

Veille microbiologique : les fièvres hémorragiques virales en République centrafricaine ; données sérologiques actualisées chez l'homme.

E. Nakounné, B. Selekon & J. Morvan

Laboratoire des fièvres hémorragiques virales et Centre OMS de référence pour les maladies émergentes, Institut Pasteur, BP 923, Bangui, République centrafricaine. Tirés-à-part : J. Morvan, Institut Pasteur, BP 923, Bangui, République centrafricaine. Fax : (236)61 01 09, e-mail : morvan@intnet.cf

Manuscrit n°2035. "Santé publique". Reçu le 9 février 1999. Accepté le 5 mai 2000.

Summary: Microbiological surveillance: viral haemorrhagic fevers in the Central African Republic; updated serological data for human beings.

An investigation was conducted between 1994 and 1997 in forested areas of the Central African Republic (CAR) to determine the seroprevalence of IgG antibodies against several haemorrhagic fever viruses present in the region. Sera were obtained from 1762 individuals in two groups (Pygmy and Bantu located populations) living in 4 forested areas in the south of the country. Sera were tested for IgG antibodies against Ebola, Marburg, Rift Valley fever (RVF), Yellow fever (YF) and Hantaviruses by enzyme immunoassay (EIA), and against Lassa virus by immunofluorescent assay. The prevalence of IgG antibodies was 5.9% for Ebola, 2% for Marburg, 6.9% for RVF, 6.5% for YF, 2% for Hantaan. No antibodies were detected against Lassa, Seoul, Puumala and Thottapalayam viruses. No IgM antibodies were detected against RVF and YF viruses. The distribution of antibodies appears to be related to tropical rain forest areas. This study indicates that several haemorrhagic fever viruses are endemic in forested areas of the CAR and could emerge due to environmental modification.

Résumé :

Une surveillance sérologique a été conduite de 1994 à 1997 dans les zones forestières de la République centrafricaine (RCA) pour déterminer la séroprévalence des anticorps dirigés contre plusieurs virus responsables de fièvres hémorragiques présents dans la sous-région. Les sérums ont été prélevés chez 1762 sujets appartenant à deux groupes (Pygmées et populations d'origine bantou) vivant dans 4 régions forestières du sud du pays. Les sérums ont été testés par ELISA pour les anticorps de type IgG dirigés contre les virus Ebola, Marbourg, fièvre de la vallée du Rift (RVF), fièvre jaune (YF), Hantavirus, et par immunofluorescence pour le virus Lassa. La prévalence observée a été de 5,9 % pour Ebola, 2,0 % pour Marbourg, 6,9 % pour RVF, 6,5 % pour YF, 2 % pour Hantaan. Aucun anticorps n'a été détecté vis-à-vis des virus Lassa, Séoul, Puumala et Thottapalayam. Par ailleurs, aucun anticorps de type IgM dirigé contre les virus RVF et YF n'a été mis en évidence. La distribution de ces anticorps apparaît étroitement liée aux zones de forêt humide partiellement dégradées par l'homme. Cette étude indique que plusieurs virus responsables de fièvres hémorragiques sont présents dans la forêt tropicale de RCA, où ils circulent à bas bruit et sont susceptibles d'émerger à tout moment du fait de modifications écologiques mettant en contact l'homme et les vecteurs et réservoirs.

Hemorrhagic fever virus
Ebola
Marburg
Rift Valley fever
Yellow fever
Hantavirus
Lassa
Central African Republic
Sub-saharan Africa

fièvre hémorragique virale
Ebola
Marbourg
fièvre de la Vallée du Rift
fièvre jaune
Hantavirus
République centrafricaine
Afrique intertropicale

Introduction

Les fièvres hémorragiques virales qui sévissent en Afrique sont nombreuses: la fièvre de Lassa, la fièvre de la vallée du Rift, la maladie de Marbourg, la fièvre hémorragique à virus Ebola, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHF) et la fièvre jaune. La République centrafricaine (RCA) est située au cœur d'une zone où plusieurs de ces virus responsables de pathologies souvent mortelles sont endémiques ou émergents. L'écosystème forestier du sud du pays est favorable à l'émergence de tels agents pathogènes. Les enquêtes séro-

logiques réalisées dans les années 80 chez l'homme et les animaux (20, 24, 39, 41), ont mis en évidence la circulation de plusieurs d'entre eux en RCA. Par ailleurs, plusieurs virus responsables de fièvre hémorragique ont été isolés: le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVF) à Zinga, en 1974 (10, 14, 40), en zone forestière; le virus amaril (16); le virus CCHF à partir de tiques *Hyalomma nitidum* (63), le virus Mobala antigéniquement proche de celui de Lassa chez des rongeurs (23, 25). Des séquences virales du virus Ebola (44) ont récemment été identifiées en 1999 en zone forestière. Au cours de la dernière décennie, plusieurs foyers épidémiques se sont mani-

festés dans les pays voisins: le virus Ebola a ré-émergé en 1995 en République démocratique du Congo, ex-Zaire (50), et s'est manifesté au Gabon en 1994-96 (51); la fièvre de la vallée du Rift est réapparue en 1997 en Afrique orientale (52) et en Egypte (1); la fièvre jaune sévit à nouveau dans ses territoires classiques (53, 66, 68) ou est en extension (49, 61).

Pour plusieurs d'entre elles, le point commun est d'être des zoonoses. Elles sont transmises à l'homme par l'intermédiaire d'arthropodes ou de rongeurs (Hantavirus, Arénavirus), par contact avec les animaux malades (fièvre de la vallée du Rift) ou à partir d'un réservoir naturel encore mal connu (Filovirus).

Les modifications des écosystèmes concourent à l'apparition de cette situation et exposent au risque d'émergence de ces virus: les systèmes d'exploitation forestière provoquent des perturbations directes et indirectes (pistes forestières, clairières ouvertes, introduction accrue de l'homme dans la forêt, migrations humaines régionales, déplacement et modification de la faune); les modifications climatiques ou hydrographiques augmentent les contacts entre vecteurs et réservoirs (arthropodes et vertébrés) et l'homme.

Dans cette région d'Afrique centrale, où les structures sanitaires sont souvent défaillantes, avec un risque d'épidémisation par transmission inter-humaine ou nosocomiale, un programme de veille microbiologique a été développé, depuis 1994, à l'Institut Pasteur de Bangui. Son objectif est de déterminer les facteurs et les risques d'émergence de ces principaux virus et de préciser les réservoirs de virus pour certains d'entre eux.

Nous rapportons ici les résultats de l'enquête sérologique effectuée chez l'homme, premier volet de ce programme. Elle a été réalisée par technique immunoenzymatique pour les virus Ebola, Marbourg, RVF, amaril, ainsi que pour les Hantavirus et, par immunofluorescence indirecte pour le virus Lassa.

Matériels et méthodes

La zone d'étude (figure 1)

Au regard des résultats des études précédentes, l'enquête sérologique a été réalisée sur des sérums humains prélevés

Figure 1.

Carte de la République centrafricaine. Sites de prélèvements.
Map of the Central African Republic. Locations Investigated.



entre 1992 et 1997 sur quatre sites du sud de la RCA, en zone forestière ou péri-forestière (Lobaye, Nola, Belemboke et Bangassou):

- le site de la Lobaye (3°38 N, 18°03 E) est une zone de forêt tropicale dense humide, semi-décidue, à 150 km au sud de Bangui, dans la préfecture de Mbaïki. Il s'agit de forêt primaire anciennement secondarisée et en partie exploitée par l'homme (clairières forestières et plantations) et partiellement dégradée le long des axes routiers. Les prélèvements ont été réalisés, en 1995, dans trois campements pygmées (Sangoumbe, Sakoumbou et Mogboto) situés de part et d'autre de la rivière Lobaye, à proximité de la lisière forestière, et dans un village non pygmée (Gouga), le long d'une piste forestière sur la rive gauche de la rivière. Les prélèvements de 1997 ont été pratiqués dans et autour d'une exploitation forestière (Batalimo);

- les sites de Nola (3°31N, 16°02 E) et Belemboke (40km au sud) sont deux zones mosaïques de forêt secondaire dégradée par les activités agricoles, situées dans la préfecture de la Sangha-Mbaere, à 400 km au sud-est de Bangui. Dans la région de Nola, les prélèvements ont été effectués chez des "Villageois" vivant dans des villages le long de deux axes routiers de la rive droite de la rivière Sangha (axe sud vers Salo qui mène à Bayanga, et axe ouest sur la piste Nola-Yokadouma qui mène au Cameroun). A Belemboke, les prélèvements ont eu lieu dans le village autour d'une mission catholique (année 1994) et dans les camps pygmées avoisinants (Pygmées sédentarisés) (années 1992 et 1994);

- le site de Bangassou (4°41 N, 22°48 E) est une zone de savane arbustive, située à la limite nord du bloc forestier guinéo-congolais, comportant des reliefs de forêt galerie, dans la préfecture de Mbomou, à 500 km à l'est de Bangui. Les prélèvements ont été effectués chez des villageois non pygmées, habitant les faubourgs ou à quelques kilomètres de Bangassou.

Les populations étudiées

Les régions étudiées abritent deux catégories de population culturellement différentes:

- les Pygmées Aka: ils sont le plus souvent semi-nomades, vivent dans des camps saisonniers constitués de bois et de feuillages, qu'ils occupent plusieurs mois dans l'année, situés dans la forêt ou le long des routes forestières en périphérie des villages d'agriculteurs. Les contacts avec les villageois qui les mettent largement à contribution (viande de chasse, travaux agricoles, abattage de bois) sont très fréquents, mais ils sont essentiellement cueilleurs et chasseurs.

- les populations d'origine bantou ou oubangienne, plutôt sédentaires, vivent dans des villages linéaires situés en lisière de forêt, le long des axes routiers, séparés de la forêt par des champs et des jachères, ou implantés sur les berges des fleuves. Ils sont d'abord agriculteurs, pêcheurs ou commerçants, avec des activités forestières annexes (chasse, charbon de bois, exploitation forestière).

Entre 1992 et 1997, à l'occasion de différentes missions sur le terrain, des prélèvements sanguins (10 ml) ont été pratiqués au pli du coude sur tube sec (Veinoject) sur 1743 sujets volontaires (684 Pygmées et 1059 Villageois), apparemment en bonne santé, présents sur les sites à l'occasion du passage de l'équipe. Après

centrifugation sur place, les sérums ont immédiatement été congelés en azote liquide. Une fiche de consentement et une fiche de renseignements épidémiologiques ont été rédigées sur place. Les conditions locales (prélèvements sur les campements de chasse) n'ont pas toujours permis de disposer de données épidémiologiques complètes (notamment l'âge ou les habitudes).

Pour compléter l'étude, 181 sérums prélevés à Kikwit (République démocratique du Congo) en 1990, au cours d'une enquête portant sur les virus HTLV, et deux lots de sérums, l'un collecté à l'occasion d'une épidémie de diarrhée sanglante à Ngoïla au Cameroun, en 1998 (21 sérums), et l'autre à l'occasion d'une épidémie de syndromes analogues à la dengue à Gordil dans le nord de la RCA, en 1998 (29 sérums), ont également été analysés.

Recherche des anticorps par technique ELISA

Les Filovirus

La technique ELISA pour la détection des anticorps de type IgG utilisée dans cette enquête est une méthode dérivée de la méthode originale décrite pour ce type d'antigènes viraux (46). Brièvement, les sérums, ainsi que le sérum témoin positif et 3 sérums témoins négatifs, ont été testés en screening, dilués au 1:100, vis-à-vis de l'antigène spécifique (surnageant de culture de cellules Vero E6 infectées par le virus Ebola-Zaire souche Mayinga, ou par le virus Marbourg souche Muzoke, inactivées par la β -propiolactone) fourni par W. SLENCZKA (Institute für Virologie, Marbourg) et d'un antigène témoin (surnageant de cellules Vero E6 non infectées). Les antigènes ont été directement adsorbés sur microplaque 96 cupules (Immulon I, Dynatech). Les anticorps IgG spécifiques ont été révélés par une antiglobuline humaine marquée à la peroxydase (Kirkegaard and Perry, Gaithersburg, MD). La lecture a été réalisée au spectrophotomètre (PR 2100 Sanofi Diagnostics Pasteur) à 492 nm, et les résultats ont été exprimés par la différence de densité optique (DDO) entre la cupule antigène et la cupule témoin. Les sérums ont été considérés comme réactifs si leur DDO était supérieure à la valeur seuil (moyenne DDO sérums négatifs + 3 écarts types). Les sérums réactifs à la sélection ont ensuite été testés à trois dilutions (1:100, 1:400, et 1:1600), le titre correspondant à l'inverse de la dernière dilution réactive quand la somme des DDO des trois dilutions était supérieure à 1. Les sérums ont été considérés comme positifs quand leur titre était supérieur ou égal à 400.

Les anticorps de type IgM ont été détectés par technique ELISA avec immunocapture d'antigène (13).

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift

Les anticorps de type IgG ont été recherchés par technique ELISA selon la technique antérieurement décrite (33, 35, 46). Les sérums ont été testés vis-à-vis de l'antigène spécifique (surnageant de cellules Vero E6 infectées par la souche Smithburn [Institut Pasteur, Dakar] et soniquées) vis-à-vis d'un antigène témoin (surnageant de cellules Vero E6 non infectées) et vis-à-vis d'un autre Phlébovirus présent en RCA, le virus St Floris, souche préparée dans les mêmes conditions. Le protocole de détection et de titrage a été identique à celui utilisé pour les Filovirus.

Les anticorps de type IgM ont été détectés sur les sérums dilués au 1:400 par immunocapture ELISA selon la technique décrite antérieurement par MORVAN *et al.* (45).

Le virus de la fièvre jaune

Les anticorps de type IgG ont été recherchés par technique ELISA indirecte sur microplaque où l'antigène (surnageant de

cellules Vero E6 infectées par la souche RCA/88.89 soniquées, inactivées par la β -propiolactone) a été préalablement adsorbé au moyen d'une immune ascite de souris. Le reste du protocole est identique à celui des Filovirus.

Les anticorps de type IgM ont été détectés par la technique d'immunocapture Mac-ELISA classique (38) recommandée par l'OMS. L'antigène utilisé est un broyat de cerveaux de souris nouveaux-nés infectés, fourni par le CRORA (Institut Pasteur, Dakar).

Les Hantavirus

Les anticorps spécifiques ont été recherchés par la technique ELISA décrite par IVANOV *et al.* (29) modifiée selon un protocole comparable à celui qui est utilisé pour les Filovirus. Les antigènes utilisés, fournis par le CDC d'Atlanta (Special Pathogens Branch, P. ROLLIN) sont des surnageants de cocultures de cellules Vero E6 infectées par les virus prototypes Hantaan (souche 76-118 Corée isolée d'un *Apodemus agrarius*), Seoul (souche 80-39 Seoul isolée d'un *Rattus norvegicus*), Puumala (souche Sotkamo isolée d'un *Clethrionomys glareolus*) et Thottapalayam (souche Thaïlande isolée d'un *Suncus*) et irradiées. Pour compléter la recherche d'anticorps dirigés contre les Hantavirus, une protéine recombinante *Escherichia coli* (fournie par le CDC d'Atlanta) a été utilisée pour la détection des anticorps anti-Sin Nombre.

Le virus Congo-CHF

En raison de l'absence de spécificité de la technique ELISA sandwich, due aux fréquentes réactions croisées vis-à-vis des autres *Nairovirus* présents en RCA, notamment avec le virus Dugbé (27), cet antigène n'a pas été étudié.

La technique d'immunofluorescence indirecte

Le virus Lassa

Elle a été utilisée pour la détection des anticorps de type IgG dirigés contre le virus Lassa. Il s'agit d'une technique dérivée de la méthode décrite par WULFF *et al.* (69), réalisée sur cellules Vero E6 infectées par la souche Josiah, irradiées par rayons gamma. Les sérums dont le titre était supérieur à 16 ont été considérés comme positifs.

Les Filovirus

Les sérums prélevés en 1995 sur le site de la Lobaye ont été testés en parallèle par la technique d'immunofluorescence mise au point par WULFF *et al.* (69), modifiée par JOHNSON *et al.* (30). Les lames contenant un mélange de cellules Vero E6 infectées par le virus Ebola (souche Ebola-Zaire Mayinga ou souche Ebola-Soudan Boniface) ou par le virus Marbourg (souche Musoki) et de cellules Vero E6 non infectées ont été fournies par J.P. GONZALEZ (Department of Epidemiology, Yale University, New Haven). Compte tenu de la faible spécificité de la technique, seuls les sérums dont le titre était supérieur ou égal à 64 ont été retenus.

Résultats

Les Filovirus (tableau I)

Des anticorps IgG anti-Ebola et anti-Marbourg ont été détectés dans les 4 zones de l'enquête. Globalement, 92 (5,95 %) des 1544 sérums testés étaient porteurs d'anticorps IgG anti-Ebola, et 31/1547 (2,01 %) porteurs d'anticorps IgG anti-Marbourg, en dehors de toute manifestation pathologique, dans les deux groupes de population et dans les quatre zones de l'enquête.

Tableau I.

Prévalence des anticorps de type IgG anti-Ebola et anti-Marbourg (sérum positifs avec titre 1 :400 en ELISA).
Prevalence of anti-Ebola and anti-Marburg IgG type antibodies.

| | Ebola | | Marbourg | |
|-----------------|-----------------|--------------------|-----------------|--------------------|
| | Pygmées nb % | Villageois nb % | Pygmées nb % | Villageois nb % |
| Lobaye 1995 | 25/192 (13,0) | 2/52 (3,8) | 10/192 (5,2) | 0/50 (-) |
| Lobaye 1997 | - | 21/205 (10,2) | - | 0/205 (-) |
| Belemboke 1992 | 7/360 (1,9) | - | 3/357 (0,8) | - |
| Belemboke 1994 | 16/132 (12,1) | 3/99 (3,0) | 1/132 (0,7) | 2/107 (1,8) |
| Bangassou 1995 | - | 8/226 (3,6) | - | 9/226 (3,9) |
| Nola 1995 | - | 10/278 (3,6) | - | 6/278 (2,2) |
| Kikwit RCD 1990 | - | 5/181 (2,8) | - | 1/181 (0,5) |
| Gordil RCA 1998 | - | 0/29 (-) | - | 0/29 (-) |
| Ngoïla Cam 1998 | - | 0/21 (-) | - | 0/21 (-) |

Pour le virus Ebola, au cours de la période 1994-1997, la séroprévalence des anticorps a été trouvée plus élevée chez les Pygmées (41/324; 12,65 %) que chez les Villageois (44/860; 5,1 %), ($p = 7.10^{-5}$). Dans chaque groupe, la séroprévalence était indépendante du sexe. A Belemboke, en l'absence de toute pathologie déclarée, on a pu observer une augmentation significative ($p = 0,003$) de la séroprévalence des anticorps entre 1992 (1,9 %) et 1994 (12,1 %). Pour ces mêmes sérums, la recherche des anticorps de type IgM est restée négative (données non publiées). Dans la Lobaye, l'enquête réalisée en 1997 chez les personnels d'une exploitation forestière et parmi la population villageoise qui l'entoure a montré une augmentation non significative ($p = 0,12$) de la séroprévalence par rapport à la situation observée dans la Lobaye en 1995. La séroprévalence dans les populations villageoises vivant dans les aires à faciès forestier dégradé (Nola, Bangassou) était comparable à celle observée en période inter-épidémique à Kikwit, dans un faciès phytogéographique superposable.

Les sérums prélevés en Lobaye en 1995 ($n = 244$) ont également été testés par technique d'immunofluorescence indirecte. Les résultats montrent alors une prévalence des anticorps anti-Ebola beaucoup plus élevée (83/244; 34 %) que par technique ELISA (27/244; 11,06 %). Elle est comparable dans les deux groupes de population et dans les deux sexes (résultats non présentés). Les résultats obtenus avec les deux méthodes sont très souvent discordants. La fréquence du portage des anticorps anti-Ebola détectés par immunofluorescence est en augmentation par rapport aux résultats des enquêtes antérieures réalisées par la même technique (tableau II).

Tableau II.

Prévalence des anticorps de type IgG anti-Ebola par immunofluorescence. Comparaison avec les enquêtes précédentes en République Centrafricaine.
Prevalence of anti-Ebola IgG type antibodies by immunofluorescence. Comparison with previous surveys in the Central African Republic.

| | nb sérums | % + | références |
|-----------------------|-----------|------|---------------------------|
| Bangassou 1979 | 499 | 3,4 | SALUZZO et al. 1980 (60) |
| RCA total 1982 | 1909 | 4,5 | GONZALEZ et al. 1983 (24) |
| Lobaye | 499 | 2,6 | " |
| Nola | 80 | 3,4 | " |
| RCA total 1984 | 296 | 2,6 | MEUNIER et al. 1987 (41) |
| RCA total 1985 | 659 | 22,0 | MEUNIER et al. 1987 (41) |
| Lobaye chasseurs 1987 | 127 | 24,0 | JOHNSON et al. 1993 (31) |
| Lobaye fermiers 1987 | 300 | 14,0 | " |
| Lobaye 1995 | 244 | 34,0 | |
| Pygmées | 192 | 34,4 | |
| Villageois | 52 | 32,7 | |

Pour le virus Marbourg, la séroprévalence est plus faible, retrouvée également dans les deux groupes de population.

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (tableau III)

Les résultats révèlent une séroprévalence globale de 6,9 % des anticorps de type IgG anti-RVF, variant de 3,1 % à 11,9 % suivant les sites, attestant de la circulation du virus RVF dans

Tableau III.

Séroprévalence des anticorps de type IgG et IgM anti-RVF et anti St Floris par ELISA.
Seroprevalence of anti-RVF and anti-St Floris IgG and IgM type antibodies by ELISA.

| | IgG RVF | | IgM RVF nb | IgG St Floris nb % |
|---------------------------|---------------|---|---------------|-----------------------|
| | nb | % | | |
| Lobaye 1995 Pygmées | 23/192 (11,9) | | 0/192 | 1/192 (0,5) |
| Lobaye 1995 Villageois | 6/52 (11,5) | | 0/52 | 0/52 |
| Lobaye 1997 Villageois | 21/205 (10,2) | | 0/205 | 1/205 (0,5) |
| Belemboke 1992 Pygmées | 11/360 (3,1) | | 0/360 | 0/360 |
| Belemboke 1994 Pygmées | 7/132 (5,3) | | 0/132 | 1/132 (0,7) |
| Belemboke 1994 Villageois | 9/107 (8,4) | | 0/107 | 0/107 |
| Bangassou 1995 Villageois | 18/226 (8,0) | | 0/226 | 1/226 (0,4) |
| Nola 1995 Villageois | 26/488 (5,3) | | 0/420 | 1/488 (0,2) |
| Gordil RCA 1998 | 3/29 (10,0) | | 0/29 | 0/29 |
| Ngoïla Cameroun 1998 | 0/21 | | 0/21 | 0/21 |

les différents écosystèmes forestiers étudiés. Cette circulation ne s'accompagne d'aucune manifestation pathologique et l'absence d'anticorps spécifiques de type IgM témoigne d'une situation non épidémique. Ces résultats obtenus par la technique ELISA montrent une prévalence des anticorps plus élevée que celle observée au cours des enquêtes précédentes qui faisaient appel à la technique d'immunofluorescence (tableau IV). La proportion des sujets séropositifs est comparable chez les Pygmées (41/684; 5,9 %) et chez les villageois (80/1078; 7,4%) ($p = 0,25$), ce qui suggère un risque identique d'exposition aux vecteurs entre les deux groupes de population dans le même écosystème. Le risque paraît plus élevé dans la région de la Lobaye (50/449; 11,1 %) que dans les autres sites étudiés (71/1313; 5,4 %) ($p = 6.10^{-4}$; ddl 3).

Par ailleurs, 5 sérums parmi les 1762 sérums testés ont été trouvés porteurs d'anticorps anti-St Floris et aucune réaction croisée entre les deux antigènes n'a été mise en évidence.

Tableau IV.

Prévalence des anticorps de type IgG anti-RVF par immunofluorescence. Comparaison avec les enquêtes précédentes en République Centrafricaine.
Prevalence of anti-RVF IgG type antibodies by immunofluorescence. Comparison with previous surveys in the Central African Republic.

| | nb | % + | référence |
|------------------------|------|------|---------------------------|
| RCA total 1979-1982 | 1909 | 1,2 | GONZALEZ et al. 1983 (24) |
| RCA total 1984-1985 | 836 | 0,35 | MEUNIER et al. 1987 (41) |
| Lobaye 1985 Villageois | 96 | 0 | " |
| Bangui 1985-1987 | 327 | 0 | GONZALEZ et al. 1989 (20) |

Le virus de la fièvre jaune (tableau V)

L'étude montre l'absence de circulation récente du virus amaril dans les 4 régions étudiées (absence d'anticorps de type IgM dans les 1 279 sérums testés). Les taux de prévalence des anticorps de type IgG observés dans les sites de la Lobaye et de Belemboke illustrent à la fois le faible niveau de transmission et l'absence de couverture vaccinale. La proportion élevée de sujets porteurs d'anticorps observée à Bangassou fait suite à une campagne récente de vaccination.

Tableau V.

Séroprévalence des anticorps anti-amarils de type IgG et IgM par ELISA.
Seroprevalence of IgG and IgM anti-amaril antibodies by ELISA.

| | IgG fièvre jaune | | IgM fièvre jaune nb |
|----------------------------|------------------|---|------------------------|
| | nb | % | |
| Lobaye 1995 Pygmées | 10/192 (5,2) | | 0/192 |
| Lobaye 1995 Villageois | 6/52 (11,5) | | 0/52 |
| Lobaye 1997 Villageois | 16/205 (7,8) | | 0/205 |
| Belemboke 1992 Pygmées | 13/313 (4,2) | | 0/322 |
| Belemboke 1994 Pygmées | 2/132 (1,5) | | 0/132 |
| Belemboke 1994 Villageois | 2/107 (1,8) | | 0/107 |
| Bangassou 1995 Villageois* | 96/184 (52,2) | | 0/184 |
| Nola 1995 Villageois | 34/278 (12,2) | | 0/278 |
| Gordil RCA 1998 | 2/29 (6,9) | | 0/29 |
| Ngoïla Cameroun 1998 | 4/21 (19) | | 0/21 |

* campagne de vaccination anti-amarile 4 mois avant les prélèvements

Les Hantavirus (tableau VI)

Dans toutes les zones étudiées, on note la présence d'une faible séroprévalence des anticorps anti-Hantaan. Globalement, 35 (2,01 %) des 1734 sérums testés réagissent avec l'antigène Hantaan par technique ELISA. La prévalence apparaît plus élevée dans le sexe féminin. Il n'a été retrouvé aucun anticorps dirigé contre les antigènes Seoul, Puumala et Thottapalayam. Par ailleurs, 10 sérums ont réagi avec la protéine recombinante Sin Nombre utilisée comme antigène, avec des titres élevés (1 : 1600 à 1 : 3200). Ces 10 sérums, confirmés au CDC d'Atlanta, ont été testés avec un antigène natif (lysate de cellules infectées par le virus Sin Nombre isolé d'un *Peromyscus maniculatus*) : ils ont tous été trouvés négatifs (P. ROLLIN, communication personnelle).

Tableau VI.

Séroprévalence (ELISA) des anticorps de type IgG dirigés contre les antigènes Hantavirus.
Sero prevalence (ELISA) of IgG antibodies against Hantavirus antigens.

| | Hantaan nb % | Seoul nb | Puumala nb | Thottapalayam nb |
|-------------------------|-----------------|-------------|---------------|---------------------|
| Lobaye 1995 Pygmées | 5/192 (2,6) | 0/192 | 0/192 | 0/192 |
| Lobaye 1995 Villageois | 1/52 (1,9) | 0/52 | 0/52 | 0/52 |
| Lobaye 1997 Villageois | 3/205 (1,5) | 0/205 | 0/205 | 0/205 |
| Belemboke 92 Pygmées | 7/351 (1,9) | 0/351 | 0/351 | 0/351 |
| Belemboke 94 Pygmées | 3/132 (2,3) | 0/132 | 0/132 | 0/132 |
| Belemboke 94 Villageois | 2/107 (1,9) | 0/107 | 0/107 | 0/107 |
| Bangassou 95 Villageois | 9/226 (3,9) | 0/226 | 0/226 | 0/226 |
| Nola 1995 Villageois | 5/469 (1,1) | 0/469 | 0/469 | 0/469 |
| Gordil RCA 1998 | 0/29 | 0/29 | 0/29 | 0/29 |
| Ngoila Cameroun 1998 | 0/21 | 0/21 | 0/21 | 0/21 |

Le virus Lassa

Aucun sérum testé n'a été trouvé porteur d'anticorps anti-Lassa.

Discussion

Les Filovirus

Les résultats obtenus au cours de cette enquête confirment la circulation des Filovirus en RCA, notamment la circulation du virus Ebola qui était soupçonnée depuis plusieurs années. Les résultats obtenus sur 244 sérums par la technique d'immunofluorescence ont montré que la séroprévalence des anticorps anti-Ebola était en augmentation par rapport aux données des enquêtes précédentes utilisant la même technique (20, 24, 31, 39, 60). Toutefois, cette méthode est considérée comme une méthode peu spécifique et n'a qu'une valeur présumptive. Pour cette enquête, nous avons utilisé la technique ELISA qui est actuellement reconnue comme ayant une meilleure sensibilité et une meilleure spécificité (5, 54) et qui est recommandée pour les enquêtes de terrain.

Le cycle naturel de ce virus demeure encore une énigme, mais plusieurs éléments sont en faveur de l'hypothèse d'un cycle péri-forestier. La séroprévalence significativement plus élevée chez les Pygmées ou parmi les populations vivant en lisière de forêt suggère l'existence d'une relation étroite entre la vie dans cet écosystème et le risque d'exposition au virus (26, 32). La mise en évidence récente de séquences virales chez des petits mammifères terrestres péri-forestiers de RCA par MORVAN *et al.* (44) est en faveur d'un cycle enzootique à partir duquel le virus est susceptible d'émerger en fonction de facteurs liés aux modifications de l'environnement ou des activités humaines.

Les données de la biologie moléculaire (15, 55) indiquent qu'il existe un groupe de souches spécifiques de l'Afrique centrale

(le sous-type Ebola-Zaire). L'histoire naturelle de ce virus semble marquée par une co-évolution ancienne entre le virus et son réservoir naturel.

Alors que les manifestations cliniques sont rares, les enquêtes sérologiques témoignent d'un niveau élevé de transmission dans les différents groupes de population étudiés. Cette constatation soulève la question de l'existence de souches virales enzootiques non pathogènes ou responsables d'infections subcliniques (3) transmises fréquemment à partir du réservoir infecté.

Les travaux en cours ont pour objectifs, d'une part d'identifier le ou les réservoirs de virus, d'autre part d'assurer une veille écologique et microbiologique indispensable pour déceler l'émergence du virus hors de son biotope naturel.

Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift

Dès 1969, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVF) a été isolé en RCA. Le virus Zinga, dont l'identité avec le virus RVF a été reconnue (14, 40), a d'abord été isolé chez *Mansonia africana* (10) dans la région forestière de la Lobaye, puis chez l'homme (11, 18). D'autres Phlébovirus, apparemment non pathogènes pour l'homme, ont été isolés à partir de rongeurs ou d'arthropodes (Arumowot, Gabek forest, Gordil et St Floris). Les différentes enquêtes sérologiques, utilisant les techniques d'immunofluorescence indirecte ou d'inhibition de l'hémagglutination (18, 24, 42) ont montré l'existence d'une faible séroprévalence chez l'homme, avant tout dans les zones de savane du nord à économie pastorale.

Cette étude, réalisée entre 1992 et 1997 dans les zones forestières du sud du pays, à l'écart des régions d'élevage, montre paradoxalement, en l'absence de toute manifestation pathologique déclarée, une séroprévalence relativement élevée des anticorps anti-RVF, plus élevée que celles observées au cours des enquêtes précédentes (19, 24, 41) qui faisaient appel à la technique d'immunofluorescence. Ces résultats soulèvent ainsi l'hypothèse d'un cycle selvatique de souches de virus RVF apparemment peu ou non pathogènes, susceptibles d'émerger et de contaminer l'homme, ou la possibilité de circulation d'autres Phlébovirus apparentés.

La technique d'immunofluorescence indirecte, seule praticable pour les enquêtes de masse à l'époque des enquêtes précédentes, a une spécificité médiocre et une faible sensibilité. Les réactions antigéniques croisées entre les différents Phlébovirus sont fréquentes et les tests sérologiques doivent être interprétés avec prudence. La technique ELISA utilisée dans cette étude présente l'avantage d'une bonne sensibilité et d'une bonne spécificité reconnues égales à celle de la neutralisation avec réduction de plages (35, 48). Pour augmenter la spécificité de la technique ELISA, nous avons adopté un seuil de positivité au 1 : 400 qui limite le risque de réaction croisée. Aucune réaction croisée avec l'antigène St Floris n'a été observée.

La RCA semble présenter deux situations épidémiologiques distinctes. Dans le nord du pays, zone d'élevage bovin et de migration de troupeaux à partir des zones enzootiques du sud Soudan, la circulation du virus RVF se fait à faible niveau chez l'homme et les animaux. Une tendance à l'augmentation de la séroprévalence, en rapport avec l'évolution du cheptel, avait été signalée par MATHIOT *et al.* (39). En 1998, la séroprévalence des anticorps anti-RVF de type IgG chez les bovins était de 2,3 % (MORVAN, données non publiées). En revanche, dans le sud du pays, en zone forestière tropicale humide, les résultats sérologiques évoquent une circulation permanente du virus dans un cycle selvatique. L'absence de formes cliniques pose le problème d'une circulation très active d'un virus non pathogène.

Les études moléculaires (58) ont montré l'existence de trois groupes de souches correspondant à des variants géographiques (Afrique de l'Ouest, Égypte et Afrique centrale et de l'Est). Elle ont permis aussi de détecter des réassortants qui suggèrent des échanges entre les groupes et la possible existence d'un cycle selvatique dans la forêt tropicale humide. Le virus RVF/Zinga, isolé il y a 30 ans en zone forestière, paraît être au centre du dispositif.

Ce cycle sauvage est mal connu et pose la question de la participation conjointe, à côté des arthropodes vecteurs comme *Mansonia africana* et les *Aedes* du groupe palpalis, d'un hôte réservoir sauvage. Plusieurs espèces de mammifères peuvent être infectés et présenter une virémie: des chauve-souris (47) ou des petits mammifères terrestres (56). Un programme de recherche du réservoir sauvage chez les micro-mammifères forestiers est en cours de développement à Bangui.

Le virus de la fièvre jaune

La RCA est une zone à risque de fièvre jaune. Les premières enquêtes sérologiques (9) ont montré l'existence d'un cycle sauvage à bas bruit, confirmé par l'isolement du virus amaril chez plusieurs espèces d'*Aedes* (16, 17). Deux cas humains ont été recensés en 1985 et 1986 (39) en lisière de forêt tropicale. Les zones décrites dans notre étude représentent typiquement le biotope du cycle selvatique de la fièvre jaune (forêt et galeries forestières de savane) où le virus est entretenu en équilibre entre les vecteurs sauvages (*Aedes africanus*) et les singes.

Dans les aires d'endémicité, le virus a généralement une faible virulence et les contacts avec l'homme sont peu fréquents, ce qui explique les faibles taux de séroprévalence observés. Les résultats obtenus au cours de notre enquête confirment la faible activité du virus amaril en RCA pendant la période 1992-1997. La séroprévalence est sensiblement plus élevée à Nola, proche des zones infectées d'Afrique centrale (49, 53) où la fièvre jaune est réapparue depuis 1994. Les manifestations cliniques observées dans l'aire d'endémicité sont le plus souvent discrètes, comme si les souches virales selvatiques avaient une pathogénicité moindre. Plusieurs études moléculaires ont mis en évidence l'existence de deux grands topotypes: le topotype africain (avec deux sous-groupes génomiques: Afrique de l'Ouest et Afrique centrale et de l'Est) et le topotype américain (6, 37, 67). Il semble que l'aptitude vectrice des *Aedes* soit variable selon la localisation géographique, ce qui pourrait aussi être une autre raison de la faible circulation du virus en RCA.

Depuis 1987, l'Afrique se trouve dans une période de grande activité pour la fièvre jaune et les zones d'émergence de forêt dégradée présentent un risque important d'émergence du virus amaril. La corrélation observée entre l'apparition des épidémies et la forte amplification du cycle sauvage justifie une veille microbiologique renforcée (57) dans le but de prévoir les émergences.

Les Hantavirus

L'extension des Hantavirus est peu ou mal connue en Afrique (62). Plusieurs enquêtes ont suggéré leur présence en Afrique de l'Ouest et en Afrique centrale (18, 22, 24, 36). Un cas humain de HFRS (fièvre hémorragique avec syndrome rénal) a été rapporté en RCA par COULAUD *et al.* (7) et attribué, sur la présence d'IgM, à un Hantavirus ou virus apparenté. Les résultats de notre étude sont également en faveur d'un faible niveau d'endémicité: 2,01 % des sérums testés réagissent avec l'antigène Hantaan par technique ELISA. En l'absence d'isolement, il est difficile de préciser l'identification du virus en circulation.

Les Hantavirus sont transmis par des petits mammifères de la famille des *Muridae* (*Apodemus agrarius* pour Hantaan, *Rattus norvegicus* pour Seoul, *Clethrionomys glareolus* pour Puumala) ou de la famille des *Insectivoridae* (*Suncus* pour Thottapalayam). L'absence de l'hôte réservoir originel du virus Hantaan et la très grande biodiversité animale dans les zones forestières étudiées posent la question de savoir si d'autres mammifères sont susceptibles de jouer le rôle du réservoir de virus. Certaines espèces ont été impliquées dans la transmission de virus Hantaan et de virus apparentés, comme les chauve-souris en Corée (34) ou *Rattus rattus* et *Mastomys* sp en Afrique (59).

Les anticorps détectés au cours des différentes enquêtes, quelle que soit la technique utilisée (immunofluorescence indirecte ou ELISA) peuvent témoigner de la présence d'un virus antigéniquement proche du virus Hantaan prototype ou de virus nouveaux, à l'instar de ce qui est observé sur le continent américain. GONZALEZ *et al.* (22) ont ainsi montré que les sérums réactifs en IFI ne sont pas neutralisés par le virus homologue, suggérant l'existence d'une infection par un virus apparenté. Les différentes techniques sérologiques mettent en évidence deux types de réactions croisées: le groupe Hantaan-Seoul et le groupe Puumala-Sin Nombre (12). Ce regroupement corrèle parfaitement avec la répartition phylogénique des Hantavirus ainsi qu'avec les réservoirs de virus (*Murinae* pour Hantaan et Seoul, *Arvicolinae* pour Puumala, *Sigmodontinae* pour Sin Nombre, *Insectivoridae* pour Thottapalayam) (62).

Les résultats obtenus avec le virus Sin Nombre, Hantavirus du Nouveau monde, doivent être pris avec précaution. Les résultats communiqués par le CDC (P. ROLLIN) démontrent qu'il s'agit probablement d'une réaction non spécifique avec la protéine recombinante *E. coli*. Cette réactivité, rarement retrouvée sur les sérums nord-américains, peut être expliquée par la forte prévalence des anticorps dirigés contre le LPS d'*E. coli* O157 dans la population générale de RCA (GERMANI, communication personnelle).

L'épidémiologie des Hantavirus est mal connue en RCA. Une enquête impliquant la recherche des anticorps anti-Hantavirus et la détection des génomes viraux par RT-PCR sur les organes de micro-mammifères est en cours pour confirmer la circulation de ce groupe de virus et identifier les réservoirs naturels locaux.

Le virus Lassa et les Arénavirus

Au sein des Arénavirus, l'analyse des caractères antigéniques et l'étude phylogénique des souches ont permis de distinguer le groupe des Arénavirus de l'Ancien monde ou "complexe des virus CML-Lassa" (4, 19) isolés en Afrique de l'Ouest et au Nigeria. Plusieurs Arénavirus de ce complexe, non pathogènes pour l'homme, sont présents chez les rongeurs en RCA: Ippy (8, 64) et Mobala (23, 25). Selon les enquêtes précédentes (20), le virus Lassa serait absent de RCA, ce que semble confirmer notre travail. Toutefois, la technique d'immunofluorescence indirecte habituellement utilisée pour les enquêtes manque de sensibilité et de spécificité (70). Il existe des réactions croisées entre les virus du complexe Lassa (28, 43).

La présence en RCA de *Praomys* et de *Mastomys*, hôtes réservoir du virus Lassa de répartition ubiquitaire et péri-domestique pour *Mastomys*, impose la prudence et la poursuite de la surveillance. Cette surveillance devra comprendre la réalisation d'enquêtes sérologiques chez l'homme et les rongeurs par technique ELISA (2, 65) et la détection du virus chez les rongeurs par technique moléculaire (4).

Conclusion

Plusieurs virus responsables de fièvres hémorragiques sont endémiques en RCA. Ils circulent de manière occulte dans les zones forestières du sud du pays d'où ils sont susceptibles d'émerger à tout moment. Ces constatations justifient la mise en place d'une veille microbiologique permanente.

Remerciements

Nous remercions P. ROLLIN (Special Pathogens Branch, CDC Atlanta, États-Unis) pour la fourniture des antigènes Hantavirus et le contrôle des sérums réactifs avec l'antigène Sin Nombre, W. SLENCZKA (Institute für Virologie, Marbourg, RFA) pour la fourniture des antigènes Ebola et Marbourg, et J.-P. GONZALEZ (IRD et Mahidol University, Nakhonpathom, Thaïlande) pour sa collaboration sur le terrain. Ce travail a été aidé par un financement de l'Union européenne (STD-3/TS3CT94-0286) et de l'Institut Pasteur.

Références bibliographiques

1. ABD EL-RAHIM IH, ABD EL HAKIM LI & HUSSEIN M – An epizootic of Rift Valley fever in Egypt in 1997. *Rev Sci Tech*, 1999, **18**, 741-748.
2. BAJANI MD, TOMORI O, ROLLIN PE, HARRY TO, BUKBUK ND *et al.* – A survey for antibodies to Lassa virus among health workers in Nigeria. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 1997, **91**, 379-381.
3. BECKER S, FELDMANN H, WILL C & SLENCZKA W – Evidence for occurrence of filovirus antibodies in human and imported monkeys: do subclinical filovirus infection occurs worldwide. *Med Microbiol Immunol*, 1992, **181**, 43-55.
4. BOWEN MD, PETERS CJ & NICHOL ST – The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*, 1996, **219**, 285-290.
5. BUSICO KM, MARSHALL KL, KSIAZEK TG, ROELS TH, FLEERACKERS Y *et al.* – Prevalence of IgG antibodies to Ebola in individuals during an Ebola outbreak, Democratic Republic of the Congo. *J Infect Dis*, 1999, **179S** (suppl 1), 102-107.
6. CHANG G-SJ, CROPP BC & KINNEY RM – Nucleotide sequence variation of the envelope protein gene identifies two distinct genotypes of yellow fever virus. *J Virology*, 1995, **69**, 5773-5780.
7. COULAUD X, CHOUAIB E, GEORGES AJ, ROLLIN P & GONZALEZ JP – First human case of haemorrhagic fever with renal syndrome in the Central African Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1987, **81**, 686.
8. DIGOUTTE JP – *Rapport Annuel de l'Institut Pasteur de Bangui*, 1970, 59.
9. DIGOUTTE JP – La fièvre jaune en Afrique centrale. *Cah ORS - TOM Sér Entomol Méd Parasitol*, 1972, **10**, 145-154.
10. DIGOUTTE JP, CORDELLIER R, ROBIN Y, PAJOT FX & GEOFFROY B – Le virus Zinga (ArB 1976) nouveau prototype d'arbovirus isolé en République Centrafricaine. *Ann Inst Pasteur*, 1974, **125B**, 107-118.
11. DIGOUTTE JP, JACOBI JC, ROBIN Y & CAGNARD VJ – Infection à virus Zinga chez l'homme. *Bull Soc Pathol Exot*, 1974, **67**, 451-457.
12. ELGH F, LUNKVIST A, ALEXEYEF OA, STENLUND H, AVSIC-ZUPANC T *et al.* – Serological diagnosis of hantavirus infection by an enzyme-linked immunosorbent assay based on detection of immunoglobulin G and M responses to recombinant nucleocapsid protein of five viral serotypes. *J Clin Microbiol*, 1997, **35**, 1122-1130.
13. ELLIOTT LH, BAUER SP, PEREZ-ORONNOZ G & LLOYD ES – Improved specificity of testing methods for filovirus antibodies. *J Virol Methods*, 1993, **43**, 85-100.
14. GEORGES AJ, ABDUL-WAHID S, MEUNIER DMY, GEORGES MC, SALUZZO JF *et al.* – Serological equivalence of endemic Zinga virus and Rift Valley Fever in Central African Republic. *Lancet*, 1983, **I**, 1138.
15. GEORGES-COURBOT MC, SANCHEZ A, LU CY, BAIZE S, LEROY EM *et al.* – Isolation and phylogenetic characterization of Ebola virus causing different outbreaks in Gabon. *Emerg Infect Dis*, 1997, **3**, 59-62.
16. GERMAIN M, HERVE JP, SUREAU P, FABRE J, ROBIN Y & GEOFFROY B – Une souche de virus amaril isolée d'*Aedes (St) opok* (Corbet et van Someren), en RCA. *Cah ORSTOM, Sér Entomol Méd Parasitol*, 1976, **14**, 101-104.
17. GERMAIN M, SUREAU P, HERVE JP, FABRE J & MOUCHET J – Isolement du virus de la fièvre jaune à partir d'*Aedes* du genre *A. africanus* (Theobald) en RCA. Importance des savanes humides et semi-humides en tant que zones d'émergence du virus amaril. *Cah ORSTOM, Sér Entomol Méd Parasitol*, 1976, **14**, 125-139.
18. GONZALEZ JP, BOUQUETY JC, LESBORDES JL, MADELON MC, MATHIOT CC *et al.* – Rift Valley fever as haemorrhagic fever in the Central African Republic. *Ann Inst Pasteur/Virol*, 1987, **138**, 385-390.
19. GONZALEZ JP, GEORGES AJ, KILEY MP, MEUNIER DMY, PETERS CJ & McCORMICK JB – Evolutionary biology of Lassa virus complex. *Med Microbiol Immunol*, 1986, **175**, 157-159.
20. GONZALEZ JP, JOSSE R, JOHNSON ED, MERLIN M, GEORGES AJ *et al.* – Antibody prevalence against haemorrhagic fever viruses in randomized representative central african populations. *Res Virol*, 1989, **140**, 319-331.
21. GONZALEZ JP, MATHIOT CC, BOUQUETY JC, DIEMER JM, GUERRE L *et al.* – Status of hantavirus in the Central African Republic. *Ann Inst Pasteur/Virol*, 1988, **139**, 301-304.
22. GONZALEZ JP, McCORMICK JB, BAUDON D, GAUTON JC, MEUNIER DMY *et al.* – Serological evidence for Hantaan-related virus in Africa. *Lancet*, 1984, **II**, 1036-1037.
23. GONZALEZ JP, McCORMICK JB, GEORGES AJ & KILEY MP – Mobala virus: biological and physico-chemical properties of a new arenavirus isolated in the Central African Republic. *Ann Inst Pasteur/Virol*, 1984, **135E**, 145-158.
24. GONZALEZ JP, McCORMICK JB, SALUZZO JF & GEORGES AJ – Les fièvres hémorragiques africaines d'origine virale, contribution à leur étude en République Centrafricaine. *Cah ORSTOM, Sér Entomol Méd Parasitol*, 1983, **21**, 119-130.
25. GONZALEZ JP, McCORMICK JB, SALUZZO JF, HERVE JP, GEORGES AJ & JOHNSON KM – An arenavirus isolated from wild caught rodents (*Praomys* sp.) in the Central African Republic. *Intervirology*, 1983, **19**, 105-112.
26. GONZALEZ JP, NAKOUNNE E, SLENCZKA W, VIDAL P & MORVAN JM – Ebola and Marburg virus antibody prevalence in selected populations of the Central African Republic. *Microbes Infect*, 2000, **2**, 39-44.
27. GUILHERME JM, GONELLA-LEGALL C, LEGALL F, NAKOUNNE E & VINCENT J – Seroprevalence of five arboviruses in Zebu cattle in the Central African Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1996, **90**, 31-33.
28. HOWARD CR & YOUNG PR – Variation among New and Old World arenaviruses. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1984, **78**, 299-306.
29. IVANOV AP, TKACHENKO EA, PETROV VA, PASHKOV AJ, DZAGUROVA TK *et al.* – Enzyme immuno assay for the detection of virus-specific IgG and IgM antibody in patients with haemorrhagic fever with renal syndrome. *Arch Virol*, 1988, **100**, 1-7.
30. JOHNSON KM, ELLIOT LH & HEYMANN DL – Preparation of polyvalent immunofluorescent intracellular antigen and use in human serosurvey. *J Clin Microb*, 1981, **5**, 527-529.
31. JOHNSON ED, GONZALEZ JP & GEORGES AJ – Hemorrhagic fever virus activity in equatorial Africa: distribution of filovirus reactive antibody in the Central African Republic. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993, **87**, 530-532.
32. JOHNSON ED, GONZALEZ JP & GEORGES AJ – Filovirus activity among selected ethnic groups inhabiting the tropical forest of equatorial Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1993, **87**, 536-538.
33. JOUAN A, COULIBALY I, ADAM F, PHILIPPE B, RIOU O *et al.* – Analytical study of a Rift Valley fever epidemic. *Res Virol*, 1990, **141**, 175-186.
34. KIM GR, LEE YT & PARK CH – A new reservoir of Hantavirus: isolation of Hantaviruses from lung tissues of bats. *Arch Virol*, 1994, **134**, 85-95.
35. KSIAZEK TG, JOUAN A, MEEGAN JM, LE GUENNO B, WILSON ML *et al.* – Rift Valley fever among domestic animals in the recent West african outbreak. *Res Virol*, 1989, **140**, 57-67.
36. LEE PW, GIBBS CJ & SVEDMYR A – Antibody to Korean haemorrhagic fever virus in man in parts of the world where haemorrhagic fever with renal syndrome is not known. *Lancet*, 1981, **II**, 240-256.
37. LE PINIEC L, DALGARNO L, HUONG VTQ, MONATH TP, DIGOUTTE JP & DEUBEL V – Geographic distribution and evolution of yellow fever virus based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J Gen Virol*, 1994, **75**, 417-423.
38. LHUILLIER M & SARTHOU JL – Intérêt des IgM anti-amariles dans le diagnostic et la surveillance épidémiologique de la fièvre jaune. *Ann Inst Pasteur/Virol*, 1983, **134**, 349-359.
39. MATHIOT CC, GONZALEZ JP & GEORGES AJ – Problèmes actuels des arboviroses en Centrafrique. *Bull Soc Pathol Exot*, 1988, **81**, 396-401.

40. MEEGAN JM, DIGOUTTE JP, PETER CJ & SHOPE RE – Monoclonal antibodies to identify Zinga virus as Rift Valley fever virus. *Lancet*, 1983, **1**, 64.
41. MEUNIER DMY, JOHNSON ED, GONZALEZ JP, GEORGES-COURBOT MC & GEORGES AJ- Données sérologiques actuelles sur les fièvres hémorragiques virales en République Centrafricaine. *Bull Soc Pathol Exot*, 1987, **80**, 51-61.
42. MEUNIER DMY, MADELON MC, LESBORDES JL & GEORGES AJ - La fièvre de la Vallée du Rift et les phléboviroses en République Centrafricaine. *Bull Soc Pathol Exot*, 1988, **81**, 49-57.
43. MEUNIER DMY, McCORMICK JB, GEORGES AJ, GEORGES MC & GONZALEZ JP - Comparison of Lassa, Mobala, Ippy virus by immunofluorescent test. *Lancet*, 1985, **1**, 873-874.
44. MORVAN JM, DEUBEL V, GOUNON P, NAKOUNNE E, BARRIERE P *et al.* – Identification of Ebola virus sequences present as RNA or DNA in organs of terrestrial small mammals of the Central African Republic. *Microbes Infect*, 1999, **1**, 1193-1201.
45. MORVAN JM, SALUZZO JF, FONTENILLE D, ROLLIN PE & COULANGES P - Rift Valley fever in the east coast of Madagascar. *Res Virol*, 1991, **142**, 475-482.
46. NICKLASSON B, PETERS CJ, GRAUDIEM M & WOOD O - Detection of human immunoglobulines G and M antibodies to Rift Valley fever by enzyme linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol*, 1984, **2**, 225-229.
47. OELOFSEN MJ & VAN DER RYST E – Could bats act as reservoir host for Rift valley fever virus? *Onderstepoort J Vet Res*, 1999, **66**, 51-54.
48. ORGANISATION MONDIALEDELASANTE – La fièvre de la vallée du Rift : un problème naissant pour l'homme et l'animal. *OMS, publications Offset*, 1982, **63**, 75pp.
49. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE - Fièvre jaune, Gabon. *Rapp épidémiol hebd*, 1995, **70**, 163-164.
50. ORGANISATIONMONDIALE DELASANTE – Fièvre hémorragique Ebola, Zaïre. *Rapp épidémiol hebd*, 1995, **70**, 241-242.
51. ORGANISATIONMONDIALE DELASANTE – Épidémie de fièvre hémorragique à virus Ebola au Gabon officiellement déclarée terminée. *Rapp épidémiol hebd*, 1996, **71**, 125-126.
52. ORGANISATION MONDIALE DELA SANTE – Épidémie de fièvre de la vallée du Rift en Afrique de l'Est, 1997-98. *Rapp épidémiol hebd*, 1998, **73**, 105-112.
53. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE – Fièvre jaune, 1996-1997. *Rapp épidémiol hebd*, 1998, **73**, 353-360.
54. PETERS CJ & LEDUC JW – An introduction to Ebola: the virus and the disease. *J Infect Dis*, 1999, **179** (suppl 1), ix-xvi.
55. PISANO MR, DURAND JP & TOLOU H – Partial genomic sequence determination of yellow fever virus strain associated with a recent epidemic in Gabon. *Acta Virol*, 1996, **40**, 103-105.
56. PRETORIUS A, OELOFSEN MJ, SMITH MS & VAN DER RYST E - Rift Valley fever virus: a seroepidemiologic study of small terrestrial vertebrates in South Africa. *Am J Trop Med Hyg*, 1997, **57**, 693-698.
57. ROBERTSON SE, HULL BP, TOMORI O, BELE O, LEDUC JW & ESTEVES K - Yellow fever: a decade of reemergence. *JAMA*, 1996, **276**, 1157-1162.
58. SALL AA, ZANOTTO PM, SENE OK, ZELLER H, DIGOUTTE JP *et al.* – Genetic reassortment of Rift valley fever virus in nature. *J Virol*, 1999, **73**, 8196-8200.
59. SALUZZO JF, DIGOUTTE JP, ADAM F, BAUER SP & McCORMICK JB – Serological evidence for Hantaan-related virus infection in rodents and man in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 1985, **79**, 874-875.
60. SALUZZO JF, GONZALEZ JP, GEORGES AJ & JOHNSON KM - Note préliminaire sur la présence des anticorps vis-à-vis du virus Ebola parmi les populations du sud-est de la République Centrafricaine. *Bull Soc Pathol Exot*, 1980, **73**, 238-241.
61. SANDERS EJ, MARFIN AA, TURKEI PM, KURIA G, ADEMBA G *et al.* – First recorded outbreak of yellow fever in Kenya, 1992-1993. I. Epidemiologic investigations. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59**, 644-649.
62. SCHMALJOHN C & HJELLE B – Hantavirus: a global disease problem. *Emerg Infect Dis*, 1997, **3**, 95-103.
63. SUREAU JP, CORNET JP, GERMAIN M, CAMICAS JL & ROBIN Y – Enquête sur les arbovirus transmis par les tiques en République Centrafricaine (1973-1974). Isolement des virus Dugbe, CHF-Congo, Jos et Bhanja. *Bull Soc Pathol Exot*, 1976, **69**, 28-33.
64. SWANEPOEL R, LEMAN PA, SHEPERD AJ, SHEPERD SP, KILEY MP & McCORMICK JB – Identification of Ippy as a Lassa fever-related virus. *Lancet*, 1985, **1**, 639.
65. TER MEULEN J, KOULEMOU K, WITTEKINDT T, WINDISCH K, STRIGL S *et al.* – Detection of Lassa virus antinucleoprotein immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies by a simple recombinant immunoblot assay for field use. *J Clin Microbiol*, 1998, **36**, 3143-3148.
66. THONNON J, FONTENILLE D, TALL A, DIALLO M, RENAUDINEAU Y *et al.* – Re-emergence of yellow fever in Senegal in 1995. *Am J Trop Med Hyg*, 1998, **59**, 108-114.
67. TOULOU H, PISANO MR & DURAND JP – Epidémiologie moléculaire de la fièvre jaune. *Méd Trop*, 1998, **58** (supp 2), 37-41.
68. VICENS R, ROBERT V, PIGNON D, ZELLER H, GHIPPONI PM & DIGOUTTE JP – Yellow fever epidemic in the extreme North of Cameroon in 1990: first yellow fever virus isolation in Cameroon. *Bull OMS*, 1993, **71**, 173-176.
69. WULFF H & JOHNSON KM - Indirect immunofluorescence for the diagnosis of Lassa fever infection. *Bull OMS*, 1975, **52**, 429-436.
70. WULFF H, McINTOSH BM, HAMNER DM & JOHNSON KM – Isolation of an arenavirus closely related to Lassa virus from *Mastomys natalensis* in South-East Africa. *Bull OMS*, 1977, **55**, 441-444.