

# 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



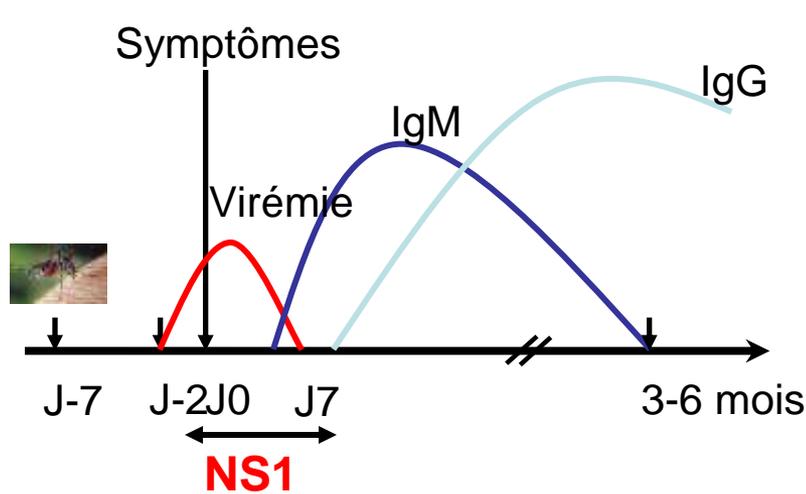


Famille	Genre	virus
Flaviviridae	Flavivirus	<b>Dengue</b> <b>West-Nile</b> <b>Usutu</b> Tick-Borne encephalitis Fièvre jaune Encéphalite japonaise Encéphalite de St Louis Uganda S Wesselsbron Zika
Togaviridae	Alphavirus	<b>Chikungunya</b> O' Nyong Nyong Sindbis Mayaro Semliki Forest Tonate VEE EEE WEE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

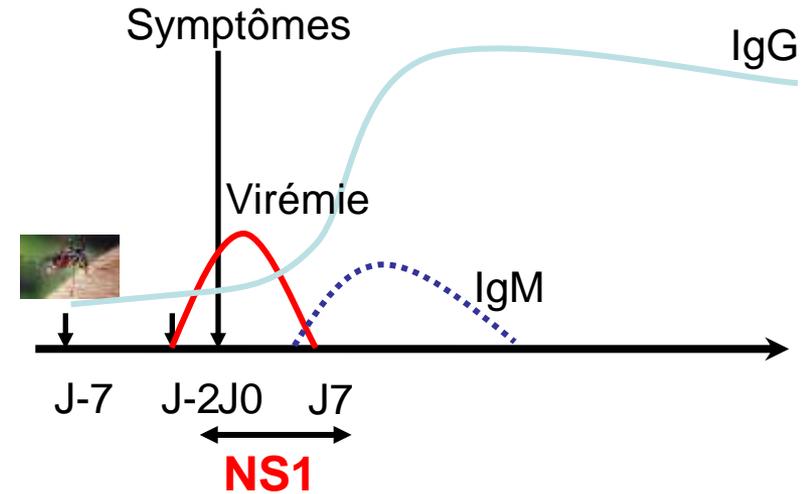
## Principales familles

### homme

# Solutions commerciales existantes: exemple de la dengue



Primo-infection dengue



Dengue secondaire

- ✓ : Détection par RT PCR (+Isolement viral)
- ✓ Sérologie : IgM et IgG

Sérologie nécessite 2 prélèvements dont 1 tardif ( 15 jours)

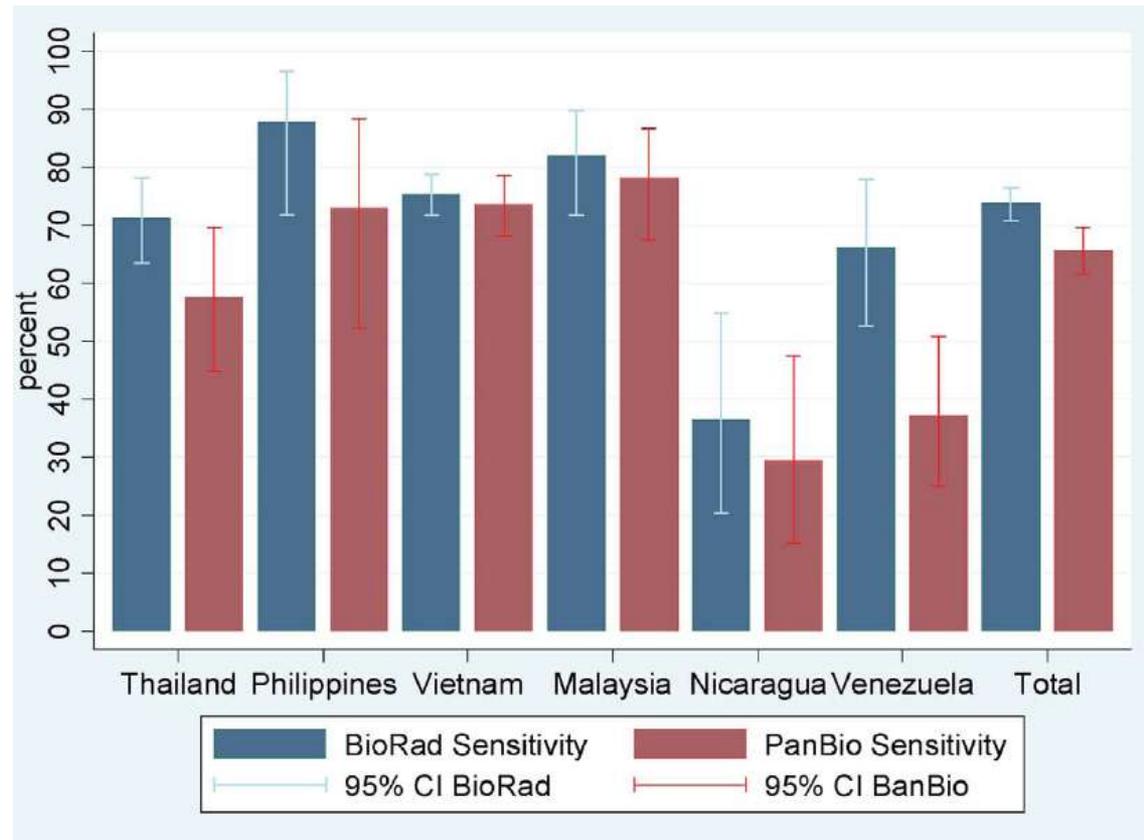
# Performances publiées des différents tests NS1

## 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

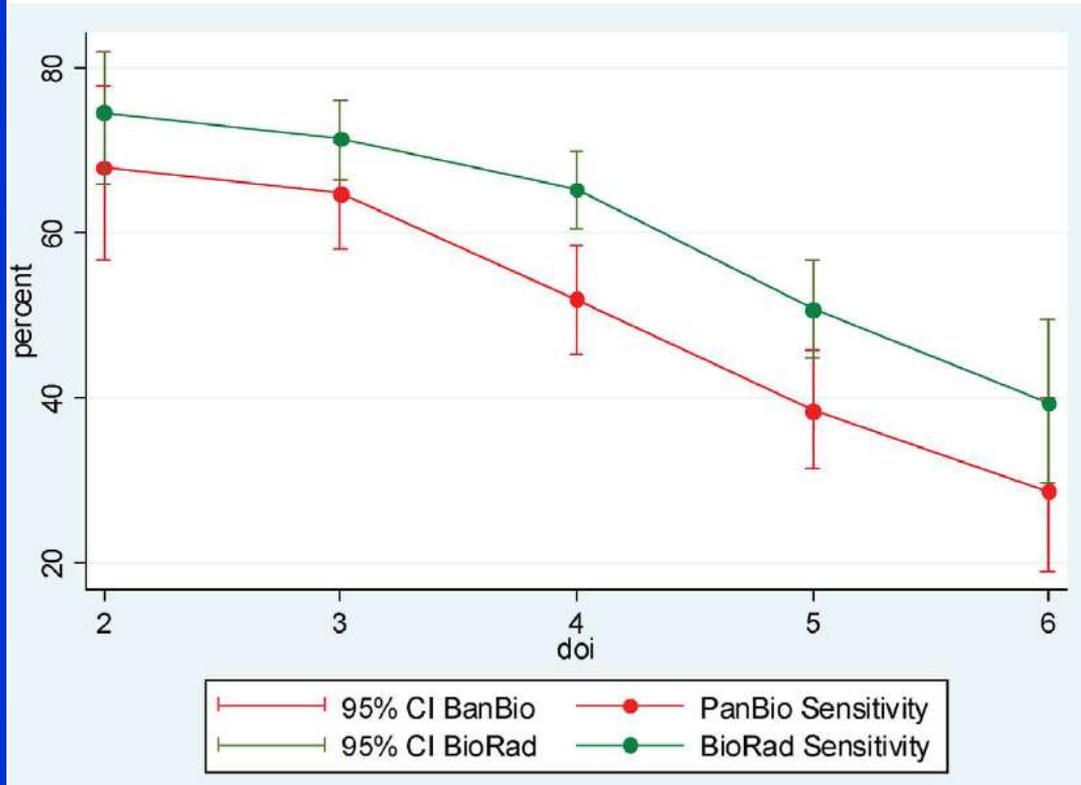
# NS1 / détection de l'ARN viral



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.

# Sensibilité détection NS1 / J post début signes cliniques

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)



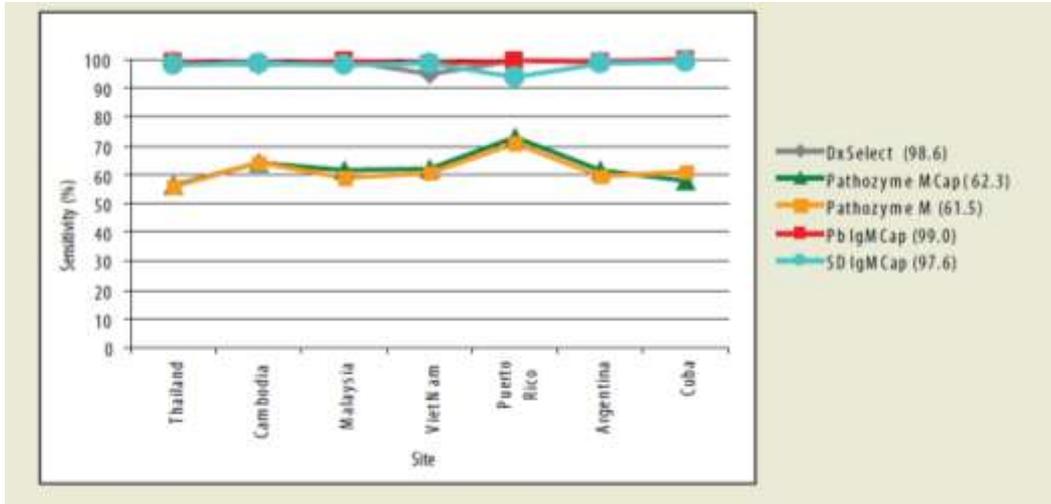
# Evaluation des kits ELISA – ICT IgM dengue\*

- ✓ 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

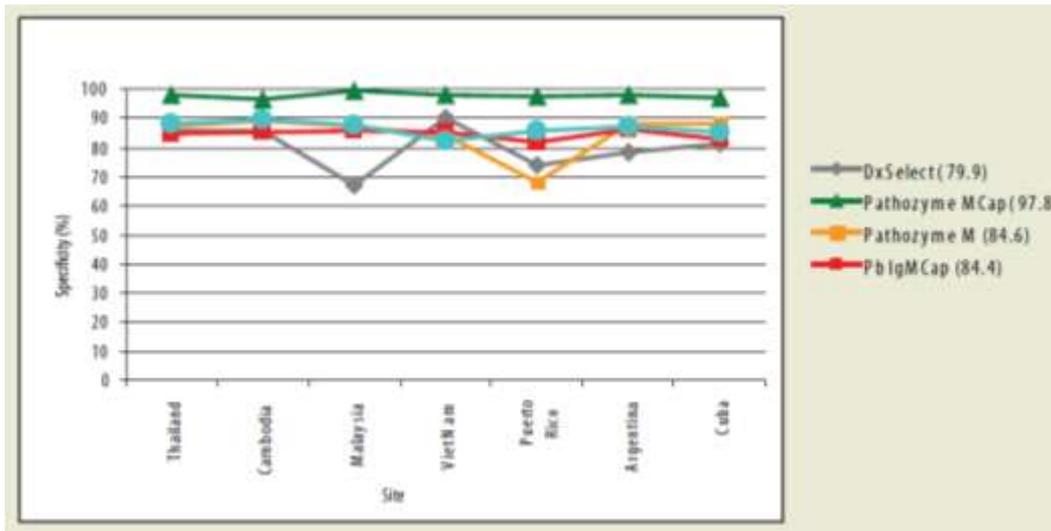
\* Diagnostics Evaluation Series n° 3, WHO 2009



# Sérologie IgM DEN – Kits ELISA

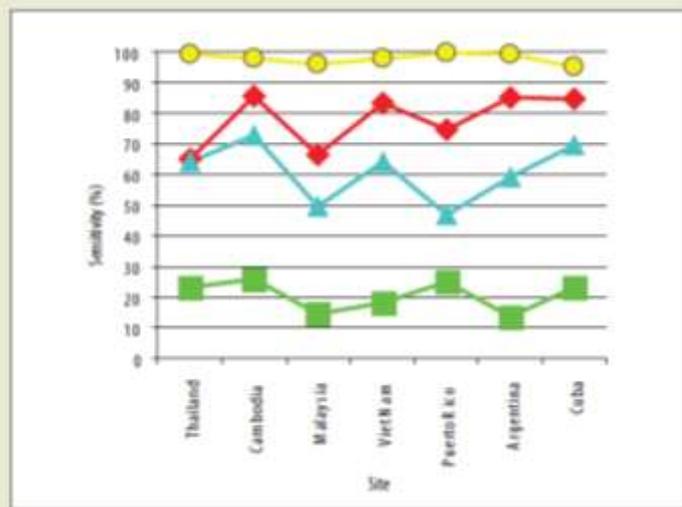


Sensibilité

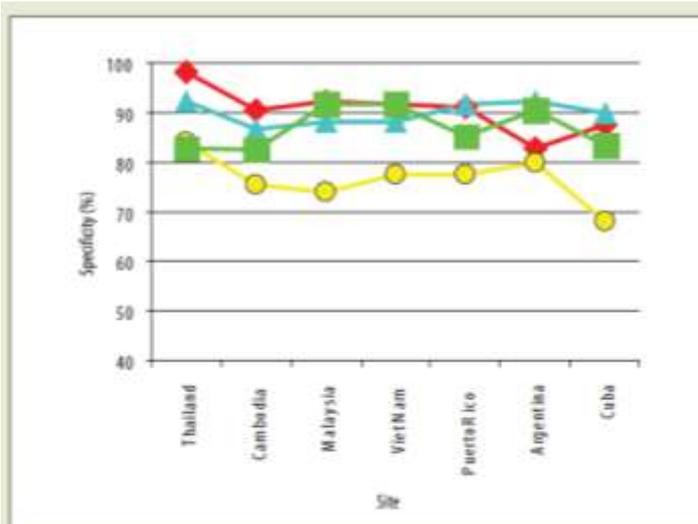


Spécificité

# Sérologie IgM DEN – Tests rapides

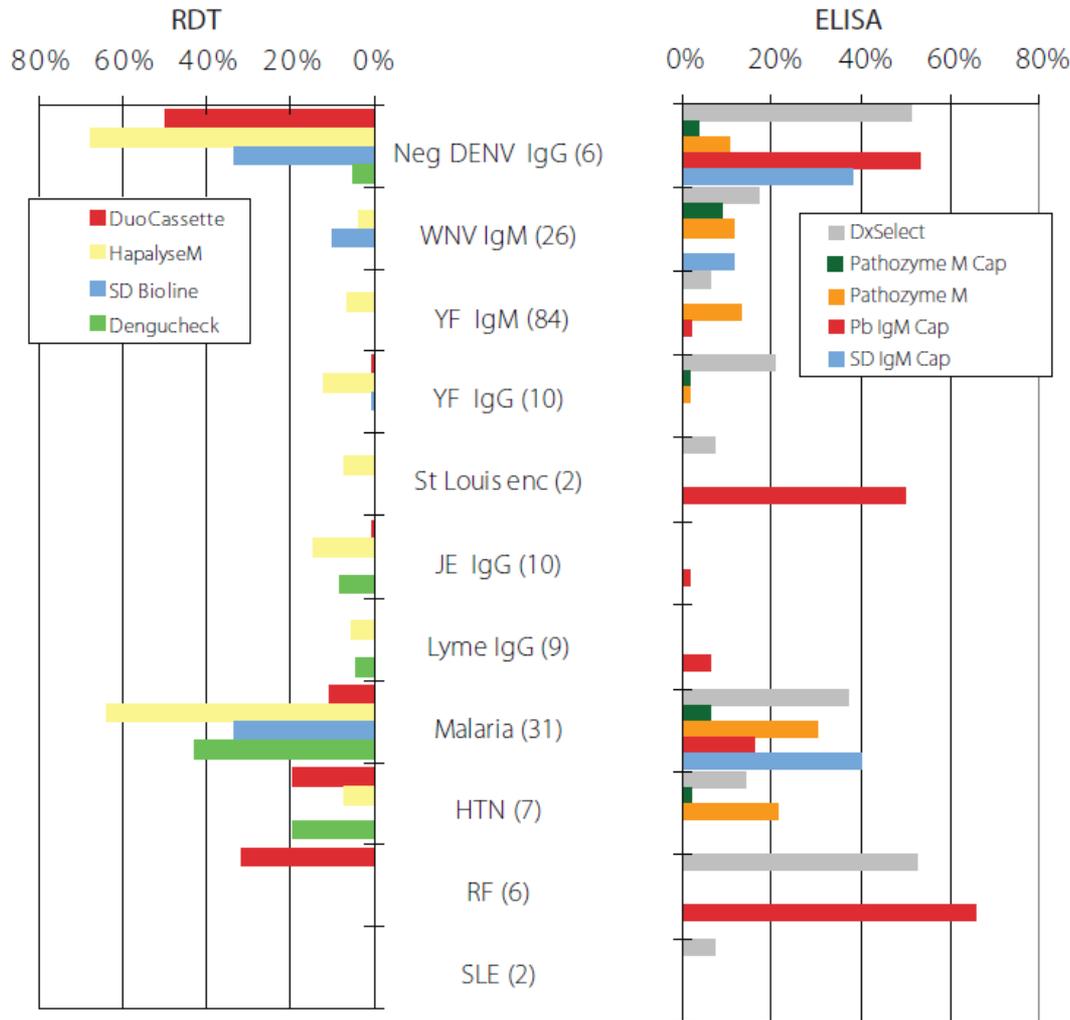


Sensibilité



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

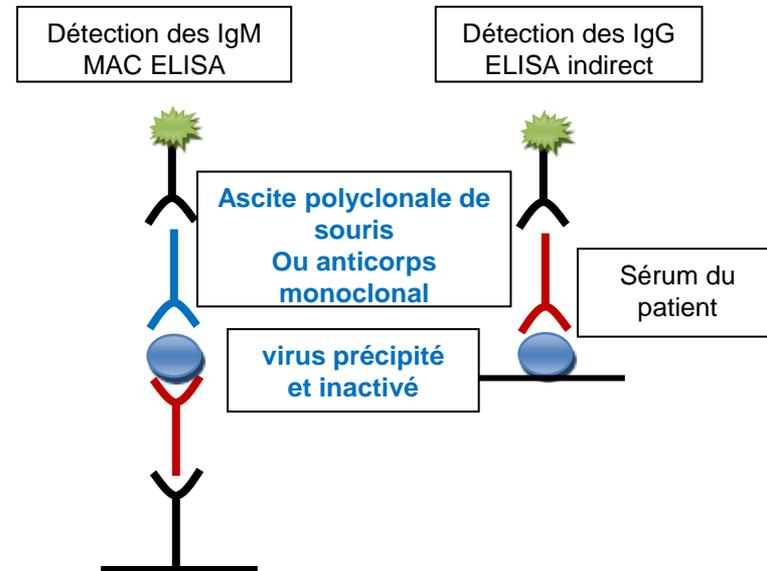


✓ Sérologie : Elisa IgG/IgM, Immunofluorescence, séroneutralisation, Western-blot

✓ 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	<b>Dengue</b>	+	+	+
		<b>West-Nile</b>	+	+	+
		<b>Usutu</b>	+	+	+
		TBE	+	+	+
		Fièvre jaune	+	+	+
		Encéphalite japonaise	+	+	+
		Encéphalite de St Louis	+	+	+
		Uganda S	+	-	+
		Wesselsbron	+	-	+
		Zika	+	-	+
	Alphavirus	<b>Chikungunya</b>	+	+	+
		O' Nyong Nyong	+	-	+
		Sindbis	+	-	+
		Mayaro	+	+/-	+
		Semliki Forest	+	-	+
		Tonate	+	-	+
		VEE	+/-	+/-	+
		EEE	+/-	+/-	+
		WEE	+/-	+/-	+
	Phlebovirus	Rift Valley Fever	+	+	+
		<b>Toscana</b>	+	+	+
		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<sup>ère</sup> 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

