquelle appartient le virus Ebola. Les souches pathogènes des filovirus provoquent des fièvres hémorragiques qui en quelques jours déciment plus des deux tiers des populations infectées. Vingt ans après que les filovirus eurent été pour la première fois identifiés, leur cycle naturel (sites d'apparition, vecteurs du virus, modalités de diffusion, etc), demeure quasi méconnu. Aussi une étude épidémiologique, menée par l'Orstom (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en coopération) en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine), Der Institute für Virologie Philipps Universität (Allemagne) et l'Union européenne, a-t-elle été lancée en 1995 afin de mesurer, dans une région d'endémie, la prévalence des personnes touchées par des filovirus et les facteurs favorisant l'infection par ces virus. L'étude a été conduite dans le district de la Lobaye, au sud de la République Centrafricaine dans des villages et campements situés dans la forêt tropicale humide et à ses abords. Cette région a été choisie pour sa proximité géographique, ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus Ebola, le nord du Zaïre et l'extrême sud-ouest du Soudan.

En novembre 1995, les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur près de 300 personnes - 200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois ban-tous sédentaires - et les ont analysés afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont été par ailleurs réalisées sur des échantillons sanguins provenant de rongeurs, chauves-souris et singes chassés par les pygmées. Les résultats de cette étude laissent aujourd'hui apparaître que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de la zone d'étude. Les taux de personnes séropositives lors des tests sont respectivement de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont également identifié deux espèces de singes (*Cerco-pithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*) porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg. En l'absence de signes cliniques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, les souches de ces filovirus circulant en République centrafricaine ne semblent pas pathogènes pour l'homme. L'analyse de ces différents résultats et leur confrontation avec ceux d'études antérieures ont conduit les chercheurs à formuler deux hypothèses : la famille des filovirus présenterait en Afrique diverses souches dont les unes seraient pathogènes et les autres pas. Le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection par les filovirus, en favorisant un rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour vérifier cette dernière hypothèse, une nouvelle phase de ce programme de recherche sera lancée au début de l'année 97 et utilisera des images satellitaires dans l'objectif de caractériser précisément les composantes de l'environnement (densité du couvert végétal notamment) dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante.



Echos de la recherche

NOIS. 5/02/1997
La Gazette du Laboratoire 19

Les informations publiées dans cette rubrique ont été choisies parmi les nombreux communiqués qui nous parviennent. Merci de votre dynamisme !

Sur la piste du virus EBOLA

A la fin des années 1970, apparaissent en Afrique les premières épidémies dues aux filovirus, une famille de virus récemment décrite et à laquelle appartient le virus Ebola. Les souches pathogènes des filovirus provoquent des fièvres hémorragiques qui en quelques jours déciment plus des deux tiers des populations infectées.

Vingt ans après que les filovirus eurent été pour la première fois identifiés, leur cycle naturel (sites d'apparition, vecteurs du virus, modalités de diffusion, etc...) demeurent quasi méconnus. Aussi une étude épidémiologique, menée par l'Orstom (Institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération) en collaboration avec l'institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine), Les instituts de Virologie Philipps Universität (Allemagne) et l'Union européenne, a-t-elle été lancée en 1995 afin de mesurer, dans une région d'endémie, la prévalence des personnes touchées par des filovirus et les facteurs favorisant l'infection par ces virus. L'étude a été conduite dans le district de la Lobaye, au sud de la République centrafricaine, dans des villages et campements situés dans la forêt tropicale humide et à ses abords. Cette région a été choisie pour sa

proximité géographique, ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus Ebola, le nord du Zaïre et l'extrême sud-ouest du Soudan.

En novembre 1995, les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur près de 300 personnes (200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires) et les ont analysés afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus, le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont été par ailleurs réalisées sur des échantillons sanguins provenant de rongeurs, chauve-souris et singes chassés par les pygmées.

Les résultats de cette étude laissent aujourd'hui apparaître que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de la zone d'étude. Les taux de personnes séropositives lors des tests sont respectivement de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont également identifié deux espèces de singes (*Cercopithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*) porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg. En l'absence de signes cli-

niques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, les souches de ces filovirus circulant en République centrafricaine ne semblent pas pathogènes pour l'homme.

Par ailleurs, il est apparu que les pygmées des campements forestiers sont plus touchés par ces filovirus (18% ont des anticorps contre le virus Ebola, 14% contre le virus de Marburg) que les villageois sédentaires (respectivement 13% et 8%). Parmi les populations pygmées, ceux vivants dans la forêt profonde sont deux fois plus nombreux à avoir été infectés par l'un et l'autre de ces virus que ceux habitant dans des campements proches des routes. Ces derniers pratiquent dans une moindre mesure des activités de subsistance (chasse, cueillette) dans la forêt du fait d'échanges commerciaux avec les agriculteurs villageois.

L'analyse de ces différents résultats et leur confrontation avec ceux d'études antérieures ont conduit les chercheurs à formuler deux hypothèses : la famille des filovirus présenterait en Afrique diverses souches dont les unes seraient pathogènes et les autres pas ; le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection par les filovirus, en favorisant un

rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour vérifier cette dernière hypothèse, une nouvelle phase de ce programme de recherche sera lancée au début de l'année 1997 et utilisera des images satellitaires dans l'objectif de caractériser précisément les composantes de l'environnement (densité du couvert végétal notamment) dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante.

Pour en savoir plus, contactez : Jean-Paul Gonzalez, Orstom, Yale University, New Haven (Etats-Unis),
Tél. 00 1 203 785 6110 - Fax. 00 1 203 785 4782
E-mail: gonzalez@biomed.med.yale.edu

Bibliographie :

J.-P. Gonzalez, E. Nakoune, W. Slenczka, J. Morvan et P. Vidal, "Human and animal filovirus surveillance in endemic areas of Central Africa", à paraître.

J.-P. Gonzalez et P. Vidal, "Ebola : les arcanes d'un virus mortel", *Orstom Actualités*, n°49, 1996.

J.-P. Gonzalez, "Des virus, des rongeurs et des fièvres", *Orstom Actualités*, n°47, 1995.

E.-D. Johnson, J.-P. Gonzalez, A.-J. Georges, "Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of Equatorial Africa", *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and Hygiene*, n°87, 1993.

L'EXPANSION

Ojd : 157766

14 BOULEVARD POISSONNIERE
75308 PARIS CEDEX 09

Tel: 01 53 24 40 40
20 FEV 1997

(biMensuel)

- 528917 -

// l'Argus de la presse // PARIS



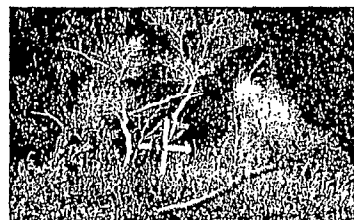
santé

Sur la piste des fièvres hémorragiques

Les filovirus sont responsables de fièvres hémorragiques qui peuvent tuer en quelques jours jusqu'à 70 % des populations infectées. A cette famille appartient le virus Ebola, qui a fait des ravages en Afrique en 1995. Pour en savoir plus sur ces agents, apparus vers la fin des années 70, l'Orstom (institut français de recherche en développement) a lancé dès 1995, en collaboration avec l'Institut Pasteur

de Bangui (Centrafrique), l'Institut de virologie de l'université de Phillips (Etats-Unis) et l'Union européenne, des études épidémiologiques. Des prélèvements sanguins effectués auprès de 300 personnes (Pygmées et villageois bantous) ainsi que sur des animaux laissent penser que le contact avec la forêt tropicale humide est un facteur majeur d'infection. Cette année, des observations de la végétation seront effec-

tuées par satellite pour déterminer les environnements à risque. On soupçonne notamment certains fruits d'être les vecteurs des filovirus.



La forêt tropicale humide serait un facteur majeur d'infection.

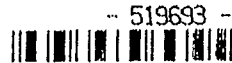
RECHERCHE ET INDUSTRIE

1 RUE TUPIN
69002 LYON

Tel: 0478929893+
JAN 1997

(Mensuel)

// l'Argus de la presse // PARIS



13658-D/158 - [11]

Premiers résultats d'une étude sur le virus Ebola

L'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (Orstom) vient de révéler les premiers résultats d'une étude épidémiologique, menée en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine), un institut allemand de Virologie (Philipps Universität) et l'Union européenne, sur les infections provoquées par les filovirus (notamment le virus Ebola). Les travaux ont été conduits dans le district de la Lobaye, au sud de la République Centrafricaine. Les chercheurs ont effectués des prélèvements sanguins sur 200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus : le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont aussi été réalisés sur des animaux chassés par les pygmées (rongeurs, chauves-souris, singes).

Le taux de personnes séropositives révélé par les tests est de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont aussi identifié deux espèces de singes porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg. Mais l'absence de signes cliniques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, semblent indiquer que les souches de ces filovirus circulant en République Centrafricaine ne seraient pas pathogènes pour l'homme. Par ailleurs, l'enquête a montré que les pygmées vivant dans les forêts sont plus touchés (18% ont des anticorps contre le virus Ebola, 14% contre le virus de Marburg) que les villageois sédentaires (13% et 8%). Les chercheurs ont ainsi été amenés à formuler deux hypothèses : les filovirus présenteraient en Afrique diverses souches, dont les unes seraient pathogènes et les autres pas ; le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection, en favorisant un rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour explorer plus avant cette dernière voie, une nouvelle recherche utilisera des images satellitaires, afin de caractériser précisément les composantes de l'environnement dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante. ■

BIOFUTUR

141 RUE DE JAVEL
75747 PARIS CEDEX 15

Tel: 01 45 58 90 49
FEVRIER 97

(Mensuel)

- 524442 -

l'Argus de la presse PARIS



Les multiples facettes d'Ebola

La famille des filovirus, à laquelle appartient le terrible virus Ebola qui fit 250 morts au Zaïre en 1995 et qui sévit actuellement au Gabon (40 morts depuis juillet), regrouperait plusieurs souches dont les unes seraient pathogènes et les autres non. En outre, le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection supplémentaire. Telles sont les deux hypothèses formulées par des chercheurs de l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (Orstom) au terme d'une étude épidémiologique lancée en novembre 1995 en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine) et l'Institut de virologie de l'université Philipps (Allemagne), avec le soutien financier de l'Union européenne. À partir de prélèvements sanguins effectués sur 300 personnes vivant en République centrafricaine, les chercheurs ont relevé des taux de séropositivité de 17 % pour le virus Ebola et de 13 % pour celui de Marburg, un autre filovirus également responsable de fièvres hémorragiques mortelles. Ces taux sont plus importants chez les pygmées vivants à l'intérieur de la forêt que chez les villageois installés au bord des routes. Selon les auteurs, l'absence de signes cliniques chez les personnes séropositives tend à prouver que l'on est en présence de souches de filovirus non pathogènes. Mais l'hypothèse reste à vérifier. « Si ces résultats étaient validés, on pourrait aussi bien avoir affaire à des formes inapparentes d'Ebola ou à des individus ayant développé par le passé des symptômes cliniques bénins et qui ne s'en souviennent pas » constate Bernard Le Guenno, de l'Institut Pasteur à Paris. Seule, la mise au point d'un test spécifique du virus Ebola permettrait de trancher en faveur de l'une de ces trois solutions. ■

LANCEMENT / Nouvelle flambée de fièvre hémorragique Ebola au Gabon: neuf personnes sont mortes depuis le début du mois de décembre, les contrôles aux frontières sont renforcés et les voyageurs en provenance de Libreville systématiquement contrôlés à l'entrée en France par exemple . 20 ans après la panique causée par l'irruption de ce virus inconnu sur les bords de la rivière Ebola au Zaïre , les chercheurs traquent toujours Ebola , cette fois en s'aidant des populations au contact du virus : les pygmées de la forêt tropicale, Anne-Laure Marie

Brusque montée de température, maux de tête et de gorge , enfin vomissements et hémorragies : en une dizaine de jours, le virus Ebola tue sa victime . La première épidémie fin 76 au Soudan et au Zaïre sème la panique avant de disparaître avec la mort du dernier malade. 20 ans après le virus est toujours tapi dans la forêt . Quand des animaux infectés en sortent , l'homme peut être infecté 9 morts au Gabon en un mois, la contagion se fait par simple contact. D'où vient Ebola , de quel organisme se sert-il pour circuler ? faute d'avoir obtenu cette réponse en laboratoire ,c'est l'observation du milieu naturel qui est maintenant privilégiée . En République Centrafricaine , dans le district de Lobaye les chercheurs européens ont intensifié leurs efforts depuis 2 ans sur la piste d'Ebola jean paul gonzalez de la coopération scientifique française

L'an prochain, une nouvelle phase du programme sera lancée .On se servira d'images satellites pour savoir s'il y a un lien entre les composantes de la foret et la circulation du virus . Mais au moment où ils approchent d'Ebola , les chercheurs sont de plus en plus convaincus d'une chose: ce n'est pas d'un seul virus qu'il s'agit mais de toute une famille aux formes multiples dont certaines ne sont pas mortelles . D'autres si.

Numéro 26
Titre Sur la piste du virus Ebola

Date de rédaction 01/12/1996

Mise à jour

Rédacteur mls

Chercheur J.-P. Gonzales

Disciplines virologie epidemiologie

Mots clés VIRUS EBOLA FILOVIRUS FIÈVRES HEMORRAGIQUES FORÊT

Zone géographique Afrique Republique centrafricaine

Type médias Presse générale Biotechnologies Environnement Sciences
 Agriculture Santé Océanographie
 Industrie Livres Santé

Contact médias/chercheur M.-O. Monchicourt - France Info (MLS)

Type retours Presse générale Industrie Océanographie
 PQR Biotechnologies Sciences humaines
 Radio Santé Internet
 Télévision Livres
 Agriculture Environnement

Références des retours

Le Figaro, "Dans la forêt africaine - le virus Ebola en circulation" - 2.1.97
Le Quotidien du Médecin, "De nouvelles données sur le cycle des virus Ebola et Marburg dans la nature", Dr C.F - le 08.01.97
La Quinzaine africaine, "Sur la piste du virus Ebola" - 10.01.97
Pour la science, "Vivre avec le virus Ebola" - février 1997
Recherche et Industrie, "Premiers résultats d'une étude sur le virus Ebola" - janvier 1997
Biofutur, "Les multiples facettes d'Ebola" - février 97
L'Expansion, "Sur la piste des fièvres hémorragiques" - 20.02.97
La Gazette du Laboratoire, "Sur la piste du virus Ebola" - 5.02.97
Le Figaro/Aurore, "Les microbes ne seront pas vaincus", Catherine Pérez et C. Petit Nicolas - 5.04.97
Recherche et Santé, "Meilleure compréhension du cycle des fièvres d'Ebola et de Marburg", 2ème trimestre 97

RFI - santé

QUOTIDIEN DU MEDECIN

Qjd : 80610

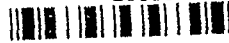
140 RUE JULES GUESDES
92593 LEVALLOIS PERRET

Tel: 01 47 30 75 00
8 JANVIER 97

(Quotidien)

Argus de la presse PARIS

- 508986 -



De nouvelles données sur le cycle des virus Ebola et Marburg dans la nature

UNE étude épidémiologique menée en République centrafricaine montre, d'une part, que les virus Ebola et Marburg circulent activement chez les habitants et certains primates et, d'autre part, que l'intensité de cette circulation dans la population humaine varie selon les activités pratiquées : elle est plus forte chez les personnes vivant dans les campements forestiers que chez les villageois sédentaires.

Ces résultats ont été obtenus après analyse de prélèvements sanguins effectués sur près de 200 Pygmées vivant en forêt et 100 villageois bantous sédentaires. 17% des personnes de cette série étaient positives pour le virus Ebola et 13% pour le virus Marburg. Des anticorps contre le virus Marburg ont également été retrouvés chez deux espèces de singe.

Des souches non pathogènes

« En l'absence de signes cliniques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, les souches de ces filo-

virus circulant en République centrafricaine ne semblent pas pathogènes pour l'homme », expliquent les chercheurs (1). Ceux-ci ont également observé un taux de séropositivité plus important chez les Pygmées vivant en forêt que chez les villageois sédentaires : 18%, contre 13% pour le virus Ebola et 14%, contre 8% pour le Marburg.

A partir de ces résultats et de ceux d'études précédentes, les auteurs émettent deux hypothèses sur le cycle naturel des filovirus. La première est qu'il existerait en Afrique des souches pathogènes et non pathogènes de ces virus. Selon la seconde, « le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection par les filovirus en favorisant un rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus ». Ils tenteront de vérifier cette dernière hypothèse par une étude qui devrait commencer au début de cette année.

Dr C. F.

(1) Jean-Paul Gonzales et coll., ORSTOM, institut Pasteur de Bangui, Der Institute für Virologie Philipps Universität (Allemagne).

Dans la forêt africaine

Le Figaro,
déc. 1996

Le virus Ebola en circulation

*Ce redoutable tueur vient d'être découvert
chez des populations pygmées et bantoues,
mais aussi des primates du Centrafrique.*

Des chercheurs de l'Orstom – Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération – se sont lancés l'an dernier sur la piste du virus Ebola, car son cycle naturel reste encore très mystérieux et son réservoir inconnu. Ils ont mené leur étude au cœur de la forêt centrafricaine dans le district de la Lobaye, une région choisie pour ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus au Nord du Zaïre et à l'extrême sud-ouest du Soudan.

Comparant les taux d'anticorps dirigés contre l'Ebola et un proche cousin le « Marburg » appartenant lui aussi à la famille des filovirus chez 200 pygmées vivant dans des campements au cœur de la forêt et une centaine de villageois bantous sédentaires, ils ont découvert que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de cette région. Les premiers, les pygmées, avec 18 % d'anticorps contre le virus Ebola et 14 % contre le Marburg – sont un peu plus touchés que les seconds, avec respectivement 13 % et 8 %. Ils ont également mis en évidence deux espèces de singes porteurs d'anticorps

contre le Marburg. Et parmi les pygmées, les habitants des profondeurs de la forêt sont deux fois plus nombreux à avoir été infectés par ces deux virus que ceux qui vivent dans les campements proches des routes. Ces derniers pratiquent moins la chasse ou la cueillette pour assurer leur subsistance, préférant les échanges commerciaux avec les agriculteurs villageois.

Fort de ces résultats, les chercheurs émettent pour l'heure deux hypothèses : la famille de ces filovirus serait en Afrique constituée de diverses souches, les unes pathogènes pour l'homme, les autres non ; et le contact avec la forêt tropicale humide serait un facteur de risque d'infection, en favorisant un rapprochement de l'hôte (encore inconnu) avec la source de ces virus. Pour vérifier cette dernière hypothèse, un nouveau programme de recherche va être lancé début 1997. Il aura recours à des images par satellite afin de caractériser très précisément les composantes de l'environnement et en particulier la densité du couvert végétal au sein duquel circulent ces terribles virus.

Dr C. P.

coursé au vaccin anti-*Helicobacter* est désormais ouverte, plusieurs firmes ont des essais en cours rendant concevable l'éradication d'un mal autrefois très répandu. Tout récemment, des chercheurs ont mis en évidence, chez des patients souffrant d'angine de poitrine, la présence d'une bactérie - la *Chlamydiae* - à l'intérieur des artères coronaires athéromateuses. Là encore, pourquoi ne pas envisager de produire des vaccins contre l'angine de poitrine et l'infarctus ? Plus inattendu encore, des chercheurs allemands ont mis en évidence dans le sang de grands dépressifs la présence d'un *Borna virus*, virus connu pour provoquer des troubles du comportement chez des chevaux et des chèvres. Plusieurs cancers, comme celui du foie ou du col de l'utérus se sont révélés être dus à des virus, hépatites pour l'un, papillomavirus pour l'autre. Le rôle des coxsavirus est soupçonné dans la genèse du diabète insulino-dépendant. Des maladies neurologiques, comme celles de Parkinson ou d'Alzheimer, sont suspectées d'être infectieuses, sans preuve encore tangible. Dr M. P.

Sida, encéphalopathies à prions, Ebola, hépatites B, C, D, E, G... Il ne se passe pas de semaine sans que l'une de ces maladies infectieuses ne fasse parler de ses méfaits. Sans même citer des fièvres aux noms plus exotiques, comme la maladie des légionnaires, la fièvre de la vallée du Rift, l'encéphalite à virus West Nile. En même temps, des maux que l'on croyait définitivement vaincus, comme la tuberculose (huit millions de nouveaux cas), la peste ou le choléra, font un retour fulgurant. Un rappel à la modestie, disposer d'un traitement ne suffit pas. La misère, une mauvaise hygiène, la difficulté d'accéder aux soins, la faiblesse de l'état immunitaire en raison d'une maladie comme le sida ou la malnutrition peuvent faire reculer le progrès.

Première cause de décès prématuré, les maladies infectieuses ont fait l'an dernier 17 millions de victimes, dont neuf millions d'enfants. Ces ravages sont d'autant plus inquiétants que la résistance aux antibiotiques ne cesse de croître partout dans le monde. Il y a encore quelques années, les experts prenaient les bactéries pour des petites bêtes « très bêtes ». Ils ont déchanté depuis et s'aperçoivent qu'elles ont plus d'un tour dans leur sac. Certaines ont un programme génétique leur permettant de modifier leur métabolisme, et d'échapper ainsi au bactéricide qui les menace. Et plus globalement, elles pratiquent le troc, échangeant avec beaucoup de facilité les gènes capables de résister à l'antibiotique qui devait les détruire. Cet échange aurait lieu en particulier dans les élevages intensifs de porcs ou de volailles, supplémentés en antibiotiques mal purifiés.

LE PÉRIL VIRAL

Même constat pour les parasites qui eux aussi font de la résistance aux médicaments censés les éradiquer. Le paludisme repart de plus belle pour deux raisons

Lassa, Junin, Guanarito... Ils ont des noms de tueurs exotiques. Ce sont les nouveaux virus. Les anciens, quant à eux, opèrent un retour en force. Ils ne seront toujours pas terrassés au siècle prochain.

Plasmodium falciparum, résiste de mieux en mieux aux antipaludéens, et le moustique qui transporte ce parasite est de moins en moins sensible aux insecticides. Le professeur Guy Blaudin de Thé annonçait lors d'un colloque organisé par l'Institut Pasteur que le péril viral sera celui du troisième

millénaire. Depuis le début des années 60, une trentaine de nouveaux virus dangereux pour l'homme ont été identifiés. Ils ont tous des noms de tueurs exotiques, du lieu où les limiers de la recherche les ont débusqués : Lassa, Machupo, Marburg, Junin, Guanarito, Ebola. D'autres peu-



vent apparaître de façon imprévisible. Comme le rappelle Mirko Grmek, historien de la médecine, un virus pathogène peut très bien « naître » d'un virus resté longtemps inoffensif. Tout récemment, des chercheurs de l'Orstom ont montré que des pygmées vivant au cœur de la forêt équatoriale sont porteurs d'anticorps contre le virus Ebola et son cousin, le Marburg, sans être malades pour autant. Pour surveiller et surtout réagir au plus vite à l'éruption de ces maladies émergentes, le célèbre CDC (Centre de contrôle des maladies) d'Atlanta monte la garde pour l'ensemble du globe. On ne compte plus les succès de ses détectives de choc engoncés dans leurs scaphandres, en PVC dans la traque aux nouvelles maladies : sida, Ebola, mal des Navajos. L'Organisation mondiale de la santé a, elle aussi, mis en place un système d'alerte justifié par la multiplication des échanges aériens qui font de Conakry ou de Delhi un petit faubourg de Paris. Car le monde est devenu un village, où des épidémies très localisées au départ sont autant de foyers d'incendie menaçant l'ensemble de la planète. Alors que, dans les siècles précédents, les épidémies suivaient la lente marche des caravanes ou des armées d'invasion. Les microbes ne sont pas et ne seront pas vaincus. Il sont même les seuls êtres vivants capables d'occuper absolument toutes les niches écologiques. « Aussi peut-on imaginer, en cas de cataclysme mondial, que les microbes entaillés sous terre, au fond des mers, dans l'atmosphère, voire dans l'espace interplanétaire, capables de résister aux fortes températures, à l'absence d'oxygène, pourraient bien être les seuls êtres vivants à subsister », écrit Xavier et Laurence Roland (1), deux microbiologistes.

Dr C. P.

MANZER/SIPA

(1) Bactéries, virus et champignons, collection « Domino », éditions Flammarion.

L'EXPANSION

Ojd : 157766

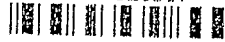
14 BOULEVARD POISSONNIERE
75308 PARIS CEDEX 09

Tel: 01 53 24 40 40
20 FEV 1997

(biMensuel)

// l'Argus de la presse // PARIS

- 528917 -



santé

Sur la piste des fièvres hémorragiques

Les filovirus sont responsables de fièvres hémorragiques qui peuvent tuer en quelques jours jusqu'à 70 % des populations infectées. A cette famille appartient le virus Ebola, qui a fait des ravages en Afrique en 1995. Pour en savoir plus sur ces agents, apparus vers la fin des années 70, l'Orstom (institut français de recherche en développement) a lancé dès 1995, en collaboration avec l'Institut Pasteur

de Bangui (Centrafrique), l'Institut de virologie de l'université de Phillips (Etats-Unis) et l'Union européenne, des études épidémiologiques. Des prélèvements sanguins effectués auprès de 300 personnes (Pygmées et villageois bantous) ainsi que sur des animaux laissent penser que le contact avec la forêt tropicale humide est un facteur majeur d'infection. Cette année, des observations de la végétation seront effec-

tuées par satellite pour déterminer les environnements à risque. On soupçonne notamment certains fruits d'être les vecteurs des filovirus.



La forêt tropicale humide serait un facteur majeur d'infection.



Les informations publiées dans cette rubrique ont été choisies parmi les nombreux communiqués qui nous parviennent. Merci de votre dynamisme !

Sur la piste du virus EBOLA

A la fin des années 1970, apparaissent en Afrique les premières épidémies dues aux filovirus, une famille de virus récemment décrite et à laquelle appartient le virus Ebola. Les souches pathogènes des filovirus provoquent des fièvres hémorragiques qui en quelques jours déciment plus des deux tiers des populations infectées.

Vingt ans après que les filovirus eurent été pour la première fois identifiés, leur cycle naturel (sites d'apparition, vecteurs du virus, modalités de diffusion, etc...) demeurent quasi méconnus. Aussi une étude épidémiologique, menée par l'Orstom (Institut Français de recherche scientifique pour le développement en coopération) en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine), Les Instituts de Virologie Philipps Universität (Allemagne) et l'Union européenne, a-t-elle été lancée en 1995 afin de mesurer, dans une région d'endémie, la prévalence des personnes touchées par des filovirus et les facteurs favorisant l'infection par ces virus. L'étude a été conduite dans le district de la Lobaye, au sud de la République centrafricaine, dans des villages et campements situés dans la forêt tropicale humide et à ses abords. Cette région a été choisie pour sa

proximité géographique, ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus Ebola, le nord du Zaïre et l'extrême sud-ouest du Soudan.

En novembre 1995, les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur près de 300 personnes (200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires) et les ont analysés afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus, le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont été par ailleurs réalisées sur des échantillons sanguins provenant de rongeurs, chauve-souris et singes chassés par les pygmées.

Les résultats de cette étude laissent aujourd'hui apparaître que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de la zone d'étude. Les taux de personnes séropositives lors des tests sont respectivement de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont également identifié deux espèces de singes (*Cercopithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*) porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg. En l'absence de signes cli-

niques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, les souches de ces filovirus circulant en République centrafricaine ne semblent pas pathogènes pour l'homme.

Par ailleurs, il est apparu que les pygmées des campements forestiers sont plus touchés par ces filovirus (18% ont des anticorps contre le virus Ebola, 14% contre le virus de Marburg) que les villageois sédentaires (respectivement 13% et 8%). Parmi les populations pygmées, ceux vivant dans la forêt profonde sont deux fois plus nombreux à avoir été infectés par l'un et l'autre de ces virus que ceux habitant dans des campements proches des routes. Ces derniers pratiquent dans une moindre mesure des activités de subsistance (chasse, cueillette) dans la forêt du fait d'échanges commerciaux avec les agriculteurs villageois.

L'analyse de ces différents résultats et leur confrontation avec ceux d'études antérieures ont conduit les chercheurs à formuler deux hypothèses : la famille des filovirus présenterait en Afrique diverses souches dont les unes seraient pathogènes et les autres pas ; le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection par les filovirus, en favorisant un

rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour vérifier cette dernière hypothèse, une nouvelle phase de ce programme de recherche sera lancée au début de l'année 1997 et utilisera des images satellitaires dans l'objectif de caractériser précisément les composantes de l'environnement (densité du couvert végétal notamment) dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante.

Pour en savoir plus, contactez : Jean-Paul Gonzalez, Orstom, Yale University, New Haven (Etats-Unis),
Tél. 00 1 203 785 6110 - Fax. 00 1 203 785 4782
E-mail: gonzalez@biomed.med.yale.edu

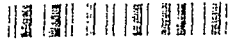
Bibliographie :

J.-P. Gonzalez, E. Nakoune, W. Slenczka, J. Morvan et P. Vidal, "Human and animal filovirus surveillance in endemic areas of Central Africa", à paraître.

J.-P. Gonzalez et P. Vidal, "Ebola : les arcanes d'un virus mortel", *Orstom Actualités*, n°49, 1996.

J.-P. Gonzalez, "Des virus, des rongeurs et des fièvres", *Orstom Actualités*, n°47, 1995.

E.-D. Johnson, J.-P. Gonzalez, A.-J. Georges, "Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of Equatorial Africa", *Transactions of the Royal Society of tropical medicine and Hygiene*, n°87, 1993.



SUR LA FIEVRE DU VIRUS EBOLA

Après s'être fait oublier un temps le revoilà encore plus dangereux. Le virus Ebola est à l'origine d'une décision d'examen aux frontières, de tous les voyageurs en provenance du Gabon.

Marie-Lise Sabrié a, dans une fiche d'actualité scientifique de l'Orstom, fait le point.

Selon elle, à la fin des années 1970, apparaissaient en Afrique les premières épidémies dues aux filovirus, une famille de virus récemment décrite et à laquelle appartient le virus Ebola.

Les souches pathogènes des filovirus provoquent des fièvres hémorragiques qui en quelques jours déciment plus des deux tiers des populations infectées.

Vingt ans après que les filovirus eurent été pour la première fois identifiés, leur cycle naturel (sites d'apparition, vecteurs du virus, modalités de diffusion, etc), demeure quasi méconnu.

Aussi une étude épidémiologique, menée par l'Orstom (Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en coopération) en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine), Der Institute für Virologie Philipps Universität (Allemagne) et l'Union européenne, a-t-elle été lancée en 1995 afin de mesurer, dans une région d'endémie, la

prévalence des personnes touchées par des filovirus et les facteurs favorisant l'infection par ces virus. L'étude a été conduite dans le district de la Lobaye, au sud de la République Centrafricaine dans des villages et campements situés dans la forêt tropicale humide et à ses abords.

Cette région a été choisie pour sa proximité géographique, ses similitudes culturelles et écologiques avec les premiers sites d'apparition du virus Ebola, le nord du Zaïre et l'extrême sud-ouest du Soudan.

En novembre 1995, les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur près de 300 personnes - 200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires - et les ont analysés afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont été par ailleurs réalisées sur des échantillons sanguins provenant de rongeurs, chauves-souris et singes chassés par les pygmées. Les résultats de cette étude laissent aujourd'hui apparaître que ces deux virus circulent activement chez les habitants ainsi que chez certains primates de la zone d'étude. Les taux de personnes séropositives lors des tests sont respectivement de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont également identifié deux espèces de singes (*Cerco-pithecus aethiops* et *Erythrocebus patas*) porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg.

En l'absence de signes cliniques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, les souches de ces filovirus circulant en République centrafricaine ne semblent pas pathogènes pour l'homme. L'analyse de ces différents résultats et leur confrontation avec ceux d'études antérieures ont conduit les chercheurs à formuler deux hypothèses : la famille des filovirus présenterait en Afrique diverses souches dont les unes seraient pathogènes et les autres pas. Le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection par les filovirus, en favorisant un rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour vérifier cette dernière hypothèse, une nouvelle phase de ce programme de recherche sera lancée au début de l'année 97 et utilisera des images satellitaires dans l'objectif de caractériser précisément les composantes de l'environnement (densité du couvert végétal notamment) dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante.

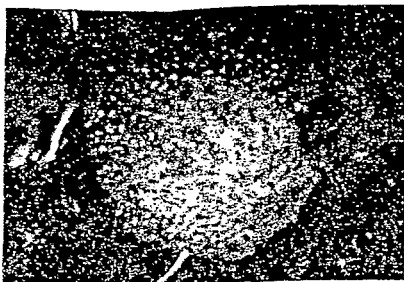
Des éponges à fibres optiques

Leurs «épines» captent la lumière.

On ne reconnaît aux éponges qu'une seule activité, celle qui consiste à filtrer l'eau qui les traverse pour en capturer les substances nutritives. R. Cattaneo-Vietti et ses collègues de l'Université de Gênes ont montré qu'une éponge de l'Antarctique utilise ses spicules de silice pour capturer la lumière solaire et en faire bénéficier une algue avec qui elle vit en symbiose.

Rossella racovitzæ est une éponge dotée d'une charpente robuste constituée de baguettes de silice qui font saillie, tels des piquants de hérisson. Certains ont la forme d'une épine lisse, d'autres sont ramifiés à leur extrémité. Ces spicules découpent les prédateurs, mais ils servent aussi aux éponges à s'adapter à leur environnement. Les extrémités des spicules de certaines éponges, telle *Rossella antarctica*, servent d'ancre : elles s'accrochent dans le sable ou dans les sédiments, de sorte que l'éponge résiste aux courants.

Rossella racovitzæ vit dans les eaux froides et obscures de l'Antarctique, à 120 mètres de profondeur dans la mer de Ross. On a observé que des algues brunes (des diatomées) adhèrent à la base de ses spicules. Les symbioses entre éponges et bactéries sont très fréquentes, mais celles entre éponges et algues sont rares. Quand une telle symbiose



Éponge dont les spicules canalisent la lumière.

existe, les algues sont des espèces microscopiques unicellulaires ou filamenteuses qui adhèrent à des éponges vivant dans les eaux chaudes des mers tropicales, à proximité de la surface. Comment l'algue symbiotique de *Rossella racovitzæ* survit-elle en eau profonde ?

Les chercheurs italiens ont prélevé sur une éponge *Rossella racovitzæ* des spicules longs de dix centimètres. Après les avoir courbés, ils ont suivi la transmission d'un rayon laser émis sous différents angles d'incidence : comme dans une fibre optique, l'intensité lumineuse est transmise quasi intégralement à l'autre extrémité du spicule quand la source lumineuse est perpendiculaire à l'entrée, c'est-à-dire perpendiculaire à la croix qui le termine. En outre, cette croix semble canaliser l'énergie lumineuse : en son absence, moins du tiers de l'intensité lumineuse incidente est transmise. Ces spicules transmettraient à l'éponge et à son algue symbiotique l'énergie lumineuse nécessaire à leur survie. Les fibres optiques ont-elles été découvertes par une éponge, il y a quelques centaines de millions d'années ?

Marie-Thérèse LANDOUSY

BRÈVES

Barrage et poissons

Le remplissage de la retenue du barrage hydroélectrique de Petit-Saut, sur le fleuve Sinnamary en Guyane, inonde près de 350 kilomètres carrés de forêt tropicale depuis juin 1995. Selon Bernard de Mérona, de l'ORSTOM, les poissons n'ont, pour l'instant, pas trop souffert des perturbations hydrologiques. En aval, il y a au total autant de poissons qu'auparavant. Toutefois, 12 des 20 espèces les plus abondantes se sont raréfiées. Dans le lac, les captures sont trois à quatre fois plus nombreuses que dans la rivière, et neuf espèces dominent, en alternance, le peuplement.



Solutions d'avenir

Pour dissoudre des hydrocarbures dans l'eau, on ajoute du savon, longues chaînes moléculaires dont chaque extrémité se lie soit à l'eau soit aux hydrocarbures. Le savon qui forme un «pont» entre les deux phases solubilise les hydrocarbures. Des chimistes italiens et américains ont synthétisé une famille de molécules analogues au savon qui permettent de dissoudre des produits organiques dans le dioxyde de carbone liquide. Celui-ci, abondant, facile à manipuler et inerte, pourrait donc remplacer de nombreux solvants organiques et halogénés, toxiques, utilisés dans l'industrie.

Vivre avec le virus Ebola

Aucune personne infectée par le virus Ebola ne semblait survivre. Pourtant des analyses de sang réalisées par une équipe de l'ORSTOM sur 200 pygmées vivant dans des campements forestiers en République centrafricaine ont révélé la présence d'anticorps anti-Ebola dans un cinquième de cette population. Ainsi ces personnes ont été contaminées par un virus Ebola qui est inoffensif, contrairement aux virus très pathogènes qui ont déclenché des épidémies au Zaïre. Les pygmées, qui vivent dans la forêt tropicale humide, ont plus souvent des anticorps anti-Ebola que les villageois habitant à la lisière de la forêt.

Suite page 26

Avortement régulateur

En Roumanie, la pyramide des âges est modelée par les mesures anti-avortement.

En Roumanie, comme dans la plupart des pays d'Europe centrale et orientale depuis la Seconde Guerre mondiale, l'avortement est le principal mode de régulation des naissances. En 1997, le planning familial et les moyens modernes de contraception y sont encore peu utilisés. Les évolutions de la législation concernant l'avortement ont donc des conséquences directes sur la natalité. La pyramide des âges établie par Cornelia Muresan, de l'Université de Cluj, d'après les chiffres du recensement de 1992 montre que les irrégularités sur les 50 dernières années suivent l'assouplissement

et le durcissement de la réglementation de l'avortement.

Selon le Code pénal promulgué en 1948 par le nouveau régime communiste, l'avortement est un délit. Cette position est toutefois progressivement assouplie : en 1955, un décret annule le caractère délictueux si l'intervention est pratiquée par un médecin et pour certaines catégories de grossesses à risques ; en 1957, l'avortement devient autorisé sans conditions sur simple demande. Pendant les dix années suivantes, la natalité baisse régulièrement.

La situation change brusquement en 1966 : l'avortement est à nouveau presque totalement interdit. L'effet de surprise est complet : la fécondité double entre 1966 et 1967. Le succès de ces mesures natalistes se maintient l'année suivante. Cette interdiction marque le début d'une période volontariste, où le

BIOFUTUR

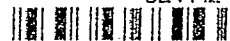
141 RUE DE JAVEL
75747 PARIS CEDEX 15

Tel: 01 45 58 90 49
FEVRIER 97

(Mensuel)

- 524442 -

/ L'Argus de la presse / PARIS



Les multiples facettes d'Ebola

La famille des filovirus, à laquelle appartient le terrible virus Ebola qui fit 250 morts au Zaïre en 1995 et qui sévit actuellement au Gabon (40 morts depuis juillet), regrouperait plusieurs souches dont les unes seraient pathogènes et les autres non. En outre, le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection supplémentaire. Telles sont les deux hypothèses formulées par des chercheurs de l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (Oxstom) au terme d'une étude épidémiologique lancée en novembre 1995 en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine) et l'Institut de virologie de l'université Philipps (Allemagne), avec le soutien financier de l'Union européenne. À partir de prélèvements sanguins effectués sur 300 personnes vivant en République centrafricaine, les chercheurs ont relevé des taux de séropositivité de 17 % pour le virus Ebola et de 13 % pour celui de Marburg, un autre filovirus également responsable de fièvres hémorragiques mortelles. Ces taux sont plus importants chez les pygmées vivants à l'intérieur de la forêt que chez les villageois installés au bord des routes. Selon les auteurs, l'absence de signes cliniques chez les personnes séropositives tend à prouver que l'on est en présence de souches de filovirus non pathogènes. Mais l'hypothèse reste à vérifier. « Si ces résultats étaient validés, on pourrait aussi bien avoir affaire à des formes inapparentes d'Ebola ou à des individus ayant développé par le passé des symptômes cliniques bénins et qui ne s'en souviennent pas » constate Bernard Le Guenno, de l'Institut Pasteur à Paris. Seule, la mise au point d'un test spécifique du virus Ebola permettrait de trancher en faveur de l'une de ces trois solutions. ■

RECHERCHE ET INDUSTRIE

1 RUE TUPIN
69002 LYON

Tel : 0478929893+
JAN 1997

(Mensuel)

// l'Argus de la presse // PARIS



-- 519693 --

13653-D/158 - [14]

Premiers résultats d'une étude sur le virus Ebola

L'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération (Orstom) vient de révéler les premiers résultats d'un étude épidémiologique, menée en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République Centrafricaine), un institut allemand de Virologie (Philipps Universität) et l'Union européenne, sur les infections provoquées par les filovirus (notamment le virus Ebola). Les travaux ont été conduits dans le district de la Lobaye, au sud de la République Centrafricaine. Les chercheurs ont effectué des prélèvements sanguins sur 200 pygmées vivant dans des campements forestiers et une centaine de villageois bantous sédentaires afin d'y détecter la présence d'anticorps contre deux filovirus : le virus Ebola et celui de Marburg. Des analyses du même type ont aussi été réalisés sur des animaux chassés par les pygmées (rongeurs, chauves-souris, singes).

Le taux de personnes séropositives révélé par les tests est de 17% pour le virus Ebola et de 13% pour celui de Marburg. Les chercheurs ont aussi identifié deux espèces de singes porteurs d'anticorps contre le virus de Marburg. Mais l'absence de signes cliniques de maladie chez les personnes présentant une sérologie positive, semblent indiquer que les souches de ces filovirus circulant en République Centrafricaine ne seraient pas pathogènes pour l'homme. Par ailleurs, l'enquête a montré que les pygmées vivant dans les forêts sont plus touchés (18% ont des anticorps contre le virus Ebola, 14% contre le virus de Marburg) que les villageois sédentaires (13% et 8%). Les chercheurs ont ainsi été amenés à formuler deux hypothèses : les filovirus présenteraient en Afrique diverses souches, dont les unes seraient pathogènes et les autres pas ; le contact avec la forêt tropicale humide constituerait un facteur de risque d'infection, en favorisant un rapprochement de l'hôte avec la source de ces virus. Pour explorer plus avant cette dernière voie, une nouvelle recherche utilisera des images satellitaires, afin de caractériser précisément les composantes de l'environnement dans lequel les filovirus circulent de façon prépondérante. ■

RECHERCHE ET SANTE

45 RUE JEAN JAURES
92300 LEVALLOIS PERRET

Tel: 01 49 68 06 91
2 TRIMESTRE 97

(Trimestriel)

- 559096 -

l'Argus de la presse / PARIS



MEILLEURE COMPRÉHENSION DU CYCLE DES FIÈVRES D'EBOLA ET DE MARBURG

À la fin des années 70, sont apparues en Afrique de brutales et redoutables fièvres hémorragiques jusque-là inconnues. Elles étaient dues au virus Ebola et au virus de Marburg, deux souches pathogènes d'une famille de virus de découverte récente, les filovirus. Ces fièvres provoquent la mort en quelques jours des deux tiers des personnes infectées. Jusqu'ici, sans doute en raison de leur rapidité et de leur violence, elles ne se sont pas répandues largement dans les populations des régions tropicales et forestières du Zaïre et du Sud Soudan où elles se sont manifestées.



Le cycle naturel de cette famille de virus est encore mal connu, mais une enquête de l'ORSTOM, l'Institut français de recherche scientifique pour le développement en coopération, en collaboration avec l'Institut Pasteur de Bangui (République centrafricaine), un institut allemand de virologie et l'Union européenne, vient d'apporter quelques lumières. Lancée en

1995, l'étude a été conduite en République centrafricaine dans des villages et des campements de la forêt tropicale humide et de ses abords (district de la Lobaye, une région très proche géographiquement, écologiquement et culturellement des zones d'apparition du virus Ebola (nord du Zaïre et sud-ouest du Soudan).

Des prélèvements sanguins ont été effectués d'une part sur trois cents personnes - deux cents Pygmées vivant dans des campements de la forêt et cent villageois bantous sédentaires - et d'autre part sur des rongeurs, chauve-souris et singes chassés par les Pygmées.

L'étude montre que les deux virus (Ebola et Marburg) circulent activement chez les habi-

tants et certains primates de la zone. Les taux de séropositivité chez les personnes testées sont de 17 % pour le virus Ebola et de 13 % pour le virus Marburg. Deux espèces de singes (*Cercopithecus Aethiops* et *Erythrocebus Patas*) sont porteurs d'anticorps contre le virus Marburg.

Cependant, en l'absence de signes cliniques de maladie chez les séropositifs, il semble que les souches virales circulant en République centrafricaine ne soient pas pathogènes pour l'homme. La famille des filovirus présente en Afrique diverses souches dont certaines seraient pathogènes et d'autres pas. Le contact avec la forêt tropicale humide serait un facteur de risque en rapprochant les victimes du réservoir à virus