

Enquête sérologique en Tunisie sur les arbovirus

B. NABLI,¹ C. CHIPPAUX-HYPPOLITE,² A. CHIPPAUX³ & J. TAMALET⁴

Les conditions écologiques réunies en Tunisie — présence de nombreux arthropodes, passages d'oiseaux migrateurs — et la fréquence de syndromes méningo-encéphaliques d'étiologie indéterminée ont incité les auteurs à entreprendre un premier sondage immunologique sur la présence des arbovirus.

Au cours d'une enquête menée en divers points du pays, 1406 sérums, dont 1370 prélevés chez des enfants de moins de 15 ans, ont été titrés vis-à-vis d'une série d'antigènes : 5 % d'entre eux présentaient des anticorps pour un ou plusieurs des antigènes étudiés. Ces résultats montrent l'activité dans la population tunisienne de divers arbovirus, et en particulier du virus West Nile.

D'importants travaux d'ensemble, plus particulièrement en Egypte (Taylor et al., 1956; Schmidt et al., 1960), en Grèce (Theiler et al., 1960; Pavlatos & Smith, 1964), en Israël (Ben-Porath et al., 1966), en Italie (Verani et al., 1967), et en France méditerranéenne (Panthier, 1968), ont précisé au cours des quinze dernières années la répartition des arbovirus dans le bassin méditerranéen, leur incidence dans la pathologie infectieuse et ont analysé les principaux maillons de leur chaîne épidémiologique. Ainsi non seulement des affections saisonnières connues de longue date, mais certaines épidémies, ont-elles pu être rattachées à une étiologie virale précise: virus de la dengue à Athènes en 1927, virus de la fièvre à phlébotomes parmi les troupes alliées en 1943-1944, virus West Nile en Israël en 1951-1952.

Complétant habituellement les enquêtes immunologiques, des isolements de virus ont été réalisés parallèlement chez l'homme ou l'animal malades, chez le vecteur et parfois chez l'animal réservoir:

West Nile a été isolé en Israël (Olejnik, 1952; Bernkopf et al., 1953; Goldblum et al., 1957; Nir et al., 1967), en Egypte (Work et al., 1953; Taylor et al., 1956; Schmidt & El Mansouri, 1963) et en France (Hannoun et al., 1964; Panthier et al., 1966, 1968);

Sindbis a été isolé à plusieurs reprises en Egypte et en Israël (Nir et al., 1967), Tahyna en France (Hannoun et al., 1966) et en Italie du Nord (Balducci et al., 1968);

les souches Sicile et Naples du virus de la fièvre à phlébotomes ont été isolées en Italie (Sabin et al., 1944) et en Egypte (Taylor, 1959; Schmidt et al., 1960).

C'est en fonction de ces isolements et des résultats des enquêtes sérologiques que nous avons choisi les souches utilisées pour la préparation de nos antigènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Sérums

L'enquête porte sur 1406 échantillons de sérums prélevés en divers points du territoire tunisien (fig. 1). Parmi ces sérums, 1094 ont été recueillis dans l'île de Djerba, au sud-est de la côte tunisienne (fig. 2). Cette île constitue un ensemble écologique bien défini. Sa population relativement stable reste fidèle à un mode de vie traditionnel. Son climat est subtropical avec des pluies rares et irrégulières.

Des autres sérums, 205 proviennent de la région de Tunis, 85 du gouvernorat de Gabès et 22 de diverses autres localités.

Ces sérums sont ceux d'enfants d'âge scolaire, à l'exception de 36 sérums de Tunis. Aucun de ces sujets n'a été vacciné contre la fièvre jaune.

Antigènes

Sept souches d'arbovirus ont été utilisées pour la préparation des antigènes:

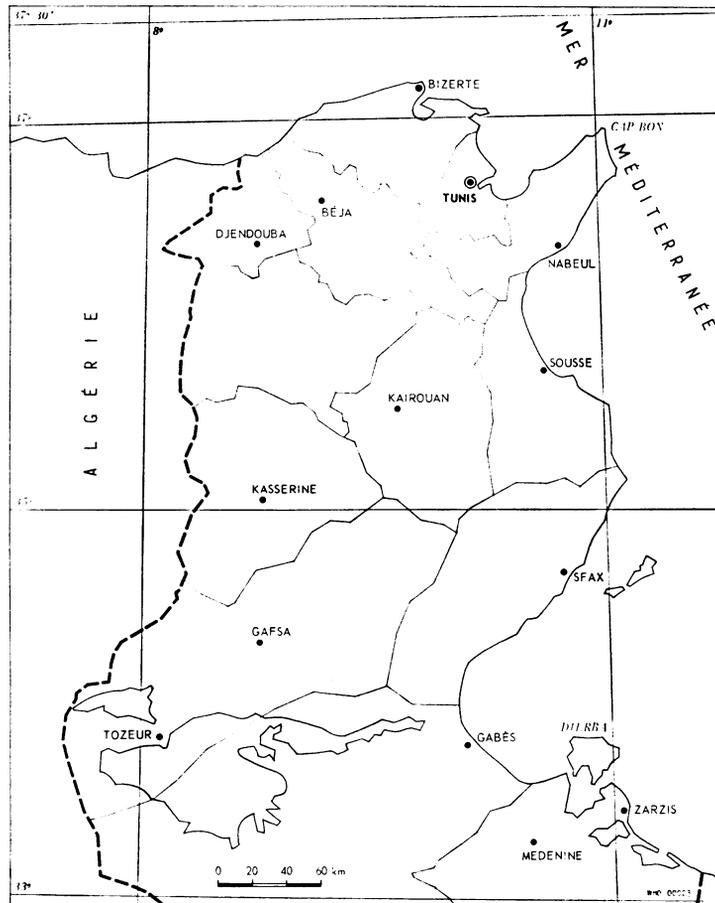
¹ Médecin Chef de Service des Hôpitaux, Laboratoire de Recherches virologiques, Institut d'Ophtalmologie, Tunis, Tunisie.

² Chef de travaux de bactériologie-virologie, Faculté de Médecine, Marseille, France.

³ Spécialiste des Hôpitaux des Armées, Ecole d'Application du Service de Santé des Troupes de Marine, Marseille.

⁴ Professeur à la Faculté de Médecine, Biologiste des Hôpitaux, Marseille.

FIG. 1
SITUATION GÉOGRAPHIQUE DES RÉGIONS PROSPECTÉES



Sindbis, souche Eg Ar 339;
chikungunya (CHIK), souche S-27 (Ross, 1956);
West Nile, souche Halima, isolée en Camargue
(France);
encéphalite japonaise (JE), souche Nakayama;
encéphalite d'Europe centrale, souche Graz;
fièvre à phlébotomes, souche Sicile;
Tahyna, souche isolée en Camargue (France).

Toutes ces souches sont entretenues par passages sur cerveaux de souris et conservées à -80°C .

Les 6 antigènes hémagglutinants sont préparés à partir de cerveaux de souris âgés de 2 à 4 jours, prélevés à la phase paralytique; West Nile, Sindbis,

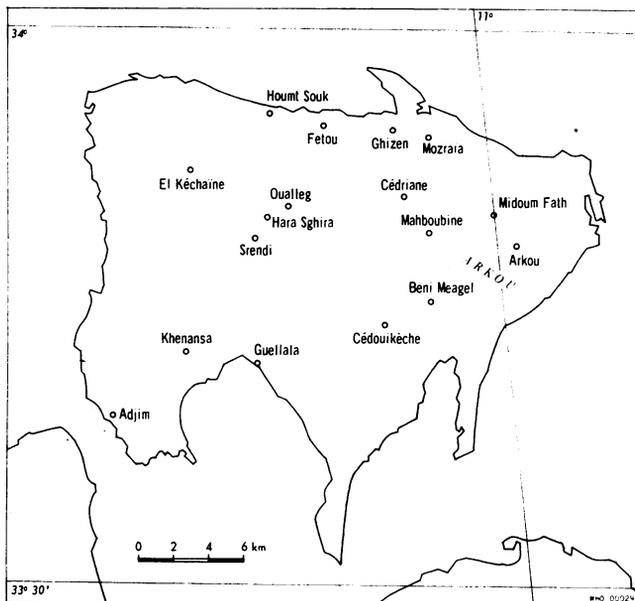
Graz et JE sont extraits au Fréon 113; Sicile et chikungunya en saccharose-acétone. Le titre de chaque lot d'antigène est contrôlé avant chaque réaction à pH et à température optimaux.

L'antigène Tahyna fixant le complément est préparé à partir de cerveaux de souris infectés, traités au Fréon 113; il est titré en échiquier avec un immunsérum de souris.

Méthodes

Ainsi qu'il est maintenant classique de le faire pour un premier sondage épidémiologique sur les arbovirus, c'est la réaction d'inhibition de l'hémagglutination (IH) selon la technique de Clarke &

FIG. 2
POINTS DE PRÉLÈVEMENT DES SÉRUMS DANS L'ÎLE DE DJERBA



Casals (1958) qui a été choisie pour tester l'ensemble des sérums avec les divers antigènes. Toutefois, 25 sérums déjà examinés en IH avec l'antigène West Nile ont été contrôlés par séroneutralisation sur souris (SN). Par ailleurs, l'emploi de la réaction de fixation du complément a permis d'étudier 170 sérums avec un antigène Tahyna non hémagglutinant.

Techniques

Inhibition de l'hémagglutination. Les sérums, conservés à -25°C puis décomplémentés, ont été absorbés systématiquement avec une suspension de kaolin et des globules rouges d'oie. Un premier examen d'orientation effectué sur une seule dilution au dixième (1/10) du sérum permet de sélectionner les sérums positifs. Puis un titrage quantitatif en précise le titre. Chaque série de réactions se fait en microméthode: plaque de Plexiglas de Takatsy, répartition à la micropipette de 0,025 ml de sérum dilué et de 0,025 ml d'antigène contenant au moins 8 unités hémagglutinantes. Après contact d'une heure à la température du laboratoire, on ajoute 0,05 ml de suspension de globules rouges d'oie dont la concentration est ajustée au photomètre.

Cette incubation brève à la température du laboratoire permet de conserver un excellent titre à tous les antigènes, mais peut diminuer très légèrement le titre inhibant l'hémagglutination (Smith, 1967).

Les témoins habituels — sérums, titre de l'antigène et suspension globulaire — sont inclus dans chaque série.

Fixation du complément. C'est une réaction de Kolmer réalisée sur plaques de Plexiglas avec 2 unités de complément et une incubation à 4°C pendant 18 heures.

Séroneutralisation. Elle a été seulement qualitative, par inoculation intracrânienne à des souris de 6 semaines de 0,02 ml d'un mélange sérum-virus après incubation à 37°C pendant une heure. Le virus West Nile est dilué de façon à contenir au moins 200 DL_{50} . Le sérum est pur. Après dix jours d'observation et contrôle, pour chaque série, du titre du virus, des sérums positif et négatif témoins, on compte comme sérums neutralisants ceux qui protègent 4 ou 5 souris sur 5, et comme sérums partiellement neutralisants ceux qui protègent seulement 3 souris sur 5.

TABLEAU 1
RÉSULTATS DES RÉACTIONS D'INHIBITION DE L'HÉMATAGGLUTINATION

Antigènes Régions	Sindbis		West Nile		JE		Graz		Sicile		CHIK				
	Nombre de sérums étudiés	Sérums positifs													
													Nombre	%	Nombre
Djerba	1 094	2	0,2	42	3,8	4	0,4	1	<0,1	256	1	0,4	12	0	0
Tunis	205	1	0,5	16	7,8	1	0,5	5	2,4	205	10	4,8	76	0	0
Gabès	85	0	0	6	7,0	1	1,2	1	4,5	22	1	4,5	3	0	0
Autres régions	22	0	0	2	9,0	1	4,5	0	0	22	1	4,5	9	0	0
Total	1 406	3	0,2	66	4,7	7	0,5	7	0,5	505	13	2,5	100	0	0

RÉSULTATS ET COMMENTAIRES

Le tableau 1 présente l'ensemble des résultats des réactions d'IH et montre une prépondérance de West Nile (66/1406, soit 4,7%). Sur les 1406 sérums, 70, soit 5%, présentent des anticorps pour au moins un des antigènes.

Le tableau 2 indique la répartition géographique et le titre des sérums positifs avec l'antigène West Nile et le tableau 3 les résultats de la séroneutralisation avec le virus West Nile. La concordance est absolue pour les 14 sérums négatifs; 4 sérums d'enfants de 7 ans sont positifs en IH et négatifs en séroneutralisation. Cette discordance s'explique par le fait qu'il peut s'agir d'anticorps hétérologues de moindre spécificité; en effet nous relevons 7 sérums sur 70 positifs pour 2 ou 3 antigènes du groupe B.

Par ailleurs, les 170 sérums titrés en fixation du complément avec Tahyna sont tous négatifs.

Il est difficile de comparer ces résultats avec ceux des enquêtes effectuées dans d'autres régions méditerranéennes: le choix des sérums — tranches d'âge, localités, conditions épidémiologiques, rapport de l'échantillon à la population totale — et le choix de la gamme d'antigènes sont très variés, en fonction des motivations de ces enquêtes.

C'est ainsi que Pavlatos & Smith (1964) ont analysé l'étiologie de l'épidémie grecque de 1927 et ont recueilli leurs sérums dans dix localités parmi deux groupes d'âge: sujets nés avant ou après 1928. Les premiers montrent 18% de porteurs d'anticorps dengue et 6% de porteurs d'anticorps West Nile, et les seconds 1% de porteurs d'anticorps pour les deux antigènes. Il n'y a aucun porteur d'anticorps Sindbis ni d'isolement de virus.

Taylor et al. (1956) ont étudié la distribution géographique du virus West Nile en période épidémique (23 isollements de virus chez des enfants fébriles). Sur 943 sérums recueillis dans 17 localités du delta du Nil, 55% neutralisent ce virus dont 36% de sérums d'enfants de 0 à 14 ans et 68% de sérums de sujets de 15 ans et plus. A Alexandrie (Egypte), Mohammed et al. (1968) ont trouvé sur 133 sérums 15% de porteurs d'anticorps pour West Nile, 2% pour la dengue, 26% pour Sicile, 13% pour Tahyna et aucun porteur d'anticorps Sindbis.

En Israël, Ben-Porath et al. (1966), sur 616 sérums recueillis dans une région où le virus West Nile a été actif quelques années auparavant, trouvent selon les villages, les groupes ethniques et l'âge, de 5 à 33% de porteurs d'anticorps West Nile chez l'enfant et de 1,3 à 35% de porteurs d'anticorps Sindbis pour l'ensemble des sérums.

TABEAU 2
RÉPARTITION DES SÉRUMS TESTÉS ET DES SÉRUMS POSITIFS EN IH
POUR L'ANTIGÈNE WEST NILE, SELON LA LOCALITÉ ET LE TITRE

Point de prélèvement	Nombre de sérums étudiés	Sérums positifs		Nombre de sérums de titre			
		Nombre	%	1/10	1/20	1/40	1/80
<i>Ile de Djerba</i>							
Adjim	142	7	4,9	—	4	3	—
Arkou	57	1	1,7	1	—	—	—
Beni Meagel	36	2	5,5	2	—	—	—
Cédouikèche	23	1	4,3	1	—	—	—
Cédriane	36	3	8,3	1	—	2	—
El Kéchaïne	20	2	10,0	1	—	1	—
Fetou	57	2	3,5	1	—	—	1
Ghizen	34	2	5,9	1	—	1	—
Guellala	146	2	1,4	1	—	1	—
Houmt Souk	114	2	1,7	2	—	—	—
Khenansa	83	1	1,2	1	—	—	—
Mahboubine	131	10	7,6	5	4	1	—
Midoum Fath	98	6	6,1	5	1	—	—
Mozraïa	43	1	2,2	1	—	—	—
Hara Sghira	8	0	—	—	—	—	—
Oualleg	34	0	—	—	—	—	—
Srendi	32	0	—	—	—	—	—
Total Djerba	1 094	42	3,8	23	9	9	1
<i>Gabès</i>							
Gabès	85	6	7,0	4	—	2	—
<i>Tunis</i>							
Tunis	205	16	7,8	16	—	—	—
<i>Autres régions</i>							
Autres régions	22	2	9,0	2	—	—	—
Total général	1 406	66	4,7	45	9	11	1

TABEAU 3
RÉSULTATS DES ÉPREUVES DE
SÉRONEUTRALISATION (SN) AVEC LE VIRUS WEST NILE

Nombre de sérums étudiés	Titre IH	Nombre de sérums positifs en SN	Nombre de sérums négatifs en SN
5	1/10	3	2
2	1/20	1	1
4	1/40	3	1
14	0	0	14
25		7	18

Verani et al. (1967), en Italie du Nord, notent en particulier sur 209 sérums étudiés avec une très large gamme d'antigènes l'absence de porteurs d'anticorps Sindbis et la présence d'anticorps pour les antigènes West Nile (8,3%), dengue (0,9%), Sicile (20,5%) et encéphalite à tiques (1,9%).

Enfin l'un de nous a trouvé dans un groupe de 17 écologistes travaillant en Camargue 10 porteurs d'anticorps West Nile (60%), 13 porteurs d'anticorps Tahyna (76%) et aucun porteur d'anticorps Sindbis.

L'ensemble de ces résultats reflète malgré leur hétérogénéité l'existence de foyers d'activité très inégale, parfois très limitée, de ces différents virus,

en particulier West Nile, Sicile, Sindbis, foyers dans lesquels s'inscrivent ces premiers résultats tunisiens.

CONCLUSION

Au terme de cette première enquête qui porte essentiellement sur des sérums de jeunes enfants de l'île de Djerba, nous pouvons conclure à la présence dans la population tunisienne de signes d'activité d'arbovirus du groupe B, dont très probablement West Nile, et des virus Sicile et Sindbis.

La Tunisie est un lieu de passage et d'hivernage de nombreuses espèces d'oiseaux migrateurs. On sait l'importance de cette notion dans le cycle des virus West Nile et Sindbis et peut-être dans le transport transcontinental d'autres arbovirus. Le continent africain est « le prolongement de l'Europe

méridionale et la traversée de la Méditerranée détermine les grands courants de migration; les côtes constituent des routes bien tracées » (Dorst, 1962).

Le cap Bon voit passer de nombreux oiseaux en provenance d'Italie, de Sicile se dirigeant vers l'Afrique centrale ou l'Egypte; certaines espèces hivernent en Tunisie de novembre à avril.

Ces conditions écologiques permettaient de supposer avec beaucoup de vraisemblance la présence endémique en Tunisie d'arbovirus déjà identifiés dans différents pays méditerranéens. L'île de Djerba pourrait représenter une zone de recherches « privilégiée » pour un travail d'ensemble sur les arbovirus, groupant l'analyse des conditions biologiques des réservoirs et des vecteurs, des essais d'isolement de virus et une surveillance sérologique.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons tous nos remerciements pour leur collaboration technique efficace à MM. E. Hassoun, R. Ben Hamida, A. Hammani et à M^{lle} J. Cheour.

SUMMARY

SEROLOGICAL STUDY OF ARBOVIRUSES IN TUNISIA

A serological investigation was conducted in Tunisia to obtain preliminary information on the arboviruses that might be present among the population. Altogether 1406 serum samples were drawn, 1094 of them from persons living on the island of Djerba; all but 36 of the total sera were from children of school age. The haemagglutination-inhibition test was used for most sera, but serum neutralization tests were also performed on 25 sera and complement-fixation tests on 170. Seven antigens representative of the more important arboviruses isolated in the Mediterranean area were used—namely, Sindbis, chikungunya, West Nile, Japanese encephalitis, Central European tick-borne encephalitis, Sicilian sandfly fever and Tahyna.

It was shown that arbovirus infections are present among the Tunisian population, some 5% of the total

sera tested containing antibodies to one or more of the antigens. The highest proportions of antibody were to West Nile (4.7%) and Sicilian sandfly fever (2.5%); rather few sera were positive for Central European tick-borne encephalitis and Japanese encephalitis (0.5% each) or to Sindbis (0.2%), and none to chikungunya or Tahyna.

The authors point out that, since birds are known to be important in the West Nile and Sindbis virus cycles and may play a role in the transcontinental transmission of other arboviruses and since Tunisia is on the spring and autumn bird-migration route between Europe and Africa and also serves as an important wintering territory, a variety of arboviruses already known from other countries elsewhere in the Mediterranean area may well be endemic in Tunisia.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Balducci, M., Verani, P., Lopes, M. C., Sacca, G. & Gregorig, B. (1968) *Acta virol.*, **12**, 457
 Ben-Porath, E., Fattal, B., Goldblum, N., Akov, Y. & Yofe, Y. (1966) *Israel J. med. Sci.*, **2**, 411
 Bernkopf, H., Levine, S. & Nerson, R. (1953) *J. infect. Dis.*, **93**, 207
 Chippaux, A., Beytout, D., Morvan, D., Seurat, J., Laumond, C., Cossard, C. & Fraissignes, B. (1968) *Bull. Méd. milit. franç.*, **62**, 49
 Clarke, D. A. & Casals, J. (1958) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **7**, 561
 Dorst, J. (1962) *Les migrations d'oiseaux*, Paris, Payot

- Goldblum, N., Sterk, V. V. & Jasinska-Klingberg, W. (1957) *Amer. J. Hyg.*, **66**, 363
- Hannoun, C., Panthier, R. & Corniou, B. (1966) *Acta virol.*, **10**, 362
- Hannoun, C., Panthier, R., Mouchet, J. & Eouzan, J. P. (1964) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **259**, 4170
- Mohammed, Y. S., Sekeyova, M., Gresikova, M. & El-Dawala, K. (1968) *Indian J. med. Res.*, **56**, 381
- Nir, Y., Goldwasser, R., Lasowski, Y. & Avivi, A. (1967) *Amer. J. Epidem.*, **86**, 372
- Olejnik, E. (1952) *Bull. Res. Coun. Israel E*, **2**, 210
- Panthier, R. (1968) *Ann. Inst. Pasteur*, **114**, 518
- Panthier, R., Hannoun, C., Beytout, D. & Mouchet, J. (1968) *Ann. Inst. Pasteur*, **115**, 435
- Panthier, R., Hannoun, C., Oudar, J., Beytout, D., Corniou, B., Joubert, L., Guillon, J. C. & Mouchet, J. (1966) *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **262**, 1308
- Pavlatos, M. & Smith, C. E. G. (1964) *Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.*, **58**, 422
- Sabin, A. B., Philip, C. B. & Paul, J. R. (1944) *J. Amer. med. Ass.*, **124**, 603
- Schmidt, J. R. & El Mansouri, H. K. (1963) *Ann. trop. Med. Parasit.*, **57**, 415
- Schmidt, J. R., Schmidt, M. L. & MacWilliams, J. G. (1960) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **9**, 450
- Smith, C. E. G. (1967) In: *Proceedings of the 15th International Symposium on Immunological Methods of Biological Standardization, Royaumont 1965*, Bâle/New York, Karger, **4**, 263
- Taylor, R. M. (1959) In: *Proceedings of the sixth International Congresses of Tropical Medicine and Malaria*, **5**, 149
- Taylor, R. M., Work, T. H., Hurlbut, H. S. & Farag Rizk (1956) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **5**, 579
- Theiler, M., Casals, J. & Moutoussis, C. J. (1960) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **103**, 244
- Verani, P., Balducci, M., Lopes, M. C., Alemano, A. & Sacca, G. (1967) *Amer. J. trop. Med. Hyg.*, **16**, 203
- Work, T. H., Hurlbut, H. S. & Taylor, R. M. (1953) *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)*, **84**, 719
-