

INFECTION A VIRUS NYANDO CHEZ L'HOMME

Par J.-P. DIGOUTTE, V.-J.-M. GAGNARD, P. BRES et F.-X. PAJOT (*)
(avec la collaboration technique de Mme PERREAU)

Le virus Nyando était isolé pour la première fois au Kenya en 1959 par WILLIAMS WOODALL et CORBET (1) à partir d'un lot d'*Anopheles funestus* Giles, 1900 capturés dans un village situé dans la vallée de la rivière Nyando. De nombreux sérums humains prélevés dans la même région possédaient des anticorps neutralisant et certains fixaient le complément en présence de l'antigène préparé à partir de cette souche prouvant ainsi une infection récente. Ceci mettait en évidence la diffusion du virus mais n'indiquait pas qu'il puisse jouer un rôle en pathologie humaine.

En mai 1969 le virus Nyando était isolé à l'Institut Pasteur de Bangui à partir du sérum d'une malade présentant un état fébrile avec courbatures. L'année précédente, à la même époque, il avait pu être isolé à partir du même vecteur qu'au Kenya : *Anopheles funestus*. Ces Moustiques avaient été capturés dans la banlieue proche de Bangui.

ORIGINE DE LA SOUCHE

Observation clinique.

Mme D. M. âgée de 42 ans vit à Bangui depuis de nombreuses années et demeure sur les bords du fleuve Oubangui. Elle est sédentaire et ne sort jamais en dehors de la ville. Au mois d'avril 1969 elle a présenté un premier épisode fébrile d'origine indéterminée et aucun virus n'a été isolé du sérum prélevé d'ailleurs assez tardivement au 7^e jour de la maladie. Mme D. présente un deuxième épisode fébrile durant 24 heures le 8 mai. Le 30 mai 1969 dans la soirée elle est prise d'un brusque accès fébrile à 40° C avec vomissements et courbatures. Un hémogramme pratiqué

(*) Séance du 8 novembre 1972.

- 3 AOÛT 1973
IMPRIMERIE BARNÉOUD S. A. — LAVAL
O. R. S. T. O. M.

Collection de Référence

5362 Ent. Med.

immédiatement met en évidence une leucopénie à 4.000 leucocytes et de nombreux schizontes de *Plasmodium falciparum*. Elle reçoit alors trois comprimés de chlorhydrate d'amodiaquine. Le lendemain matin la température est descendue à 38° C, mais remonte à 40° C le soir même et se maintient ensuite pendant quatre jours entre 38° C et 40° C malgré un traitement au chloramphénicol injectable à la dose de 1 g. 50 par jour. La température redevient normale au 6^e jour de l'évolution. Il est à noter que la malade néglige habituellement toute prophylaxie antipalustre.

Le 31 mai un certain nombre d'examenens sont mis en route : hémoculture dosage des transaminases SGOT-SGPT, tests hépatiques, nouvelle recherche d'hématozoaires : tous devaient se révéler négatifs. En même temps du sang et des selles sont confiés à l'Institut Pasteur pour recherche de virus.

L'examen clinique pratiqué le 1^{er} juin ne montre ni éruption, ni céphalées. La malade se plaint simplement de vomissements, sans diarrhée concomitante.

Le syndrome clinique s'est en somme résumé à une fièvre oscillant entre 38° C le matin et 40° C le soir pendant quatre jours accompagnée de vomissements et à un accès palustre concomitant le premier jour. L'échantillon de sérum tardif a été prélevé le 9 décembre 1969 soit six mois après cet épisode.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sérums du malade.

Le sérum précoce a été prélevé le 31 mai 1969, dès le lendemain du début de l'affection, il a été centrifugé dans un appareil non réfrigéré et inoculé immédiatement. Le reste du sérum a été fractionné en deux parties, l'une étant conservée à — 65°, et l'autre placée dans un congélateur à — 25° C.

Le sérum tardif a été prélevé le 9 décembre 1969 et conservé dans un congélateur à — 25°.

Technique d'isolement.

Le sérum pur a été inoculé le jour du prélèvement à deux portées de souriceaux nouveau-nés et dilué à 1/10 à une portée, par voie mixte, intracérébrale (0 ml. 02) et intrapéritonéale (0 ml. 02).

Les passages suivants ont été inoculés par voie intracérébrale seulement, les cerveaux étant broyés dans une quantité de Hanks albuminé à 0,4 0/0 donnant environ une solution à 1/10.

Méthodes d'identification.

Seule la sensibilité au chloroforme a été recherchée. La suspension virale du 5^e passage diluée à 1/100 est répartie après centrifugation en deux tubes. Dans un des tubes avec une seringue de 0 ml. 25 est ajouté 0 ml. 05 de chloroforme ; par aspiration et refoulement le

mélange est émulsionné pendant 10 minutes. Après centrifugation de courte durée des dilutions de raison dix sont réalisées avec le surnageant du tube traité et du tube non traité. Les deux gammes de dilution sont ensuite inoculées.

Les identifications ont été menées soit avec des sérums hyper-immuns de souris adultes récoltés après inoculation intrapéritonéale de suspension de cerveaux de souriceaux infectés soit avec des liquides d'ascites obtenus avec la souche de Leucome T 180.

Les réactions d'inhibition d'hémagglutination ont été mises en œuvre en plaque OMS selon la méthode de CLARKE et CASALS (2) avec des antigènes préparés en saccharose acétone. La même technique de préparation a été utilisée pour les antigènes servant dans les réactions de fixation du complément suivant la technique dite L. B. C. F. (3) adaptée par SEVER à la microtechnique sur plaque (4).

Pour les identifications les techniques de séroneutralisation furent exécutées en mettant en présence pendant 1 heure au bain-marie à 37° le sérum à étudier et le virus en dilution successive de raison dix.

Les sérums précoces et tardifs de la malade ont été étudiés selon la technique de CAUSEY (5), utilisant 0 ml. 1 de virus en dilution progressive, 0 ml. 1 de sérum inactivé à tester et 0 ml. 2 de sérum frais de cobaye maintenus pendant 1 heure au bain-marie à 37° avant de les inoculer aux souriceaux par voie intracérébrale.

Dans les deux méthodes l'index de neutralisation est donné par la différence entre le titre du virus obtenu en présence du sérum à tester et le titre obtenu en présence d'un sérum témoin qui peut être soit un sérum normal de souris soit le sérum précoce ayant permis l'isolement de la souche chez la malade.

RÉSULTATS

Historique des passages.

La souche a été isolée à partir d'un passage à l'aveugle effectué sur deux souriceaux prélevés au 6^e jour de l'observation. Tous les autres souriceaux ont survécu au 15^e jour sur les trois portées, mais on doit relever qu'un souriceau a été noté malade au 14^e jour mais était rétabli le lendemain. Au premier passage l'incubation a été de 7 à 11 jours, trois souriceaux survivant au 15^e jour. Au deuxième passage l'incubation s'est réduite à 6 à 9 jours, mais tous les souriceaux étaient morts au 10^e jour. Le temps moyen de survie a passé de 4 à 5 jours au troisième passage, à 4 jours au quatrième et s'est stabilisé à 3 jours à partir du cinquième.

Au dernier passage un titrage est réalisé sur souriceaux nouveau-nés et sur souris sevrées âgées de 21 jours. Le titre est de $10^{-5,8}$ sur les premiers, alors que la souche est irrégulièrement pathogène par voie intracérébrale pour les sevrées de 21 jours.

Tenté sur le sérum conservé à -65° le réisolement a échoué. La souche a reçu le numéro d'identification HB 69-761.

Propriétés physiques et chimiques.

En présence de chloroforme le titre du virus est inférieur à 10^2 alors que le titre de la suspension témoin atteint $10^{5,8}$.

Le virus filtre sur une membrane millipore $0 \mu 22$, le titre après filtration est de 10^{-5} alors qu'il est de $10^{-5,8}$ avant.

La lyophilisation pratiquée en sérum de cobaye inactivé n'a pas modifié le titre.

Propriétés immunologiques.

Les essais pour obtenir un antigène hémagglutinant les globules rouges d'oie se sont révélés infructueux. Par contre le même antigène fixe le complément à la dilution de 1/32 en présence d'un sérum homologue préparé sur souris adulte.

Identification.

En inhibition d'hémagglutination le sérum homologue préparé à partir de la souche HB 69-761 ne donne aucun résultat sur les antigènes de références de l'Institut Pasteur de Bangui possédant une hémagglutinine.

La souche HB 69-761 comparée par l'un d'entre nous (P. B.) aux immunsérums de référence du Centre Régional O. M. S. (Institut Pasteur de Dakar) a donné les résultats suivants : en réaction de fixation du complément le criblage a été effectué à la dilution de 1/8 et a donné des résultats positifs avec deux immunsérums Nyando et Y 176 (Eretmapodites 124) (6).

Les résultats des réactions croisées sont donnés dans le tableau I.

La souche a été alors comparée en réaction de séroneutralisation croisée avec les mêmes immunsérums et virus. Les résultats sont donnés dans le tableau II.

Les résultats de ces deux types de réactions montrent que la souche HB 69-761 est proche sinon identique à Nyando.

TABLEAU I

Fixation du complément en réaction croisée.

Souche HB 69-761

avec les antigènes et les immunsérums du groupe Nyando.

Sérums ascites		Antigènes			
		HB 69-761	Nyando	Y 176	Eret 124
HB 69-761	A4 (*)	32/32 (≠)	16/32	8/8	8/32
Nyando	S4	8/64	8/32	0/0	0/0
	A4	64/64	64/32	32/8	32/8
Y 176	A3	16/32	16/32	64/8	64/32
Eret 124	A3	8/32	8/32	16/8	32/32

(*) S1, 2, 3... A1, A2, A3 sérums ou ascites obtenus sur souris après 1, 2, 3 injections.
(≠) Inverse du titre sérum/inverse du titre antigène.

TABLEAU II

Séroneutralisation croisée.

Souche HB 69-761

avec les virus et les immunsérums du groupe Nyando.

	Virus			
	HB 69-761	Nyando	Y 176	Eret 124
Sérum normal	4,1	4,1	7,5	4,8
HB 69-761	> 2,6	> 3,1	2,0	0,4
Nyando	> 2,3	> 3,1	0,9	
Y 176	0,7	1,1	6,0	
Eret 124	0,3	1,2		3,3

Résultats sérologiques chez la malade.

Les anticorps fixant le complément ou neutralisant ont été recherchés dans le sérum précoce et dans le sérum tardif. Les deux antigènes utilisés sont d'une part le virus homologue BH 69-761 et le virus Nyando isolé l'année précédente d'un lot d'*Anopheles funestus* (Ar B 839).

En réaction de fixation du complément selon la technique en échi-

quier les deux sérums en dilution de raison deux de 1/8 à 1/256 avec les antigènes dilués de 1/2 à 1/64 donnent des réactions négatives.

Dans un deuxième temps les deux sérums ont été dilués de 1/4 à 1/128 et comparés de nouveau aux mêmes antigènes. Le sérum précoce est négatif alors que le sérum tardif fixe le complément à la dilution de 1/4 en présence de HB 69-761, mais est négatif en présence de l'autre souche Nyando (Ar B 839).

En réaction de séroneutralisation le titre du virus HB 69-761 est de $10^{4,5}$ en présence du sérum précoce alors qu'il est de 10^2 en présence du sérum tardif. L'index de neutralisation est donc de 2,5. Le titre du virus en présence de sérum normal de souris est de $10^{5,6}$.

COMMENTAIRE

Après le premier isolement de Nyando les enquêtes sérologiques montraient que de nombreux sérums humains prélevés dans la même région possédaient des anticorps neutralisants montrant ainsi la diffusion de cette nouvelle souche.

L'isolement du virus à partir du sérum d'une malade ayant présenté un épisode fébrile met en évidence son rôle en pathologie humaine.

La réalité de l'intervention de cet arbovirus ne paraît faire aucun doute. Si cette souche se trouvait déjà dans la gamme d'antigènes de référence de l'Institut Pasteur de Bangui et si elle n'a pas été résolée, la présence d'anticorps fixant le complément et neutralisant dans le sérum tardif et leur absence dans le sérum précoce permettent d'affirmer l'authenticité de l'isolement.

Le syndrome clinique de cette affection se résume dans ce cas à un état fébrile ayant duré quatre jours accompagné de vomissements. La présence d'hématozoaires le premier jour de l'évolution de la maladie s'explique par le fait que cette malade néglige habituellement toute prophylaxie antipalustre.

Les circonstances de l'isolement de Nyando en mettent bien en évidence les difficultés. La souche a été isolée à partir d'un passage à l'aveugle effectué au 6^e jour de l'observation des souriceaux, alors que tous les autres survivaient au 14^e jour. Ce virus s'est adapté ensuite assez difficilement.

Les résultats des tests immunologiques montrent la complexité du diagnostic sérologique de ce type d'arbovirose. Il est vrai que le sérum tardif a été prélevé plus de six mois après la phase aiguë de la maladie ce qui peut expliquer le titre très faible des anticorps fixant le complément. Pour ces niveaux très bas, de faibles variations intratypiques peuvent entraîner une réaction négative en fixation du

complément avec la souche de référence ; d'où l'intérêt de choisir comme antigène de référence pour le diagnostic sérologique de ce type d'affection une souche possédant un excellent pouvoir antigénique et de prélever le sérum tardif autant que possible trois semaines à un mois après la fin de la maladie.

En réalité cet isolement confirme ce qui avait déjà été observé pour l'isolement de Tataguine dans les fièvres exanthématiques (7) : dans de nombreux cas seul l'index neutralisant du sérum tardif permet d'affirmer l'étiologie d'un syndrome clinique si la souche n'a pu être isolée du sérum précoce.

CONCLUSION

Le virus Nyando isolé au Kenya en 1959 par WILLIAMS WOODALL d'un lot d'*Anopheles funestus* a été retrouvé en République Centrafricaine d'abord chez la même espèce d'Arthropode, puis chez une malade présentant un syndrome fébrile ayant duré quatre jours et accompagné de vomissements.

La souche a été difficile à isoler et l'étude immunologique des sérums précoces et tardifs montre la complexité du diagnostic sérologique de ce type d'affection.

RÉSUMÉ

Le virus Nyando a été isolé du sérum d'une malade sédentaire habitant à Bangui et présentant un syndrome fébrile sans exanthème ayant persisté quatre jours. Le sérum a été inoculé par voie mixte intracérébrale et intrapéritonéale à trois portées de souris âgées de moins de 24 heures.

Les souris ont été récoltées à l'aveugle car aucun d'entre eux ne présentait de signes pathologiques et tous les autres survivaient à la fin de la période d'observation.

L'adaptation a été difficile et il a été nécessaire d'attendre le cinquième passage pour voir le temps moyen de survie se stabiliser à trois jours.

L'identification de la souche a été conduite par la réaction de fixation du complément confirmée par la réaction de séroneutralisation.

La présence d'anticorps dans le sérum tardif confirme la réalité de l'isolement mais les techniques sérologiques utilisées mettent en évidence les difficultés du diagnostic immunologique de ce type d'affection.

SUMMARY

The Nyando virus has been isolated from a sedentary patient's serum, living in Bangui and presenting a febrile syndrom without exanthemas, for four days. The serum has been inoculated by both intracerebral and intraperitoneal mixed way to three litters of suckling mice, less than 24 hours old.

The suckling mice of the isolation have been harvested blindly, because none of them was presenting pathological signs and all the others were alive at the end of the observation time.

The adaptation has been difficult and it was necessary to wait for the fifth passage to see the average survival time fixing at three days.

The identification of the strain has been led by the complement fixation test confirmed by the reaction of seroneutralisation.

The presence of antibodies in the convalescent serum confirms the reality of the isolation but the serological technics used prove the difficulties of the immunological diagnostic, in this kind of affection.

BIBLIOGRAPHIE

- WILLIAMS (M. C.), WOODALL (J. P.) et CORBET (P. S.). — Nyando Virus a hitherto undescribed virus isolated from « *Anopheles funestus* » Giles collected in Kenya. *Arch. ges. Virusforsch.*, 1965, 15, 422-427.
- CLARKE (J.), CASALS (D. H.). — Technique for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod born viruses. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1958, 7, 561-573.
- Diagnostic Procedures for Viral and rickettsial diseases. American Public Health Association New York, 1964, 3rd Edit.
- SEVER (J.). — Application of microtechnique to viral serological investigation. *Immunology*, 1962, 88, 320.
- CAUSEY (O. R.), CAUSEY (C. E.), MAROJA (O. M.) et MACEDO (D. G.). — The isolation of arthropod born viruses including members of two hitherto undescribed serological groups in the Amazon Region of Brazil. *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, 1961, 10, 227-249.
- ARDOIN (P. L. M.) et SIMPSON (D. I. H.). — Relations antigéniques entre le virus Nyando et deux virus isolés en Éthiopie à partir de collectes d'Eretmapodites. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1965, 58, (4), 573-589.
- DIGOUTTE (J. P.), BRES (P.), NGUYEN TRUNG LUONG (P.) et DURAND (B.). — Isolement du virus Tataguine à partir de deux cas de fièvres exanthématiques. *Bull. Soc. Path. exot.*, 1969, 62, (1), 72-80.