

BILAN DE DIX ANNÉES DE SURVEILLANCE DE LA RAGE DANS DES COLONIES ESPAGNOLES DE CHIROPTÈRES *

**Blanca Amengual¹, Jordi Serra-Cobo², Laurent Audry¹,
Florence Larrous¹ et Hervé Bourhy¹**

RESUME : La rage est une zoonose due à l'infection par les Lyssavirus. Ces virus infectent le système nerveux central chez l'homme et aussi chez de nombreux autres mammifères dont les chauves-souris. De 1992 à 2001, 1081 sérums, 27 culots de sang et 107 cerveaux ont été obtenus à partir de 14 espèces de chauves-souris en Espagne. La présence d'anticorps spécifiques anti-EBL1 a été détectée chez plusieurs espèces d'entre elles (*Myotis myotis*, *Miniopterus schreibersii*, *Tadarida teniotis* et *Rhinolophus ferrumequinum*) en Aragon et dans les Iles Baléares. Des échantillons de cerveau, culot de sang, poumon, cœur, langue et œsophage-larynx-pharynx de *M. myotis*, *M. nattereri*, *R. ferrumequinum* et *M. schreibersii* ont aussi été trouvés positifs par RT-PCR. Les résultats ont été confirmés par séquençage. Durant ces 10 années, la séroprévalence a été plus particulièrement suivie dans deux colonies de chauves-souris de Majorque. La variation significative de la séroprévalence enregistrée dans l'une d'entre elles est en faveur du passage périodique du virus. Certains animaux séropositifs et bagués ont été recapturés durant plusieurs années indiquant que l'infection de certaines chauves-souris par EBL1 n'est pas létale.

SUMMARY : Rabies is a worldwide zoonosis due to lyssavirus infection with multiple host species acting as reservoir. It infects the central nervous system of humans and other mammals including bats. Between the years 1992 to 2001, 1081 sera, 27 blood pellets and 107 brains were obtained from 14 bat species in Spain. Specific anti-EBL1 neutralizing antibodies have been detected in *Myotis myotis*, *Miniopterus schreibersii*, *Tadarida teniotis* and *Rhinolophus ferrumequinum* in the region of Aragon and the Balearic Islands. Positive results were also obtained by nested RT-PCR on brain, blood pellet, lung, heart, tongue and esophagus-larynx-pharynx of *M. myotis*, *Myotis nattereri*, *R. ferrumequinum* and *M. schreibersii*. The determination of the nucleotide sequence confirmed the presence of EBL1 RNA in the different tissues. In one colony, the prevalence of seropositive bats over time corresponded to an asymmetrical curve with a sudden initial increase peaking at 60% of the bats, followed by a gradual decline. Banded seropositive bats were recovered during several years indicating that EBL1 infection in these bats was non-lethal. At least one of this species (*M. schreibersii*) has a migratory behavior and could be one of the responsible of the dissemination of EBL1 on both shores of Mediterranean Sea.



* Communication présentée lors des Journées AEEMA-AESA, 22-23 mai 2003

¹ Laboratoire de la rage, Institut Pasteur, 25 rue du Docteur Roux, 75015 Paris, France

² Instituto Pirenaico de Ecología (CSIC), av. Montañana, 177, apdo.202, 50080 Zaragoza, Espagne

I - INTRODUCTION

La rage est une zoonose due à l'infection par les Lyssavirus. Les espèces animales hôtes qui agissent comme réservoir sont nombreuses. Ces virus infectent le système nerveux central chez l'homme et aussi chez de nombreux autres mammifères. Les chauves-souris ne font pas exception. Les cas de rage chez les Chiroptères représentent moins de 5% des cas de rage animale répertoriés dans le monde. Cependant, les analyses phylogéniques distinguent sept génotypes parmi les lyssavirus infectant les Chiroptères. Le passage de trois des six génotypes de lyssavirus de Chiroptères aux animaux non volants (en particulier à des carnivores domestiques et sauvages) est décrit. De même, le passage de ces virus de l'animal à l'homme est documenté pour cinq des six génotypes de lyssavirus de Chiroptères. Ils représentent donc un risque pour la santé publique. En Europe, 630 cas ont été détectés de 1977 à 2000 [Muller, 2000]. Des études moléculaires distinguent, parmi les lyssavirus qui causent la rage des chauves-souris européennes, les génotypes 5 et 6 [Bourhy *et al.*, 1992 ; Bourhy *et al.*, 1993], qui correspondent respectivement à *European Bat Lyssavirus 1* (EBLV1) et à EBLV2 [Amengual

et al., 1997]. Quatre cas humains (deux dus à EBLV1 et deux dus à EBLV2) ont été répertoriés depuis 1985. Cette enzootie rabique atteint de nombreux pays européens et on peut suspecter que la totalité de l'Europe soit touchée. La grande majorité des diagnostics positifs a été effectuée sur des chauves-souris insectivores appartenant aux Genres *Eptesicus* (*Eptesicus serotinus*), *Myotis* (*Myotis myotis*, *M. daubentoni* et *M. dasycneme*) et *Pipistrellus* (*Pipistrellus pipistrellus* et *P. nathusii*). Quatre-vingt quinze pourcent des cas répertoriés correspondent à l'espèce de chauve-souris non migratrice *Eptesicus serotinus* [Muller, 2000] qui ne peut expliquer la dispersion des différents isolats dans toute l'Europe. En Espagne, le premier isolat EBL fut identifié à Valence en 1987.

Pour mieux connaître la circulation des lyssavirus dans les colonies naturelles de chauves-souris et identifier le rôle des différentes espèces de Chiroptères dans cette circulation, une étude pluridisciplinaire rassemblant des spécialistes de l'écologie des chauves-souris et des virologistes a débuté il y a 10 ans en Espagne. Les résultats de cette étude sont présentés dans cet article.

II - MATERIEL ET METHODES

Les régions autonomes d'Espagne principalement étudiées ont été : Aragon, îles Baléares, Catalogne et Valence (figure 1). Les critères de sélection des localités ont tenu compte des aspects épidémiologiques, écologiques et éthologiques des espèces.

Les prises de sang ont été réalisées à une veine de l'aile. Après la centrifugation, sérums et culots de sang ont été stockés à -20°C.

La technique utilisée pour la détection des anticorps anti EBL a été la séroneutralisation [Bourhy *et al.*, 1990].

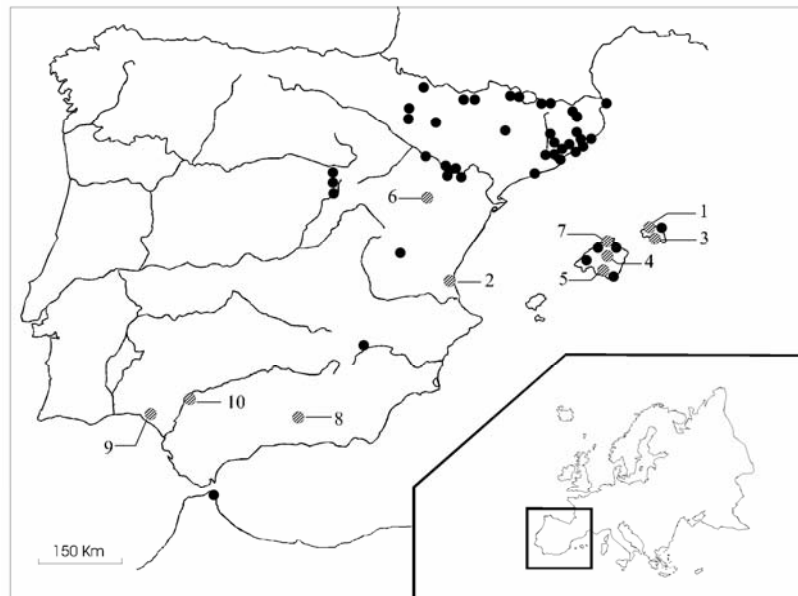
La technique utilisée pour détecter la présence d'antigènes viraux a été détectée par immunofluorescence.

La détection des ARN EBL1 a été entreprise par extraction des ARN totaux, synthèse d'ADN complémentaire, amplification génétique par PCR, deuxième amplification par PCR nichée et finalement séquençage selon le protocole de Applied Biosystems. Les alignements multiples des séquences ont été générés avec le logiciel Clustal W 1,60. [Tordo *et al.*, 1986 ; Kwok *et al.*, 1989 ; Thompson *et al.*, 1994 ; Amengual *et al.*, 1997 ; Crepin *et al.*, 1998 ; Serra-Cobo *et al.*, 2002].

Figure 1

La carte montre les localités d'Espagne où les chauves-souris ont été analysées.

1. Ciutadella ; 2. El Saler ; 3. Ferreries ; 4. Inca ; 5. Lluçmajor ; 6. Oliete ; 7. Pollença ; 8. Granada ; 9. Huelva ; 10. Sevilla. Les cercles rayés indiquent les colonies où les résultats ont été positifs selon notre étude (localités n° 1, 3, 4, 5, 6 et 7) et selon des études précédentes (localités n° 2, 8, 9 et 10) [Sánchez-Serrano, 1999].



III - RESULTATS

De 1992 à 2001, 1081 sérums, 122 culots de sang et 107 cerveaux ont été obtenus à partir de 14 espèces de chauves-souris en Espagne (tableau I). La présence d'anticorps spécifiques anti-EBL1 a été détectée chez

plusieurs espèces d'entre elles (*Myotis myotis*, *Miniopterus schreibersii*, *Tadarida teniotis* et *Rhinolophus ferrumequinum*) en Aragon et dans les îles Baléares.

Tableau I
Nombre d'échantillons analysés par espèce et année^a

Species	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	Total
<i>R. ferrumequinum</i>		8				9		11/1	30/3	21/3	58/6
<i>R. euryale</i>		6			10						16
<i>R. hipposideros</i>				16		0/1					16/1
<i>P. pipistrellus</i>	61	64	75	18	13/6	0/16	0/14	3/15			234/5
<i>P. kulhii</i>				1							1
<i>E. serotinus</i>	21		44	33/1	1						99/1
<i>M. myotis</i>		1		63	65	44	29/2	58/8	35/9	33/1	295/15
<i>M. blythi</i>		20	1	2							23
<i>M. nattereri</i>		1					0/1		0/1		1/2
<i>M. capaccinii</i>						3				1/3	3
<i>M. emarginatus</i>				9		7/2					16/2
<i>P. austriacus</i>			3	6	2/4			1			12/4
<i>Mi. schreibersii</i>	8	18			14	8	9/2	70/6	41/1	50/9	168/9
<i>T. teniotis</i>					22	12					34
Total	90	118	123	148/1	127/11	83/22	38/19	143/30	106/8	105/16	1081/107

^aDans les fractions (x/y), le numérateur (x) correspond au nombre de sérums analysés et le dénominateur (y) au nombre de carcasses analysées.

E= *Eptesicus* ; M= *Myotis* ; P= *Plecotus* ; R= *Rhinolophus* ; T= *Tadarida* ; Mi= *Miniopterus*

Des échantillons de cerveau, culot de sang, poumon, cœur, langue et œsophage-larynx-pharynx de *M. myotis*, *M. nattereri*, *R. ferrumequinum* et *M. schreibersii* ont aussi été trouvés positifs par nRT-PCR. Les résultats ont été confirmés par séquençage. Tous les cerveaux ont été analysés par immunofluorescence et ont été trouvés négatifs.

En fonction des résultats obtenus, des études plus précises ont été entreprises aux Îles Baléares (tableau II). Durant sept années, la séroprévalence a été suivie dans cinq colonies. Dans deux de ces colonies (Inca et Lluçmajor) localisées dans l'île de Majorque, une variation significative du pourcentage de

séropositifs a été obtenue (figure 2). Dans la colonie N° 4 (Inca), le pourcentage de chauves-souris séropositives a augmenté de 3,3% en 1995 à 59,3% en 1996. Ce pourcentage a diminué ensuite jusqu'en 1999 (10%). Ce pourcentage est resté stable en 2000, et a augmenté à nouveau en 2001. En ce qui concerne la localité N° 5 (Lluçmajor), le pourcentage de chauves-souris séropositives est resté stable de 1995 à 2001.

Certains animaux séropositifs et bagués ont été recapturés durant plusieurs années, ce qui indique que l'infection de certaines chauves-souris par EBL1 n'est pas létale (tableau III).

Tableau II
Pourcentages de sérums positifs aux Îles Baléares

Île	Localité	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
Minorque	Ferrières					3%	0	3%
						<i>M.schr</i>	<i>M.schr</i>	<i>M.schr</i>
	Ciutadella			20%		0	5%	0
				<i>R.ferrum</i>		<i>R.ferrum</i>	<i>R.ferrum</i>	<i>R.ferrum</i>
Majorque	Lluçmajor	33%	22%	18%	43%	18%	0	30%
		<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>
	Inca	3%	59%	41%	32%	10%	10%	38%
		<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>	<i>M.my</i>
	Pollença		14%			1%		
			<i>M.schr</i>			<i>M.schr</i>		

M.schr = *Miniopterus schreibersii* ; *R.ferrum* = *Rhinolophus ferrumequinum* ; *M.my* = *Myotis myotis*

Figure 2

Incidence de *Myotis myotis* séropositives dans les colonies d'Inca et Lluçmajor (Majorque) de 1995 à 2001

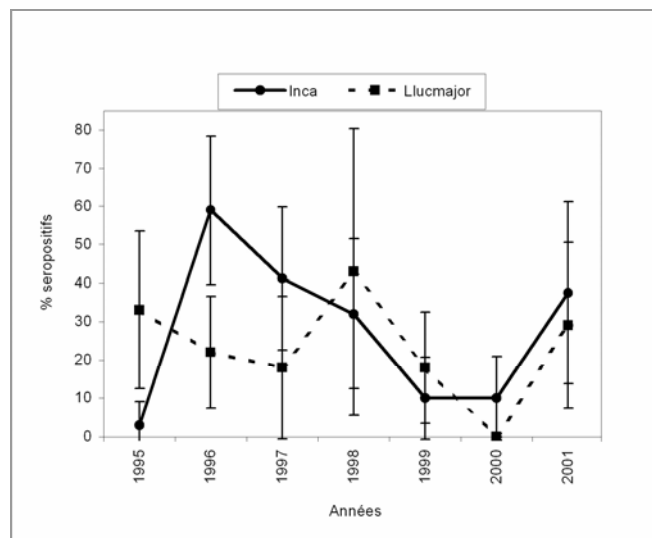


Tableau III
Animaux séropositifs, bagueés et recapturés

Espèce	Sexe	Localité	Date	Anticorps	Date de recapture	Anticorps
<i>R.ferrumequinum</i>	F	Ciudadella	2000	34	2001	0
<i>M.myotis</i>	F	Inca	1997	29,3	2001	0
<i>M.myotis</i>	F	Inca	1997	783,2	2001	31,3
<i>M.myotis</i>	F	Inca	1997	0	2001	35,5
<i>M.myotis</i>	F	Inca	2000	29	2001	38,75
<i>M.myotis</i>	F	Inca	2000	0	2001	40,45

IV – DISCUSSION

Ce travail décrit la première détection de la présence d'anticorps spécifiques dirigés contre EBL1 dans quatre espèces de chauves-souris insectivores européennes : *M. myotis*, *M. schreibersii*, *T. teniotis* et *R. ferrumequinum*.

La distribution de *T. teniotis* et *M. schreibersii* au sud-est de l'Europe et au nord de l'Afrique [Serra-Cobo, 1989 ; Aulagnier *et al.*, 1986] peut contribuer à la dispersion d'EBL1 dans le sud de l'Europe. Ce résultat concorde avec la possible origine africaine des EBL1 suggérée par Amengual *et al.* en 1997.

Ces données sérologiques sont complétées par la détection d'ARN d'EBL1 par nRT-PCR dans plusieurs tissus (cerveau, culot de sang, poumon, cœur, langue et œsophage-larynx-pharynx) de quatre *M. myotis*, un *M. nattereri*, un *M. schreibersii* et deux *R. ferrumequinum*. Ces résultats sont en faveur de l'existence d'une infection réduite ou peu productive. Des ARN viraux ont été détectés chez des chauves-souris cliniquement normales. La recapture de chauves-souris séropositives, après plusieurs années, indique qu'elles survivent à l'infection par EBL1. La détection de séquences d'EBL1 dans les culots de sang (11 sur 122) montre que cette technique peut être utilisée pour le suivi épidémiologique des colonies de chauves-souris. Des travaux publiés en 1998 et traitant de cas d'infection asymptomatique chez des chauves-souris de zoos [Ronsholt *et al.*, 1998] soulignaient aussi

la difficulté de détecter des cas d'infection cliniquement silencieuse seulement par immunofluorescence.

La sensibilité des différents espèces de chauves-souris européennes à l'infection par EBL dépend probablement de l'animal et du virus impliqué. Le tableau IV [Muller, 2000 ; Amengual *et al.*, 1997 ; Pérez-Jordá *et al.*, 1995 ; Kappeler, 1989 ; Bruyère *et al.*, 2000] présente les espèces de chauves-souris infectées ainsi que le type de virus ou d'anticorps détecté. Ce tableau contraste avec les données issues du diagnostic de la rage qui indiquent que 95 % des cas sont obtenus chez l'espèce *Eptesicus serotinus*. La circulation des EBL semble impliquer de nombreuses autres espèces. Le rôle de chacune d'entre elles dans l'entretien des cycles épidémiologiques dus à EBLV1 et 2 reste à déterminer.

La circulation d'EBL1 dans plusieurs colonies sauvages de chauves-souris a d'importantes implications pour la santé publique. La probabilité d'infection de l'homme par EBL1, sans doute faible d'après les analyses rétrospectives de cas humain, reste néanmoins inconnue. L'entrée des touristes et spéléologues dans certains refuges a été limitée aux périodes durant lesquelles les chauves-souris en sont absentes.

Tableau IV
Espèces de chauves-souris infectées par des Lyssavirus, Europe, 1954-2000

Family	Species	Lyssavirus ^a	Anticorps ^b
Vespertilionidae	<i>Eptesicus serotinus</i>	EBL1	EBL1
	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	NC	ND
	<i>Pipistrellus nathusii</i>	NC	ND
	<i>Vespertilio murinus</i>	EBL1	ND
	<i>Myotis dasycneme</i>	EBL2	ND
	<i>Myotis daubentonii</i>	EBL2	ND
	<i>Myotis myotis</i>	EBL1	EBL1
	<i>Myotis nattereri</i>	EBL1	ND
	<i>Nyctalus noctula</i>	NC	ND
	<i>Miniopterus schreibersii</i>	EBL1	EBL1
	<i>Tadarida teniotis</i>	NC	EBL1
Molossidae			
Rhinolophidae	<i>Rhinolophus ferrumequinum</i>	EBL1	EBL1

^aNC = not characterized^bND = not done

BIBLIOGRAPHIE

- Amengual B., Whitby J.E., King A., Serra-Cobo J., Bourhy H. - Evolution of European bat Lyssaviruses. *J. Gen. Virol.*, 1997, **78**, 2319-2328.
- Aulagnier S., Thevenot M. - Catalogue des Mammifères sauvages du Maroc. Rabat-Agdal, Maroc : Travaux de l'Institut Scientifique, Série Zoologique ; 1986.
- Bourhy H., Kissi B., Lafon M., Sacramento D., Tordo N. - Antigenic and molecular characterization of bat rabies virus in Europe. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, **30**, 2419-26.
- Bourhy H., Kissi B., Tordo N. - Molecular diversity of the lyssavirus genus. *Virology*, 1993, **194**, 70-81.
- Bruyère V., Janot C. - La France bientôt indemne de rage. *Bulletin Epidémiologique Mensuel de la Rage en France*, 2000, **30**, 1-17.
- Crepin P., Audry L., Rotivel Y., Gacoin A., Caroff C. - Bourhy H. Intravital diagnosis of human rabies by PCR on saliva and cerebrospinal fluid. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, **36**, 1117-21.
- Kappeler A. - Bat rabies surveillance in Europe. *Rabies Bulletin Europe*, 1989, **13**, 12-13.
- Kwok S., Higuchi R. - Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, **339**, 237-8.
- Muller W.W. - Review of reported rabies cases data in Europe to the WHO Collaborative Centre Tübingen from 1977 to 2000. *Rabies Bulletin Europe*, 2000, **24**, 11-19.
- Pérez-Jordá J.L., Ibáñez C., Muñoz M., Téllez A. - Lyssavirus in *Eptesicus serotinus* (Chiroptera : Vespertilionidae). *J. Wildl. Dis.*, 1995, **31**, 372-377.
- Ronsholt L., Sorensen K.J., Brusckhe C.I.M., Wellenger G.J., Oirschot J.T. van, Johnstone. - Clinical silent rabies infection in (zoo) bats. *Vet. Rec.*, 1998, **142**, 519-20.
- Sánchez-Serrano L.P. - Rabia transmitida por murciélagos insectívoros en España. *Boletín Epidemiológico Instituto de Salud Carlos III*, 1999 ; **7**, 149-156.
- Serra-Cobo J. - Biological and ecological study of the *Miniopterus schreibersii* (PhD thesis). Barcelona : University of Barcelona, 1989.
- Serra-Cobo J., Amengual B., Abellán C. and Bourhy H. - European Bat Lyssavirus Infection in Spanish Bat Populations. *Emerging Infectious Diseases*, 2002, **8**, No. 4, 413-420.
- Tordo N., Poch O., Ermine A., Keith G., Rougeon F. - Walking along the rabies genome : is the large G-L intergenic region

a remnant gene? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, **83**, 3914-3918.

Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. -
CLUSTAL W : improving the sensitivity of

progressive multiple alignment through
sequence weighting, position-specific gap
penalties and weight matrix choice.
Nucleic Acids Res., 1994, **22**, 4673-80.



Remerciements

Ce travail a été financé par le Ministerio de Sanidad y Consumo Español et par la Conselleria de Salut i Consum del Govern des Îles Baléares.

Les auteurs veulent remercier Josep Márquez, Catalina Massuti, Joan Oliver et Antonia Sánchez pour leur support et coopération.