

LA SURVEILLANCE ET LE DIAGNOSTIC DES INFECTIONS A VIRUS WEST NILE CHEZ LES ANIMAUX DANS LES ECOSYSTEMES MIXTES DU SUD-EST DE ROUMANIE *

Gheorghe Savuța ¹, Serban Moroșan ¹, Dragos Aniță ¹, Adriana Aniță ¹, Luanda Ludu ¹,
Aurelia Ionescu ², Mihai Marinov Jr ³, Stefan Răileanu ³ et Sylvie Lecollinet ⁴

RESUME

Une étude épidémiologique sur la présence du virus West Nile a été réalisée chez les chevaux dans la région du sud-est de la Roumanie et dans le haras Lucina, situé dans les Carpates, au nord du pays.

Les résultats ont montré une séroprévalence de 33,5% pour les IgG et la présence d'IgM dans les sérums chez des chevaux du sud-est de la Roumanie.

Un test ELISA combo « *WNV-ImmunoComb-Equine West Nile Virus Antibody Test Kit* », produit par Biogal Galed Laboratories a été testé, le kit combo ayant une plus grande applicabilité dans les haras pour le dépistage des infections avec le virus West Nile chez les chevaux.

Des échantillons de sang et d'organes d'oiseaux ont été prélevés. Les résultats de séroneutralisation ont montré une séropositivité de 10% (3/31) chez les corneilles adultes (*Corvus frugilegus*) et une séroprévalence de 1% chez les moineaux (*Passer domesticus*). Des prélèvements d'organes de corbeaux et des moustiques ont été récoltés pour l'isolement du virus.

Mots-clés : Virus West Nile, sérosurveillance, chevaux, diagnostic.

SUMMARY

We carried out an epidemiological study on the presence of the West Nile virus in horses in the Eastern part of Romania and in the Lucina stud farm, located in the Carpath Mountains, in the North of the country.

We found a 33.5% prevalence in IgG antibodies in horses from the Southeastern area and an anti-IgM response was also present.

A combo kit, "*WNV-ImmunoComb-Equine West Nile Virus Antibody Test Kit*", made by Biogal Galed Laboratories, was tested, the combo kit being more practical for use in the field for preliminary diagnosis of West Nile infections in horses.

We sampled birds from the studied areas. The results of the seroneutralisation test showed a 9.68% (3/31) seropositivity in adult Hooded crow (*Corvus frugilegus*) from Salcioara locality in the Danube Delta and a positive result in one sample from a House Sparrow (*Passer domesticus*) in Maliuc meaning a 0.81% seroprevalence. We also collected mosquitoes and crow brains for viral isolation.

Keywords : West Nile virus, Serosurvey, Horses, Diagnosis tests.

* Texte de la communication affichée lors des Journées AEEMA, 22-23 mai 2008

¹ U.Ș.A.M.V. Iași, Roumanie

² I.D.S.A. București, Roumanie

³ I.N.C.D.D Tulcea, Roumanie

⁴ UMR 1161 ENVA-AFSSA-INRA Alfort, France

I - INTRODUCTION

Les infections à virus West Nile ont été signalées pour la première fois en Ouganda [Smithburn *et al.*, 1940] et elles sont devenues ubiquistes ces dernières années [Dauphin *et al.*, 2004].

En juillet-octobre 1996, une épidémie de fièvre West Nile a été enregistrée dans le sud du pays (le champ du Danube et Bucarest) avec des centaines de cas de manifestations nerveuses chez les humains, dont 17 létales [Savage *et al.*, 1999].

Le virus est maintenu dans un cycle enzootique par des moustiques ornithophiles et des oiseaux. Les oiseaux qui développent une importante virémie sont les principaux hôtes du virus (surtout les oiseaux sauvages) et leur migration printanière représente la voie d'introduction du virus West Nile dans les régions indemnes [Ostlund *et al.*, 2000].

Les équidés, comme les autres mammifères ainsi que les reptiles et les amphibiens, sont considérés comme un cul-de-sac épidémiologique dans la transmission du virus

et représentent des indicateurs de la présence du virus West Nile dans le territoire [Hubálek *et al.*, 1996].

Nos recherches ont porté sur la présence et l'activité du virus West Nile dans le sud-est de la Roumanie, territoire qui réunit toutes les conditions épidémiologiques pour le maintien du virus dans la nature : la présence de grandes étendues d'eau (Delta du Danube), la présence d'une riche faune d'oiseaux sauvages dont un grand nombre d'oiseaux migrateurs et la présence d'équidés demi-sauvages. De même, des tests sérologiques ont été réalisés sur les chevaux d'une écurie du nord de la Roumanie.

Ayant vu l'importance des oiseaux et des moustiques dans l'épidémiologie des infections à virus West Nile [van der Meulen *et al.*, 2005] nous avons décrit l'ornithofaune du territoire étudié dans le Delta du Danube et nous avons entamé des examens virologiques sur des organes d'oiseaux et des moustiques.

II - MATERIEL ET METHODE

Dans une première phase de notre projet de recherche, nous avons réalisé une sérosurveillance du virus West Nile chez des chevaux du sud-est de la Roumanie. Partant de 508 échantillons prélevés dans les départements de Braila, Constanta, Galati, Ialomita, Tulcea et Delta du Danube, 167 échantillons ont été testés pour les IgG, en utilisant le kit ELISA "*Kit for detection of West Nile anti prM-E antibodies in horse sera*" produit par ID.VET Innovative Diagnostics. De même, nous avons testé 215 prélèvements de chevaux de l'écurie Lucina, pour voir si l'infection touche la région où les moustiques vecteurs ne rencontrent pas les conditions nécessaires pour la diffusion du virus.

Afin de tester la reproductibilité de la méthode utilisée en Roumanie, 76 prélèvements de sérum de chevaux provenant des départements Tulcea, Galati et de l'écurie Lucina ont été retestés en France pour les IgG, en utilisant le même test. De plus, à l'UMR 1161 les échantillons ont été testés pour les

IgM en utilisant une méthode ELISA capture du laboratoire d'Alfort.

En Roumanie, des essais ont été réalisés en vue de valider un test rapide ELISA « *WNV-ImmunoComb-Equine West Nile Virus Antibody Test Kit* » produit par Biogal Galed Laboratoires, qui est un test immunoenzymatique modifié nommé „dot” ELISA, test utilisé pour la détection des anticorps spécifiques du virus West Nile dans le sérum de cheval. L'étude a été réalisée sur les échantillons prélevés antérieurement.

Afin de vérifier les résultats du test ELISA immunocomb, 88 prélèvements ont été sélectionnés pour être testés, dont 44 (50%) qui ont donné une réponse positive au test ELISA indirect ID.VET et 44 (50%) qui ont donné une réponse négative au même test. Dans une deuxième étape de notre recherche, en 2007, 68 échantillons de sérum de chevaux provenant des départements Tulcea et Braila (où la séroprévalence a été la plus grande en 2006) et 34 échantillons des chevaux de l'écurie Lucina ont été sélectionnés et analysés

en Roumanie en utilisant le kit ID.VET pour les IgG et en France pour les IgG et les IgM.

Pendant les deux années de recherche, nous avons étudié l'ornithofaune du Delta du Danube et suivi les espèces d'oiseaux migrants et résidents.

Nous avons prélevé du sérum des oiseaux du Delta du Danube, Mila 23, Iazurile, Mila26, Sulina, Dunavățul de Jos, Sălcioara, Maliuc, Grindul Lupilor. De ces prélèvements, 241 ont été testés dans le laboratoire UMR 1161 Alfort par séroneutralisation-neutralisation des effets cytopathiques en plaque 96 puits et pour

confirmation par la méthode de neutralisation des plaques de lyse.

De même, nous avons prélevé des échantillons d'organes de corbeaux et des moustiques du genre *Culex*, *Coquillettidia richardii*, *Ochlerotatus caspius* de localités Sălcioara, Grindul lupilor et Tulcea.

Les échantillons de cerveau de corbeaux (24) et les moustiques (15 pools de 50 moustiques) ont été soumis à l'isolement du virus sur des cultures cellulaires Vero âgées de 48 heures.

III - RESULTATS ET DISCUSSION

Le plus grand nombre de résultats positifs a été obtenu dans le département Tulcea (34 sur 73 prélèvements testés) (tableau 1), suivi par le département Braila (10 réponses positives sur 20 sérums testés), ensuite les

départements Galati (8 sérums positifs), Ialomița (3) et Constanta (1). La séroprévalence totale est de 33.5%. Dans le nord de la Roumanie, nous n'avons obtenu aucun résultat positif.

Tableau 1

Résultats de l'enquête sérologique dans le sud-est de la Roumanie

Départements	Nombres d'échantillons	Nombres d'échantillons positifs	Pourcentage d'échantillons positifs
Braila	20	10	50,0%
Constanta	25	1	4,0%
Galati	30	8	26,7%
Ialomița	19	3	15,8%
Tulcea	73	34	46,6%
Total	167	56	33,5%

Les résultats obtenus au laboratoire de virologie UMR 1161 Alfort, à la suite de l'analyse de 76 échantillons de Braila et Tulcea, sont semblables à 94% avec les résultats obtenus dans notre pays. En plus, à la suite de la recherche d'IgM, un prélèvement de Sulina (Tulcea) a été trouvé positif. Les chevaux de l'écurie Lucina sont séronegatifs pour les IgM.

En ce qui concerne les résultats préliminaires pour la validation du test „dot”, parmi les 44 sérums positifs au test ELISA indirect, 42 ont

répondu de façon positive au test ELISA immunocomb et deux ont répondu de façon négative. Parmi les 44 sérums négatifs au test ELISA indirect 43 ont été négatifs et un positif au test immunocomb.

Les tests sérologiques réalisés en 2007 dans les départements Braila et Tulcea ont montré une séroprévalence de 31% (tableau 2). A Sulina, deux sérums ont été trouvés positifs pour les IgM.

Tableau 2
Résultats de l'enquête sérologique dans deux départements
du sud-est de la Roumanie en 2007

Départements	Localités	Nombre d'échantillons analysés	Résultats positifs ELISA IgG	Pourcentage résultats positifs ELISA IgG	Résultats positifs ELISA IgM	Pourcentage résultats positifs ELISA Ig M
Braila	Chişcani	3	0	59%	0	4%
	Gropeni	6	4		0	
	Tichileşti	2	1		1	
	Tufeşti	6	5		0	
Tulcea	Sulina	11	4	36%	2	
	Mahmudia	40	7	17%	0	
Total		68	21	31%	3	

Les résultats de la séroneutralisation ont montré une séropositivité de 10% (3/31) chez les corneilles adultes (*Corvus frugilegus*) de la localité Sălcioara, dans le Delta du Danube et un seul sérum positif de moineau (*Passer domesticus*) à Maliuc, ce qui représente une séroprévalence de 1%.

Pour les résultats de l'isolement viral sur culture cellulaire, parmi 24 échantillons d'organes, quatre ont développé un effet cytopathogène. Pour les moustiques, un échantillon a développé un effet cytopathogène (tableau 3). Les isolements ont été confirmés par RT-PCR.

Tableau 3
Résultats de l'isolement viral sur culture cellulaire

Echantillons		Nombre d'échantillons analysés	Résultats positifs	Résultats négatifs
1	Organes de corbeaux	24	4	20
2	Moustiques	15	1	14
Total		39	5	34

IV - CONCLUSION

L'enquête sérologique a été faite sur des chevaux de cinq départements du sud-est de la Roumanie, qui ont un rôle important dans l'épidémiologie du virus West Nile: Braila, Constanta, Galati, Ialomiţa et Tulcea. Deux types d'ELISA ont été utilisés pour faire une première évaluation de la présence d'anticorps contre le virus West Nile dans cette région. La séroprévalence constatée a été de 33,5%.

La comparaison entre les deux tests ELISA montre que le test combo est suffisamment sensible et spécifique et peut être utilisé pour le dépistage préliminaire des infections par le virus West Nile chez les chevaux.

Les résultats obtenus indiquent la séroconversion contre le virus West Nile dans le sud-est de la Roumanie et l'absence d'activité du virus dans le haras Lucina, situé au nord du pays, où des vecteurs spécifiques ne sont pas nombreux et le climat est plus froid.

La présence d'IgM contre le virus West Nile chez les chevaux indique l'existence et la circulation du virus West Nile dans la région du sud-est de la Roumanie pendant la période 2006-2007.

Les examens virologiques ont permis l'isolement du virus West Nile dans cinq échantillons sur les 39 analysés.

BIBLIOGRAPHIE

Cantile C, Di Guardo G, Eleni C, Arispici M. - Clinical and neuropathological features of West Nile virus equine encephalomyelitis in Italy. *Equine Vet. J.*, 2000, **32** (1), 31-35.

Dauphin G., Zientara S., Zeller H., Murgue B. - West Nile: worldwide current situation in animals and humans. *Comp. Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2004, **27**, 343-355.

Hubálek Z, Halouzka J. - Arthropod-borne viruses of vertebrates in Europe. *Acta Scientiarum Naturalium Brno*, 1996, **30** (no.4-5), 1-95.

Ostlund E.N., Andresen J.E., Andresen M. - West Nile encephalitis. *Vet. Clin. North Am., Equine Pract.*, 2000, **16**, 427-441.

Peiris J.S.M., Amerasinghe F.P. - West Nile fever.: Beran G.W., Steele J.H., editors. Handbook of zoonoses. Section B: Viral. 2nd ed. Boca Raton (FL): CRC Press; 1994. p. 139-48.

Savage H.M., Ceianu C., Nicolescu G., Karabatsos N., Lanciotti R., Vladimirescu A. *et al.* - Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania, 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1999, **61** (4), 600-611 ; erratum in : *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2000, **62** (1), 162.

Smithburn K.C., Hughes T.P., Burke A.W., Paul J.H. - A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1940, **20**, 471-492.

Van der Meulen K.M., Pensaert M.B., Nauwynck H.J. - West Nile Virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.*, 2005, **150**, 637-657.

Ward M.P., Levy M., Thacker H.L., Ash M., Norman S.K., Moore G.E. *et al.* - Investigation of an outbreak of encephalomyelitis caused by West Nile virus in 136 horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2004, **225** (1), 84-89.



Remerciements

Au laboratoire de virologie UMR 1161, Maisons-Alfort, France.

Le projet a été financé par CNMP- CEEX (contrat No. 105/2006), un programme du Ministère de l'Education et de la Recherche, Roumanie.