

Méthodes diagnostiques des arboviroses

I. Leparc-Goffart

IRBA Marseille



CEMI 17 : ACTUALITES SUR LES ARBOVIROSES. 15 et 16 mars 2012 Institut Pasteur

Méthodes diagnostiques des arboviroses

- Solutions commerciales existantes (Exemple pour le virus de la Dengue)
- le CNR
- Demain

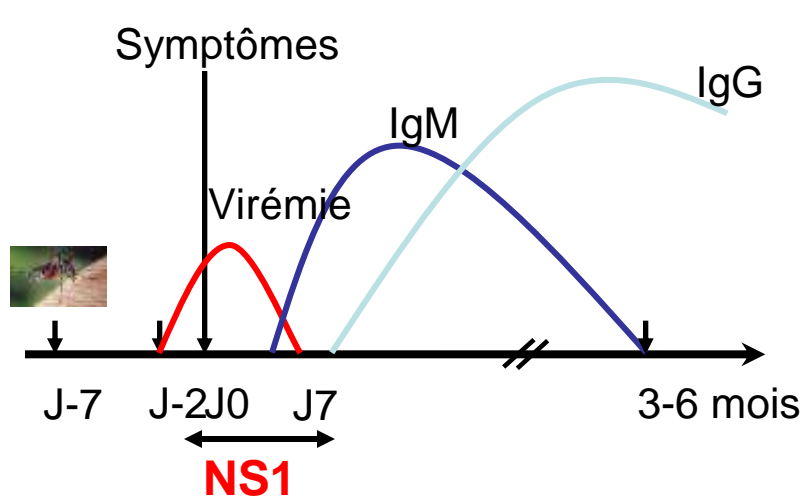




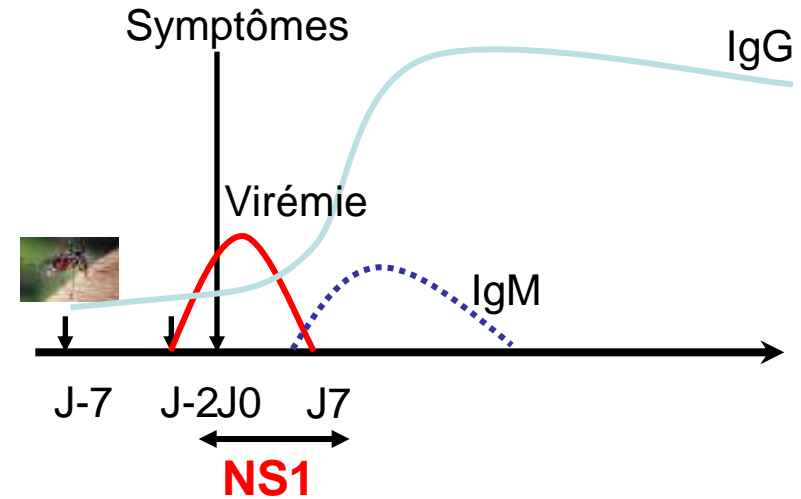
Famille	Genre	virus
Flaviviridae	Flavivirus	Dengue West-Nile Usutu Tick-Borne encephalitis Fièvre jaune Encéphalite japonaise Encéphalite de St Louis Uganda S Wesselsbron Zika
Togaviridae	Alphavirus	Chikungunya O' Nyong Nyong Sindbis Mayaro Semliki Forest Tonate VEE EEE WEE
Bunyaviridae	Phlebovirus	Rift Valley Fever Toscana Sandfly Naples Sandfly Sicilian
	Nairovirus	Dugbe Erve
	Orthobunyavirus	Bunyamwera Tahyna

Principales familles
d'arbovirus pathogènes
homme

Solutions commerciales existantes: exemple de la dengue



Primo-infection dengue



Dengue secondaire

- ✓ ≤ 7 jours : Détection par RT PCR (+Isolement viral)
- ✓ ≥ 5 jours Sérologie : IgM et IgG

Sérologie nécessite 2 prélèvements dont 1 tardif (≥ 15 jours)

Performances publiées des différents tests NS1

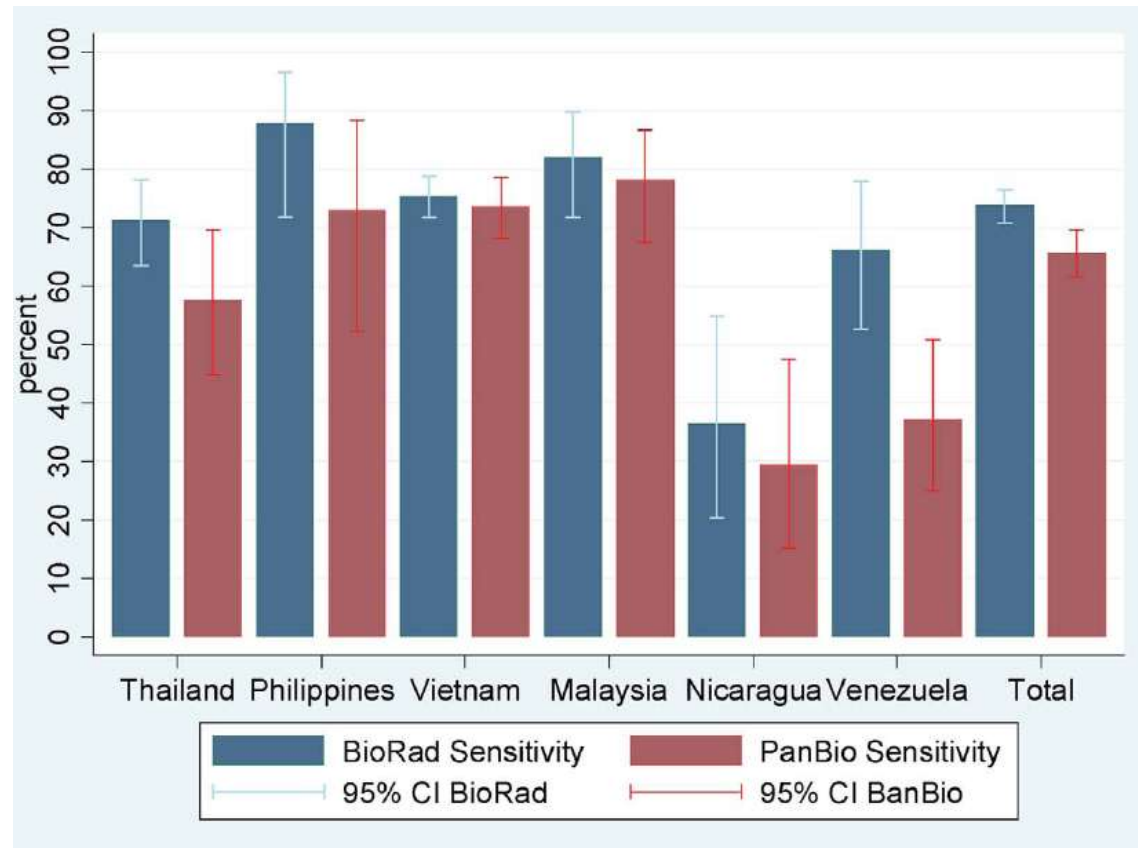
Stratégie de diagnostic biologique de la dengue, HCSP, 2011

Test	Sensibilité	Spécificité
Elisa : Platelia (Bio-Rad)	37 - 93,7 %	86,1 - 100 %
Elisa : Pan E (Panbio)	52 - 83,3 %	89 - 100 %
ICT : STRIP (Bio-Rad)	49,4 - 98,9 %	90,6 - 100 %
Elisa ou ICT SD NS1 (Standard Diagnostics)	52 - 76,7 %	98,3 - 100 %

Liste non exhaustive de kits commerciaux

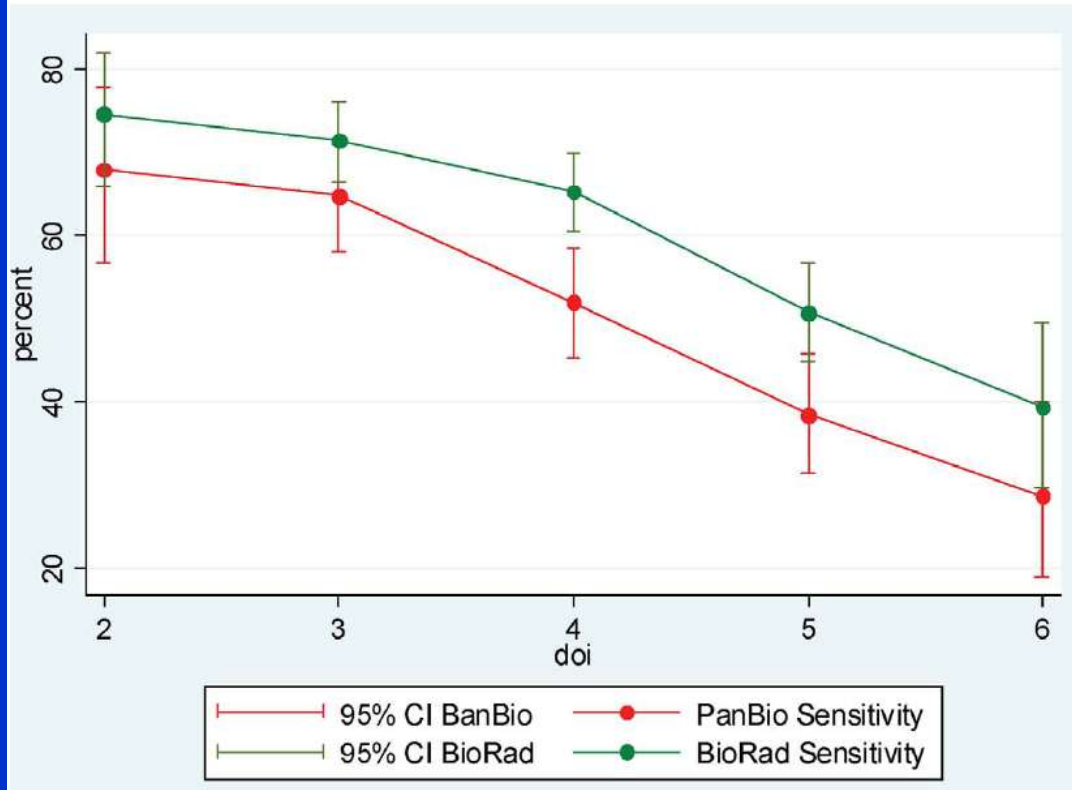


NS1 / détection de l'ARN viral



Guzman et al. PLoS Negl Trop Dis. 2010 ;4i: e811. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis.

Pour l'Asie



Sensibilité en fonction du sérotype:

PanBio: D1>D2>D3>D4

Biorad: D1>D3>D4>D2

Guzman et al. PLoS Negl Trop Dis. 2010 ;4i: e811. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis.

- Grande spécificité
 - Sensibilité:
 - dengue primaire / dengue secondaire
 - Sérotype
 - Délai entre prélèvement et date de début des signes cliniques
- Neg: analyses complémentaires (RT-PCR et/ou sérologie)



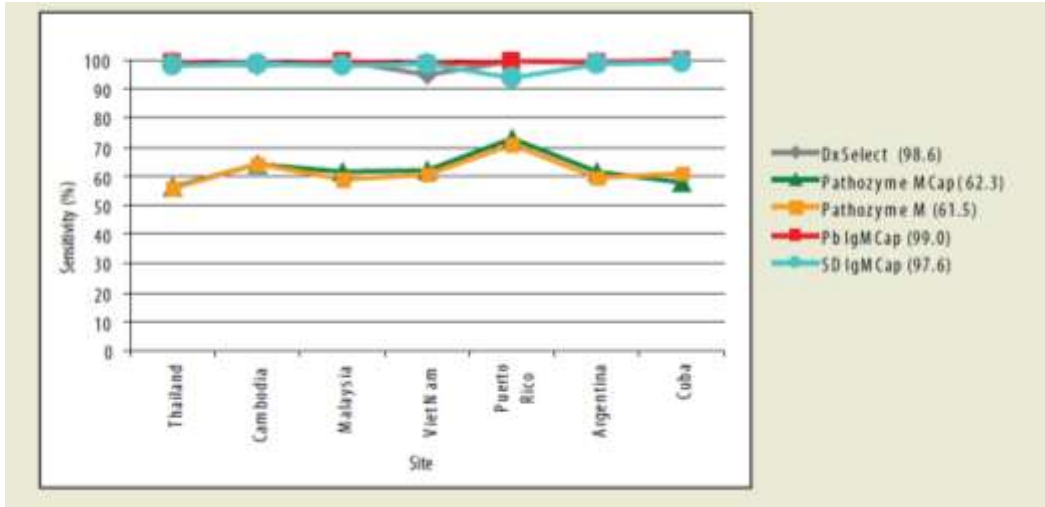
Evaluation des kits ELISA – ICT IgM dengue*

- ✓ 350 sérums (181 + IgM; 169 – IgM)
- ✓ Validation des sérums:
 - CDC
 - Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS)
- ✓ Evaluation: 7 laboratoires de référence
- ✓ Critères d'inclusion des tests commerciaux:
 - Identifier la réponse anticorps pour les 4 sérotypes de dengue
 - Détecter infection primaire et secondaire
 - Spécificité pour la dengue

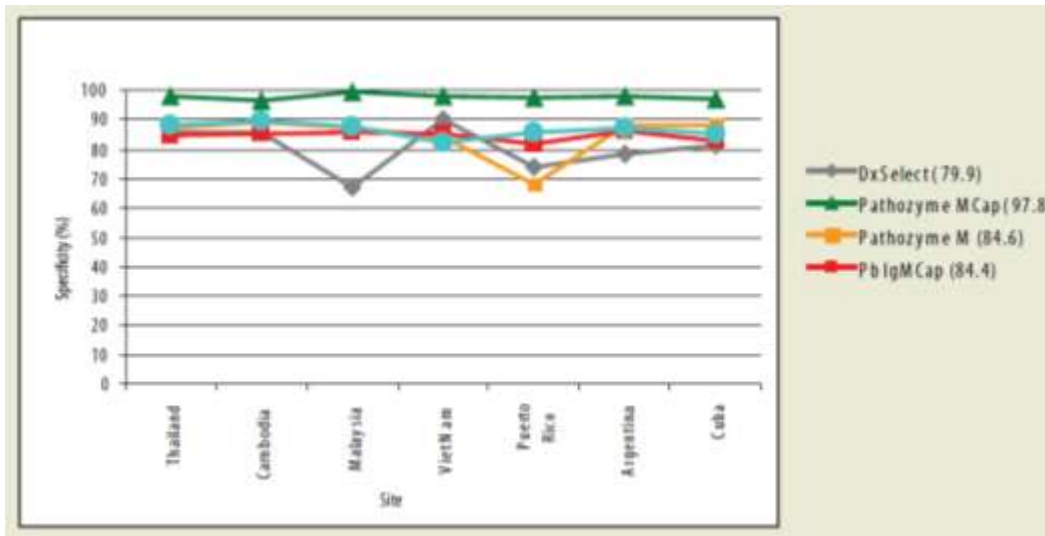
* Diagnostics Evaluation Series n° 3, WHO 2009



Sérologie IgM DEN – Kits ELISA



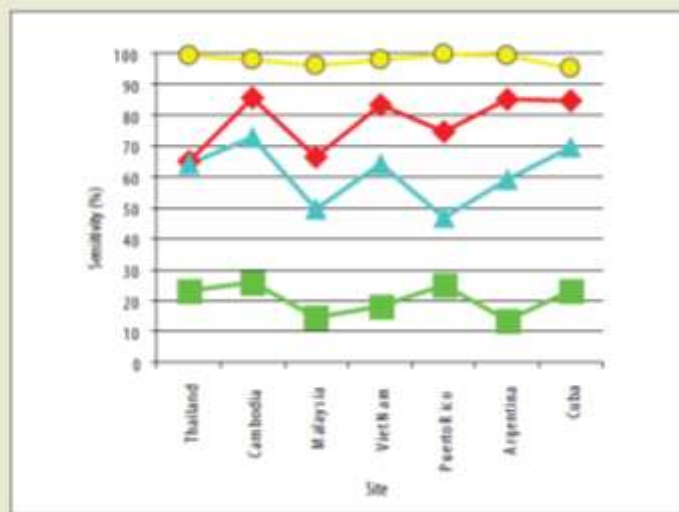
Sensibilité



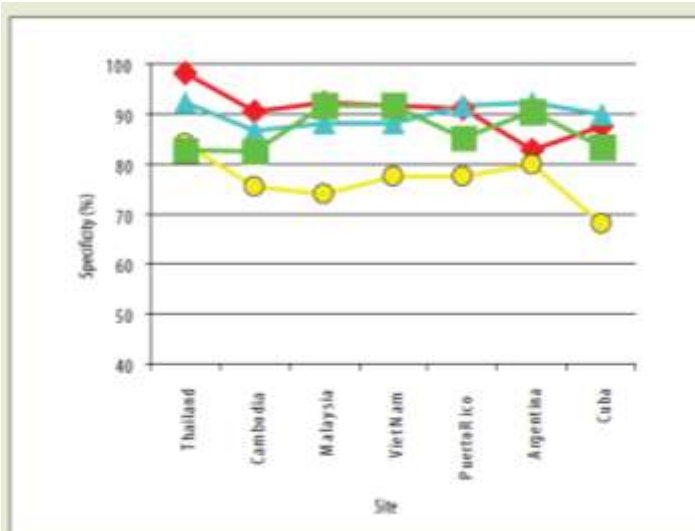
Spécificité



Sérologie IgM DEN – Tests rapides

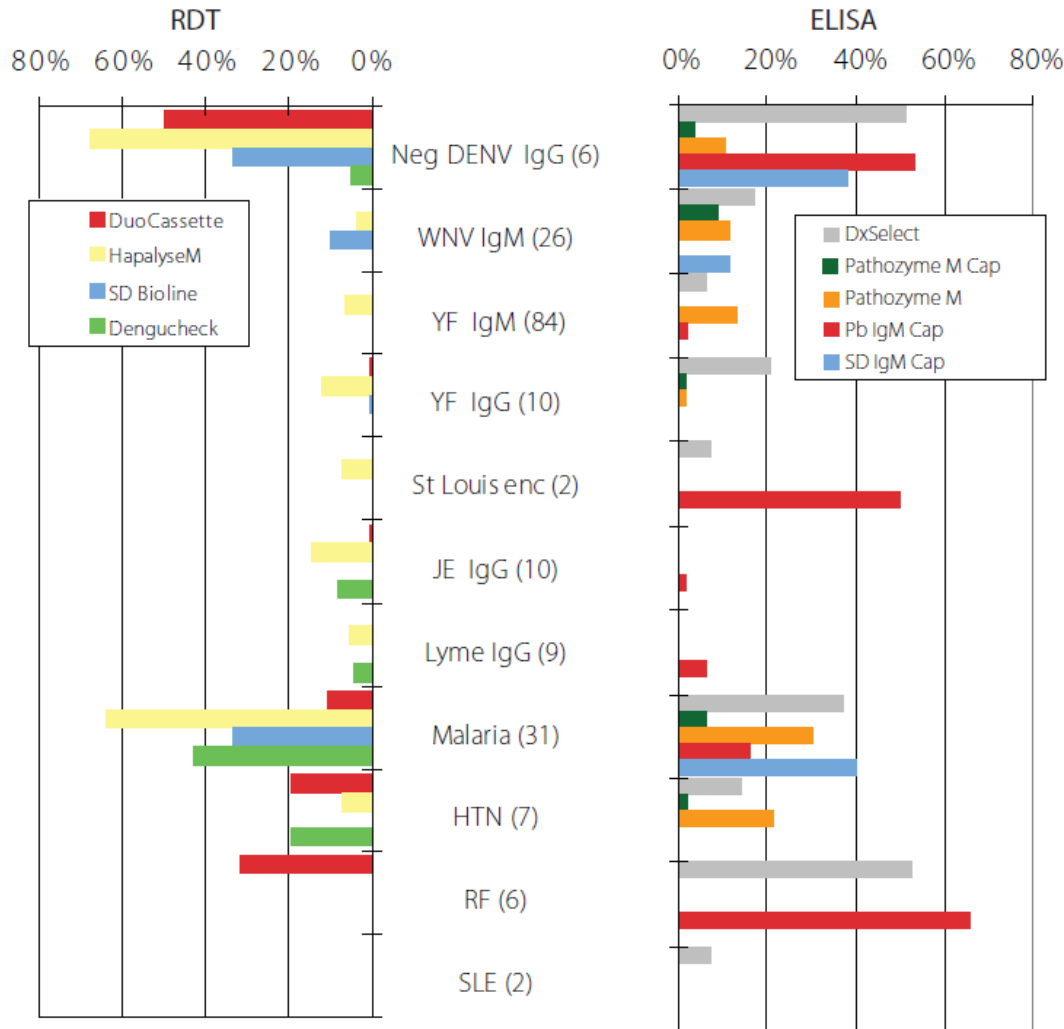


Sensibilité



Spécificité

Faux positifs



Intérêts de
prélèvements
précoces pour
détection de l'ARN
viral

Flavivirus:

- ✓ Kits serologiques presque « maison » :
 - ELISA : antigène = virus inactivé (TBE)
 - Immunofluorescence
 - problème du sérocroisement Flavivirus
- ✓ Manque d'évaluation

Chikungunya:

- ELISA : antigène = virus inactivé
- Immunofluorescence
- Manque cruel d'un kit ELISA robuste



- Connaitre les forces et faiblesses des kits utilisés, la diversité de réponse des patients en fonction des arbovirus recherchés
- Nécessité d'évaluer les kits de RT-PCR
- Confirmation des cas par le CNR
 - Positifs → isolement, séquençage, détection faux positifs en sérologie, seroneutralisation
 - Négatifs

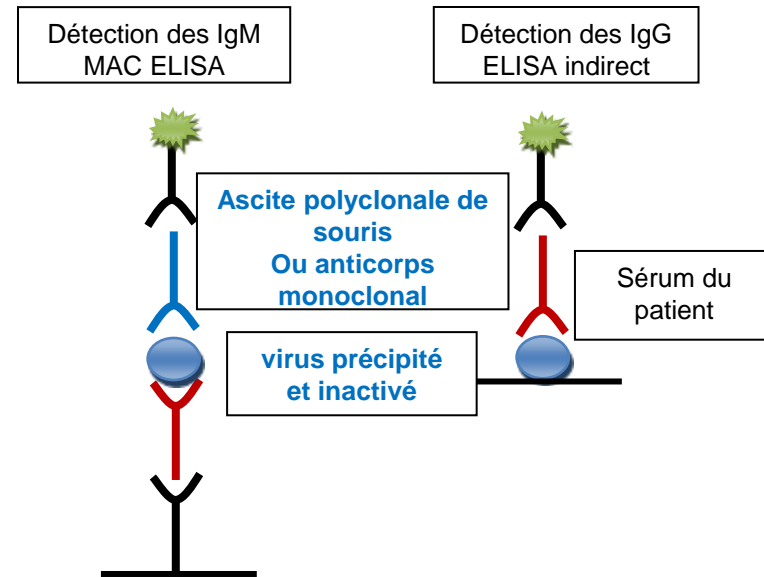


✓ Sérologie : Elisa IgG/IgM, Immunofluorescence, séroneutralisation, Western-blot

✓ Détection d'ARN viral par RT-PCR (temps réel)

✓ Isolements viraux et titrages

✓ Génotypage par le séquençage partiel de produits d'amplification génique (collaboration avec la PF8, IP Paris)





Famille	Genre	virus	Sérologie	RT-PCR Spécifique	RT-PCR de genre
	Flavivirus	Dengue	+	+	+
		West-Nile	+	+	+
		Usutu	+	+	+
		TBE	+	+	+
		Fièvre jaune	+	+	+
		Encéphalite japonaise	+	+	+
		Encéphalite de St Louis	+	+	+
		Uganda S	+	-	+
		Wesselsbron	+	-	+
		Zika	+	-	+
	Alphavirus	Chikungunya	+	+	+
		O' Nyong Nyong	+	-	+
		Sindbis	+	-	+
		Mayaro	+	+/-	+
		Semliki Forest	+	-	+
		Tonate	+	-	+
		VEE	+/-	+/-	+
		EEE	+/-	+/-	+
		WEE	+/-	+/-	+
	Phlebovirus	Rift Valley Fever	+	+	+
		Toscana	+	+	+
		Sandfly Naples Sandfly Sicilian	+	+	+
	Nairovirus	Dugbe	+	-	+
		Erve	+	+/-	+
	Orthobunyavirus	Bunyamwera Tahyna	+	-	+
			+	-	+

Diagnostic des arbovirus - Challenge

Complexité:

- Cas des multi voyageurs – Anticorps anti-flavivirus (sérocroisement)
- Attention sérocroisement alphavirus: Chik/Mayaro
=> Cas chik en guyane = mayaro – pb sante publique alerte

Diversité:

- Dengue ou chikungunya: virus / IgM/IgG
- Syndrome neuroméningé:
 - WNV/TBE: diagnostic séro (+ sérocroisement)
 - Toscana: Virus+IgM+IgG

Réactivité:

- Virus Usutu
- Virus de Schmallenberg : kit RT-PCR évalué



Perspectives techniques pour le diagnostic des arbovirus

Détection du génome viral:

Développement de RT-PCR multiplexe en fonction de l'origine géographique et des symptômes.

Détection des anticorps (ELISA et bandelettes):

=> Une voie possible: protéines recombinantes, pour contrer les sérocroisements + reproductibilité de production des réactifs

Développement et validation de l'utilisation de protéines recombinantes (collaboration avec Philippe Desprès, IP Paris) -> Difficulté spécificité: exemple Toscana

Développement ELISA IgM indirects (réactifs, émergence)



Perspectives stratégiques pour le diagnostic des arbovirus

- Industriels: développer kits de RT-PCR et sérologiques (cf chikungunya)
- Rôle des laboratoires de biologie médicale: diagnostic de 1^{ère} intention
- Rôle du CNR:
 - Confirmation des cas
 - Surveillance
 - Développement d'outils robustes (RT-PCR et sérologique) pour le transfert au laboratoire hors CNR
 - Développer de nouveaux outils de diagnostic pour augmenter le panel des arbovirus diagnostiqués

