



HAL
open science

Problématique diagnostique d'infection par un virus dengue en zone endémo-épidémique (Guadeloupe) et élaboration de contrôles internes de la qualité pour les tests AgNS1 et IgM

Clarisse Benard

► **To cite this version:**

Clarisse Benard. Problématique diagnostique d'infection par un virus dengue en zone endémo-épidémique (Guadeloupe) et élaboration de contrôles internes de la qualité pour les tests AgNS1 et IgM. Sciences pharmaceutiques. 2015. dumas-01191535

HAL Id: dumas-01191535

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01191535>

Submitted on 2 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Bordeaux 2 – Victor Segalen
U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2015

Thèse n° 59

MEMOIRE

Pour le diplôme d'Etudes Spécialisées de Biologie Médicale

Tenant lieu de

THESE

Pour l'obtention du DIPLOME d'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 29 mai 2015

A l'Université Toulouse III –Paul Sabatier

par

Clarisse BENARD

Née le 04 février 1987 à Perpignan

Problématique diagnostique d'infection par un virus dengue
en zone endémo-épidémique (Guadeloupe)
Elaboration de Contrôles internes de Qualité pour les tests
AgNS1 et IgM

Directeur de thèse

Madame le Docteur Cécile HERRMANN-STORCK

Membres du jury

Madame le Docteur Véronique DUBOIS

Président

Monsieur le Professeur Hervé J.A. FLEURY

Juge

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Juge

Remerciements

Madame le Docteur Cécile HERRMANN-STORCK

Médecin biologiste en microbiologie et biologie moléculaire

Praticien hospitalier

Laboratoire de parasitologie bactériologie et virologie, CHU de Pointe-à-pitre

Je te remercie pour l'aide précieuse que tu m'as apporté tout au long de cette thèse, pour ton expertise et ta disponibilité. Merci pour la confiance que tu m'as accordé en acceptant d'encadrer mon travail, tu as toujours su me guider et me conseiller.

Madame le Docteur Véronique DUBOIS

Maître de conférence universitaire - Praticien Hospitalier

Laboratoire de Bactériologie, Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Vous avez accepté de présider mon jury de thèse. Soyez assuré de mes sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Hervé J.A. FLEURY

Professeur de virologie

Chef de service du laboratoire de virologie

Hôpital Pellegrin, CHU de Bordeaux

Je suis honorée de votre présence au sein des membres du jury.

Merci pour l'intérêt que vous portez à mon travail.

Monsieur le Professeur Christophe PASQUIER

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier

Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de Toulouse

Laboratoire de Virologie, CHU de Toulouse

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail.

Merci pour toutes ces années d'enseignement de cette discipline.

A Régine, Géraldine et Julie, qui m'ont beaucoup aidé dans la réalisation technique de ma thèse.

Et à Rebecca, Régine, Dominique, Marie-Odile, Françoise, Delphine, Léna, Jessica, Sarah et Cécile qui ont participé activement à la réalisation du SHN !

Merci pour votre gentillesse et votre accueil toujours chaleureux.

Remerciements

A mes parents et à mon frère qui m'ont toujours poussé à donner le meilleur de moi-même, pour leur soutien au quotidien, et leur encouragement, même avec l'éloignement. Qu'ils sachent combien ils sont importants pour moi.

A Jean-max, qui embellit ma vie depuis maintenant 6 ans. Quand je regarde tout ce qu'on a déjà construit et tous nos projets à venir, je ne peux être que comblée ! Je t'aime.

A Sandy, Fafa et Elo, grâce à vous les années de fac ont été mémorables. Même si la distance ne joue pas en notre faveur, vous resterez toujours mes acolytes.

Vive la bande des 4 fantastiques !

A Marie, qui a toujours été là pour moi. Enfin de retour en métropole et pas loin de chez vous en plus, on va enfin pouvoir passer du temps ensemble ! Plein de bonheur à vous 2 (4) pour la suite qui ne peut être qu'épanouissante.

A Aurélie, pour toutes ces années de collège et lycée, pour ces vacances à Empuria brava et pour tout le reste ! Vivement qu'on se retrouve et que vous me présentiez votre nouveau chez vous. En attendant septembre... !

A Elisa et Mathieu, on vous attend de nouveau en Gwada l'année prochaine pour qu'on se fasse enfin la trace de la Volcano ensemble !!

A Alex, JR, Polo, Julia, Thomas et Justine, pour ces 2 années de rêve en Gwada ! Pour ceux qui ont déjà déserté ou qui désertons l'île avant l'année prochaine, vous avez intérêt à venir nous voir rapidement !

A Arnaud. Merci d'avoir amplifié la passion de mon homme pour la pêche ...

L'année prochaine : penser à acheter un 2^{ème} congélateur

A Benoît et Sam. A chaque fois que je verrais quelqu'un essayer de décrocher une noix de coco, je penserais à vous !

Et à tous ceux que je n'ai pas cités, d'ici et d'ailleurs, mais qui ont marqué mes pensées.

Liste des abréviations

AcM Anticorps monoclonaux

ADE *Antibody Dependent Enhancement* (augmentation de l'infection dépendante des anticorps)

ADN Acide désoxyribonucléique

AgNS1 Antigène (protéine) non structurale 1 (*Non structural 1*)

AINS Anti-inflammatoires non stéroïdiens

ARN Acide ribonucléique

ARS Agence régionale de santé

CHU Centre hospitalier universitaire

CIQ Contrôle interne de la qualité

CIRE Cellule de l'institut de veille sanitaire en région

CNR Centre national de référence

CRP *C-reactive protein* (protéine C réactive)

CV Coefficient de variation

DENV Virus de la dengue

DF Fièvre dengue classique

DFA Départements français d'Amérique

DH Dengue hémorragique

DM-DIV Dispositif médical de diagnostic in vitro

DO Densité optique

DSC Dengue avec syndrome de choc

ECP Effet cytopathique

EIA *Enzyme Immuno Assays* (dosage immunoenzymatique)

ELISA *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (dosage immunoenzymatique en phase solide)

GOT/ASAT Glutamate oxaloacétique transaminase/Aspartate aminotransférase

GPT/ALAT Glutamate pyruvate transaminase/Alanine aminotransférase

HCSP Haut conseil de la santé publique

IB Immunoblot

ICT Immunochromatographique

ICTV Comité international de taxonomie des virus

IF Immunofluorescence

IgG Immunoglobuline G

IgM Immunoglobuline M

ISO *International Organization for Standardization*

JEV *Japanese encephalitis virus* (virus de l'encéphalite japonaise)

NABM Nomenclature des actes de biologie médicale

NFS Numération formule sanguine

OMS Organisation mondiale de la santé (*WHO : World Health Organisation*)

PBS *Phosphate buffered saline* (Tampon phosphate salin)

PCR RT *Polymerase Chain Reaction real time* (polymérisation en chaîne en temps réel)

PRNT *Plaque reduction neutralization*

PSAGE Programme de surveillance, d'alerte et de gestion des épidémies

RE Réticulum endoplasmique

RT-PCR *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction* (transcriptase inverse – amplification génique par polymérisation en chaîne)

S/CO Densité optique lue pour cet échantillon (S) sur la moyenne des densités optiques des deux mesures du calibrateur (CO)

SHN Sérum humain négatif pour l'antigène NS1

SLEV *Saint Louis encephalitis virus* (virus de l'encéphalite de St. Louis)

SVF Sérum de veau foetal

TBEV *Tick Borne Encephalitis Virus* (Virus de la méningo-encéphalite à tiques)

WNV *West Nile virus* (Virus du Nil occidental)

YFV *Yellow Fever Virus* (Virus de la fièvre jaune)

SOMMAIRE

I – INTRODUCTION	8
A - Historique au niveau mondial et dans la Caraïbe.....	9
B - Virologie et cycles viraux.....	13
1 - Classification des virus de la dengue.....	13
2 - Structure des virus de la dengue	14
3 - Tropisme cellulaire et cycle viral chez l'homme	17
4 - Polymorphisme moléculaire.....	20
5 - Vecteurs de la dengue	22
6 - Cycle de transmission de la dengue	29
7 - Réservoirs et Hôtes	32
C - Epidémiologie des virus de la dengue	33
1 - Epidémiologie actuelle	33
2 - Situation épidémiologique en Guadeloupe – Les phases du PSAGE	34
3 - Facteurs influençant le risque épidémique.....	38
D - Immunité et immuno-pathologie.....	40
1 - Immunité protectrice contre la dengue.....	40
2 - Dengue hémorragique : les théories pathogéniques	41
E - Evolution clinique de la dengue et biologie non spécifique	45
1 - Modalités diagnostiques et interprétation des données biologiques	45
2 - Evolution clinique.....	49
3 - Patients à risque	55
F - Traitements et prévention.....	56

II – PROBLEMATIQUE DIAGNOSTIQUE DE LA DENGUE EN CONTEXTE	
EPIDEMIQUE	60
A - Diagnostic différentiel.....	60
B - Diagnostic biologique spécifique.....	62
1 - Définitions des cas de dengue	63
2 - Diagnostic direct ou diagnostic précoce de la dengue.....	63
3 - Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique	74
C - Stratégie diagnostique	84
1 - Recommandations du Haut Conseil de la Santé Publique (2011)	84
2 - Mise en pratique dans un contexte endémo-épidémique : Recommandations du Cire Antilles Guyane (2013)	87
3 - Interprétation des tests diagnostiques	90
III – ELABORATION DES CONTROLES INTERNES DE LA QUALITE POUR LA	
DETECTION DE L'ANTIGENE NS1 ET DES ANTICORPS IGM DE LA DENGUE..	92
A - Généralités sur les contrôles internes de la qualité (CIQ).....	93
B - Fabrication et évaluation d'un CIQ AgNS1 et d'un CIQ IgM dengue Erreur ! Signet non défini.	
1 – Matériels et méthodes	95
2 - Résultats.....	99
C - Discussion	113
IV – CONCLUSION.....	117
V – ANNEXES.....	118
VI – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	133

I – INTRODUCTION

Avant 1970, seuls neuf pays avaient connu des épidémies de dengue sévère [1].

Aujourd'hui, la dengue est devenue un problème de santé publique majeure dans l'ensemble des régions tropicales et intertropicales du globe.

Dans la Caraïbe, la dengue demeure fort complexe au plan épidémiologique, avec la circulation des quatre sérotypes de la maladie et des conditions fort propices à sa transmission. Depuis 1995, la Guadeloupe a connu six épidémies importantes [2].

Ce contexte épidémiologique justifie un diagnostic biologique simple, rapide et fiable.

Le choix des tests à utiliser est crucial et doit prendre en compte la situation épidémiologique, la durée d'évolution de la pathologie, la disponibilité et le coût des tests [3]. La fiabilité des tests est assurée en grande partie par les contrôles internes de la qualité qui permettent de valider la manipulation, indépendamment des contrôles disponibles dans les coffrets réactionnels.

Dans la première partie, nous décrivons la triade infectieuse virus-vecteur-hôte, l'épidémiologie de la dengue, son évolution clinico-biologique ainsi que sa pathogénie. Dans la deuxième partie, nous présenterons la stratégie diagnostique recommandée en contexte épidémique, en prenant comme exemple l'épidémie de dengue de 2013 en Guadeloupe. Pour finir, la troisième partie sera consacrée à l'étude de l'élaboration des contrôles internes de la qualité pour la détection de l'antigène NS1 et la sérologie IgM de la dengue, réalisée au sein du laboratoire de virologie du Centre Hospitalier Universitaire de Pointe-à-pitre.

A - Historique au niveau mondial et dans la Caraïbe

Le terme « Dengue » est employé depuis très longtemps pour désigner une maladie fébrile accompagnée de myalgies, d'arthralgies, et suivie d'exanthème, sévissant dans les régions tropicales et méditerranéennes, et recouvrant en réalité des syndromes d'étiologies très diverses. De nos jours, la confusion existe encore avec ce qu'il est convenu d'appeler les syndromes « dengue-like » (paludisme, chikungunya, leptospirose...) qui se définissent comme une fièvre d'apparition brutale avec un ou plusieurs symptômes non spécifiques (myalgies, arthralgies, céphalées frontales, asthénie, douleurs rétro-orbitaires, éruptions maculo-papuleuses...), en l'absence de point d'appel infectieux.

C'est à la fin du XVIIIe siècle (1779-1780) que les premières épidémies de dengue, clairement documentées « dengue-like », ont été rapportées. Elles ont concerné pratiquement simultanément trois continents, l'Asie (Indonésie et Inde), l'Afrique (Égypte, Arabie et Perse) et l'Amérique du Nord (Philadelphie et Pennsylvanie) [4].

En 1869, le Collège royal de médecine de Londres inscrivit la maladie sous le nom de « dengue », mot issu du swahili « *ki dinga pepo* » (langage africain) qui décrit la maladie comme des crampes causées par un esprit malin.

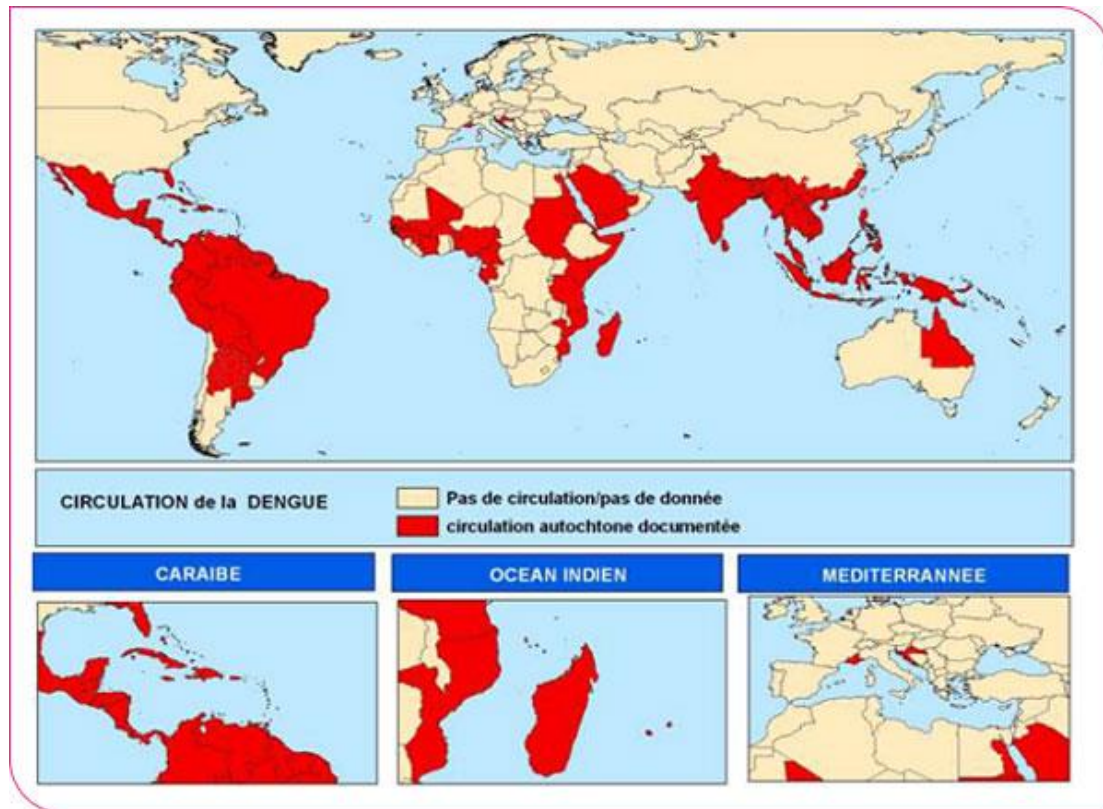
Ce n'est qu'en 1945 que Sabin et Schlesinger isolent les deux premiers sérotypes de la dengue [5], et seulement en 1956 que les sérotypes 3 et 4 sont isolés par Sather [6], alors que la nature virale de l'agent pathogène a été démontrée précédemment par Ashburn et Craig dès 1907 [7].

La forme hémorragique fut reconnue en tant que nouvelle maladie pour la première fois aux Philippines en 1956 [6]. A la dengue classique bénigne s'ajoutèrent alors la dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc.

Dans la Caraïbe, ce n'est qu'en 1952 que le virus de la dengue de sérotype 2 (DENV-2) fut isolé pour la première fois, à Trinidad [8]. En 1963, le sérotype 3 (DENV-3) était mis en évidence à Porto Rico où l'épidémie toucha près de 27 000 personnes, puis s'étendit à la Jamaïque et au Venezuela (respectivement 15 000 et 30 000 cas recensés). En 1977, l'apparition du sérotype 1 (DENV-1) fut responsable d'une nouvelle épidémie d'envergure dans la Caraïbe : 35 000 cas à Porto Rico, 47 000 cas en Martinique [9].

Depuis l'identification en 1981 des premières formes hémorragiques de la dengue dans la Caraïbe (épidémie de Cuba, après introduction de souches virales du sud-est asiatique) [10], la Guadeloupe a connu en 1995 une première épidémie importante liée à la circulation prédominante du virus DENV-2 avec l'enregistrement de 7 cas de forme hémorragique. En 2001, une épidémie associée au virus DENV-3 a touché près de 5% de la population. En 2005, une nouvelle épidémie, largement dominée par le virus DENV-4, a néanmoins vu circuler de façon concomitante les virus DENV-2 et DENV-3 [2]. Les épidémies suivantes en 2007 et 2010 touchaient respectivement 5 et 10% de la population, avec 411 cas hospitalisés et 6 décès en 2010 [11]. Le vecteur impliqué dans ces épidémies était le moustique *Aedes aegypti*.

Figure 1. Aires de répartition de la dengue (2011) [12]



Le nombre de cas dans les Amériques, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental a dépassé 1,2 million en 2008 et 2,3 millions en 2010 (sur la base des données officielles transmises par les États Membres à l'OMS). En 2010, la région des Amériques a signalé à elle seule 1,6 million de cas, dont 49 000 cas de dengue sévère.

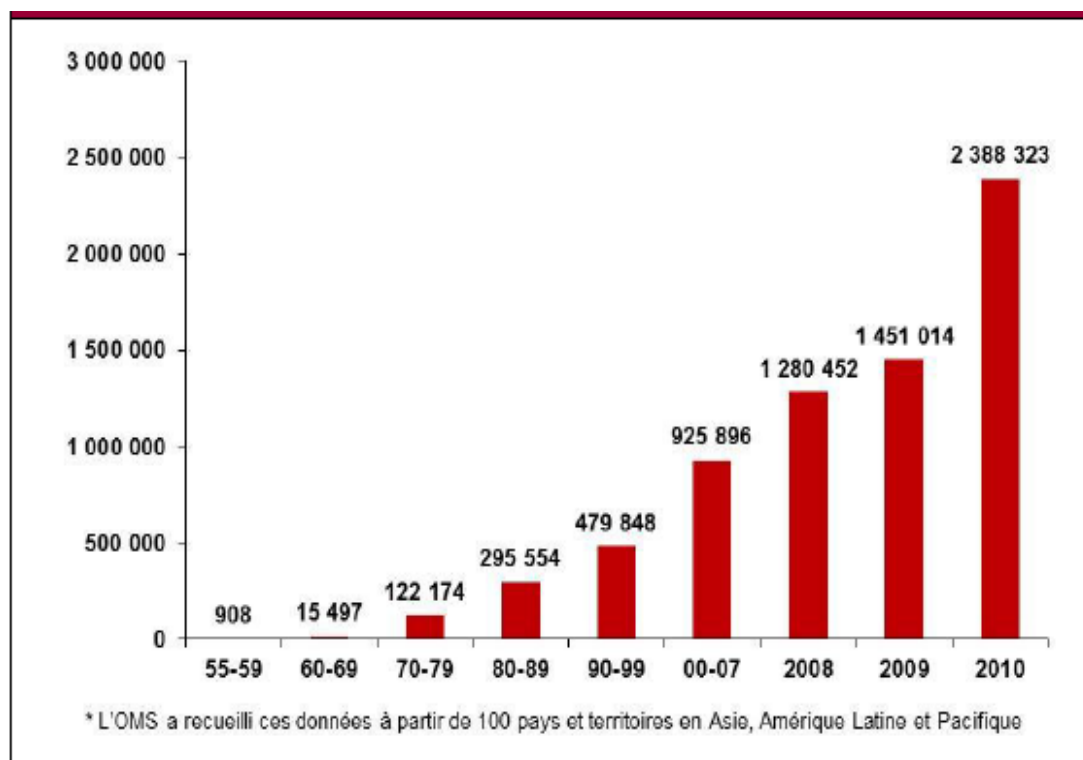
La menace d'une flambée de dengue existe désormais en Europe avec le moustique vecteur *Aedes albopictus*. Des cas autochtones ont été rapportés pour la première fois en France et en Croatie en 2010, et des cas importés ont été détectés dans trois autres pays européens [1]. Le ministère chargé de la santé a mis en place un réseau national de surveillance du moustique vecteur *Aedes albopictus* en France

métropolitaine à partir de 1999, suite à son signalement en Normandie la même année sur des sites d'importation de pneus.

Au début de la saison de surveillance 2013, ce moustique très agressif et très anthropophile est alors implanté dans 17 départements des régions Provence-Alpes-Côte d'Azur, Corse, Languedoc-Roussillon, Midi-Pyrénées, Aquitaine et Rhône-Alpes [13].

Bien que peu présent dans la Caraïbe (prédominance d'*Aedes aegypti*), son apparition est surveillée notamment à Cuba. Ses capacités vectorielles sont accrues par rapport à *Aedes aegypti* du fait de sa très grande agressivité.

Figure 2. Nombre annuel moyen de cas de dengue (simples et sévères) pour la période 1955 – 2007 et nombre annuel entre 2008 et 2010 en Asie, Amérique Latine et Pacifique [14]



B - Virologie et cycles viraux

1 - Classification des virus de la dengue

Le Comité International de Taxonomie des Virus ou ICTV [15] répertorie le virus de la dengue dans la famille des *Flaviviridae*. Celle-ci est subdivisée en quatre genres :

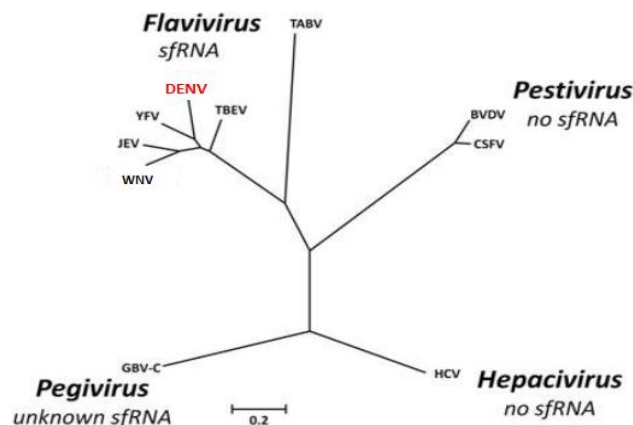
-*Flavivirus* qui inclue notamment les groupes du virus de la dengue (DENV), du virus de la fièvre jaune (YFV), du virus de l'encéphalite japonaise (JEV), du virus West Nile (WNV), du virus de la méningo-encéphalite à tiques (TBEV), et du virus de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV),

-*Pestivirus*, comprenant des agents pathogènes chez l'animal,

-*Hepacivirus*, correspondant au virus de l'hépatite C (HCV) et au GB virus A.

-*Pegivirus* (GB virus C ou GBV-C)

Figure 3. Arbre phylogénétique schématique des genres et des principaux virus de la famille des *Flaviviridae*, basé sur la séquence en acides aminés de l'ARN polymérase ARN dépendante. BVDV : bovine viral diarrhea virus, CSFV : classical swine fever virus, TABV : tamana bat virus [16]



La dengue est également classée parmi les arbovirus, où elle constitue d'ailleurs la plus fréquente des viroses transmises chez l'homme.

Les arbovirus, contraction de l'expression anglo-saxonne *arthropod borne virus*, regroupent un vaste ensemble de virus de familles différentes transmis indirectement de vertébré à vertébré (hôte) par l'intermédiaire d'un arthropode hématophage, ceci après un cycle de réplication du virus chez l'arthropode (vecteur biologique).

La définition des arbovirus est écologique et ne repose pas sur la structure des virus.

Parmi les arbovirus de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*, on retrouve des virus responsables de syndromes aigus fébriles ou « dengue-like » (DENV, WNV, virus de la Forêt de Kyasanur), de fièvres hémorragiques (DENV, YFV, virus de la Forêt de Kyasanur) ou de syndromes encéphalitiques (DENV, SLEV, WNV, JEV...)

Les principaux arbovirus pathogènes pour l'homme sont répertoriés dans le tableau 1 en annexe [17].

Les *Flavivirus* possèdent des épitopes en commun, ce qui peut gêner l'interprétation des réactions sérologiques (réactions croisées). Il faut avoir recours à la séroneutralisation pour pouvoir différencier les anticorps des différents *Flavivirus*.

2 - Structure des virus de la dengue

Le génome du DENV est un ARN monocaténaire de polarité positive. La taille de la molécule d'ARN est d'environ 11 000 paires de bases, avec une variation de

quelques dizaines de paires selon le sérotype. Les virions de la dengue, d'un diamètre d'environ 50 nm, possèdent une capsidie icosaédrique à symétrie cubique.

Son enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule-hôte, dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines structurales virales, la protéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M) [18,19] (figure 4).

La protéine E permet l'attachement viral à la cellule cible ainsi que sa pénétration, et est la cible privilégiée des anticorps neutralisants. Elle est divisée en trois domaines structuraux ou fonctionnels : le domaine central (domaine I), le domaine de dimérisation qui présente un peptide de fusion (domaine II) et le domaine de reconnaissance du récepteur au virus à la surface cellulaire (domaine III).

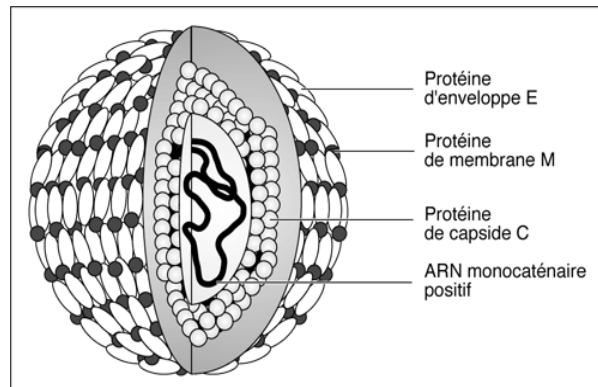
La protéine M est synthétisée sous forme de précurseur PrM qui permet le maintien de l'intégrité de la conformation de la protéine E pendant l'assemblage du virion. Le clivage de PrM en protéine M a lieu lors de l'export du virion vers l'extérieur de la cellule en même temps qu'il acquiert son enveloppe d'origine cellulaire.

Le génome viral associé à une troisième protéine structurale, la protéine de capsidie (C), forme la nucléocapsidie (figure 4).

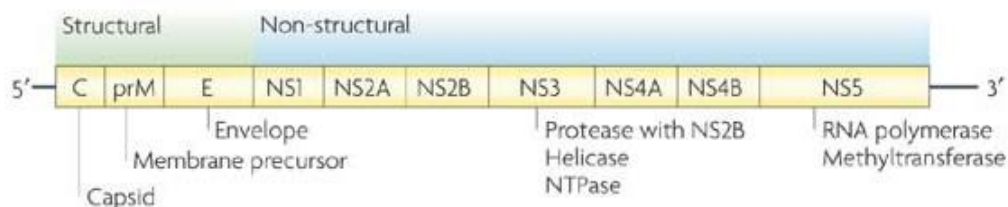
En plus des trois protéines structurales citées ci-dessus, le génome de la dengue code pour sept protéines non structurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b et NS5).

Figure 4. Organisation structurale du virus de la dengue [20] **(A)** et représentation schématique du génome viral [21] **(B)**

A



B



Les fonctions de certaines protéines non structurales ne sont pas encore clairement établies.

Des comparaisons de séquences et des analyses biochimiques suggèrent que NS3 est probablement trifonctionnelle et possède des activités de protéase, d'hélicase et d'ARN triphosphatase [22,23].

Une activité ARN polymérase ARN-dépendante a été montrée *in vitro* pour la protéine NS5 [24].

La protéine NS1 existe sous deux formes, soluble ou associée aux membranes cellulaires. Bien qu'elle ne semble posséder aucun site d'ancrage, elle est capable sous forme d'homodimère de s'associer aux membranes des cellules infectées. La

dimérisation de NS1 est également nécessaire à son export le long de la voie de sécrétion, du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. La protéine NS1 est donc présente sur la surface cellulaire des cellules infectées.

Une autre partie de la protéine NS1 est libérée dans le milieu extracellulaire, sous forme soluble hexamérique. Cette forme peut donc être détectée dans le sérum de patients infectés. Elle est capable d'induire une activation du système du complément par formation de complexes immuns, par fixation à des protéines régulatrices du complément comme les clusterines [25], aboutissant à la génération d'anaphylatoxines et de complexes terminaux du complément responsables de fuite plasmatique décrite lors des formes sévères de dengue [26]. Elle peut également induire des mécanismes d'échappement immunitaire complément-dépendants en se fixant à des protéines de l'hôte comme le facteur H, protéine de régulation du complément [27], ou le facteur C4 [28].

Les virus de la dengue étant des virus enveloppés, ce sont des virus fragiles. Ils sont sensibles à l'éther, au chloroforme, au désoxycholate de sodium, ils sont également fragiles à la chaleur et très vite inactivés hors des cellules.

3 - Tropisme cellulaire et cycle viral chez l'Homme

Chez l'homme, les virus de la dengue se répliquent dans les cellules de la lignée phagocytaire mononucléée : macrophages, monocytes, histiocytes et cellules de Küppfer [29].

Les cellules endothéliales, le tissu hépatique et la moelle osseuse seraient également des cibles virales.

Parmi les cellules du système immunitaire, les cellules dendritiques de la peau sont décrites comme les premières cibles cellulaires du virus de la dengue au site d'inoculation par le moustique vecteur de la maladie. L'infection de ces cellules serait ainsi le point de départ pour la dissémination du virus de la dengue chez l'individu infecté.

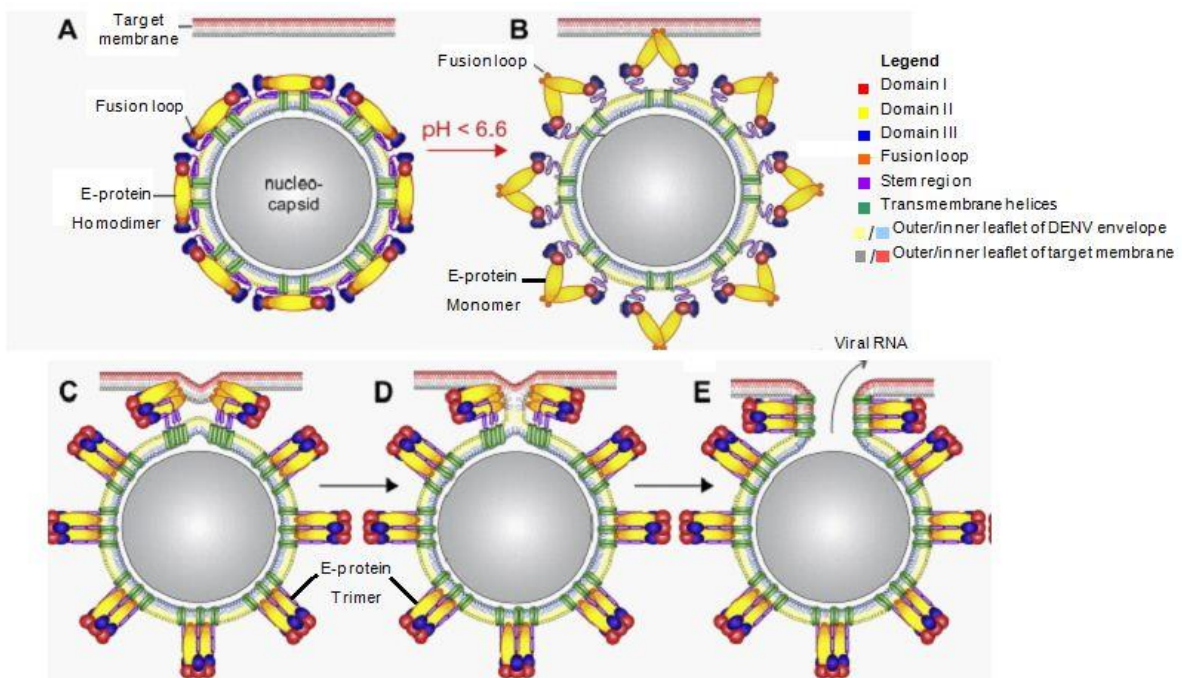
Dans le cas d'une cellule de mammifère, l'attachement du virus à la surface cellulaire implique une interaction entre la protéine d'enveloppe E et des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire. Deux équipes de l'Institut Pasteur ont identifié le rôle de récepteur pour le virus de la dengue de la molécule DC-SIGN (*DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin*), une lectine de type C mannose-spécifique, située à la surface des cellules dendritiques de la peau [30].

Un processus d'endocytose récepteur-dépendante conduit alors à l'internalisation de la particule virale dans une vésicule à clathrines. Une pompe à protons permet ensuite l'acidification de l'endosome, ce qui provoque un changement de conformation irréversible de la protéine d'enveloppe E, initialement présente sous forme d'un homodimère dans la particule virale, et expose des régions hydrophobes réagissant avec les lipides de la membrane de l'endosome (figure 5). Se produit alors la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule cible.

La décapsidation permet la libération de l'ARN génomique viral [18].

Figure 5. Processus de fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale

[31]



(A) Homodimère de la protéine E à la surface de la particule virale ;

(B) Diminution du pH endosomal provoquant la dissociation de l'homodimère de E en monomères et permettant l'insertion du peptide de fusion dans la membrane de l'endosome ;

(C, D) Trimère de la protéine E stable en structure d'épingle à cheveux ;

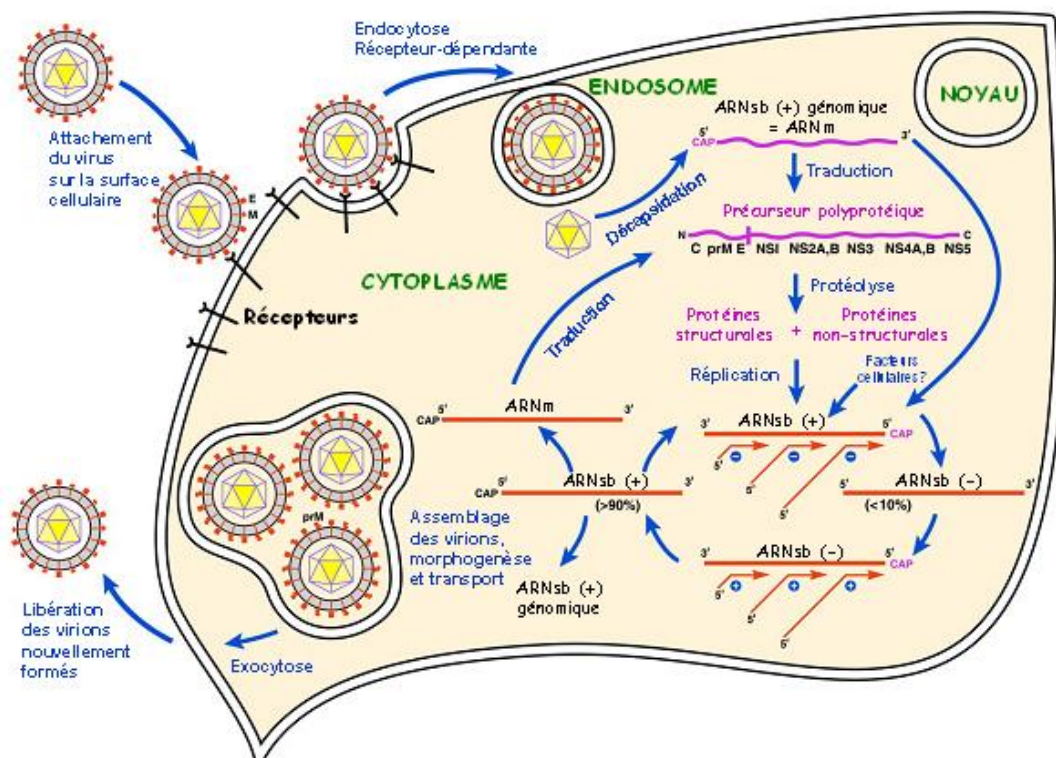
(E) Ouverture du pore de fusion permettant la sortie de l'ARN viral dans le cytoplasme de la cellule.

Le cycle de réplication virale a lieu dans le cytoplasme de la cellule-hôte (figure 6).

L'assemblage du virion se produit dans le réticulum endoplasmique (RE) et les virus

sortent de la cellule par l'intermédiaire du réseau transgolgien.

Figure 6. Cycle du virus de la dengue dans une cellule de mammifère [32]



Les premières synthèses commenceraient aux alentours de 10 heures post-infection, moment où les premières protéines virales deviennent détectables. La production de particules virales atteint son maximum environ 24 heures après le début de l'infection.

4 - Polymorphisme moléculaire

Parmi les virus de la dengue, Il existe quatre sérotypes : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4, qui se définissent en particulier par l'induction chez l'hôte d'anticorps neutralisants spécifiques de chaque sérotype. Ces anticorps n'induisent pas d'immunité croisée effective. Ils ne sont pas différenciables par les méthodes de sérologie classiques (sérologie croisée).

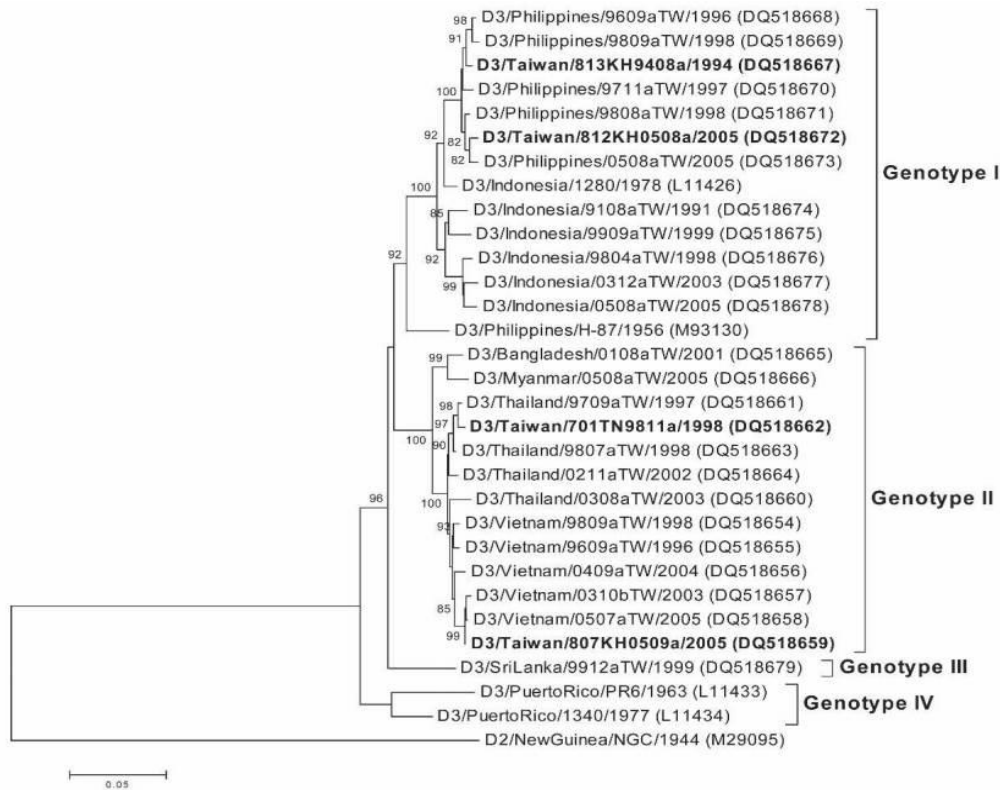
Le pourcentage d'homologie protéique inter-sérotypique varie entre 60 et 70%, le sérotype étant déterminé par la glycoprotéine d'enveloppe E [33].

Chaque sérotype comporte plusieurs variants, appelés aussi génotypes, sous-types ou topotypes quand ils sont rattachés à une zone géographique. L'identification de ces génotypes par des techniques de biologie moléculaire (génotypage) a permis d'identifier différentes souches lors d'épidémies ou d'épizooties et d'en suivre la circulation entre différentes localités. Il faut donc considérer un sérotype comme une famille de topotypes ayant entre eux des relations plus ou moins étroites, les topotypes étant définis comme des souches de virus présentant 6 à 7 % de divergence au niveau de leurs séquences nucléotidiques [34], avec cependant une immunisation croisée entre eux.

L'émergence de ces variants génomiques s'explique par le fait que durant la réplication des virus à ARN, des erreurs sont introduites de manière aléatoire dans leur génome par les ARN polymérases ARN dépendantes. Ces recombinaisons génomiques, dont les conséquences infectieuses et immunitaires sont encore à l'étude, pourraient représenter un facteur d'évolution et/ou de risque d'apparition de souche d'un nouveau type.

Les analyses phylogénétiques des génotypes sont basées sur l'étude de séquences génomiques partielles ou complètes, comme la séquence nucléotidique du gène de l'enveloppe (E).

Figure 7. Arbre phylogénétique basé sur le séquençage complet du gène de la protéine d'enveloppe (E) du virus DENV-3. Les virus sont identifiés en utilisant la nomenclature sérotype/pays/souche/année d'isolement [35].



5 - Vecteurs de la dengue

La diffusion des virus de la dengue est étroitement liée à la répartition des moustiques vecteurs de la maladie. Ces moustiques appartiennent à la famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Culicinae*, au genre *Aedes* et au sous-genre *Stegomyia*. Leur rôle dans la transmission du virus de la dengue a été démontré dès le début du XXe siècle grâce à des expériences sur hôtes humains volontaires. La première expérience fut réalisée par Graham en 1903, près de 40 ans avant l'isolement des premiers virus de la dengue. A la suite des travaux de Bancroft en

1906 [36], l'implication d'*Aedes aegypti* dans la transmission du virus de la dengue a été admise, puis confirmée par Cleland en 1918 [37].

Dans les années 1920, des chercheurs de l'armée américaine précisaient la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti*, et identifiaient *Aedes albopictus* comme autre vecteur du virus de la dengue.

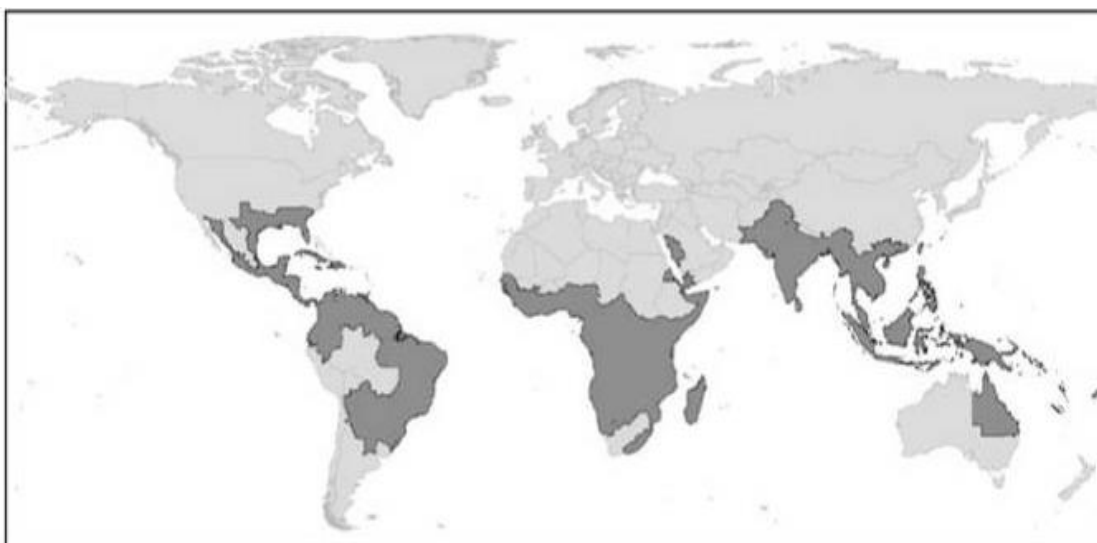
- *Aedes aegypti* : vecteur principal des virus de la dengue

Originaire d'Afrique, ce moustique a été décrit à partir de spécimens provenant du sud de l'Egypte en 1762 par Linné.

Cosmopolite et pantropical, son aire de répartition se serait étendue vers l'ouest dès le XVIIe siècle, au bassin méditerranéen au XVIIIe siècle, à l'Asie du Sud-est puis aux îles du Pacifique à partir du XIXe siècle, grâce à la navigation fluviale.

Son introduction dans les ports a signé le début des premières épidémies.

Figure 8. Distribution mondiale d'*Aedes aegypti* (2006) [38]



Le corps de ce moustique est noir décoré de taches blanches ou argentées. La trompe est entièrement noire et les pattes sont nettement striées de blanc aux articulations et aux extrémités [39].

Figure 9. *Aedes aegypti* femelle [40]



Il est retrouvé entre le 42^{ème} degré de latitude nord et le 40^{ème} degré de latitude sud [41]. Très anthropophile, il est surtout urbain.

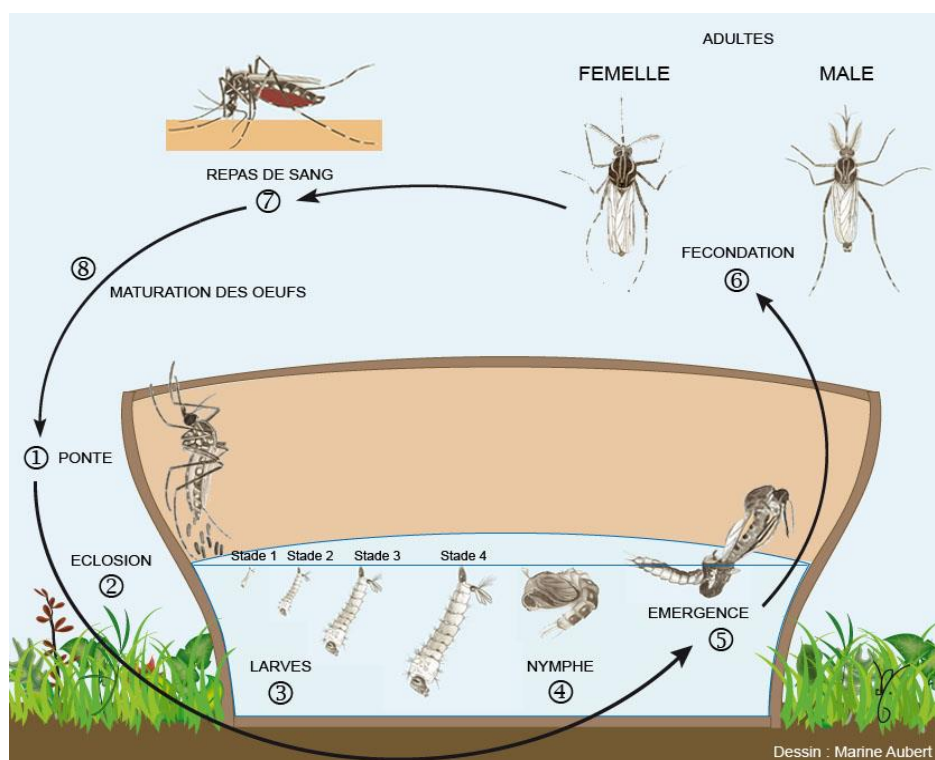
Ses gîtes de ponte habituels sont de petites collections artificielles d'eau claire rencontrées autour des habitations (sous-pots, récipients pour boutures, vases, gouttières, vieux pneus...).

Chez les moustiques vecteurs, seules les femelles sont hématophages, pour se procurer les acides aminés nécessaires à l'ovogénèse. L'*Aedes* femelle a une activité diurne et nocturne avec des pics d'activité en début de matinée et au crépuscule. Elle est attirée par le gaz carbonique, les radiations thermiques de la peau, les couleurs foncées et les odeurs, notamment l'acide lactique et les produits de dégradation des acides gras éliminés dans la sueur [42].

La femelle *Aedes aegypti* pond ses œufs environ 48 heures après un repas sanguin. Ceux-ci peuvent éclore très rapidement en environ 24 heures si les conditions sont optimales. Les larves vont passer par différents stades jusqu'à la nymphe d'où émergera le moustique adulte ou imago (figure 10). De la larve au moustique adulte, il se passe 7 à 12 jours selon les conditions, notamment la température et l'alimentation. Le moustique adulte a une durée de vie dans la nature estimée à 2 à 3 semaines au maximum. Il peut cependant vivre bien plus longtemps, environ 2 à 3 mois en condition de laboratoire [43].

Les œufs pondus peuvent se dessécher, rester intacts plusieurs mois voire jusqu'à deux ans (période d'arrêt = diapause) et éclore normalement une fois au contact de l'eau. Cependant, les œufs de ce moustique, spécifique des régions chaudes tropicales, ne résisteraient pas aux hivers de l'hexagone.

Figure 10. Cycle de développement du moustique *Aedes* [44]



Ce moustique est peu mobile et a une capacité de dispersion faible (100 à 500 mètres) depuis son gîte d'origine.

- *Aedes albopictus* [45,46]

Originaire des forêts d'Asie du Sud-est, ce moustique appartient au groupe *scutellaris* du sous-genre *Stegomyia*. Aussi appelé « moustique-tigre », il se distingue par la présence d'une ligne longitudinale blanche en position centrale au niveau du scutum (dos du moustique), visible à l'œil nu (figure 11).

Il se propage dans le monde entier depuis la fin des années 1970. *Aedes albopictus* colonise tout un groupe de plantes retenant l'eau de pluie (broméliacées, tiges de bambous coupées, cosses de noix de coco...) et dépose ses œufs dans les cavités naturelles des arbres. Jusqu'au début du XXe siècle, le moustique est retrouvé en Inde, en Asie du Sud-est, en Chine, en Indonésie, dans les îles de l'Océan Indien, puis à Hawaii, où il est présent dans les zones forestières, rurales et péri-urbaines. Il s'adapte ensuite à l'environnement créé par l'homme et bien que n'acquérant pas le niveau de domestication d'*Aedes aegypti*, serait responsable de l'introduction de souches de dengue dans les zones habitées.

Figure 11. *Aedes albopictus* [47]

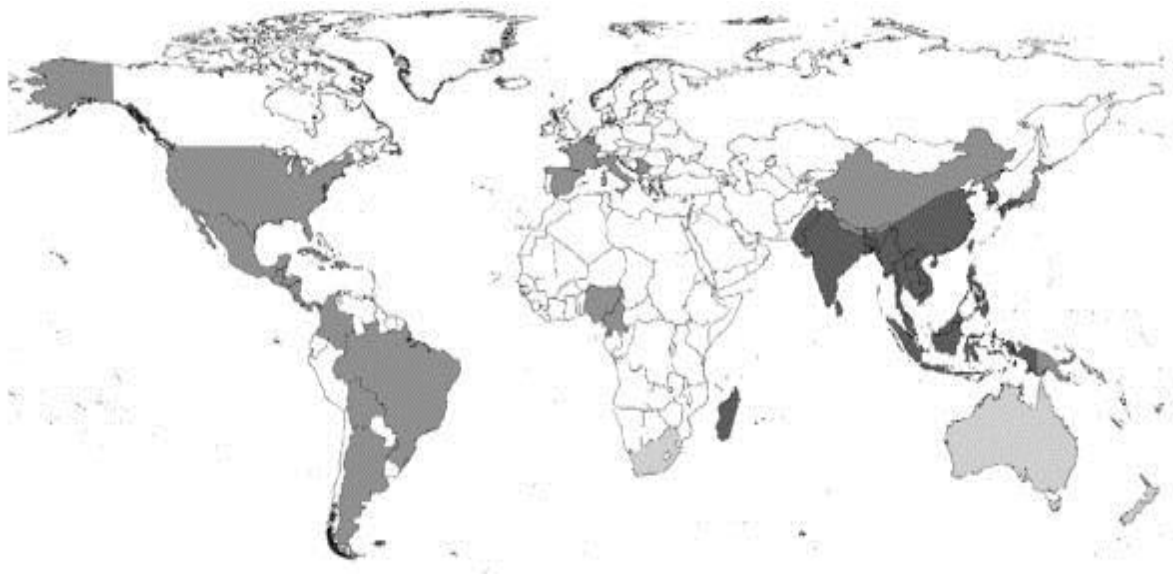


Son aire de répartition s'étend ensuite au continent américain, où il est responsable de cas sporadiques d'infection, ainsi qu'en Afrique et en Océanie (figure 12).

La dispersion mondiale du moustique a notamment été permise grâce au commerce international des pneus usagés et décorations végétales, lieu idéal de ponte pour les moustiques. Les œufs d'*Aedes albopictus* sont résistants au froid et à la sécheresse. Dans les régions tempérées, ils persistent en hiver grâce à la diapause au stade d'œufs.

Son arrivée en Europe du Sud commence en Albanie en 1979, puis en Italie à partir de 1990, en France depuis 1999, en Belgique depuis 2000, en Serbie et au Monténégro depuis 2001, en Suisse depuis 2003 et en Espagne depuis 2004.

Figure 12. Distribution d'*Ae. albopictus* avant les années 1980 (gris foncé) et ces 30 dernières années (gris clair) ; Pays ayant intercepté *Ae. Albopictus* au niveau de sites portuaires (gris très clair) (2006) [48]



- Autres vecteurs de la dengue du genre *Aedes*

Un autre moustique appartenant au groupe *scutellaris* du sous-genre *Stegomyia* est impliqué dans la transmission de la dengue. Il s'agit d'*Aedes polynesiensis*, présent essentiellement à Fidji et en Polynésie. On lui attribue les premières épidémies de dengue en Polynésie française, à la fin du XIXe siècle [49].

Dans la zone Pacifique, d'autres moustiques appartenant au même groupe et de distribution très localisée seraient impliqués : *Ae. scutellaris* (Nouvelle Guinée), *Ae. hebrideus* (Vanuatu), *Ae. Cooki* (Niue), ... [50].

Sur le continent africain, d'autres espèces du sous-genre *Stegomyia* (*Ae. luteocephalus*, *Ae. africanus*, *Ae. opok*), ainsi que deux espèces du sous-genre *Diceromyia* (*Ae. furcifer* et *Ae. taylori*) ont été décrites comme étant des vecteurs selvatiques du virus de la dengue.

En Malaisie, le virus de la dengue a été isolé chez des moustiques selvatiques du groupe *niveus* sous-genre *Finlaya*. Ils pourraient être impliqués dans la transmission de virus, du singe à l'homme.

Dans la Caraïbe, *Ae. (Gymnometopa) mediovittatus*, moustique à l'origine selvatique qui s'est adapté à l'environnement péri-domestique en zone rurale, serait un vecteur potentiel du virus de la dengue.

6 - Cycle de transmission de la dengue

Après un repas sanguin sur une personne virémique, le moustique n'est capable de transmettre le virus par nouvelle piqûre qu'après répllication du virus. La période d'incubation extrinsèque (période comprise entre l'ingestion du virus et son apparition dans les glandes salivaires) étant de 10 à 14 jours, et compte tenu de la durée de vie courte du moustique (longévité de 2 à 3 semaines), la période de transmission est limitée. Cette période d'incubation extrinsèque varie en fonction de la température, des conditions du régime alimentaire larvaire et de la dose de virus ingérée [51].

Après avoir pénétré au niveau des glandes salivaires, le virus infecte le tractus digestif du moustique et se réplique dans les cellules épithéliales de l'estomac. Celui-ci peut constituer une barrière digestive à la fois contre l'invasion et/ou la répllication, et contre la dissémination virale, et constituerait donc l'un des facteurs responsables de la variabilité intra-spécifique de la compétence vectorielle [52]. Des virémies très élevées sont ainsi nécessaires pour que le virus envahisse l'épithélium intestinal et infecte l'*Aedes*, ce qui contribue à sélectionner les souches virales à fortes virémies [53].

Le virus quitte alors l'estomac pour infecter les cellules du tissu adipeux, puis se réplique dans les cellules épithéliales des glandes salivaires.

Après la période extrinsèque de multiplication virale, le moustique transmet le virus libéré dans la salive au cours d'un nouveau repas sanguin. La répllication du virus chez ses hôtes invertébrés est généralement asymptomatique. Le virus peut ainsi

persister tout au long de la vie du moustique vecteur, qui garde alors sa compétence vectorielle. Une persistance virale est également observée dans les lignées de cellules de moustiques infectées expérimentalement. À l'opposé, l'infection des cellules de primates ou de rongeurs par le virus de la dengue aboutit généralement à la mort cellulaire.

Le vol du moustique femelle est discret et prudent, elle s'envole rapidement si elle est dérangée lors d'un repas sanguin. Ce comportement a une grande importance épidémiologique car si un moustique *Aedes* infecté est interrompu lors de son repas sanguin, il peut alors piquer une autre personne. Un moustique infecté peut donc à lui seul contaminer plusieurs personnes.

Il existe chez ce moustique une transmission verticale. La femelle peut transmettre le virus par voie transovarienne à sa descendance et le futur imago sera alors vecteur de la dengue sans avoir jamais pris de repas sanguin sur une personne virémique [54-56]. De plus, il a été démontré que la transmission verticale du virus de la dengue pouvait persister sur plusieurs générations [57,58].

La compétence vectorielle de souches sauvages d'*Aedes albopictus* a été récemment comparée à celle de souches sauvages d'*Aedes aegypti*, provenant de la même région géographique. Des expériences d'infection orale ont permis de démontrer qu'*Aedes albopictus* présente une plus faible réceptivité orale au virus de la dengue. Ainsi, en Asie du Sud-Est où les deux vecteurs sont présents, la transmission de la dengue à l'état endémique et épidémique est essentiellement attribuée à *Aedes Aegypti* [59]. Cependant, dans la mesure où la transmission

verticale du virus de la dengue est plus efficace chez *Aedes albopictus*, celui-ci assurerait le maintien du virus durant les périodes inter-épidémiques [60].

En milieu rural (zone rurale, villages, îles peu peuplées), la transmission de la dengue se déroulerait selon un mode épidémique. En effet, la majorité de la population sensible présente dans la zone serait alors infectée et immunisée, et la diminution rapide du nombre d'individus sensibles mettrait fin rapidement à l'épidémie. Par contre, en zone urbaine, la transmission suivrait plutôt un mode endémo-épidémique, du fait de la population plus vaste rencontrée dans les grands centres urbains des zones tropicales et intertropicales du globe. Le virus est alors maintenu dans un cycle « *Aedes aegypti*-Homme-*Aedes aegypti* ».

La transmission des virus de la dengue dépend principalement de deux paramètres, eux-mêmes dépendant de plusieurs facteurs. Tout d'abord, la capacité des moustiques femelles à transmettre les virus de la dengue, qui dépend principalement de la durée de l'amplification extrinsèque du virus chez le moustique, de la durée moyenne de vie des moustiques, de la densité des moustiques, du nombre de piqûres et du taux d'infection des moustiques. Ces paramètres varient en fonction des conditions environnementales et climatiques. Le deuxième paramètre est l'intensité de la transmission, qui dépend de l'immunité de la population humaine touchée [61].

Il existe, en plus de la transmission vectorielle déjà décrite, une transmission non vectorielle : transmission sanguine (transfusions, piqûres d'aiguilles...), transmission

transmuqueuse (projection de sang infecté / yeux-nez-bouche) [62], transmission materno-fœtale [63] ainsi qu'une transmission par le lait maternel [64].

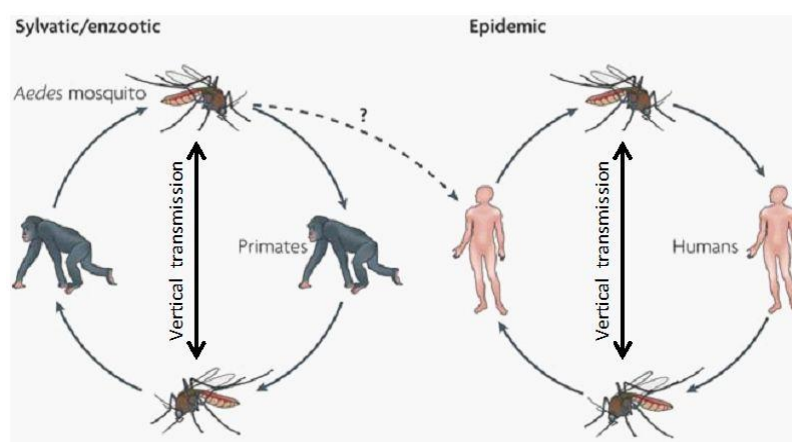
7 - Réservoirs et Hôtes

Le moustique du genre *Aedes* joue à la fois le rôle de vecteur et de réservoir du virus car il n'est pas affecté par le virus et reste donc infecté toute sa vie.

A la différence des autres arbovirus, le virus de la dengue a la particularité d'avoir un cycle strictement humain, sans réservoir animal intermédiaire.

Cependant, en Afrique, en Asie et très probablement aux Philippines, il existe en plus de ce cycle urbain Homme-*Aedes* (*Stegomyia*), un cycle forestier (ou cycle selvatique) impliquant certaines espèces de singes. Les divergences génétiques et écologiques entre les souches forestières et les souches urbaines du virus sont très importantes et, bien que les souches forestières soient responsables de cas cliniques, les épidémies qu'elles peuvent entraîner sont de faible ampleur [65].

Figure 13. Cycle de transmission de la dengue [21]



Les réservoirs des virus de la dengue peuvent donc être les humains, les moustiques et les primates. On peut néanmoins considérer que le véritable réservoir naturel de la dengue ayant un réel impact épidémiologique est aujourd'hui constitué par l'Homme. En effet, même s'il existe un cycle selvatique de transmission où le singe devient réservoir du virus et l'homme un hôte accidentel, ce sont cependant les hommes qui, par leurs déplacements, assurent la dissémination des virus et la propagation des épidémies.

C - Epidémiologie des virus de la dengue

1 - Epidémiologie actuelle

L'incidence de la dengue a progressé de manière spectaculaire dans le monde entier au cours des dernières décennies. Désormais, la maladie est endémique dans plus de 100 pays en Afrique, dans les Amériques, en Méditerranée orientale, en Asie du Sud-Est et dans le Pacifique occidental, ces deux dernières régions étant les plus touchées.

Selon les estimations de l'Organisation Mondiale de la Santé, environ 2,5 milliards d'individus sont exposés au risque d'infection par le virus de la dengue (soit 40% de la population mondiale). Chaque année dans le monde, il y aurait près de 50 millions d'infections, dont 500 000 formes sévères nécessitant une hospitalisation et responsables de 20 000 à 30 000 décès (principalement chez les enfants) [66].

2 - Situation épidémiologique en Guadeloupe – Les phases du PSAGE

L'augmentation régulière de l'incidence de la dengue en fait actuellement un problème de santé publique majeur dans les pays tropicaux.

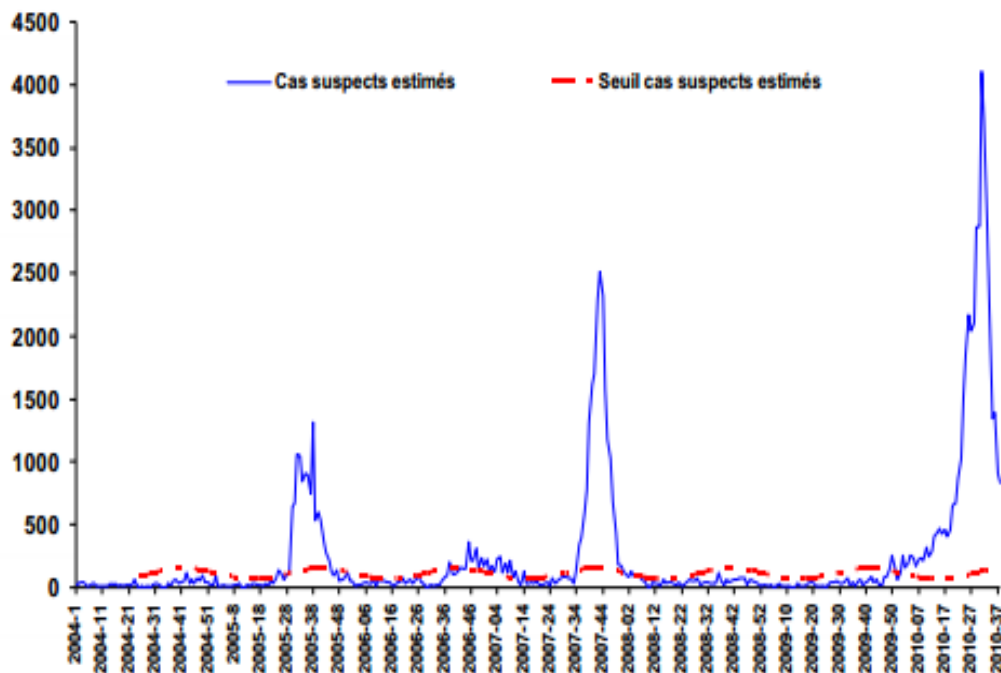
On distingue schématiquement [2] :

- des zones endémiques où les quatre sérotypes circulent en permanence à bas bruit avec des périodes épidémiques où un sérotype prédomine, notamment en Amérique tropicale et dans la Caraïbe.
- des zones épidémiques où un type donné de virus se dissémine de proche en proche, grâce aux déplacements des populations.

D'une situation épidémique engendrée par la circulation d'un seul sérotype, le continent sud-américain évolue progressivement vers une situation hyper-endémique dans laquelle les différents sérotypes vont circuler en permanence. Dans les années à venir, on peut probablement prédire une situation similaire à celle de l'Asie du Sud-Est. La dengue hémorragique pourrait alors devenir l'une des principales causes d'hospitalisation des enfants en Amérique du Sud.

Depuis l'arrivée des formes hémorragiques de la dengue dans la Caraïbe, la Guadeloupe a connu six épidémies importantes liées chacune à la circulation d'un sérotype prédominant, respectivement le DENV-2 en 1995, le DENV-3 en 2001, le DENV-4 en 2005, le DENV-2 en 2007, le DENV-1 en 2010 et enfin le DENV-4 en 2013, avec néanmoins une circulation concomitante d'un, voire de deux autres sérotypes.

Figure 14. Bilan des épidémies en Guadeloupe : nombre de cas suspects estimés de 2004 à 2010 [67]



Le Programme de Surveillance, d'Alerte et de Gestion des Epidémies de dengue (PSAGE dengue) dans les Départements Français d'Amérique (DFA) a ainsi été adopté en septembre 2007 en Guadeloupe par les autorités publiques [2]. Ce programme est animé par deux instances : la « Cellule de gestion des phénomènes épidémiques » qui a un rôle décisionnel, et « le comité d'experts des maladies infectieuses et émergentes » qui a pour rôle d'apporter un fondement scientifique aux stratégies de lutte contre la dengue. Cette stratégie épidémiologique s'appuie essentiellement sur la déclaration obligatoire des maladies transmissibles, mais aussi sur le réseau des médecins sentinelles de Guadeloupe créé en 1983, dont l'objectif est de dépister les premiers cas survenant dans une zone et d'identifier le sérotype concerné. Selon le risque épidémique, une graduation des stratégies de surveillance et de contrôle de la dengue est appliquée.

- La phase inter-épidémique de transmission sporadique

La transmission durant les périodes d'endémie (ou inter épidémique) connaît un rythme annuel saisonnier, faible ou sporadique durant la saison sèche et plus élevé durant la saison des pluies. La transmission est alors sporadique, en général de février à juin-juillet, durant laquelle les cas de dengue restent isolés, sans propagation de la maladie (absence de foyers de transmission).

- Les phases inter-épidémiques de foyers épidémiques et recrudescence saisonnière

Elles correspondent à l'apparition de foyers épidémiques, en général pendant la saison cyclonique, entre juillet et janvier. Parfois isolés, parfois plus nombreux et étendus, ils apparaissent de manière concomitante et/ou successive, mais demeurent limités dans l'espace.

- La phase de pré-alerte épidémique

Durant la période inter épidémique ou de recrudescence saisonnière, une situation épidémiologique « anormale » peut être observée à partir de l'augmentation du nombre hebdomadaire de cas au-delà du seuil établi à partir des données de surveillance des années antérieures, témoignant d'une circulation accrue du virus. Cette augmentation est souvent associée à l'émergence d'un sérotype, non détecté depuis un certain nombre d'années et ayant été détecté l'année précédente de manière sporadique. Ces signaux indiquent un risque de développement d'une

épidémie du fait d'une faible immunisation de la population à ce sérotype « émergent » et doivent être considérés comme une « pré-alerte épidémique ».

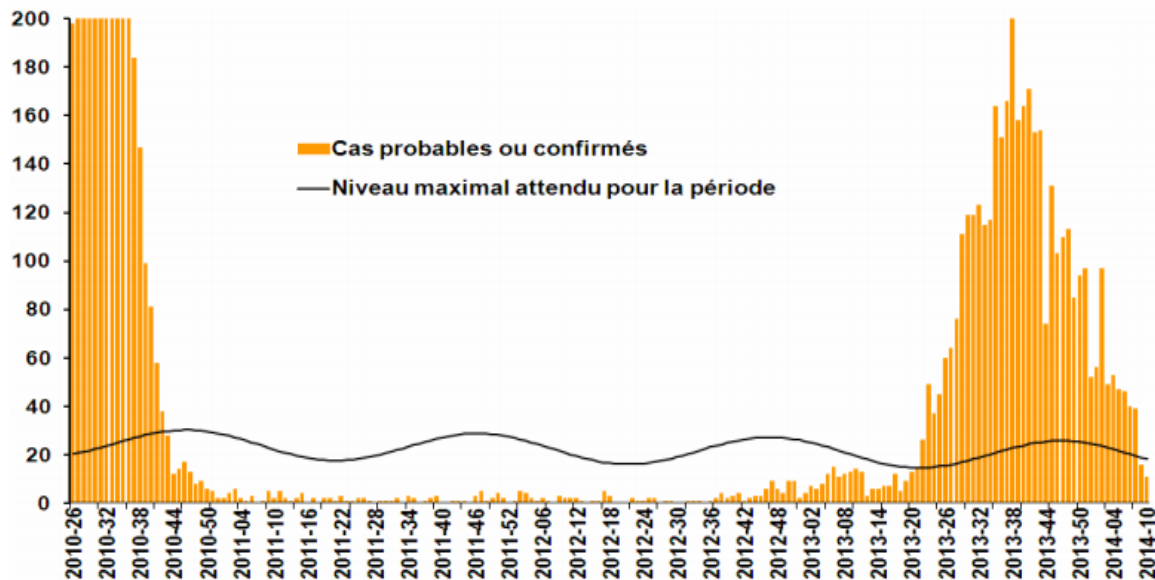
- Les phases épidémiques

Certaines années, le niveau de recrudescence saisonnière habituellement observé est franchement dépassé du fait d'une généralisation rapide de la transmission de la maladie à de nombreuses communes, à certaines îles de l'archipel, voire à la totalité du territoire guadeloupéen, provoquant l'apparition d'une épidémie. Ces phénomènes épidémiques surviennent sur un rythme souvent pluri-annuel (2007, 2010 et 2013 pour les 3 dernières épidémies). La durée des deux dernières épidémies a été exceptionnellement longue (47 semaines pour l'épidémie de 2010, 41 semaines pour celle de 2013), alors que les durées des précédentes épidémies survenues en Guadeloupe étaient de 21 semaines en 2005 et de 17 semaines en 2007. Elles apparaissent souvent au début de la saison cyclonique (entre juin et septembre). Cependant, le début de l'épidémie de 2010 est survenu de manière très inhabituelle, au cours de la première semaine de décembre (semaine 2009-49, période sèche). Les habitudes de vie d'*Aedes aegypti*, très inféodés à l'habitat humain, permettent la prolifération de ce vecteur à minima, suffisante pour une transmission efficace du virus. Ces épidémies peuvent être à l'origine d'une augmentation du nombre de formes graves de la dengue nécessitant une adaptation des pratiques médicales et de la réponse hospitalière.

La réapparition du sérotype 4 en Guadeloupe a provoqué la dernière épidémie, qui a débuté en mai 2013 (semaine 2013-22). Ce sérotype DENV-4 a très peu circulé en

Guadeloupe depuis l'épidémie de 2005, ce qui suggère qu'une part importante de la population était susceptible vis-à-vis de ce sérotype.

Figure 15. Nombre hebdomadaire des cas probables et confirmés, Guadeloupe continentale et îles proches, juillet 2010 à mars 2014 [68]



Au cours de cette dernière épidémie (de mai 2013 à mars 2014) ont été observés 15 270 cas cliniquement évocateurs, 3 870 cas probables ou confirmés, 233 cas hospitalisés dont 48 sévères et 9 décès.

3 - Facteurs influençant le risque épidémique

Le cycle de transmission des virus de la dengue par les moustiques vecteurs *Aedes* reste étroitement dépendant des relations qui lient les virus, l'hôte invertébré (le vecteur) et l'hôte vertébré (l'homme). Chaque composante de ce système vectoriel est modélisée par des facteurs extrinsèques ou facteurs environnementaux (qui influent sur les chances de contact entre le vecteur et l'homme), et par des facteurs

intrinsèques (par exemple, les mécanismes moléculaires et génétiques contrôlant la capacité des moustiques à transmettre un pathogène).

Les conditions climatiques jouent un rôle majeur dans la dynamique de la transmission de la dengue, notamment la chaleur, facteur prépondérant qui diminue la période d'incubation extrinsèque chez le moustique, augmente la susceptibilité des moustiques adultes au virus, accélère le cycle gonotrophique, le développement vers l'âge adulte ainsi que la vitesse de réplication du virus [11,69]. Les précipitations importantes, quant à elles, jouent un rôle en favorisant la création des lieux de ponte. La sécheresse peut elle aussi constituer un facteur favorable à la transmission du virus, lié à certains comportements individuels (stockage de l'eau dans l'environnement de l'habitat, manque d'attention vis-à-vis des gestes de lutte antivectorielle...). Une pluviométrie anormalement basse associée à des températures élevées peut ainsi accentuer la transmission de la dengue, comme cela a été le cas en Guadeloupe lors de l'épidémie de 2010 qui débuta la première semaine de décembre.

Les conditions d'habitat favorisant les contacts entre l'homme et le vecteur constituent également un facteur influençant le risque épidémique. La présence de certaines commodités comme l'accès à l'eau potable ou la présence d'une machine à laver, semble inversement associée au risque de transmission.

Un autre facteur majeur d'apparition des épidémies de dengue est le taux d'immunité de la population contre le(s) virus circulant(s), lorsqu'un sérotype en particulier émerge dans une région après plusieurs années de non-circulation. Inversement

lorsque le taux d'immunité devient suffisamment élevé, il contribue largement à l'extinction de l'épidémie.

D - Immunité et immuno-pathologie

1 - Immunité protectrice contre la dengue

La réponse immunitaire contre la dengue, médiée par des anticorps, offre une immunité durable limitée au seul sérotype infectant. Il s'agit donc d'une protection à long terme homotypique. Il existe cependant une immunité croisée (immunité hétérotypique) de courte durée entre les 4 sérotypes, due à la présence d'anticorps à réaction croisée qui décroissent rapidement après l'infection [21,70,71].

Après une épidémie de dengue, la population est ainsi globalement immunisée mais seulement pour une durée variable probable de 2 à 4 ans. En effet, depuis 2001, les épidémies de sérotypes différents se succédèrent en 2005, 2007, 2010 puis 2013, laissant un intervalle de 2 à 4 ans entre chacune d'elles.

L'anticorps neutralisant le plus important est celui dirigé contre le domaine III de la protéine d'enveloppe E. Sont également impliqués les domaines I et II de la protéine E. Une faible activité neutralisante a été observée avec les anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine M. La protéine NS1 induit également des anticorps chez les sujets infectés.

Des anticorps anti-NS3 ont été observés chez les sujets infectés, bien que cette protéine ait des fonctions intracellulaires associées à sa localisation près des

membranes du RE. La protéine NS5 est la réplicase virale et peu d'anticorps apparaissent contre cette protéine chez les sujets infectés [72].

Ces anticorps neutralisants bloquent la fusion et/ou l'attachement du virus aux cellules cibles, ou forment des complexes avec le virus, ensuite éliminés par les cellules phagocytaires [73].

Le transfert passif d'anticorps neutralisants de la mère à l'enfant contribue à une protection materno-fœtale qui disparaît au bout de quelques mois.

2 - Dengue hémorragique : les théories pathogéniques

a- Théorie immuno-pathologique de Scott B. Halstead

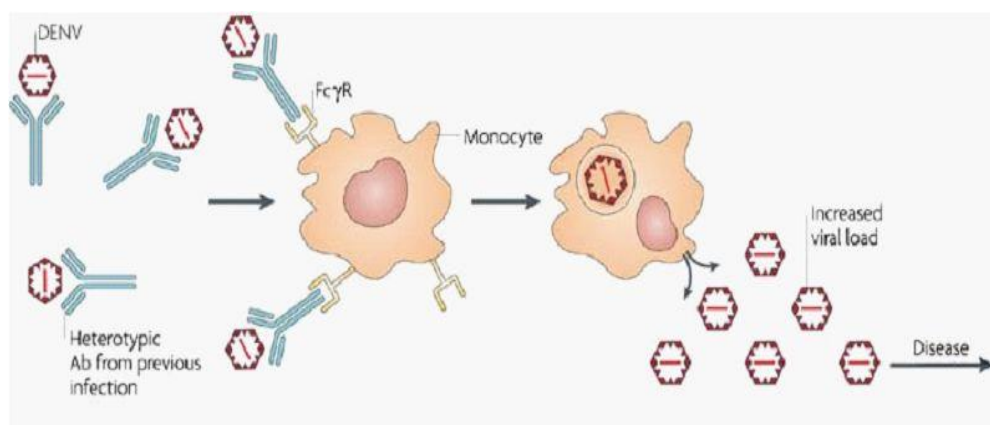
Les jeunes enfants (mais aussi de plus en plus d'adolescents) vivant dans des régions hyper-endémiques et présentant une réaction immunitaire de type secondaire (seconde infection par le virus de la dengue, mais de sérotype différent de celui de la primo-infection), ont de façon significative un risque plus élevé de développer une dengue hémorragique ou dengue avec syndrome de choc (DH/DSC) que ceux qui ont une réaction de type primaire (premier contact avec un sérotype du virus de la dengue). Toutefois, ce n'est que 3% des patients avec une réaction secondaire qui font une DH/DSC, contre moins de 0,2% de ceux qui ont une réaction primaire.

Les très jeunes enfants, âgés de 6 à 12 mois, atteints de DH/DSC, font en fait une primo-infection, mais celle-ci se déroule en présence d'anticorps maternels anti-dengue qui leur ont été transmis par voie placentaire [74].

Dans le cas particulier de la lignée monocyte-macrophage, en primo-infection, le virus entre dans la cellule selon le modèle d'endocytose dépendant des récepteurs pour le virus [75].

Par contre, dans le cas d'une infection secondaire, un autre mécanisme viendrait fortement potentialiser l'entrée du virus dans les cellules de cette lignée. Ce phénomène, appelé ADE (*Antibody Dependent Enhancement*), serait lié à la présence d'anticorps hétérologues induits par la primo-infection, et présents à des taux non neutralisants au cours de l'infection secondaire [76]. Ces anticorps, appelés anticorps facilitateurs, favoriseraient l'incorporation du virus dans ces cellules via un mécanisme d'endocytose dépendant de récepteurs pour leurs domaines Fc (figure 16). Ils augmenteraient ainsi le nombre de cellules infectées dont la lyse aboutirait à la production de médiateurs vasoactifs et procoagulants [77].

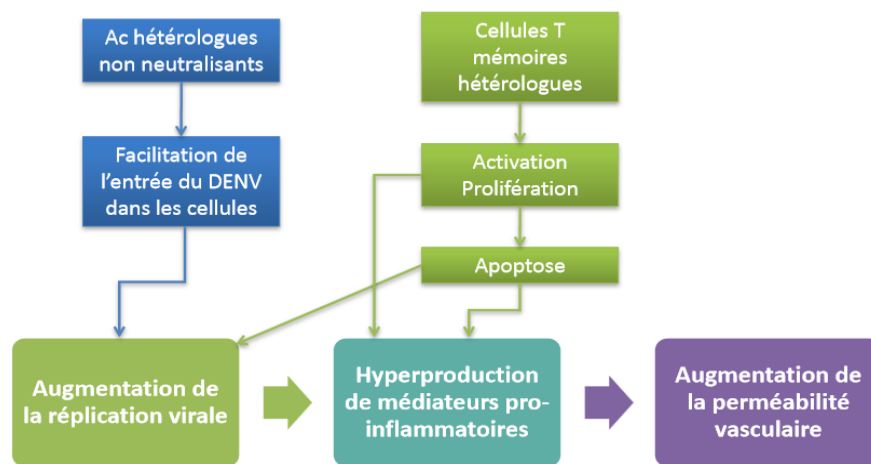
Figure 16. Schéma d'entrée du virus de la dengue dans les cellules de la lignée monocytes/macrophages par un processus anticorps-médié faisant intervenir les récepteurs Fcγ [78]



Par ailleurs, des études plus récentes ont montré qu'il existait une expansion et une activation des lymphocytes T CD4 et CD8 produits par les antigènes viraux du

premier sérotype en cause. Cette activation provoquerait une destruction accrue des monocytes infectés par un mécanisme à médiation cellulaire et par l'intermédiaire d'une cascade cytokinique (interféron gamma, interleukine 2...) qui régulerait positivement l'expression des récepteurs Fcγ à la surface des monocytes. Ce phénomène entraînerait un retard à la clairance virale par les cellules phagocytaires.

Figure 17. Modèle de la facilitation immunologique [79]



b- Théorie de l'augmentation de la virulence de Léon Rosen

La théorie de l'augmentation de la virulence des souches virales au cours des épidémies et de leur extension vers de nouvelles zones géographiques, a été longtemps injustement marginalisée, mais est actuellement sérieusement confortée par l'étude moléculaire des différentes souches de virus de la dengue.

Prenons comme exemple le virus DENV-2 qui a été aussi bien responsable d'épidémies répétées de dengue classique que de l'apparition de dengue hémorragique (DH) à Cuba, au Venezuela et au Brésil dans les années 1980-1990.

Grâce au séquençage des gènes des souches de virus DENV-2, deux variants ont pu être distingués [80] : la souche de Porto-Rico introduite dans la région en 1969, installée localement sur le mode endémo-épidémique, et engendrant des dengues « classiques », ressemble au génotype des souches isolées à la même époque en Polynésie, où la plupart des cas restaient encore bénins.

Le deuxième variant, la souche de la Jamaïque isolée en 1981, et provoquant des épidémies de DH au Venezuela (1989) et au Brésil (1990), présente des homologies de séquence avec des souches isolées dans le Sud-Est asiatique (Vietnam, Thaïlande).

C'est donc plus un facteur inter-génotypique qu'inter-sérotypique qui serait impliqué dans la virulence virale.

L'augmentation progressive de l'incidence des formes hémorragiques au fur et à mesure de la progression de ces épidémies pourrait s'expliquer par une exacerbation de la virulence de la souche virale par des passages rapides chez l'homme. Cette virulence se définit par rapport à un hôte ou à un « terrain » que le virus agresse.

Des facteurs de risque individuels, liés à l'hôte infecté, tels que l'anémie drépanocytaire, le diabète et l'asthme bronchique, ont été mis en évidence dans la DH/DSC (Dengue hémorragique/Dengue avec syndrome de choc) [81].

E - Evolution clinique de la dengue et biologie non spécifique

1 - Modalités diagnostiques et interprétation des données biologiques

En cas de suspicion de dengue, un prélèvement sanguin doit être effectué le plus tôt possible pour augmenter les chances de prélèvement en phase virémique et doit comporter au minimum un tube à NFS (numération formule sanguine de départ), un tube sec pour les examens biochimiques de base (CRP, enzymes hépatiques, ionogramme, urée et créatinine) et un tube sec pour les méthodes diagnostiques spécifiques à la dengue. Une partie du sérum est conservée à -80°C en vue d'un diagnostic génomique si nécessaire.

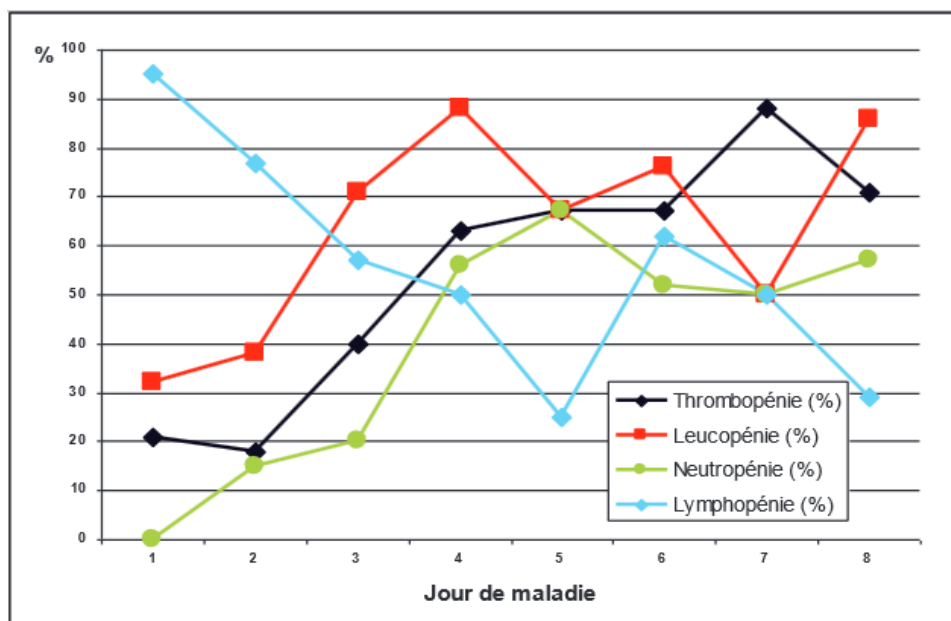
Les prélèvements devront être accompagnés d'une fiche de renseignements complétée avec la date de début des signes cliniques, la date du prélèvement, les signes cliniques, les pays visités et les vaccinations (fièvre jaune, encéphalite japonaise...) qui pourraient induire des réactions sérologiques croisées (figure 18 en annexe).

Le principal examen non spécifique d'orientation et de suivi est la NFS. Elle pourra mettre en évidence une association neutropénie - thrombopénie (< 100 G/L) à partir du 3^{ème} jour après le début des signes cliniques, très évocatrice en période épidémique. La thrombopénie est peu corrélée à la gravité. En effet, elle peut être profonde (< 20 G/L), ou discrète, y compris dans les formes graves.

La lymphopénie quasiment constante et isolée lors des deux premiers jours, avec leucocytes totaux conservés, n'est quasiment jamais observée car les patients ne sont généralement pas pris en charge aussi tôt dans la maladie.

D'après l'étude réalisée par l'équipe de l'Institut Malardé après l'épidémie de dengue de sérotype DENV-2 en Polynésie française, ce n'est que vers les 6^{ème}-7^{ème} jour que les quatre cytopénies sont retrouvées, de façon cumulée, chez plus d'un malade sur deux (étude réalisée sur 189 patients confirmés, figure 19) [82].

Figure 19. Fréquence des perturbations de l'hémogramme au cours de la dengue en fonction du jour de maladie [82]



D'autres paramètres biologiques peuvent être prédictifs d'une forme sévère de dengue :

- Une augmentation de l'hématocrite, d'au moins 20%, conséquence de l'hémoconcentration secondaire à la fuite plasmatique due à l'augmentation de la perméabilité vasculaire. Elle survient principalement entre le 3^{ème} et le

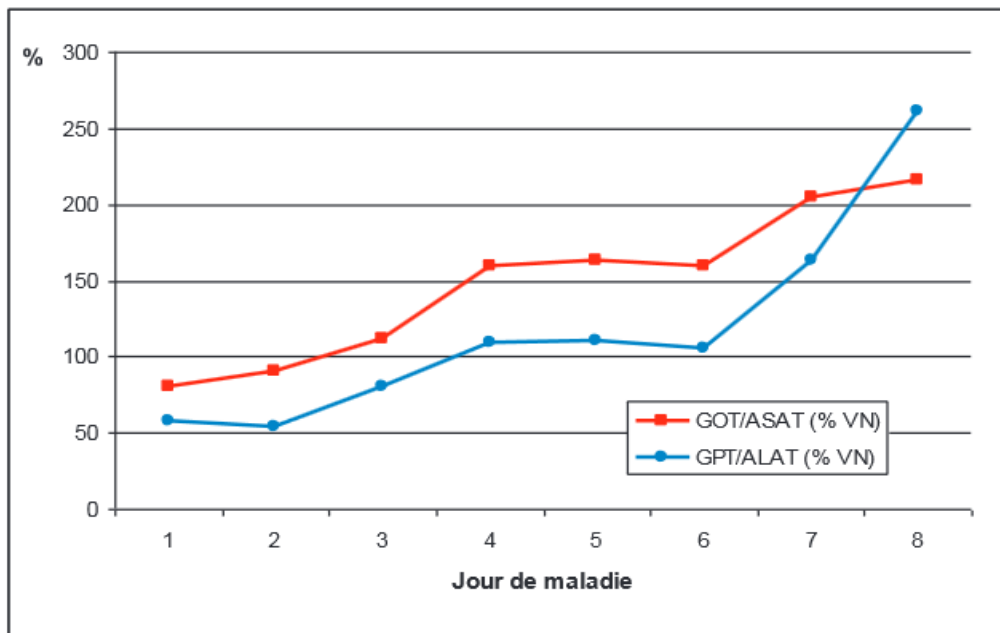
8^{ème} jour. Cependant, elle peut être réduite par un remplissage vasculaire précoce par voie intraveineuse. Une mesure fréquente de l'hématocrite est donc essentielle car elle signale la nécessité éventuelle d'ajuster ce remplissage.

- Une hypoprotidémie, hyponatrémie, hypoalbuminémie et une baisse des immunoglobulines, secondaire à la fuite plasmatique.
- Une atteinte de l'hémostase primaire : thrombopénie < 50 G/L et allongement du temps de saignement (ou test équivalent : test du Tourniquet) et du temps de céphaline activé.
- Des perturbations du bilan hépatique avec cytolyse hépatique : augmentation des transaminases, à plus de dix fois la normale dans 10% des cas, avec un pic vers le 7-8^{ème} jour (figure 20).

La normalisation est attendue en 3 semaines. Dans certains cas, une hépatite fulminante peut survenir.

Dans une étude thaïlandaise, l'augmentation forte et précoce (> 2,5 fois la normale) des GOT/ASAT (Glutamate oxaloacétate transaminase / Aspartate aminotransférase) est citée comme un bon signe prédictif de dengue hémorragique [83].

Figure 20. Augmentation des transaminases au cours de la dengue (% d'augmentation par rapport à la valeur normale supérieure) [82]



Certaines perturbations sont particulièrement informatives en zone d'endémie ou épidémique.

L'association thrombopénie/cytolyse hépatique hors zone d'endémie de dengue notamment, pourra être évocatrice d'autres pathologies infectieuses bactériennes (fièvre Q...) ou virales (hépatites...). En milieu tropical, elle est compatible avec une leptospirose, un des principaux diagnostics différentiels de la dengue.

D'après les conclusions d'une thèse d'exercice réalisée en 1999, portant sur les paramètres biologiques permettant une discrimination efficace, la CRP semble avoir ici un intérêt certain. Il ressort en effet que la CRP est supérieure à 50 mg/L dans

85% des leptospiroses, et inférieure à cette valeur dans 89% des cas confirmés de dengue [84].

D'autres facteurs prédictifs de formes sévères ont été décrits, mais ne figurent pas encore parmi les analyses de routine des laboratoires. Il s'agit essentiellement de molécules mobilisées lors de la réponse immune cellulaire, telles que les cytokines, notamment le TGF β -1 [85], ou les molécules d'adhésion comme le sVCAM-1 [86].

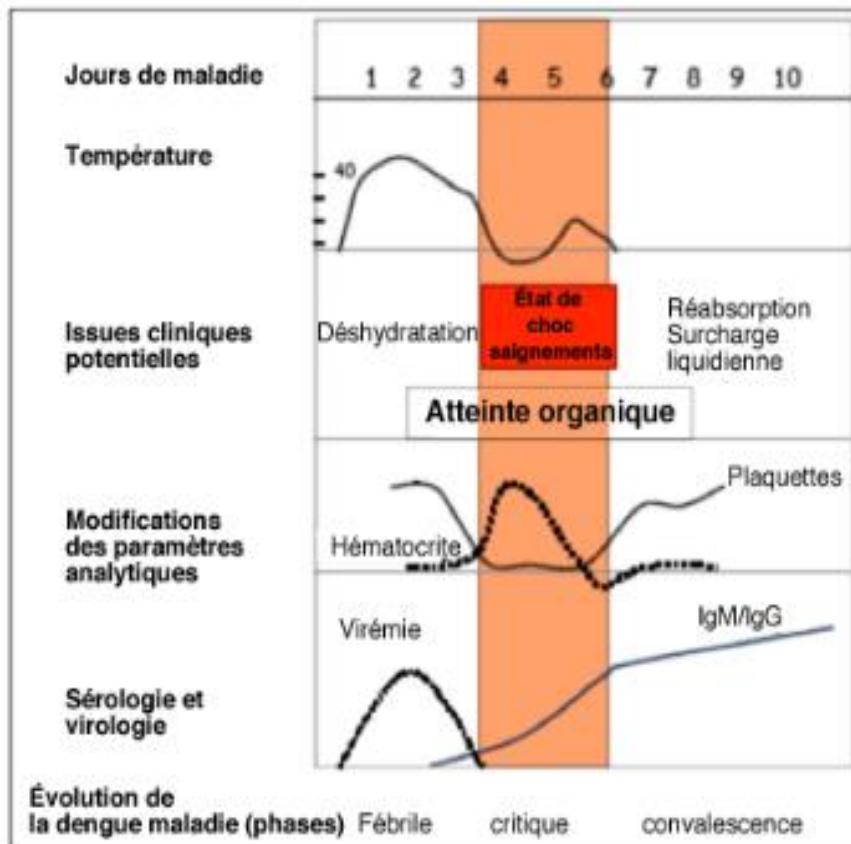
2 - Evolution clinique

La classification de l'OMS, datant de 1974 et régulièrement mise à jour jusqu'en 1997, distinguait la « fièvre dengue classique » (DF) et la DH/DSC et reste utile pour le classement *a posteriori* des formes cliniques dans les études épidémiologiques et physiopathologiques, mais ne prenait pas en compte les défaillances aiguës d'organes, qui peuvent survenir au cours de l'évolution (hépatite, myocardite, encéphalite...).

De nouvelles recommandations ont été éditées par l'OMS en 2009 [87]. Elles distinguent trois phases : la phase fébrile aiguë, suivie d'une phase critique puis d'une phase de convalescence (figure 21).

La dengue maladie correspond cependant le plus souvent à une infection asymptomatique voire à une infection se limitant à la phase fébrile.

Figure 21. Evolution de la dengue maladie en trois phases selon le jour de la maladie (paramètres biologiques, cliniques et virologiques) [88]



a- La phase fébrile

Après une période d'incubation de 5 à 7 jours (extrêmes de 3 à 15 jours), la phase fébrile aiguë débute typiquement par une fièvre supérieure à 38,5°C qui dure 3 à 5 jours en moyenne (extrêmes de 2 à 7 jours), des céphalées et des myalgies. Pendant les trois premiers jours de fièvre, rien ne permet de distinguer la dengue des autres fièvres aiguës d'origine virale.

Un rash cutané caractéristique peut survenir après 3 ou 4 jours de fièvre (figure 22).

Des signes accompagnateurs, tels des rougeurs du visage, un érythème, des douleurs corporelles généralisées sont souvent observés. La plupart des patients

présentent également une asthénie intense les confinant au lit et des signes digestifs avec inappétence, nausées et quelques vomissements.

Figure 22. Eruption cutanée caractéristique touchant le dos [89]



Des manifestations hémorragiques peuvent être retrouvées, à type de pétéchies, de saignements au niveau des muqueuses, d'ecchymoses, de saignements gastro-intestinaux ou vaginaux massifs.

Ces signes cliniques sont associés à une diminution progressive de la numération leucocytaire totale, prédominante sur les neutrophiles.

Cependant, plus de 95% des patients ne présenteront aucun signe de gravité et guériront sans complication en moins de 7 jours.

Dans la majorité des cas, seule la phase fébrile est donc observée.

b- La phase critique

C'est durant cette phase que l'apparition de signes d'alerte doit être scrupuleusement surveillée, notamment chez les patients à risque. En effet, du fait de la nature dynamique de la maladie, sa gravité n'apparaît habituellement qu'autour

de la défervescence, c'est-à-dire pendant la transition entre la phase fébrile et la phase afébrile, qui coïncide souvent avec l'entrée dans la phase critique.

Plusieurs signes d'alerte peuvent être distingués: fièvre > 39°C après le 5^{ème} jour et ceci après une brève amélioration clinique, douleurs abdominales ou thoraciques crescendo, vomissements persistants, malaise pré-syncopal ou syncopal avec ou sans hypotension orthostatique, hémorragie muqueuse, toux significative, diarrhée persistante, agitation ou somnolence. Des épanchements intra-abdominaux pourront être visibles à l'échographie. Le syndrome de fuite plasmatique correspond à la phase critique et survient chez environ 2 à 4% des patients entre le 4^{ème} et le 6^{ème} jour après le début des signes cliniques (extrêmes de 3 à 8 jours) lors de la défervescence thermique. Les critères définissant cette fuite sont un épanchement pleural ou péritonéal (clinique, radiologique ou échographique), un œdème de la vésicule biliaire à l'échographie ou une élévation de l'hématocrite associée à une baisse des plaquettes à la fin de la phase fébrile [90]. La période de fuite plasmatique est brève, entre 24 et 48 heures, mais elle peut être brutale et intense, aboutissant au choc. Les cas de dengue présentant des signes d'alerte se rétablissent habituellement avec une réhydratation par voie intraveineuse. Pour certains apparaissent des signes de gravité immédiat : troubles de la conscience, convulsions, hypotension artérielle avec ou sans signes de choc, hémorragie viscérale, dyspnée *sine materiae*, insuffisance respiratoire aigüe avec ou sans râles crépitants, épanchements séreux abondants (plèvre, péricarde, ascite). Dans les cas sévères, on peut également trouver des cas d'encéphalites authentiques liés à la dengue.

Les formes neurologiques ont été particulièrement fréquentes lors de l'épidémie de 2013 en Guadeloupe (Dr HERRMANN, communication personnelle).

L'évolution vers le syndrome de défaillance polyviscérale peut également aboutir au décès.

c- La phase de convalescence

La phase de convalescence correspond à une réabsorption progressive des liquides présents dans le milieu extravasculaire dans les 48 à 72 heures qui suivent le début de la phase critique. On observe une amélioration de l'état général avec une reprise de l'appétit, une régression des symptômes gastro-intestinaux, et une apyrexie de plus de 2 jours.

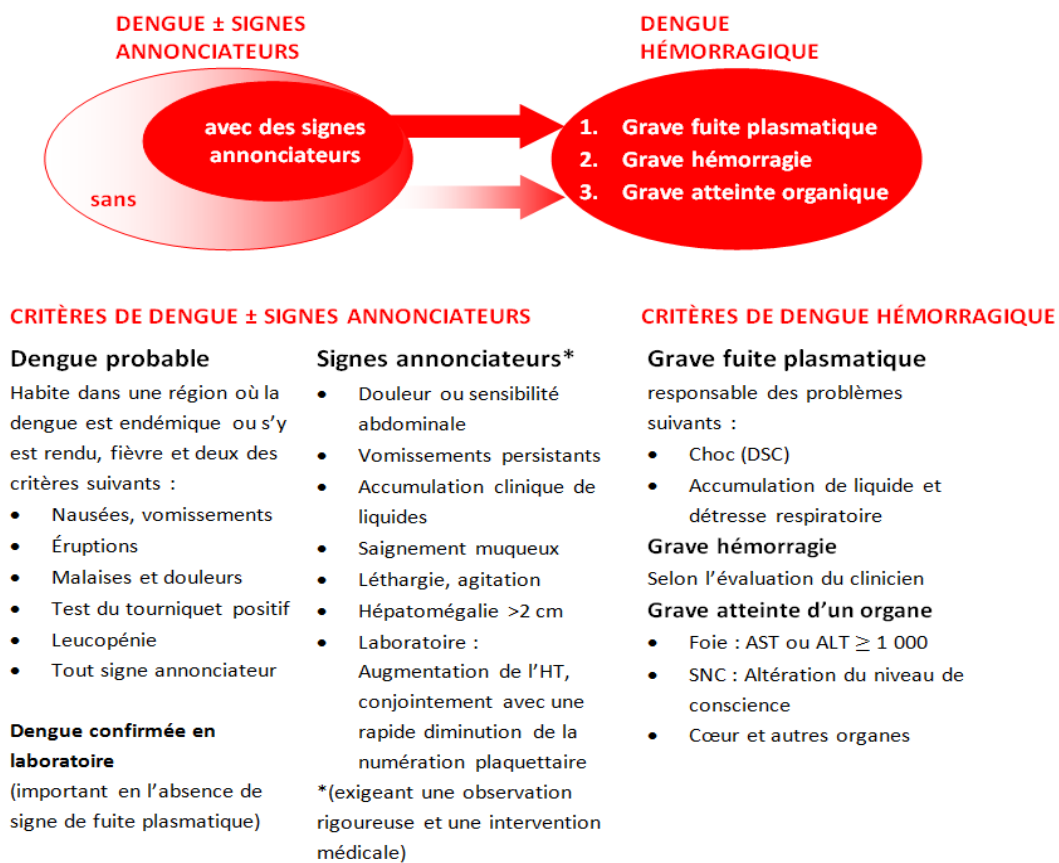
Une hypervolémie et un œdème aigu pulmonaire peuvent cependant se manifester si une quantité excessive de liquide a été administrée par voie intraveineuse, sans rééquilibration hydroélectrolytique (hyponatrémie).

d- Classification des cas de dengue par gravité

L'utilisation d'une série de paramètres cliniques et/ou biologiques dans la classification révisée des cas de dengue par niveau de gravité a permis de faire une sélection plus claire entre les patients atteints d'une dengue sévère d'une part, et d'une forme commune d'autre part. Un cas de dengue sévère est défini comme ayant une ou plusieurs des manifestations ci-dessous (figure 23) :

- Une fuite plasmatique aboutissant à un état de choc et/ou une accumulation liquidienne.
- Une hémorragie avec perte sanguine ou conséquence viscérale, excluant la gingivorragie ou l'épistaxis,
- Une atteinte organique symptomatique (hépatite, signes méningo-encéphaliques, dysfonction cardiaque, insuffisance rénale...)

Figure 23. Critères définissant la dengue avec ou sans signes d'alerte et la dengue sévère [91]



Le test du tourniquet, énoncé dans la figure 23, est un test de fragilité capillaire causée par une anomalie de la paroi capillaire ou une thrombocytopénie. Il consiste à appliquer un brassard de tensiomètre pendant cinq minutes sur le bras d'un

individu et à le gonfler à une pression située à mi-chemin entre les pressions diastolique et systolique.

Les pétéchies résultantes pourront être dénombrées et le résultat sera rendu dans une plage oscillant entre négatif (pas de pétéchies) et positif +4 (pétéchies confluentes).

3 - Patients à risque

Les patients à risque justifient au minimum d'une surveillance ambulatoire en général en milieu spécialisé [90] :

- Enfants < 2 ans ou patients âgés (au-delà de 80 ans),
- Femmes enceintes, surtout au 3^{ème} trimestre et proches du terme. En effet, en cas d'infection maternelle par la dengue au cours de la grossesse, le risque de prématurité et de mort foétale in utero est réel. En cas d'infection proche du terme, il existe un risque hémorragique tant pour la mère que pour le nouveau-né.
- Drépanocytaire de type SS, SC ou S bêta thalassémiques,
- Patients avec des maladies chroniques et/ou des traitements associés (insuline, anticoagulants, anti agrégants-plaquettaires) : conséquences à évaluer au cas par cas,
- Patients immunodéprimés ou sous chimiothérapie,
- Patients souffrant d'hémophilie ou de thrombocytopathie,
- Patients avec un surdosage de paracétamol ou une prise d'aspirine ou d'anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS),

-Patients ayant eu récemment une chirurgie ou un traumatisme (crânien surtout) ou un accident vasculaire cérébral.

F - Traitements et prévention

Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique de la dengue. Le traitement est avant tout symptomatique, avec recours à la réanimation dans les cas graves.

Pour les patients vus pendant la phase fébrile aiguë, l'essentiel est de prévenir la déshydratation et la perte en sel. En effet, une réhydratation conduite uniquement avec de l'eau pure chez un patient par ailleurs anorexique entraînera un déséquilibre hydro-électrolytique et une hyponatrémie, responsables d'une hypotension orthostatique symptomatique survenant vers le 4^{ème} jour de la maladie. La prévention de cette complication repose sur des mesures diététiques et/ou la prescription de solutés de réhydratation [90].

Les douleurs et la fièvre seront traitées par du paracétamol en respectant l'intervalle minimal de 6 heures entre les prises de 15 mg/Kg et sans dépasser 60 mg/Kg/jour chez l'enfant et 3 g/jour chez l'adulte.

L'aspirine, l'ibuprofène, et autres AINS sont strictement interdits du fait du risque hémorragique. Par ailleurs, l'aspirine est contre-indiquée car peut potentiellement entraîner un syndrome de Reye lors d'infections virales aiguës chez l'enfant.

Les formes hémorragiques et syndrome de choc relèvent pour leur part d'un traitement symptomatique en Unité de Soins Intensifs (USI). Celui-ci consiste en un remplissage vasculaire par des solutions cristalloïdes ou colloïdes visant le maintien

ou la correction de l'équilibre hémodynamique. Ce remplissage doit être précoce et anticipé : la fuite capillaire et le choc une fois amorcés ont en effet tendance à s'aggraver de façon extrêmement subite et parfois incontrôlable [92].

Quant à la prévention, aucun vaccin n'est encore commercialisé.

Depuis plusieurs années, le laboratoire Sanofi Pasteur élabore un candidat vaccin tétravalent vivant atténué recombinant d'un type particulier (ChimeriVax™ CYD1-4). Il s'agit en effet d'un vaccin chimère basé sur la machinerie répliquative du vaccin fièvre jaune 17D et exprimant les gènes d'enveloppe des 4 sérotypes du virus de la dengue [93].

Les premiers essais cliniques de phase I/II conduits sur plus de 1000 volontaires non immuns ou pré-immuns contre les *Flavivirus* ont permis de démontrer l'innocuité et l'immunogénicité du vaccin.

Une étude de phase IIb menée sur 4002 enfants de 4 à 11 ans en Thaïlande a montré que l'efficacité du vaccin était de 61,2% contre le DENV-1, de 81,9% contre le DENV-3 et de 90% contre le DENV-4. Un des types du virus de la dengue (DENV-2) a échappé au vaccin.

Par la suite, de larges essais cliniques de phase III portant sur plus de 30 000 enfants et adolescents ont été débutés en Amérique latine et en Asie. Les résultats de l'étude menée en Amérique latine, publiés dans *The New England Journal of Medicine* en janvier 2015, montrent une efficacité globale de 60,8% contre toutes les formes de la maladie chez les enfants et adolescents âgés de 9 à 16 ans ayant reçu trois doses du vaccin. Les analyses montrent également une protection contre la dengue sévère dans 95,5% des cas ainsi qu'une réduction de 80,3% du risque

d'hospitalisation pendant la durée de l'étude [94]. Les résultats de cette étude d'efficacité de phase III en Amérique latine concordent avec les résultats déjà observés au cours des 25 mois de surveillance active de la première étude pivot d'efficacité de phase III conduite en Asie sur plus de 10 000 volontaires, montrant ainsi la cohérence des résultats dans le monde. Cette étude pivot, qui consistait à comparer l'incidence (nombre de nouveaux cas) de la dengue entre un groupe de personnes vaccinées contre cette maladie et un groupe contrôle, c'est-à-dire composé de personnes non vaccinées, avait montré une réduction de 56% des cas de dengue chez les personnes vaccinées. La protection contre les formes suffisamment sévères pour nécessiter une hospitalisation et contre les formes hémorragiques, potentiellement mortelles, était apparue plus élevée encore : respectivement de 67 % et 88,5 %. [95]. La protection vaccinale, toujours variable entre les différents sérotypes, était de plus de 75% pour les DENV-3 et 4, de 50% pour le DENV-1, et elle n'était que de 35% pour le DENV-2. Le suivi des participants à l'essai se poursuivra jusqu'en 2017 [95].

L'implication du système immunitaire dans l'accroissement du degré de gravité de la maladie et dans les dommages vasculaires a soulevé des inquiétudes à propos de toutes les stratégies de conception vaccinale proposées jusqu'à présent. En effet, l'inconvénient propre à tous les candidats vaccins à virus vivants atténués en cours d'essais cliniques est qu'une seule vaccination n'est pas suffisante pour induire une protection contre les 4 sérotypes, probablement en raison d'interférences virales entre les différentes souches du vaccin elle-même. En outre, les injections de rappel ne sont pas efficaces lorsqu'elles sont administrées à moins de 6 mois d'intervalle.

Par conséquent, les vaccins vivants atténués exigent 3 injections sur une période minimale de 12 mois, pour induire des réponses équilibrées d'anticorps contre les 4 sérotypes du virus de la dengue. Il y a un risque qu'une réponse incomplète aux vaccinations initiales puisse exacerber l'infection, selon l'hypothèse des anticorps facilitants, si celle-ci survient entre la première et la dernière injection [96].

Par ailleurs, bien que le virus provoque une virémie post-vaccinale très brève chez l'homme, incapable d'infecter efficacement les moustiques, la possibilité d'apparition de recombinaisons virulents entre virus vaccinaux et sauvages circulants est à envisager.

A l'heure actuelle, la prévention se résume donc à la lutte anti-vectorielle (utilisation de moustiquaires imprégnées, élimination des gîtes larvaires...).

Les seuls insecticides actuellement autorisés dans la communauté européenne pour une utilisation en pulvérisation spatiale appartiennent exclusivement aux familles des pyréthrinoïdes de synthèse ou des pyréthrinés naturels (Directive 98/8/CE).

Le malathion (famille des organophosphorés), est interdit d'utilisation car jugé toxique.

De plus, en Guadeloupe et Martinique, les épandages d'insecticides adulticides sont limités du fait de la résistance des *Aedes* aux molécules utilisables, comme la deltaméthrine [97]. Ils sont utilisés uniquement à visé « politique » afin de rassurer la population sur l'implication de l'ARS dans la lutte anti-moustiques. Une étude a montré que la cyperméthrine et la cyflutrène restaient des insecticides adulticides efficaces contre les espèces *Aedes* [98].

II - PROBLEMATIQUE DIAGNOSTIQUE DE LA DENGUE EN CONTEXTE EPIDEMIQUE

A - Diagnostic différentiel

Au cours des épidémies, le risque est d'attribuer toute fièvre aiguë à la dengue et de méconnaître d'autres infections nécessitant un traitement spécifique urgent.

A l'inverse, devant les premiers cas, le risque est de ne pas évoquer le diagnostic, et de ne pas prendre en charge correctement un patient présentant des signes évocateurs de dengue sévère.

Tableau 2. Diagnostic différentiel de la dengue [88]

Affections ressemblant à la phase fébrile de la dengue	
Syndromes grippaux	Grippe, rougeole, chikungunya, mononucléose infectieuse, syndrome de séroconversion du VIH
Maladies avec éruption cutanée	Rubéole, rougeole, scarlatine, infection à méningocoque, chikungunya, réactions indésirables aux médicaments
Affections diarrhéiques	Rotavirus, autres infections entériques
Maladies avec manifestations neurologiques	Méningo-encéphalite Convulsions fébriles
Affections ressemblant à la phase critique de la dengue	
Infectieuses	Gastro-entérite aiguë, paludisme, leptospirose, typhoïde, typhus, hépatite virale, syndrome de séroconversion aiguë du VIH, septicémie, choc septique
Tumorales	Leucémie aiguë, autres affections tumorales
Autres tableaux cliniques	Abdomen aigu Appendicite aiguë Cholécystite aiguë Perforation viscérale Acidocétose diabétique Syndrome de Kawasaki Acidose lactique Leucopénie, thrombopénie et hémorragie Troubles plaquettaires Insuffisance rénale Détresse respiratoire (respiration de Kussmaul) Lupus érythémateux disséminé

VIH = virus de l'immunodéficience humaine

Les erreurs de diagnostic constituent un facteur de risque majeur au cours des épidémies (y compris de décès), notamment vis-à-vis des septicémies à pyogène avec choc septique, paludisme, leptospirose, méningites bactériennes, pneumonies bactériennes à pneumocoque, péritonites, hémorragies méningées, infarctus du myocarde, Kawasaki chez l'enfant (tableau 2).

L'émergence en fin d'année 2013 d'une épidémie de Chikungunya aux Antilles, arbovirose de la famille des *Togaviridae* et du genre *alphavirus*, a rendu le diagnostic différentiel plus complexe dans la région. Les principaux symptômes étant similaires, les deux diagnostics étaient investigués en parallèle. Quelques différences entre ces arboviroses sont à connaître. Des co-infections sont observées [99].

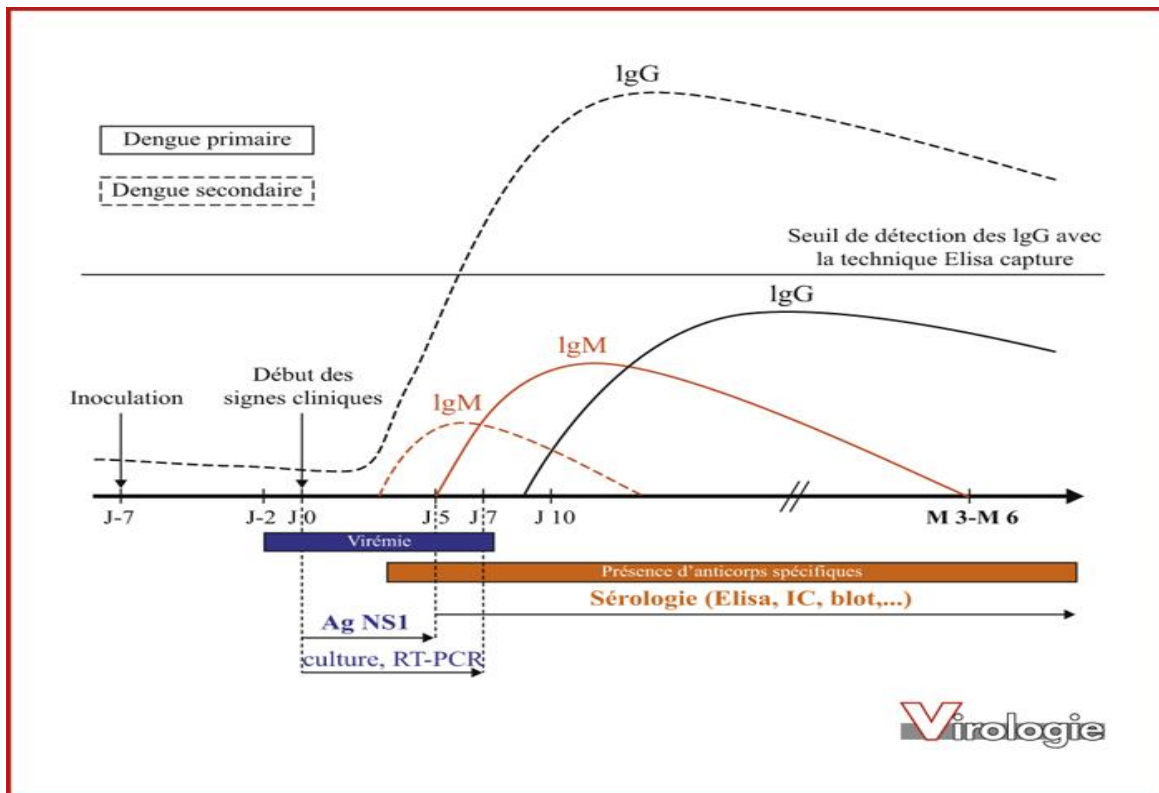
Tableau 3. Comparaison des manifestations cliniques de la dengue et du chikungunya [100,101]

	CHIKUNGUNYA	DENGUE
Fièvre	Habituel	Habituel
Eruption	J1-J4	J5-J7
Douleurs rétro-orbitaires	Peu fréquent	Habituel
Myalgies	Habituel	Habituel
Arthralgies distales	Constant	Peu fréquent
Arthrite	Habituel	Jamais
Ténosynovites	Habituel	Jamais
Hypotension	Peu fréquent	Habituel, J5-J7
Saignements mineurs	Exceptionnel	Habituel, J5-J7
Thrombopénie	Précoce et modérée	Retardée et fréquente
Lymphopénie	Habituel	Habituel
Evolution	Arthralgies chroniques	Asthénie, quelques semaines

B - Diagnostic biologique spécifique

Du fait de son large éventail de manifestations cliniques au pronostic parfois sévère et de l'absence de traitement antiviral efficace ou de vaccin commercialisé, la dengue nécessite un diagnostic rapide et performant qui devrait pouvoir optimiser la prise en charge des patients et la surveillance épidémiologique. La figure 24 illustre la cinétique des marqueurs biologiques de la dengue ainsi que les méthodes diagnostiques utilisables en fonction de la date d'apparition des signes cliniques. A ces méthodes diagnostiques doivent être étroitement associées les manifestations biologiques et cliniques.

Figure 24. Diagnostic biologique de la dengue [102]



Le diagnostic direct s'effectue par détection du génome viral par RT-PCR (*Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*) et/ou détection de l'antigène non structural NS1 (AgNS1), et exceptionnellement par isolement et caractérisation du virus. Le diagnostic indirect est fait par détection des IgM et des IgG spécifiques.

1 - Définitions des cas de dengue

Les définitions des cas de dengue ont été reprecisées par les membres des comités d'experts de Guadeloupe, Martinique et Guyane [90].

Un cas de dengue est biologiquement confirmé en cas de détection du génome viral (RT-PCR) et/ou détection d'antigène viral (NS1) et/ou séroconversion sur deux prélèvements espacés d'une semaine : apparition ou augmentation significative (au jugement du biologiste) des IgM et/ou IgG spécifiques.

Un cas de dengue est défini comme probable en présence spécifique d'IgM à un niveau significatif sur un seul prélèvement.

Un cas de dengue est défini comme suspect ou cliniquement évocateur en présence d'un syndrome cliniquement évocateur de dengue où seuls les IgG sont présents lors d'un prélèvement suffisamment tardif.

2 - Diagnostic direct ou diagnostic précoce de la dengue

Au début des signes cliniques (J0), le virus de la dengue est largement présent au sein de l'organisme : sang, cellules mononucléées du sang périphérique, tissus...

La virémie dure en moyenne six jours, elle commencerait 2 jours avant le début des signes cliniques, pour se terminer 5 à 7 jours après. C'est durant cette courte période fébrile qu'existe le risque de dissémination du virus vers le vecteur. Les tests biologiques utilisés à cette phase précoce conduisent au diagnostic de dengue récente confirmée.

a- Isolement du virus sur culture cellulaire

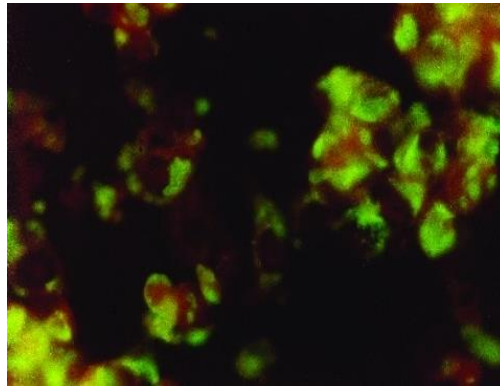
L'isolement viral est la technique de référence pour poser le diagnostic de la dengue. Le prélèvement, réalisé à partir d'un sérum, mais aussi à partir de leucocytes ou de broyats de tissus provenant de biopsies post-mortem (foie, rate), doit être réalisé dans les 5 premiers jours après le début des signes cliniques (jusqu'à J7, plus longtemps sur sang capillaire), et doit être stocké immédiatement à +4/+8°C, ou à -80°C pour les longues durées (virus sensible à la chaleur) [103].

La technique la plus sensible consiste en l'inoculation intracérébrale de souriceaux ou l'inoculation sur larves ou sur moustiques adultes. Le virus peut également être isolé *in vitro* sur lignées cellulaires de moustiques d'*Aedes pseudoscutellaris* (AP61), d'*Aedes albopictus* (C6/36) ou plus rarement de *Toxorhynchites ambionensis* (Tra284) [104], mais aussi sur lignées de cellules de mammifères (Vero, LLC-MK2, BHK21).

Un effet cytopathique (ECP) apparaît en 7 à 15 jours, puis une confirmation et un sérotypage sont réalisés par une technique d'immunofluorescence indirecte avec des

anticorps monoclonaux spécifiques d'un sérotype [105]. Le sérotype peut également être identifié par RT-PCR sur les surnageants de culture [106].

Figure 25. Immunofluorescence indirecte avec des anticorps monoclonaux identifiant le sérotype 1 du virus de la dengue dans une culture tissulaire de cellules Vero [107]



Ces techniques ne sont réalisées que dans des centres de référence équipés de laboratoires de confinement de niveau 3 (P3). De plus, bien que toujours considérée comme la technique de référence par l'OMS, cette méthode lourde techniquement ne permet de poser le diagnostic que dans un délai supérieur à 10 jours et n'est donc pas adaptée aux réponses en situation d'urgence. Pour ces raisons, cette technique n'est plus utilisée en diagnostic de routine.

b- Détection du génome viral par biologie moléculaire

Les méthodes moléculaires basées sur la RT-PCR ont contribué à améliorer le diagnostic de la dengue, et en sont devenues les principales techniques diagnostiques, permettant à la fois de détecter le virus de la dengue et d'identifier le type viral mis en cause.

Appliquée au diagnostic de la dengue dès le début des années 1990, la RT-PCR est une méthode qui permet un diagnostic précoce, valable pendant toute la phase de virémie. Cependant, il s'agit d'une technique coûteuse, longue et réalisable uniquement dans les laboratoires spécialisés équipés.

Il existe plusieurs types de RT-PCR conventionnelles, détectant et typant les virus de la dengue. Elles diffèrent par leur principe (RT-PCR classique, nichée ou semi-nichée), par la région du gène amplifié et par les méthodes de détection des produits de RT-PCR et de différenciation génotypique des quatre sérotypes (gel d'agarose, hybridation...)

De nombreux protocoles ont été développés, mais celui mis au point par Lanciotti et son équipe en 1992 reste le plus largement utilisé dans les laboratoires hospitaliers et de référence, avec plus ou moins d'adaptations (RT-PCR couplée à une PCR semi-nichée) pour augmenter la sensibilité de détection et pour typer le virus [108].

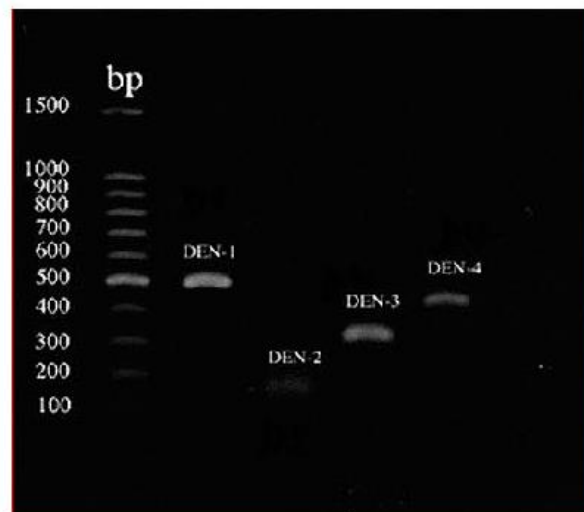
Cette PCR peut être effectuée à partir de sérum, de plasma, de moustiques ou de cellules infectées, ou encore de biopsies. Toutefois, cette technique a été optimisée pour les analyses faites sur sérum.

Après extraction des ARN viraux totaux, une première étape d'amplification par RT-PCR avec 2 amorces consensus D1 et D2 (couple d'oligonucléotides spécifiques des régions conservées de la capsidite et de la région prM) permet une amplification d'un fragment de 511 paires de base, commun aux 4 sérotypes viraux de la dengue.

Une seconde étape d'amplification par PCR dite nichée (*semi-nested PCR*) est alors réalisée. Il s'agit d'une variante au cours de laquelle le produit issu de la première PCR est de nouveau amplifié à l'aide de l'amorce D1 combinée avec des amorces spécifiques de chaque sérotype (TS1, TS2, TS3, et TS4) qui s'hybride à une partie interne (nichée) de la séquence amplifiée.

Ainsi, grâce à l'amorce sens pan-DENV utilisée pour la première étape d'amplification, et à l'utilisation de 4 oligonucléotides, chacun spécifique d'un sérotype (amorces anti-sens), cette deuxième étape permet d'obtenir des produits de PCR de taille variable en fonction du sérotype.

Figure 26. Électrophorèse des produits de RT-PCR pour l'identification des sérotypes de virus de la dengue [109]



Ce diagnostic biologique offre l'avantage de pouvoir détecter le génome viral indépendamment de l'état structural du virus dans l'échantillon biologique initial, qu'il soit partiellement dégradé, non viable ou encore complexé à des anticorps. Il augmente également la sensibilité de détection par rapport à la simple RT-PCR.

Toutefois, ces techniques demeurent longues (30 heures de la phase d'extraction au typage final) et sont soumises au risque de contamination inter-échantillons, surtout en période épidémique. Pour limiter ce risque de contamination, une PCR nichée réalisée en tube unique, adaptée de la méthode initiale, a été mise en place. Elle permet de réaliser le diagnostic de la dengue et le typage en même temps, sans ouverture des tubes entre les deux étapes. La sensibilité varie de 1 à 50 *plaque forming unit* (PFU)/mL selon le sérotype, ce qui est équivalent à la technique initiale en deux temps.

Pour permettre une détection plus rapide du virus de la dengue, des techniques de PCR RT (*PCR-real time*) ou PCR quantitative en temps réelle ont été développées puis simplifiées afin de n'avoir plus qu'une seule étape et un seul tube par échantillon (RT-PCR multiplex *one tube-one step*, c'est-à-dire avec toutes les amorces spécifiques de types et les sondes dans le même tube), permettant la détection des produits de PCR en fluorimétrie par une analyse cinétique. Deux technologies ont été principalement étudiées : la technologie TaqMan et celle utilisant le SybrGreen [102]. La technologie TaqMan consiste en des sondes marquées à l'extrémité 5' par un fluorochrome émetteur (reporter) et à l'extrémité 3' par un fluorochrome suppresseur (quencher) qui inhibe l'émission du reporter lorsqu'ils sont à proximité. Au cours de la PCR, si la sonde est hybridée sur sa cible, elle est hydrolysée par l'ADN polymérase. Le reporter ainsi séparé du quencher, émet un signal proportionnel au nombre de sondes hydrolysées, mesurable au moment de l'élongation.

Le SybrGreen est un agent intercalant, peu fluorescent à l'état libre, qui augmente en fluorescence lorsqu'il est lié à l'ADN double brin, sans inhiber la réaction de PCR : l'augmentation de fluorescence mesurée pendant l'étape de polymérisation est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés (amplicons).

La détection des produits de PCR ne s'effectue donc plus en point final, mais « en tube fermé » pendant chaque cycle d'amplification, ce qui permet de réduire les risques de contamination. Un autre avantage de cette technique est sa rapidité de réalisation (environ 60 minutes pour 30 cycles), car elle ne nécessite plus l'étape de révélation par électrophorèse ou l'hybridation de sondes [110].

La majorité des RT-PCR en temps réel permettent la quantification du virus dans le sang [111-113]. Indicateur potentiel de la gravité de la pathologie, la charge virale est très variable, allant de moins de 10^3 copies /mL à plus de 10^9 copies /mL [3]. Plus le prélèvement est précoce, plus la charge virale est élevée et elle semble être maximale à J1 [114]. Elle pourrait aussi varier en fonction du sérotype [115-118] et du fait que l'on soit en présence d'une dengue primaire ou secondaire (elle tend à être plus élevée et plus durable au cours des infections primaires) [115, 119, 120].

Une étude publiée en 2010 a démontré que le génome du virus pouvait également être détecté dans les urines ou la salive, par RT-PCR en temps réel [121].

Les problématiques diagnostiques de la dengue en zones enclavées, le coût financier pour l'acheminement des prélèvements veineux congelés ainsi que la surveillance virologique des souches circulantes en territoires insulaires a incité le

CNR Arbovirus de Guyane à développer une alternative aux prélèvements sanguins veineux. Cette alternative consiste à prélever du sang capillaire sur papier buvard (3 gouttes de sang total prélevées au bout du doigt déposées sur papier buvard Wathman) chez des sujets présentant des signes cliniques d'infection et une détection positive de la protéine NS1 sur sérum [122]. Celui-ci pourra être conservé 8 à 15 jours à 4°C avant son envoi sous pli au CNR Arbovirus de Guyane à température ambiante (stabilité de 2 mois à température ambiante de l'ARN viral) pour le sérotypage par RT-PCR (rendu des résultats sous 8 jours). Cette méthode permet notamment, à moindre coût, de déceler précocement l'introduction d'un potentiel nouveau sérotype, sans contrainte de conservation. Les performances de sensibilité et de spécificité de la RT-PCR sont respectivement de 81,6% et 90% pour le sang capillaire sur papier buvard et de 88,5% et 93,8% pour le sang veineux [123]. Ce type de prélèvement n'est pas utilisé en pratique courante, mais il représente une alternative intéressante dans les dispensaires et petites structures de santé fréquentes en zones tropicales [124].

c- Détection antigénique : la protéine NS1

La glycoprotéine NS1 est une protéine virale non structurale, sécrétée au cours de la réplication virale par tous les sérotypes de la dengue, mais dont le rôle dans la pathogénèse de la maladie n'est pas encore clairement élucidé.

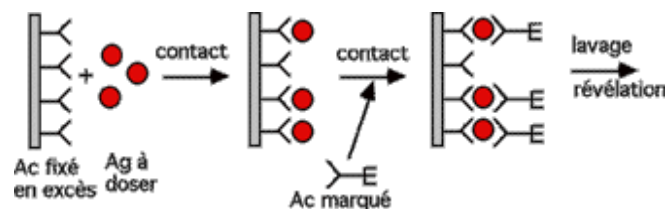
Des travaux menés en 2002 par Alcon et son équipe ont montré que cette protéine est retrouvée à des taux élevés dans le sérum des patients infectés par le virus de la

dengue au cours de la phase aiguë de l'infection, de 2 µg/mL environ à J0 pour être encore détectable à 0,04 µg/mL à J7 [125-128].

La détection de cette protéine dans le sérum des patients est utilisée pour le diagnostic précoce de la maladie car on la retrouve dès le premier jour après le début des signes cliniques et, selon certaines études, elle serait détectable jusqu'à J18 [3].

Une technique ELISA a d'abord été développée, en 2006, basée sur la détection de cet antigène par immunocapture. Ce kit « Platelia® Dengue NS1 » commercialisé par Biorad (Marnes-La Coquette, France), est une méthode immunoenzymatique en une étape de type sandwich, en format microplaque.

Figure 27. Détection d'un antigène par méthode sandwich (ELISA sandwich) en une étape [129]



Les échantillons et les étalons sont incubés simultanément avec le conjugué (anticorps monoclonal anti-NS1 couplé à la peroxydase) dans les cupules de microplaques sensibilisées par des anticorps monoclonaux anti-NS1 fixés en excès (figure 27).

En présence d'antigène NS1 dans l'échantillon, un complexe AcM-NS1-AcM/peroxydase est formé et fixé à la microplaque, et sera révélé par l'addition du

substrat de l'enzyme qui transformé en métabolite coloré permettra une mesure densitométrique de son apparition. La densité optique obtenue à 450/620 nm est proportionnelle à la quantité d'antigène NS1 présent dans l'échantillon testé.

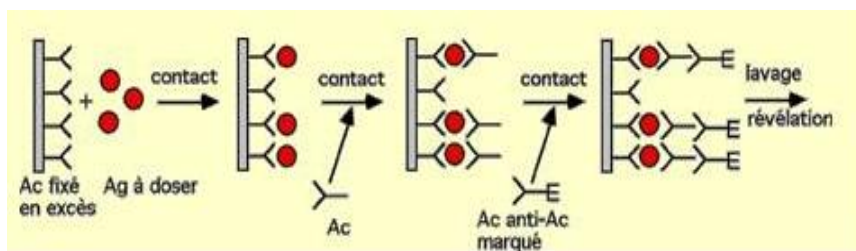
Les résultats sont exprimés sous forme d'un ratio (ratio échantillon = S/CO) correspondant à la densité optique lue pour cet échantillon (S) sur la moyenne des densités optiques des deux mesures du calibrateur (CO).

L'échantillon est considéré non réactif pour l'antigène NS1 du virus de la dengue si le ratio est inférieur à 0,50, et réactif pour l'antigène NS1 si supérieur ou égal à 1.

Entre ces deux valeurs, l'échantillon sera considéré comme douteux (zone « grise » ELISA)

Un second test immunoenzymatique de deuxième génération a ensuite été commercialisé par Panbio (figure 28). Ce kit, «Pan E-Dengue *Early* ELISA® », utilisant une méthode sandwich en deux étapes sur microplaques, présente des performances moindres en termes de sensibilité, vraisemblablement à cause de la nature des anticorps pré-sensibilisés sur microplaques [130].

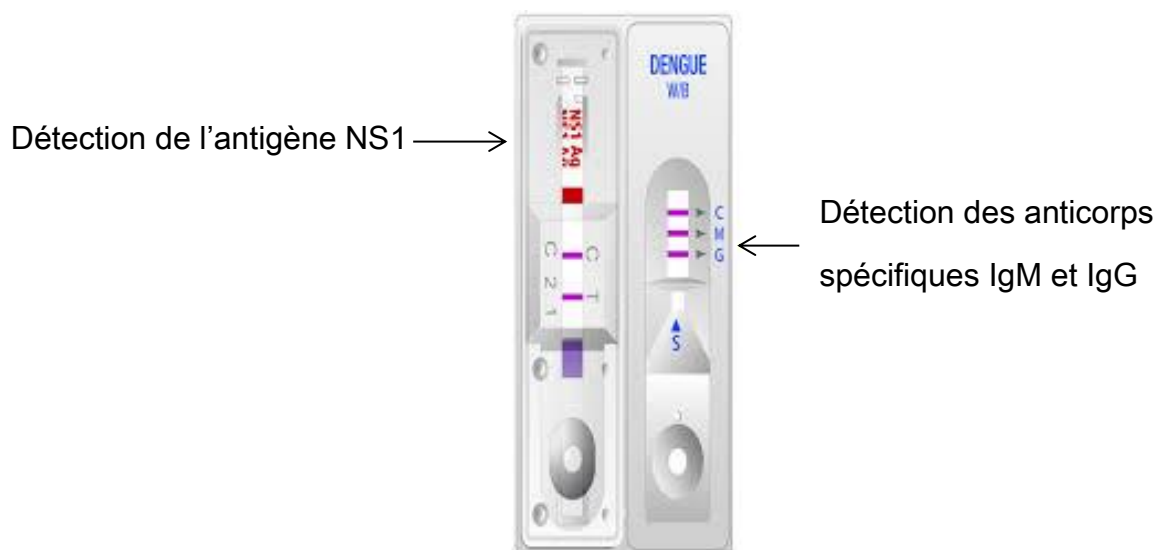
Figure 28. Dosage d'un antigène par méthode sandwich (ELISA sandwich) en deux étapes [129]



Enfin, des tests immunochromatographiques rapides ont été développés sous forme de bandelettes rapides ou de cassettes (Dengue NS1 Ag Strip de BioRad, SD Bioline NS1 de Standard Diagnostics/Eurobio), mais leurs performances restent inférieures à celles des tests immunoenzymatiques [131,132].

Le couplage de deux cassettes associant la détection de l'AgNS1 et des anticorps IgM et IgG (Dengue Duo Rapid test de Standard Diagnostics/Eurobio) n'a pas permis d'améliorer les performances des tests immunochromatographiques [133] (Figure 29).

Figure 29. Test immunochromatographique Dengue Duo Rapid



La détection de l'antigène NS1 par ces techniques ne constitue pas un indicateur de gravité.

La spécificité de détection de l'AgNS1 est très bonne, entre 96% et 100%, un résultat positif permet donc de poser le diagnostic de dengue confirmée. Cependant, la sensibilité de ce test varie selon les techniques, de 77% à 93% (Tableau 4).

Tableau 4. Tests de recherche de l'AgNS1 disposant du marquage CE (actualisation septembre 2010 AFSSAPS)

Test	Fournisseur	Technique	Sensibilité	Spécificité
Platella dengue NS1 Ag	Bio-Rad	ELISA	91 %	100 %
Dengue Early	Panbio / Diasorin	ELISA	77 %	96 %
SD Dengue NS1 Ag	Standard Diagnostics / Eurobio	ELISA	93 %	98 %
Dengue NS1 Ag Strip	Bio-Rad	Test rapide	92 %	100 %
SD Bioline NS1	Standard Diagnostics / Eurobio	Test rapide	93 %	98 %
Dengue Duo Rapid Test (Ag NS1, IgG / IgM)	Standard Diagnostics / Eurobio	Test rapide	93 %	98 %

De plus, la sensibilité de détection de l'antigène NS1 diminue lors de dengue secondaire [134]. En effet, lors des dengues secondaires, la formation de complexes IgG anti-DENV/protéine NS1 soluble entraînerait une baisse de la sensibilité des tests de détection, et pourraient ainsi conduire à des résultats faussement négatifs. Ce phénomène a des implications importantes en zone d'endémie où les patients autochtones adultes infectés ont fréquemment contracté une dengue antérieure due à un autre sérotype et ayant donc produit des anticorps IgG anti-NS1.

Des résultats négatifs pour l'antigène NS1 peuvent être observés en cas de virémie faible, de même la sensibilité de certains kits peut varier suivant le sérotype. Les sensibilités en fonction du sérotype par ordre décroissant des kits *PanE-Dengue Early ELISA* de Panbio et *Platelia* de Biorad sont respectivement : D1>D2>D3>D4 et D1>D3>D4>D2 [135].

3 - Diagnostic indirect ou diagnostic sérologique

Historiquement, plusieurs méthodes sérologiques étaient proposées pour la détection des anticorps anti-dengue, incluant les tests d'inhibition de

l'hémagglutination, de fixation du complément et de séroneutralisation. Ces méthodes ont maintenant été remplacées par les techniques immunoenzymatiques de type ELISA et les méthodes immunochromatographiques.

a- Cinétique des anticorps dirigés contre les virus de la dengue (figure 24)

L'évolution des marqueurs sérologiques IgM et IgG spécifiques de la dengue diffère selon qu'il s'agit d'une dengue primaire ou d'une dengue secondaire.

Lors d'une dengue primaire, c'est-à-dire, lorsqu'un patient est exposé pour la première fois à un virus de la dengue et ne possède pas d'IgG anti-dengue, le développement de la réponse anticorps IgM coïncide avec la disparition de la fièvre et de la virémie. Les particules virales disparaissent rapidement suite à l'apparition des anticorps spécifiques neutralisants. Dans la plupart des cas de dengue, la virémie devient détectable au moment où les symptômes apparaissent, et ne l'est plus au moment de la défervescence, soit au 4^e ou 5^e jour suivant l'apparition de la fièvre. En conséquence, les anticorps IgM spécifiques des virus de la dengue peuvent être détectés 3 à 6 jours après l'apparition de la fièvre (IgM détectées dans 50% des cas à J3-J5, et dans 95-98% des cas à J6-J10). Elles atteignent leur pic de sécrétion 2 semaines après le début de la maladie et persistent deux à trois mois après le premier épisode infectieux (voire jusqu'à six mois) [136,137]. Leur présence ne permet donc pas d'affirmer une infection en cours mais une infection récente datant de moins six mois. En conséquence, il est conseillé de confirmer le diagnostic par l'analyse d'un sérum de convalescence. Face à la difficulté d'obtenir deux

sérums consécutifs (espacés d'une semaine), les laboratoires s'appuient sur une seule détection positive pour suspecter une infection aiguë.

En outre, l'évolution des IgG lors d'une infection primaire est caractérisée par une augmentation lente et faible, débutant 7 à 10 jours après les premiers signes cliniques, et atteignant leur maximum en 2 à 3 semaines. Des titres bas d'IgG persistent pendant des décennies, constituant un indice de l'infection antérieure par un virus de la dengue. L'infection primaire est donc caractérisée par une fraction molaire élevée d'IgM anti-dengue et une fraction molaire basse d'IgG anti-dengue.

Lors d'une infection secondaire, caractérisée par un contact avec un virus hétérologue, le titre global en anticorps augmente rapidement dès la phase aiguë de l'infection. On observe une élévation rapide et de plus grande ampleur des titres d'anticorps IgG spécifiques. Leur taux croît progressivement durant environ 2 semaines et des titres élevés d'IgG se maintiennent pendant 30-40 jours. En pratique, l'observation d'une ascension du titre des IgG est rarement effectuée faute d'un second prélèvement au moment de la période de convalescence.

La cinétique de la production des IgM est identique à celle observée en infection primaire mais à des taux plus faibles et dans certains cas, elles peuvent être fugaces voire même absentes, rendant le diagnostic de dengue récente difficile [138, 139].

En outre, ces anticorps présentent une réactivité croisée avec un large éventail d'antigènes de virus de la dengue, ce qui constitue l'un des problèmes majeurs de difficulté d'interprétation des résultats biologiques. Ces anticorps de spécificité croisée apparaissent souvent dans les 2 mois après l'infection secondaire et peuvent

confondre la détermination du sérotype. Ce n'est que pendant la convalescence tardive (3-6 mois après l'infection) qu'on pourra mettre en évidence un anticorps monotypique spécifique du sérotype infectant. Le sérotypage le plus fiable et le plus utilisé reste celui effectué via la PCR.

b- La séroneutralisation virale

La technique de séroneutralisation la plus utilisée est celle de réduction des plages de lyse causées par le virus (*plaque reduction neutralization test* [PRNT]).

Des dilutions de sérums humains inactivés par la chaleur sont incubées avec des quantités définies de virus test (produisant un nombre suffisant de plages de lyse, c'est-à-dire de régions de cellules infectées).

Le principe de ce test est basé sur l'inhibition du pouvoir infectieux des virus par ces anticorps neutralisants produits par le patient lors de l'épisode infectieux. La concentration de sérum nécessaire pour réduire le nombre de plages de 50 à 90% selon les auteurs (PRNT 50 ou PRNT 90), par rapport au virus seul donne la mesure de la quantité d'anticorps. Une inhibition de 90% équivaut généralement à une infection primaire, alors qu'une inhibition de 50 à 70% se rapporte davantage à une dengue secondaire [102].

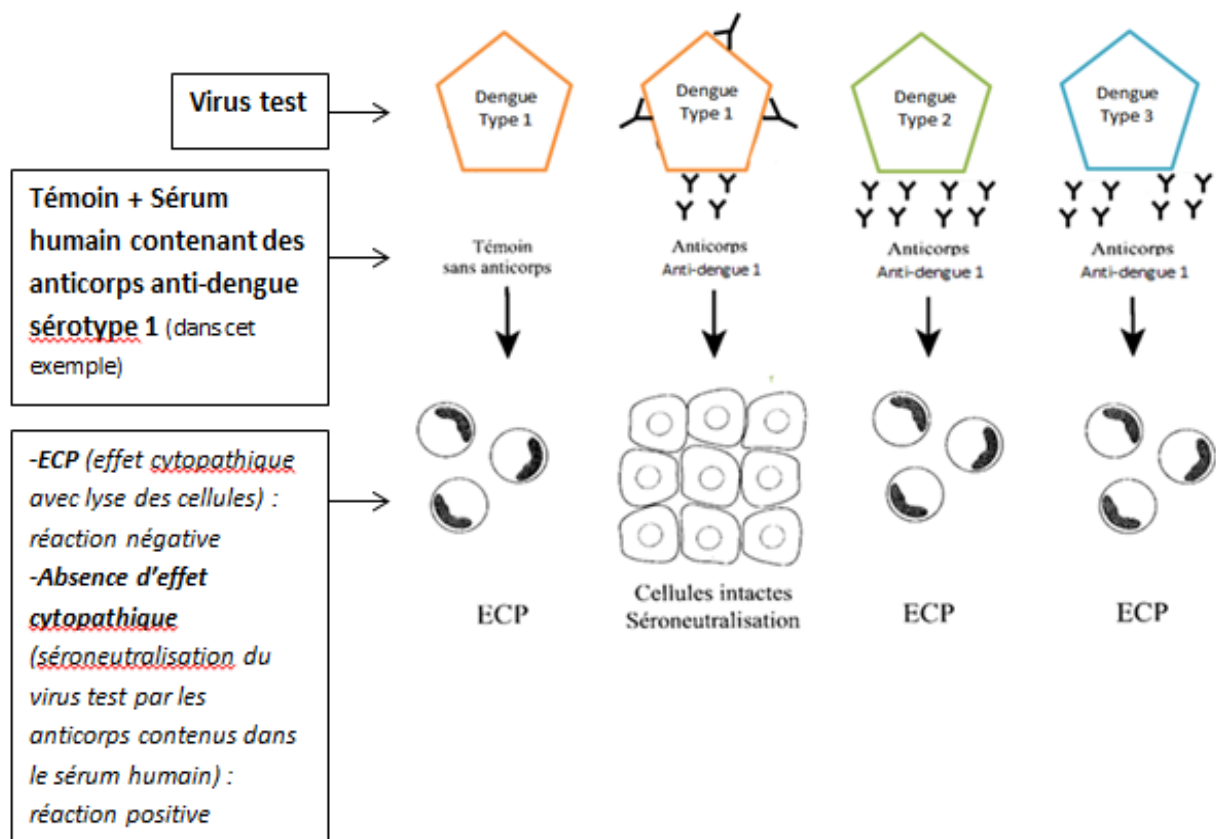
Du fait de son excellente spécificité, cette technique est principalement utilisée pour identifier le sérotype du virus de la dengue impliqué lors d'un premier contact avec le virus grâce à la persistance d'anticorps monotypiques détectables chez les patients en convalescence. La détermination du sérotype ne peut cependant pas être réalisée au cours d'une infection secondaire étant donné que les anticorps neutralisants

produits sont dirigés contre au moins 2 sérotypes et croisent généralement avec les 4 sérotypes ainsi qu'avec d'autres *Flavivirus*.

Cette technique, sensible et spécifique, a une importance majeure dans l'évaluation de l'efficacité d'un vaccin. Néanmoins, elle est coûteuse, longue, délicate à mettre en œuvre et nécessite la maîtrise de la culture cellulaire. Elle est donc peu utilisée en routine pour le diagnostic des infections par le virus de la dengue.

Figure 30. Test de séroneutralisation utilisé pour l'identification du sérotype de la dengue. L'exemple proposé montre l'identification du sérotype 1 de la dengue [140]

Les virus tests utilisés appartiennent aux sérotypes 1, 2 et 3.



c- Les techniques ELISA

Deux principes ont été développés : les techniques indirectes et l'immunocapture. Plusieurs types de kits existent : les tests EIA, les tests basés sur l'immunofluorescence (IF), les tests immunochromatographiques ou encore les immunoblots (IB).

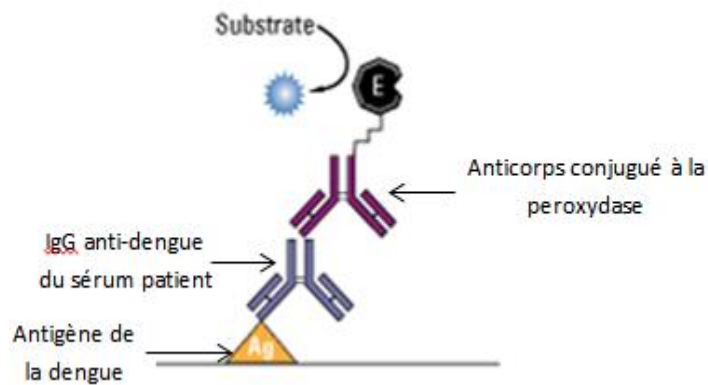
Commercialisés principalement par les sociétés australiennes (Panbio) et américaines (MRL), les tests ELISA permettent de détecter la présence individuelle ou couplée des IgM et IgG de la dengue par différentes approches.

Les performances de ces tests en termes de sensibilité et de spécificité dépendent de 3 paramètres : la valeur seuil définie du test, la durée des différentes étapes d'incubation et la nature des antigènes viraux utilisés.

Les valeurs seuils de ces tests sont relativement faibles, ce qui leur offre une bonne sensibilité, mais diminue significativement leur spécificité.

En ce qui concerne les IgG, le test ELISA indirect (figure 31) possède un seuil de détection plus bas que le test ELISA capture qui ne détecte les IgG qu'à un taux élevé. L'ELISA indirect qui est donc un test plus sensible, semble ainsi plus approprié pour les études de séroprévalence, alors que l'Elisa capture paraît plus pertinent pour le diagnostic des infections récentes par le virus de la dengue, surtout dans les régions endémo-épidémiques, où la majorité de la population a déjà contracté au moins une fois le virus [102].

Figure 31. ELISA indirect pour la détection des IgG spécifiques de la dengue [141]



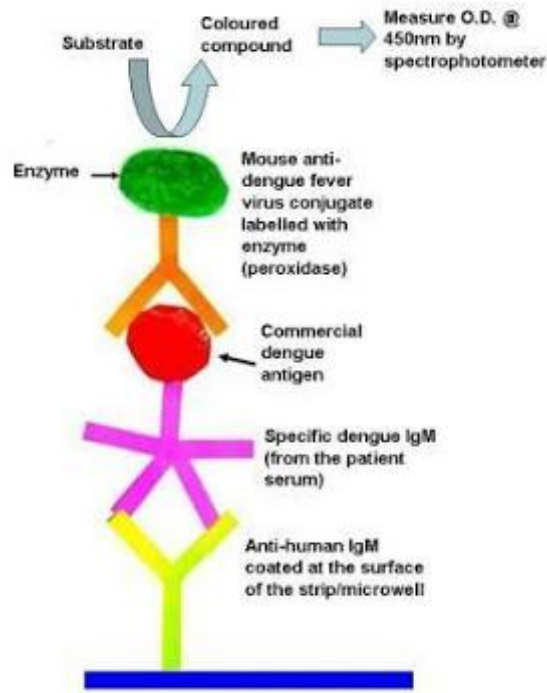
Au CHU de Pointe-à-pitre, la détection des IgM utilise une technique ELISA de type capture (figure 32). Lorsqu'ils sont présents, les anticorps sériques de classe IgM se lient aux anticorps IgM anti-humains fixés à la surface en polystyrène des bandelettes de test des micropuits. Un pool concentré d'antigènes de la dengue des sérogroupes 1 à 4 est dilué avec un diluant d'antigène jusqu'à obtention du volume de travail approprié. Les antigènes sont générés à l'aide d'un système d'expression de cellules d'insectes. Ils sont ensuite immunopurifiés à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique. Un volume égal d'anticorps monoclonaux conjugués à de la HRP (*horseradish peroxidase*) est ajouté à l'antigène dilué, ce qui permet la formation de complexes antigènes-anticorps monoclonaux.

Le sérum résiduel est éliminé de la plaque d'analyse par lavage, puis le complexe antigène-anticorps monoclonal est ajouté à la plaque d'analyse.

Après incubation, les micropuits sont lavés et un substrat incolore, composé de tétraméthylbenzidine/peroxyde d'hydrogène (chromogène TMB), est ajouté.

Figure 32. ELISA de type capture pour la détection des IgM spécifiques de la dengue

[142]



Le substrat est hydrolysé par l'enzyme et le chromogène devient bleu. Une fois la réaction stoppée par l'acide, le chromogène TMB devient jaune. Le changement de couleur indique la présence des anticorps anti-dengue dans l'échantillon testé.

Les résultats sont exprimés soit en valeur d'index soit en unités Panbio.

La plupart des tests commerciaux actuellement disponibles utilisent comme antigènes des protéines virales d'enveloppe E et de membrane M pour la détection des IgM et des IgG. Certaines techniques développées par des laboratoires spécialisés de type centre de référence utilisent des extraits de broyats de cerveaux de souris ou bien des antigènes obtenus à partir du surnageant de culture de cellules d'insectes ou de mammifères infectées. Le problème majeur de ces techniques mettant en jeu un mélange d'antigènes est leur manque de spécificité vis-

à-vis des autres *Flavivirus*, groupe où les réactions sérologiques croisées sont fréquentes (virus de l'encéphalite de Murray Valley, de l'encéphalite japonaise, du virus de la fièvre jaune ou du virus du Nil occidental).

La réaction sérologique IgM peut également croisée avec d'autres agents pathogènes comme le paludisme (en retour de zones impaludées) ou la leptospirose (également retrouvée en Guadeloupe). Un contexte inflammatoire, la présence de facteur rhumatoïde ou d'autres auto-anticorps, peut également entraîner une réaction faussement positive en IgM [143].

Des Elisa modifiées ont été développées pour détecter d'autres classes d'immunoglobulines (IgA et IgE). Les IgA, persistants moins longtemps que les IgM, pourraient être utiles pour différencier une infection en cours d'une infection datant de deux à trois mois [144]. Les IgM et les IgA spécifiques sont aussi retrouvées dans la salive [145]. Ce prélèvement de recueil, plus aisé chez les enfants ou dans des conditions précaires, pourrait être intéressant pour les études de séroprévalence [145]. La détection des IgA salivaires montre une faible sensibilité (36%) dans les infections primaires. En revanche, cette sensibilité est de 100% en cas de dengue secondaire [146].

Des travaux ont montré que le taux d'IgE serait significativement plus élevé chez les patients présentant un tableau de DHF/DSS que chez les patients avec une DF [147].

d- Distinction entre infections primaires et secondaires : Test d'avidité des IgG

Le test de référence recommandé par l'OMS pour la distinction entre les infections primaires et secondaires est le test d'inhibition de l'hémagglutination. Egalement, le calcul du ratio IgM/IgG spécifique sur un prélèvement tardif isolé peut être utilisé (quelques kits commerciaux dont le kit PanBio). Cependant, la persistance des IgM spécifiques dans certains cas jusqu'à 6 mois après l'infection, conjuguée aux possibles réactions croisées des IgM induites par d'autres *Flavivirus*, rend difficile la classification des cas selon le résultat des IgM [148].

Une autre alternative est une méthode immuno-enzymatique basée sur l'évolution de l'avidité des IgG au cours de l'épisode infectieux. Ce test, basé sur le fait que les premiers anticorps synthétisés après une stimulation antigénique ont une plus faible affinité pour l'antigène que ceux produits par la suite, permet de faire la différence entre infections primaires et secondaires, à l'aide d'un seul échantillon de sérum recueilli au cours de la phase aiguë de l'infection.

L'étude réalisée par Matheus S. et al. a mis en évidence une avidité de 25,9% et de 66,3% (index d'avidité) respectivement pour les infections primaires et secondaires. Basé sur l'analyse des seuls échantillons de sang prélevés pour cette étude entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour de la maladie, au cours de laquelle la plupart des complications cliniques se produisent, la sensibilité et la spécificité du test étaient de 95,1% et de 80,0% respectivement [149]. Le niveau d'avidité des échantillons de sérums, en

fonction de la force d'affinité de l'anticorps pour l'agent pathogène semble donc être une excellente alternative pour différencier les deux types d'infections.

C - Stratégie diagnostique

1 - Recommandations du Haut Conseil de la Santé Publique (2011)

Les actes d'isolement et de caractérisation virale, et la détection des IgM/IgG spécifiques par technique d'immuno-enzymologie (EIA) sont inscrits à la NABM et pris en charge par l'Assurance maladie.

Les libellés de ces actes sont valables pour tous les arbovirus et ne sont pas uniquement relatifs à la dengue.

Tableau 5. Prise en charge par l'Assurance maladie [150,151]

(Nb : nombre ; PCAP : période comparable de l'année précédente)

Code de l'acte	Libellé de l'acte	Nb 2008	Nb 2009	Nb 2010	PCAP 2009-2010	Cotation
1707	<u>Arboviroses</u> : recherche des IgM spécifiques par EIA	3976	3316	8516	+156,8 %	B70
1708	<u>Arboviroses</u> : recherche des IgG spécifiques par EIA	3656	2943	7363	+150,2 %	B70
4211	<u>Arbovirus</u> : Cultures cellulaires orientées et identification	1	3	1	-66,7%	B150
4273	NS1 dengue par EIA et ICT*	NA	NA	NA	NA	B50
5261	<u>Infection par le virus de la dengue et du chikungunya</u> **: détection de l'ARN des virus de la dengue et du chikungunya par RT-PCR	NA	NA	NA	NA	B250

* inscrit à la NABM en 2010 (Journal Officiel 27/08/2010)

**inscrit à la NABM en 2014 (Journal Officiel 09/03/2014)

Le faible nombre d'actes relatifs aux cultures orientées et à l'identification confirme que ce test est peu utilisé en pratique pour le diagnostic.

L'acte de détection de l'antigène NS1 de la dengue par dosage immunoenzymatique (EIA) ou immunochromatographie (ICT) est inscrit à la NABM depuis 2010 et pris en charge par l'assurance maladie. Le libellé de cet acte est spécifique de la dengue. L'indication de ce test est le diagnostic précoce de la dengue du premier au 5^{ème} jour après l'apparition des signes cliniques.

La détection du génome viral par RT-PCR est un item dédié à la fois à la dengue et au chikungunya. Le prélèvement doit être effectué uniquement jusqu'à J7 après le début des signes cliniques et n'est pris en charge que dans les situations cliniques suivantes :

- symptomatologie évocatrice chez un patient revenant d'une zone touchée par le virus de la dengue,
- symptomatologie évocatrice chez un patient se trouvant dans une zone d'activité du vecteur pendant un période d'activité du vecteur (en phase épidémique, les indications de la confirmation biologique sont limitées notamment aux cas graves, aux cas hospitalisés, aux patients atteints de comorbidités, aux formes atypiques, aux femmes enceintes et aux nouveau-nés).

L'augmentation importante du nombre d'actes en 2010 est à rapprocher de l'épidémie majeure qui a sévit dans les Départements Français d'Amérique (DFA).

En fonction de la date d'apparition des signes cliniques, différentes méthodes diagnostiques sont donc utilisées : dans un délai de sept jours, le diagnostic direct doit être utilisé, bien que la sérologie puisse être utilisée dès le troisième jour. Un résultat négatif pour l'antigénémie NS1 doit conduire à la poursuite de la stratégie diagnostique, par la recherche de l'ARN viral jusqu'au 5-7^{ème} jour et la recherche d'anticorps IgM/IgG après le 5^{ème} jour, associés à la recherche d'autres pathologies en fonction du tableau clinique et du contexte épidémiologique.

Entre le 5^{ème} et le 7^{ème} jour, la détection du génome viral par biologie moléculaire sera associée à une méthode sérologique (recherche d'IgM et d'IgG).

Passés 7 jours, la recherche des anticorps spécifiques IgG et IgM par technique ELISA permet un diagnostic en phase tardive.

Les recommandations du HCSP indépendamment de la zone géographique sont résumées dans la figure 33 en annexe [130].

Si la date de début des signes cliniques n'est pas connue ou si le prélèvement a été effectué autour de J5, la combinaison de la recherche antigénique NS1 et de la recherche d'anticorps anti-dengue permet d'augmenter la fenêtre de détection, puisqu'elle inclut celle de la positivité de l'Ag NS1 (\leq J5) et celle des IgM spécifiques de la dengue (\geq J5).

D'après les recommandations du HCSP de Janvier 2011, la biologie moléculaire est considérée comme la technique de référence dans chaque situation épidémiologique envisagée [130]. Son utilisation reste toutefois limitée en raison de la disponibilité du test, tant en France métropolitaine (test disponible au niveau des CHU) que dans les différentes zones d'endémie, et de son coût. De plus, depuis la mise en place des tests NS1, la PCR n'est quasiment plus utilisée comme technique diagnostique, mais plutôt comme technique de confirmation. En effet, désormais seuls sont testés en PCR les patients ayant eu un test NS1 positif ou douteux (afin de réaliser un sérotypage du virus), ou les patients ayant un test NS1 négatif, mais chez qui il existe une forte présomption clinique de dengue associée à une nécessité diagnostique (hors épidémie, cas grave en période épidémique).

2 - Mise en pratique dans un contexte endémo-épidémique : Recommandations du Cire Antilles Guyane (2013)

Après l'épidémie de dengue qui a sévit en Guadeloupe en 2010, le Cire Antilles Guyane a publié une actualisation de la stratégie diagnostique avec des recommandations pratiques à mettre en œuvre en situation épidémique.

Tout d'abord, lors de la phase fébrile aiguë, une demande de test diagnostique de la dengue n'est pas obligatoire, le test NS1 pouvant manquer de sensibilité et le sérodiagnostic ne se positivant qu'après le 5^{ème}-6^{ème} jour, alors que la majorité des patients est déjà guérie [90].

En l'absence de pathologie associée ou de facteurs de risque, la pratique d'exams complémentaires ou un avis spécialisé ne seront justifiés que lorsqu'il existe un doute sur le diagnostic. Chez les patients présentant des symptômes invalidants, une NFS pourra être réalisée et pourra alors affirmer le diagnostic à plus de 95% si la NFS associe une leucopénie < 4 G/L et une thrombopénie < 150 G/L, voire à plus de 98% s'il existe un rash cutané associé.

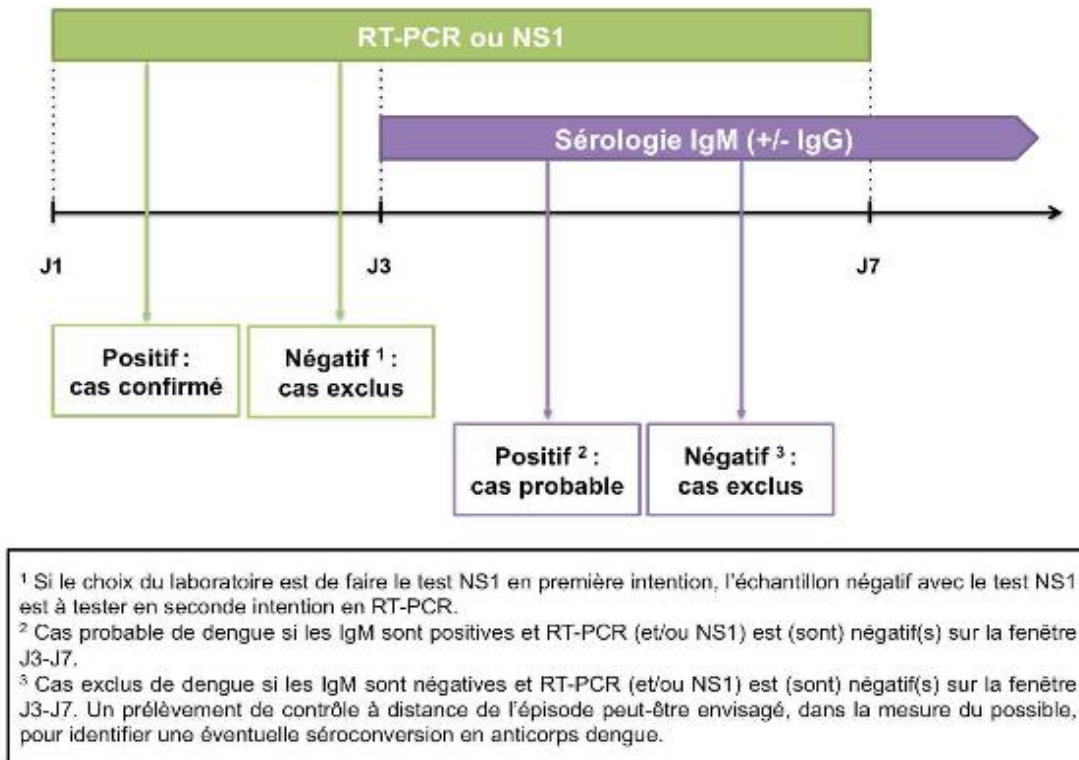
Après l'épidémie de 2010, les membres des comités d'experts de Guadeloupe, Guyane et Martinique ont pu constater que :

- Une grande majorité des prélèvements avait été réalisée dans les 7 premiers jours de la maladie ;
- Une incertitude persistait souvent sur la date des premiers signes à l'interrogatoire du patient engendrant une incertitude sur le nombre de jours de maladie lors du prélèvement ;
- Les résultats des différents tests diagnostiques ne correspondent pas toujours à ceux attendus au vu du délai de prélèvement annoncé : des IgM déjà présentes pour des délais annoncés courts (J3-J4) et des tests NS1 et RT-PCR encore positifs pour des délais annoncés longs (J5-J7).

En s'appuyant sur ces observations et sur la proportion non négligeable de patients développant une dengue secondaire dans les DFA, un algorithme diagnostique a été proposé (figure 34).

Comparativement à l’algorithme proposé par le Haut Conseil de la Santé Publique en 2011, le test antigénique NS1 peut être utilisé 2 jours de plus (jusqu’à J7 au lieu de J5), et la sérologie peut être utilisée 2 jours plus tôt (J3 au lieu de J5).

Figure 34. Stratégie diagnostique recommandée dans les DFA en milieu hospitalier quelle que soit la situation épidémiologique [90]



Diagnostic de la dengue au CHU de Pointe-à-pitre

En pratique au CHU de Pointe-à-pitre, les deux dernières observations faites par les comités d'experts (incertitude sur la date des symptômes et manque de correspondance entre résultats des tests et délai de prélèvement annoncé) ont incité la pratique du test NS1 et de la sérologie IgM/IgG pour chaque tube reçu au laboratoire pour un diagnostic de dengue.

La PCR est ensuite utilisée soit en cas de clinique sévère évocatrice de dengue sans diagnostic sérologique ou par l'antigène NS1, soit en cas de dépistage positif par l'antigène NS1 pour typer le virus dépisté. L'utilisation de la PCR à ces deux seules indications permet de limiter le nombre de techniques et donc le risque de contamination entre les tubes notamment en période épidémique. La technique utilisée est la PCR semi-nichée de Lanciotti après extraction sur QI Amp RNA minikit de Qiagen. La rétrotranscription est suivie d'une PCR en one step (pas d'ouverture de tube entre la rétrotranscription et la réaction de PCR). Les tubes sont ensuite ouverts pour récupérer 10 µL d'amplicons pour effectuer la PCR semi-nichée sur un autre site. Après le deuxième passage dans le thermocycleur, les tubes seront de nouveau ouverts pour effectuer la migration sur gel d'agarose.

Aucun protocole de RT-PCR en temps réel n'a actuellement été testé au CHU de Pointe-à-pitre.

3 - Interprétation des tests diagnostiques

L'évaluation des tests en terme de diagnostic, c'est-à-dire en termes de valeurs prédictives positives (probabilité de présenter la pathologie si le test est positif) et valeurs prédictives négatives (probabilité de ne pas présenter la pathologie si le test est négatif) n'est pas constant ni transposable entre populations de zones géographiques différentes. En effet, les valeurs prédictives dépendent de la prévalence de la pathologie au sein de la population étudiée.

En fonction des résultats des différents tests diagnostiques, plusieurs interprétations sont à évoquer (tableau 6).

Tableau 6. Interprétation biologique en fonction des résultats des différents tests diagnostiques au CHU de Pointe-à-pitre [3 ;125-127 ;134 ;136-139]

Détection Ag NS1	Sérologie IgM	Sérologie IgG	Interprétation	RT-PCR dengue
Négatif	Négatif	Négatif	Absence d'immunité ancienne vis-à-vis des <i>Flavivirus</i>	Possible*
Négatif	Négatif	Positif	-Immunité ancienne vis-à-vis d'un <i>Flavivirus</i> -Possibilité de dengue secondaire	Possible*
Négatif	Positif	Négatif	-Dengue récente probable A confirmer par RT-PCR si \leq J7 ou par un second prélèvement (séroconversion IgG ?) -Infection par un autre <i>Flavivirus</i>	Possible*
Positif	Positif	Négatif	Dengue récente confirmée	Inutile**
Positif	Positif	Positif	-Dengue récente confirmée secondaire avec présence d'IgM et d'Ag NS1 -Dengue primaire avec immunité ancienne vis-à-vis d'un autre <i>Flavivirus</i>	Inutile**
Positif	Négatif	Négatif	Dengue évolutive \leq J5	Inutile**
Négatif	Positif	Positif	-Dengue récente probable -Infection par un autre <i>Flavivirus</i>	Possible*

*Si patients à risque et/ou signes cliniques d'alerte.

**Sauf pour sérotypage à visée épidémiologique.

En Guadeloupe, la valeur prédictive négative de l'antigénémie NS1 et de la sérologie IgM baissera (nombreux faux négatifs), en raison des dengues secondaires, d'autant plus chez le sujet autochtone et âgé qui aura été potentiellement exposé à différents sérotypes. Inversement, un nourrisson ou un expatrié venant d'aménager aux

Antilles ne s'exposera pas ou moins à ce problème de diagnostic en raison du risque faible ou nul de dengue secondaire.

Par contre, la valeur prédictive négative de la biologie moléculaire n'est pas affectée.

La RT-PCR n'est pas influencée par les antécédents de dengue, par les autres *Flavivirus* ou par la vaccination contre la fièvre jaune (Tableau 7).

En zone d'endémie, la valeur prédictive positive des tests va augmenter en phase épidémique en raison d'une augmentation de la prévalence, et baisser en période inter-épidémique en raison d'une baisse de la prévalence, alors que le test utilisé sera le même.

Tableau 7. Avantages et inconvénients des différentes techniques diagnostiques [3]

	Culture virale	Biologie moléculaire	Antigène NS1	Sérologie IgM/IgG
Délai de rendu en pratique courante de laboratoire	1 à 2 semaines	1 J	ELISA 1 J Test rapide 1H	ELISA 1 J Test rapide 1 h
Diagnostic en phase aiguë	Oui (diagnostic rétrospectif, technique longue)	Oui	Oui	Non
Diagnostic après la phase aiguë	Non	Non	Non	Oui (diagnostic présomptif, sauf séroconversion des IgG)
Possibilité de sérotypage	Oui	Oui	Non	Non
Période de positivité moyenne	J1 à J 5	J1 à J5	J1 à J5	> J5 à 3 mois (IgM)
Disponibilité des tests	Laboratoires de référence	Laboratoires de référence Centre hospitalier universitaire	ELISA, réalisable techniquement dans tout laboratoire Test rapide: réalisable techniquement dans une structure de soin	ELISA, réalisable techniquement dans tout laboratoire Test rapide: réalisable techniquement dans une structure de soin
Coût des équipements	+++	+++	-	-
Prise en charge par l'assurance maladie	Oui	Oui*	Oui	Oui
Faux positifs	Non	Non (contamination de laboratoire avec les anciennes techniques) Spécificité +++	Non: spécificité +++	Oui: réactions croisées - autres <i>Flavivirus</i> - vaccination YFV - paludisme - facteur rhumatoïde - leptospirose
Faux négatifs	Oui: si mauvaise conservation du prélèvement	Non: sensibilité +++	Oui: en cas de dengue secondaire	Oui: en cas de dengue secondaire (pour les IgM)

*Détection de l'ARN du virus de la dengue par RT-PCR inscrit à la NABM en 2014 (Journal officiel du 09/03/2014)

III – ELABORATION DES CONTROLES INTERNES DE LA QUALITE POUR LA DETECTION DE L'ANTIGENE NS1 ET DES ANTICORPS IGM DE LA DENGUE

A - Généralités sur les contrôles internes de qualité (CIQ)

« Le laboratoire devra définir des systèmes de contrôle interne de qualité qui vérifient l'obtention de la qualité attendue des résultats » ISO 15189 (International).

Un laboratoire, quel qu'il soit, fournit des résultats dont il doit garantir la qualité en utilisant tous les moyens dont il peut disposer.

La détection de l'antigène NS1 ainsi que la sérologie de la dengue font appel à des réactifs qui permettent l'obtention de résultat de type qualitatif. Ces méthodes sont pourtant considérées comme quantitatives, car extrapolées à partir de la mesure d'un signal continu quantifiable (la densité optique), avec interprétation par rapport à un seuil. Quel que soit la fréquence des analyses d'échantillons de patients, un échantillon positif vis-à-vis du marqueur recherché et de préférence proche de la valeur seuil entre douteux et positif, doit être introduit dans chaque série d'analyses (contrôles internes de qualité ou CIQ).

Ce contrôle, qui consiste en la validation quotidienne des conditions de réalisation de l'analyse et à l'étude de la reproductibilité inter-manipulations, a pour objet de détecter des erreurs de manipulation, une détérioration des réactifs, de mettre en évidence de lentes dérives ou des dérives liées à l'usure du spectrophotomètre.

Plusieurs types d'échantillons de contrôles internes de qualité sont à distinguer [152].

Les contrôles de trousse sont des matériaux mis au point et fabriqués pour l'évaluation spécifique d'une trousse d'un dispositif médical de diagnostic in vitro (DM-DIV) et généralement fournis dans celle-ci. Ce type de contrôle n'est pas un véritable CIQ mais est un témoin de réaction. En pratique courante au laboratoire de virologie du CHU de Pointe-à-pitre, seul ce type de contrôle est passé lors de chaque série de patients. Le lot de contrôle change à chaque nouveau lot de coffret, ce qui ne procure pas au laboratoire les bénéfices d'un suivi de contrôle qualité au long cours sur différents lots de réactifs.

Les contrôles « dépendants » du fournisseur du couple réactif/analyseur sont des matériaux de CIQ mis au point et fabriqués pour l'évaluation spécifique d'un système analytique ou d'un DM-DIV et distribué par le fournisseur du système analytique.

Les contrôles « indépendants » du fournisseur du couple réactif/analyseur sont des matériaux de CIQ mis au point et fabriqués indépendamment des calibrateurs et des réactifs du système du test et fournis séparément. Ils permettent l'utilisation du même lot de contrôle sur des changements multiples de réactifs et de calibrateurs, donnant au laboratoire la capacité de détecter des écarts qui peuvent survenir avec de nouveaux réactifs et calibrateurs. Ces contrôles commercialisés ne couvrent malheureusement pas toutes les activités de biologie nécessitant un CIQ.

En l'absence de ces CIQ commercialisés, on peut avoir recours à l'élaboration de CIQ maison à l'aide d'un « pool » d'échantillons biologiques. Le laboratoire peut ainsi constituer des pools à partir de ses propres échantillons. L'interprétation de ces

résultats sera basée sur les mêmes règles que celles des CIQ. Le laboratoire définira la méthode de fabrication des pools et s'assurera de leur stabilité dans le temps.

B - Fabrication et évaluation d'un CIQ AgNS1 et d'un CIQ IgM dengue

Les deux CIQ élaborés par nos soins, pour la détection de l'antigène NS1 de la dengue et la sérologie IgM dengue, correspondent à des contrôles fabriqués in situ à l'aide d'un pool d'échantillons de patients conservés en sérothèque à -80°C.

1 - Matériels et méthodes

Ces manipulations ont pour objectif l'élaboration de CIQ pour deux paramètres, l'antigène NS1 de la dengue et les IgM spécifiques des virus de la dengue. Pour cela, des pools positifs pour chacun des deux paramètres provenant de sérums de patients précédemment testés et conservés en sérothèque à -80°C ont été dilués afin d'obtenir un volume suffisant pour une étude au long cours de leurs stabilités. Les dilutions ont été effectuées à l'aide de pipettes contrôlées en termes de justesse et de précision. Chaque série d'analyses effectuées pour l'antigène NS1 de la dengue et les IgM spécifiques de la dengue vérifient les critères de validation de méthode tels que précisés par le fabricant.

Les protéines et les anticorps doivent être conservés dans des conditions les protégeant de la dégradation. Les CIQ obtenus ont été conservés à -80°C pour optimiser cette intégrité après reconstitution des pools de sérums et l'ajout des

différentes matrices de dilution. Il convient aussi d'éviter de répéter des cycles de congélation et de décongélation. La façon la plus commune d'éviter ce problème est de congeler la préparation en petites fractions (aliquotes) qui pourront être décongelées successivement.

a- Antigène NS1

Les sérums étudiés ont été testé pour l'antigène NS1 avec le kit PLATELIA™ DENGUE NS1 Ag 72830 (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France), avec lecture des densités optiques au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 450nm (MultiskanFC Microplate Photometer REF 51119000).

Le tableau suivant indique les valeurs d'interprétation :

Ratio*	Résultat
Ratio < 0,50	Négatif
$0,50 \leq \text{Ratio} < 1,00$	Equivoque
Ratio $\geq 1,00$	Positif

* Ratio échantillon = S/CO, avec S la densité optique (DO) obtenue pour l'échantillon et CO la valeur seuil correspondant à la valeur moyenne des densités optiques des duplicates du calibrateur.

Le contrôle positif de trousse est constitué de tampon TRIS-NaCl buffer (pH 8,0), d'antigène NS1 de la dengue, de sérum albumine bovine, de glycérol et de conservateurs.

Lors de cette étude, deux pools positifs pour l'antigène NS1 ont été élaborés et trois matrices de dilution ont été successivement utilisées : du PBS (Phosphate buffered

saline), du sérum humain négatif pour l'Ag NS1 (SHN), et enfin du sérum de veau foetal (SVF filtré stérilement, Ref CVFSVF00-01, Lot S45710-2848, Exp 2015-11-30, et décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes).

Le premier pool, constitué de 12 sérums de patients testés positifs pour l'antigène NS1 (Ratio >10), a été dilué dans la première matrice, le PBS. Pour cela, deux méthodes différentes de dilution ont été successivement utilisées. Tout d'abord, par des dilutions en série, puis par des dilutions issues chacune du pool mère.

Le deuxième pool, constitué de 6 sérums de patients testés positifs pour l'antigène NS1 (Ratio >10), a été séparé en deux. Une partie a été diluée dans le sérum humain négatif pour l'AgNS1 (SHN), l'autre dans le sérum de veau foetal (SVF).

Pour élaborer la matrice de sérums humains négatifs pour l'AgNS1, nous avons fait appel à onze personnes du personnel des laboratoires du CHU de Pointe-à-pitre. Le sang a été prélevé sur tube sec (soit 42 tubes) avec gel séparateur (BD Vacutainer® Ref 367957, Lot 3309395, exp 2015-04) puis centrifugé à 2 200 g à température ambiante. Le sérum des 42 tubes a ensuite été poolé puis analysé et confirmé négatif pour l'Ag NS1 avec un taux de 0,15 (DO = 0,05).

Pour chacune des trois matrices utilisées, les dilutions ont été effectuées afin de déterminer la dilution optimale pour obtenir un ratio S/CO correspondant à un positif faible.

b- Anticorps IgM anti-dengue

Les sérums étudiés ont été analysés avec le Kit Test ELISA de la dengue avec capture des IgM (Panbio), la lecture spectrophotométrique s'effectuant sur le même spectrophotomètre et à la même longueur d'onde que pour l'antigène NS1.

Le tableau suivant indique les valeurs d'interprétation des résultats :

Valeur Index*	Unités Panbio*	Résultat
<0,9	<9	Négatif
0,9-1,1	9-11	Equivoque
>1,1	>11	Positif

* Pour obtenir la valeur d'index, l'absorbance de l'échantillon doit être divisée par la valeur seuil, celle-ci étant obtenue en multipliant la moyenne des 2 exemplaires d'étalon avec le facteur d'étalonnage spécifique de chaque lot. Pour obtenir les résultats en unités Panbio, il suffit alors de multiplier la valeur d'index de l'échantillon par 10.

Le contrôle positif de trousse est constitué de sérum humain.

Lors de cette étude, deux pools de sérums de patients positifs pour les IgM spécifiques de la dengue (>11 Unités Panbio) ont été élaborés et deux matrices de dilution ont été utilisées.

Le premier pool (n₁=11) a été dilué dans du PBS ; le deuxième pool (n₂= 10) a été dilué dans du sérum de veau fœtal.

Des séries de dilution ont donc été effectuées afin d'obtenir une valeur positive faible en IgM de la dengue.

c- Paramètres analysés : reproductibilité et répétabilité

Après avoir déterminé pour chacun des deux paramètres, antigène NS1 et anticorps IgM spécifiques de la dengue, la dilution optimale pour un CIQ (c'est-à-dire voisin de la valeur seuil), deux caractéristiques ont été analysées : la fidélité intermédiaire ou reproductibilité et la répétabilité.

En l'absence d'un CIQ externalisé avec le laboratoire de l'institut Pasteur de Cayenne, le calcul de la justesse est à ce jour non réalisable.

La fidélité intermédiaire ou précision inter-essai (reproductibilité) a été obtenue par l'analyse des CIQ au début de chaque série d'échantillons de patients. Un aliquote de chaque CIQ, Ag NS1 et IgM anti-dengue, a ainsi été analysé une fois par semaine hors période épidémique et tous les trois jours en période épidémique.

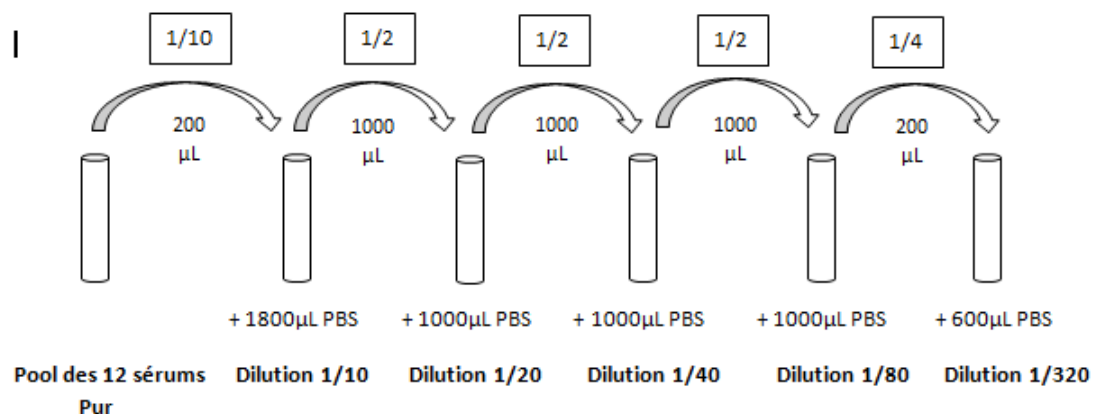
La répétabilité ou précision intra-essai a été évaluée en analysant 20 à 30 valeurs de CIQ de chacun des deux paramètres dans une même série.

2 - Résultats

a- CIQ pour l'antigène NS1

Matrice utilisée = PBS

○ Dilutions en série :



Le pool pur d'AgNS1 ainsi que chaque dilution ont été analysés, les résultats sont répertoriés ci-dessous (tableau 8).

Tableau 8. Gamme de dilution du pool AgNS1 en PBS (dilutions en série)

(Coffret Lot 2L0131 Exp 15/05/14)

Dilution	Valeur de la DO	Ratio	Interprétation
1/10	2,33	3,91	Positif
1/20	1,56	2,62	Positif
1/40	0,98	1,65	Positif
1/80	0,61	1,03	Positif
1/320	0,20	0,34	Négatif
Pur	x	x	x

La valeur de la DO de l'échantillon pur n'a pu être appréciée. En effet, la DO obtenue sur cet échantillon très réactif a dépassé la DO maximale pouvant être lue par le spectrophotomètre.

Nous avons donc choisi la dilution au 1/40 du pool comme CIQ positif faible, car voisin de la valeur seuil (ratio = 1,65 pour une valeur seuil à 1).

La quantité de dilution au 1/40 élaborée lors de la dilution en série étant insuffisante pour la conserver en tant que CIQ au long cours, nous avons renouvelé la dilution au 1/40, mais cette fois-ci directement à partir du pool mère : 200 µL de pool, dilué dans 7,8 mL de PBS, soit 8 mL de sérum dilué au 1/40 (CIQ AgNS1 n°1).

Cette dilution a alors été répartie dans des aliquotes à usage unique, soit 60 aliquotes contenant chacun 100µL de la dilution au 1/40 (prise d'essai pour un test de détection de l'antigène NS1 = 50µL) et congelés à -80°C.

Les résultats de la reproductibilité et de la répétabilité du CIQ Ag NS1 n°1 sont répertoriés respectivement dans le tableau 9 et le tableau 10.

Tableau 9. Reproductibilité du CIQ AgNS1 n°1 sur 9 aliquotes

(Le lot 3G0032 a été ouvert par erreur avant la fin du lot 2L0131)

Date	Valeur de la DO	Ratio	Lot
29/08/13	2,55	4,11	2L0131
05/09/13	3,37	6,07	Exp 15/05/2014
16/09/13	4,13	6,56	3G0032 Exp 30/12/2014
23/09/13	4,13	6,31	
26/09/13	4,04	6,57	
30/09/13	4,27	7,00	
08/10/13	3,55	5,11	
11/10/13	3,24	5,68	2L0131
14/10/13	3,89	7,48	Exp 15/05/2014

La reproductibilité a été arrêtée après seulement 9 valeurs car celles-ci ne correspondaient plus à un CIQ positif faible comme indiquait le premier résultat d'analyse (ratio = 1,65) mais à un positif fort (moyenne ratio = 6,1).

Tableau 10. Répétabilité du CIQ AgNS1 n°1 sur 20 aliquotes

(lot 3G0032 Exp 30/12/2014)

Valeur de la DO	Ratio	Valeur de la DO	Ratio
2,97	4,59	2,65	4,10
2,89	4,47	2,62	4,06
2,90	4,49	2,76	4,27
3,04	4,70	2,77	4,28
2,96	4,57	2,66	4,12
2,66	4,11	2,52	3,90
2,67	4,13	2,47	3,81
2,66	4,11	2,45	3,79
2,51	3,88	2,54	3,93
2,70	4,17	2,34	3,61

Les valeurs obtenues classaient cette fois-ci le CIQ AgNS1 n°1 parmi les CIQ moyennement positifs.

Le coefficient de variation (CV) de répétabilité obtenu de 7,11% (avec une moyenne de 4,15 et un écart-type de 0,29) correspond au CV établi par le fournisseur pour des échantillons moyennement positif (Tableau 11).

Tableau 11. Données fournisseurs pour la répétabilité de l'AgNS1

N = 30	Echantillon négatif	Echantillon faiblement positif	Echantillon moyennement positif	Echantillon fortement positif
	Ratio échantillon (S/CO)			
Moyenne	0,10	1,32	3,79	6,24
SD	0,01	0,08	0,29	0,45
% CV	13,1	6,2	7,7	7,2

L'hypothèse faite pour expliquer cette variabilité entre la première valeur mesurée du CIQ et les résultats de reproductibilité et de répétabilité serait la différence d'élaboration des dilutions : la première mesure (ratio = 1,65) a été obtenue à partir d'une dilution sériée, alors que la dilution utilisée pour étudier la reproductibilité et la répétabilité a été élaborée directement à partir du pool mère.

- **Dilutions directement à partir du pool pur**

Tableau 12. Gamme de dilution du pool AgNS1 en PBS (dilutions réalisées directement à partir du pool AgNS1) (Lot 3G0032 Exp 30/12/2014)

Dilution	Pool AgNS1 +	PBS	Valeur de la DO	Ratio	Interprétation
Pur	/	/	3,80	6,17	Positif
1/5	1000µL	5000µL	1,25	2,03	Positif
1/10	700µL	6300µL	0,81	1,31	Positif
1/20	400µL	7600µL	0,47	0,76	Taux limite
1/30	200µL	5800µL	0,33	0,53	Taux limite
1/40	200µL	7800µL	0,26	0,42	Négatif

Des volumes importants (de 6 à 8 mL) ont été élaborés volontairement afin de pouvoir utiliser directement la dilution choisie au long cours.

La dilution au 1/10 a donc été choisie comme CIQ positif faible, répartie en 100 aliquotes de 65µL chacun et congelés à -80°C (CIQ AgNS1 n°2).

Les résultats de reproductibilité sont répertoriés dans le tableau 13.

Tableau 13. Reproductibilité du CIQ AgNS1 n°2 sur 5 valeurs

Date	Valeur de la DO	Ratio	Lot
26/09/13	4,00	6,50	Lot 3G0032 Exp 30/12/2014
30/09/13	4,30	7,05	
08/10/13	4,09	5,88	
11/10/13	3,48	6,11	2L0131 Exp
14/10/13	4,54	8,73	15/05/2014

La reproductibilité a été arrêtée après seulement 5 valeurs car nous avons retrouvé les mêmes variations qu'avec le CIQ AgNS1 n°1 : les valeurs obtenues classaient le CIQ AgNS1 n°2 dans les positifs forts (moyenne ratio = 6,77).

Chacune des dilutions suivantes a été réalisée directement à partir du pool de sérum pur.

Matrice utilisée = sérum humain négatif pour l'AgNS1 (SHN)

Sept dilutions de 10mL chacune ont été analysées.

Tableau 14. Gamme de dilution du pool AgNS1 en SHN

(coffret NS1 Lot 3M0033 Exp 2015-05-30)

Dilution	Pool AgNS1+	SHN	Valeur de la DO	Ratio	Interprétation
1/10	1000µL	9000µL	0,10	0,10	Négatif
1/20	500µL	9500µL	0,11	0,11	Négatif
1/30	333µL	9667µL	0,16	0,17	Négatif
1/40	250µL	9750µL	0,10	0,11	Négatif
1/60	167µL	9833µL	0,09	0,09	Négatif
1/80	125µL	9875µL	0,11	0,12	Négatif
1/160	62,5µL	9937µL	0,11	0,12	Négatif

Toute la gamme de dilution est négative pour l'AgNS1.

Aucune dilution n'a donc été sélectionnée comme CIQ.

Matrice utilisée = sérum de veau fœtal (SVF)

Quatre dilutions faites à partir du même pool de sérums AgNS1 positifs que précédemment, ont été analysées. Le volume total de chaque dilution est 5mL.

Tableau 15. Gamme de dilution du pool AgNS1 en SVF

(coffret Lot 3M0033 Exp 30/05/2015)

Dilution	Pool AgNS1+	SVF	Valeur de la DO	Ratio	Interprétation
1/10	500µL	4500µL	5,06	6,33	Positif
1/20	250µL	4750µL	3,02	3,78	Positif
1/40	125µL	4875µL	2,97	3,72	Positif
1/100	50µL	4950µL	0,92	1,15	Positif

La dilution au 1/100 a été sélectionnée (CIQ AgNS1 n°3).

La répétabilité a été évaluée le jour même, sans congélation préalable (Tableau 16).

Tableau 16. Répétabilité du CIQ AgNS1 n°3 sur 30 valeurs

(coffret Lot 3M0033 Exp 30/05/2015)

Valeurs de la DO	Ratio	Valeurs de la DO	Ratio
1,07	1,36	0,98	1,25
1,05	1,34	0,96	1,23
1,05	1,33	1,08	1,37
0,89	1,13	0,91	1,16
0,89	1,13	1,09	1,39
0,95	1,21	0,99	1,25
1,16	1,47	0,94	1,20

1,08	1,38	0,92	1,18
1,47	1,86	0,94	1,20
1,33	1,70	0,85	1,08
1,30	1,65	0,86	1,10
0,92	1,17	0,91	1,16
0,89	1,13	0,99	1,26
0,89	1,13	0,94	1,19
0,91	1,16	1,02	1,30

Le CV obtenu de 14% (avec une moyenne de 1,28 et un écart-type de 0,18) est bien supérieur au CV du fournisseur pour un échantillon faiblement positif (CV fournisseur = 6,2%, cf. Tableau 11).

Après cette constatation, nous avons voulu comparer les CV pour la répétabilité en fonction du degré de positivité du CIQ. Pour cela, nous avons évalué la répétabilité pour la dilution au 1/20, correspondant à un échantillon moyennement positif (cf. tableau 15).

Tableau 17. Répétabilité d'un échantillon moyennement positif sur 30 valeurs
(coffret Lot 3M0033 Exp 30/05/2015)

Valeur de la DO	Ratio	Valeur de la DO	Ratio
4,13	5,79	3,98	5,58
4,22	5,91	4,16	5,83
4,18	5,86	4,06	5,68
3,88	5,44	4,18	5,86
3,92	5,50	4,16	5,83
4,00	5,61	4,03	5,64
3,98	5,58	4,25	5,95
3,90	5,46	3,79	5,32
3,95	5,54	3,97	5,57
4,04	5,67	4,00	5,61
4,02	5,63	4,14	5,80
4,16	5,83	4,04	5,66

4,04	5,66	4,12	5,77
4,12	5,78	3,87	5,42
3,99	5,59	4,16	5,83

Le CV obtenu de 2,8% (avec une moyenne de 5,67 et un écart-type de 0,16), est bien inférieur au CV du fournisseur pour un échantillon moyennement positif (CV fournisseur = 7,7%, cf. Tableau 11).

Au vu de ces résultats, il apparaît que plus la valeur du CIQ se rapproche de la valeur seuil, plus le CV augmente.

Le CIQ AgNS1 n°3 a ensuite été réparti dans des aliquotes à usage unique, à raison de 100µL par aliquote, et congelé à -80°C.

Les résultats de reproductibilité sont répertoriés dans le tableau 18.

Tableau 18. Reproductibilité du CIQ AgNS1 n°3 sur 25 valeurs
(coffret 3M0033 Exp 30/05/15)

Date	Valeur de la DO	Ratio	Interprétation
01/07/14	0,65	1,14	Positif
08/07/14	0,77	1,27	Positif
23/07/14	0,45	0,83	Douteux
29/07/14	0,89	1,17	Positif
05/08/14	0,98	1,44	Positif
12/08/14	0,97	1,75	Positif
18/08/14	1,04	1,27	Positif
26/08/14	0,72	1,50	Positif
02/09/14	0,85	1,65	Positif
08/09/14	0,64	1,56	Positif
15/09/14	0,68	1,58	Positif
23/09/14	0,61	1,42	Positif
29/09/14	0,82	1,34	Positif

06/10/14	0,76	1,37	Positif
13/10/14	0,99	1,66	Positif
20/10/14	0,85	1,25	Positif
03/11/14	1,07	1,96	Positif
10/11/14	0,62	1,57	Positif
18/11/14	1,09	2,12	Positif
24/11/14	0,89	1,98	Positif
03/12/14	1,16	2,23	Positif
08/12/14	0,92	1,64	Positif
16/12/14	0,84	1,56	Positif
06/01/15	1,21	1,70	Positif
13/01/15	0,56	1,53	Positif

Mise à part une valeur classée en douteuse, l'ensemble des valeurs (étendue des ratios de 0,83 à 2,23) du CIQ AgNS1 n°3 correspondent à des positifs faibles.

Le CV reste cependant élevé, à 20,8% (avec une moyenne de 1,54 et un écart-type de 0,32).

b- CIQ pour les anticorps IgM de la dengue

Matrice utilisée = PBS

L'échantillon pur du pool de sérums positifs pour les IgM anti-dengue ainsi que les dilutions au 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/320 et au 1/640 du pool dans du PBS ont été analysées (Tableau 19).

Tableau 19. Gamme de dilution du pool IgM en PBS

(coffret Lot 12226 Exp 02/2014)

Dilution	Valeur de la DO	Taux	Interprétation
1/10	3,46	7,27	Positif

1/20	2,99	6,28	Positif
1/40	2,32	4,88	Positif
1/80	1,86	3,91	Positif
1/320	1,44	3,02	Positif
1/640	1,01	1,76	Positif
Pur	x	x	X

La dilution au 1/640 a donc été choisie (CIQ IgM n°1) comme valeur optimale de CIQ faiblement positif (ratio = 1,76 pour une valeur seuil à 1,1).

Cette dilution a été répartie dans des aliquotes à usage unique, soit 60 aliquotes contenant chacun 150µL de la dilution au 1/640 (prise d'essai pour un test sérologique IgM anti-dengue = 10µL dilué au 1/100^e).

Ces aliquotes ont ensuite été congelées à -80°C.

Les résultats de reproductibilité du CIQ IgM n°1 sont répertoriés dans le tableau 20.

Tableau 20. Reproductibilité du CIQ IgM n°1 sur 14 valeurs

Date	Valeur de la DO	Taux	Interprétation / Lot
13/08/13	1,01	1,76	POSITIF Lot 12226 (exp 02/2014)
19/08/13	0,796	1,53	
29/08/13	0,88	1,56	
05/09/13	0,74	1,52	
12/09/13	1,12	1,89	
16/09/13	0,90	1,52	
23/09/13	0,70	1,62	
26/09/13	1,14	2,04	
30/09/13	0,80	1,50	
08/10/13	0,34	0,70	NEGATIF Lot 12306 (exp 05/2014)
11/10/13	0,33	0,77	
14/10/13	0,32	0,76	
18/10/13	0,32	0,80	
22/10/13	0,30	0,69	

Les valeurs de reproductibilité pour les IgM anti-dengue du 13/08/13 au 30/09/13 inclus, réalisées sur le coffret Lot 12226, restent stables avec une moyenne de 1,66 et un CV de 11,44%. A partir du 08/10/13 (fin de l'ancien lot), un nouveau coffret Lot 12306 (exp 05/2014) a été utilisé. Les mesures effectuées avec ce nouveau lot, stables entre elles avec une moyenne de 0,74 et un CV de 5,7%, classaient cette fois-ci le CIQ IgM n°1 dans les « Négatifs ».

Afin de déterminer si ces variations inter-lots étaient retrouvées pour les sérums des patients, sept d'entre eux testés avec le premier coffret ont été analysés avec le nouveau lot de coffret (Tableau 21).

Tableau 21. Comparaison des taux d'IgM de la dengue de sept sérums de patients entre deux lots (Lot 12226 vs lot 12306)

Sérums	Lot 12226 Exp 02/2014	Lot 12306 Exp 05/2014
1	1,26 (p)	1,79 (p)
2	1,00 (e)	0,83 (n)
3	1,15 (p)	1,26 (p)
4	1,43 (p)	1,29 (p)
5	1,09 (e)	0,89 (n)
6	1,24 (p)	1,07 (e)
7	1,37 (p)	1,18 (p)

(p) : positif (e) : équivoque (n) : négatif

Nous n'observons pas de variations significatives, même si deux sérums sont passés de la classe « équivoque » à « négatif » et que l'un d'entre eux est passé de la classe « positif » à « équivoque ».

Les résultats de répétabilité avec le 2^{ème} lot sont répertoriés dans le tableau 22.

Tableau 22. Répétabilité du CIQ IgM n°1 sur 30 valeurs

(coffret Lot 12306 exp 05/2014)

Valeur de la DO	Taux	Valeur de la DO	Taux
0,32	0,76	0,32	0,76
0,31	0,73	0,32	0,75
0,32	0,75	0,34	0,80
0,32	0,74	0,35	0,82
0,36	0,85	0,34	0,80
0,34	0,80	0,32	0,76
0,32	0,75	0,32	0,76
0,31	0,73	0,32	0,76
0,30	0,72	0,33	0,78

Le CV obtenu, avec une moyenne de 0,77 et un écart-type de 0,04, reste faible avec une valeur de 4,6%.

Matrice utilisée = sérum de veau fœtal (SVF)

Cinq dilutions d'un pool IgM positif ont été effectuées avec du sérum de veau fœtal (SVF) et analysées (Tableau 23).

Tableau 23. Gamme de dilution du pool IgM en SVF

(coffret Lot 246006 Exp 03-03-2015)

Dilution	Pool IgM +	SVF	Valeur de la DO	Taux	Interprétation
1/40	250 µL	9750 µL	0,63	1,97	Positif
1/80	125 µL	9875 µL	0,34	1,07	Taux limite
1/160	62,5 µL	9937,5 µL	0,19	0,59	Négatif
1/320	31,3 µL	9968,7 µL	0,12	0,38	Négatif
1/640	15,6 µL	9984,4 µL	0,10	0,30	Négatif

La dilution au 1/40 a donc été choisie comme CIQ positif faible (CIQ IgM n°2)

Les résultats de répétabilité sont répertoriés dans le tableau 24.

Tableau 24. Répétabilité du CIQ IgM n°2 en SVF sur 28 valeurs

(coffret Lot 246006 Exp 03-03-2015)

Valeur de la DO	Taux	Valeur de la DO	Taux
0,98	2,22	0,92	2,07
0,91	2,05	0,93	2,11
1,01	2,29	0,98	2,22
0,91	2,07	0,98	2,22
0,91	2,06	0,94	2,13
0,86	1,96	0,90	2,03
0,94	2,12	0,97	2,19
0,95	2,16	0,88	2,00
0,97	2,19	0,94	2,13
0,99	2,24	0,89	2,01
0,96	2,18	0,95	2,15
0,85	1,93	0,95	2,15
0,91	2,07	0,94	2,13
0,92	2,08	0,90	2,04

Le CV obtenu pour des valeurs faiblement positives (avec une moyenne de 2,11 et un écart-type de 0,09) est de 4%.

Les résultats de reproductibilité sont répertoriés dans le tableau 25.

Tableau 25. Reproductibilité du CIQ IgM n°2 en SVF sur 19 valeurs

(coffret Lot 246006 Exp 03-03-2015 du 26/08/14 au 08/12/14,
coffret Lot 246009 Exp 18-08-2015 du 16/12/14 au 13/01/15)

Date	Valeur de la DO	Taux	Interprétation
26/08/14	1,00	2,23	Positif
02/09/14	0,84	1,96	Positif
05/09/14	0,79	1,81	Positif

08/09/14	0,68	1,62	Positif
15/09/14	0,84	2,17	Positif
23/09/14	0,84	1,82	Positif
29/09/14	0,78	1,86	Positif
06/10/14	0,73	1,81	Positif
13/10/14	0,82	1,97	Positif
20/10/14	0,71	1,57	Positif
03/11/14	0,95	1,74	Positif
10/11/14	0,80	1,96	Positif
18/11/14	0,83	2,17	Positif
24/11/14	0,62	1,70	Positif
03/12/14	0,66	1,54	Positif
08/12/14	0,93	1,96	Positif
16/12/14	0,92	1,89	Positif
06/01/15	1,13	2,56	Positif
13/01/15	1,24	2,32	Positif

L'ensemble des valeurs du CIQ IgM n°2 correspond à des positifs faibles.

Le CV reste toutefois élevé à 13,8 % (avec une moyenne à 1,93 et un écart-type à 0,26).

C - Discussion

Pour être en mesure de valider techniquement puis biologiquement les séries d'analyses de sérums de patients pour le diagnostic biologique de la dengue, les examens réalisés, notamment la détection de l'antigène NS1 et la sérologie IgM anti-dengue, doivent comporter des contrôles internes de qualité, qui permettront de suivre au long cours la stabilité de la technique.

Parmi les trois matrices utilisées, la seule ayant abouti à des résultats de répétabilité et de reproductibilité stables dans le temps est le sérum de veau fœtal. Cette matrice

présente deux avantages essentiels. Tout d'abord, sa composition qui est similaire au sérum humain, notamment par sa teneur élevée en protéines, et également le fait qu'elle ne possède pas d'anticorps anti-dengue pouvant interférer avec l'antigène contenu dans le pool de sérum positif. Les CV de répétabilité (14% pour l'AgNS1 et 4% pour les IgM), et de reproductibilité (20,8% pour l'AgNS1 et 13,8% pour les IgM) pour des valeurs de CIQ proches de la valeur seuil restent acceptables pour des méthodes semi-quantitatives, le but étant de conserver une valeur positive faible pour le CIQ à chaque série de patients. Cette étude a permis de valider cette matrice pour l'élaboration de CIQ pour l'antigène NS1 et les anticorps IgM anti-dengue. Les fiches de validation de méthode de type quantitative (SH-FORM-43 du COFRAC) n'ont pu être que partiellement complétées grâce aux informations et données recueillies durant cette étude, certains paramètres n'ayant pas pu être étudiés (figures 35 et 36 en annexe).

L'une des difficultés rencontrées lors de cette étude vient du fait qu'il s'agit de techniques semi-quantitatives. Les CIQ ne sont donc pas considérés comme des échantillons « titrés » ; ils doivent dans la mesure du possible être proches de la valeur seuil, sans pour autant changer de catégorie d'une série à une autre (positif, négatif ou douteux/équivoque). L'objectif de ces CIQ voisins du seuil de positivité est d'avoir une idée des variations éventuelles de sensibilité de la méthode.

L'autre difficulté rencontrée concerne la nature de la matrice utilisée pour la dilution des pools de sérums positifs pour l'antigène NS1 et positifs pour les IgM anti-dengue. Durant les différentes étapes de l'étude, il faut évidemment éviter de

dénaturer la protéine que l'on veut détecter, que ce soit l'antigène NS1 ou les anticorps IgM anti-dengue. Il faut donc utiliser des milieux dont les caractéristiques sont compatibles avec la stabilité des protéines (pH, force ionique, osmolarité, sels, antioxydants...).

La première matrice utilisée (PBS = Phosphate Buffered Saline), solution saline tamponnée en phosphate, est un soluté physiologique constitué de chlorure de sodium, de phosphate disodique et de phosphate monopotassique. Son pH est de 7,2 et l'osmolarité de la somme de toutes ses composantes est de 315 mOs. Bien que le PBS présente de nombreux avantages, les résultats concernant l'antigène NS1 ne sont pas concluants. En effet, la répétabilité et la reproductibilité pour l'antigène NS1, après dilution dans du PBS et conservation à -80°C, donnent des valeurs en densité optique et en ratio beaucoup plus élevées que la première détermination (analyse d'une dilution faite extemporanément dans du PBS). L'un des problèmes soulevés par ces résultats est la différence de composition entre le PBS et le sérum humain (échantillons patients). Dans la mesure du possible, la matrice utilisée pour les contrôles de qualité doit être la plus proche possible des échantillons de patients, soit du sérum humain. Le PBS étant dépourvu de protéine et de substance lipidique, la stabilité de l'antigène NS1 en est probablement affectée. La dilution dans du PBS pourrait dévoiler d'autres épitopes sur l'antigène NS1, augmentant ainsi la densité optique du CIQ.

La deuxième matrice (sérum humain négatif pour l'AgNS1) utilisée uniquement pour l'élaboration du CIQ Ag NS1, n'a pas donné de résultats plus concluants, l'ensemble

des dilutions effectuées s'étant révélées négatives. Nous en avons déduit qu'une ou plusieurs personnes prélevées pour la réalisation du SHN avaient déjà contracté la dengue et donc présentaient dans son sérum des anticorps IgM et/ou IgG anti-NS1 ayant neutralisé l'antigène NS1 contenu dans le pool (en correspondance avec la prévalence élevée en Guadeloupe de patients avec des IgG anti-dengue). Pour utiliser une matrice humaine, les personnes prélevées devraient donc remplir une condition indispensable : ne jamais avoir été en contact avec les virus de la dengue. En pratique, en zone endémo-épidémique, cette condition difficile à remplir ne permettrait pas de réunir suffisamment de sérums pour valider un volume de CIQ utilisable sur plusieurs années.

En ce qui concerne les IgM, les premières valeurs de la reproductibilité des dilutions dans du PBS (après congélation) ne varient pas par rapport à la première détermination (dilution extemporanée dans du PBS). C'est le changement de lot à la dixième valeur de reproductibilité qui provoque un changement de catégorie du CIQ, le faisant passer de positif à négatif. Par contre, ce changement de lot ne semble pas affecter significativement les échantillons de patients. Plusieurs causes peuvent être à l'origine de ces résultats : problème de conservation des CIQ, défautuosité du nouveau lot, instabilité des aliquotes de CIQ IgM anti-dengue due à la nature de la matrice (très différente de la matrice des échantillons patients).

De cette étude, nous pouvons conclure que le sérum de veau fœtal semble être une alternative de choix pour l'élaboration de contrôles internes de qualité.

IV – CONCLUSION

Le diagnostic biologique de la dengue doit s'envisager dans une région géographique donnée en fonction de la situation épidémiologique (zone endémo-épidémique ou risque d'émergence), et du contexte clinique (cas suspect de forme sévère, patients à risque). En fonction de la disponibilité des tests et de la spécialisation du laboratoire (CNR, laboratoires d'analyses de biologie médicale), le diagnostic peut être entrepris par culture virale, détection du génome virale par RT-PCR, détection de l'antigène NS1 et/ou recherche des anticorps spécifiques de la dengue. Les RT-PCR conventionnelles sont amenées à être progressivement remplacées par les RT-PCR en temps réel, plus rapide et limitant le risque de contamination. Cependant, le manque de standardisation et le coût élevé de ces techniques limitent encore leur utilisation en pratique courante. De nombreux laboratoires continueront d'utiliser la détection de l'antigène NS1 ainsi que les techniques sérologiques comme principal outil diagnostique. L'élaboration de contrôles internes de qualité pour ces méthodes est donc indispensable pour améliorer le diagnostic et la prise en charge des patients.

Même si les avancées actuelles dans le développement et la commercialisation d'un vaccin tétravalent laissent espérer un meilleur contrôle de la dengue dans les années à venir, l'annonce de la découverte d'un cinquième sérotype de la dengue faite à Bangkok lors de la 3^{ème} conférence internationale sur la dengue en octobre 2013 pourrait rendre le développement d'un vaccin encore plus difficile [153].

V – ANNEXES

Tableau 1. Principaux arbovirus pathogènes pour l'homme [17]

Virus	Genre (famille)	Pathologie	Vecteur	Répartition géographique
▢ amaril	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre jaune	<i>Aedes</i> sp.	Afrique intertropicale, Amérique du Sud tropicale
▢ dengue (1 à 4)	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	syndrome fébrile algique, parfois fièvre hémorragique	<i>Aedes</i> sp.	Afrique, Asie, Pacifique, Amériques
▢ encéphalite japonaise	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	Asie de l'Est et du Sud-est, Inde
▢ encéphalite de Saint Louis	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	États-Unis
▢ <i>Murray Valley encephalitis</i>	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	moustiques	Australie
▢ <i>West Nile</i>	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre, parfois encéphalite	<i>Culex</i> sp.	Afrique, Bassin méditerranéen, Inde, Asie du Sud-est, États-Unis Europe, Asie (Sibérie)
▢ <i>tick-borne encephalitis</i> (Europe centrale et verno-estivale russe)	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	encéphalite	<i>Ixodidae</i>	
▢ maladie de la forêt de Kyasanur	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre hémorragique	tiques	Inde
▢ fièvre hémorragique d'Omsk	<i>Flavivirus</i> (Flaviviridae)	fièvre hémorragique	<i>Ixodidae</i>	Sibérie
▢ encéphalites équine américaines (EEE, VEE, WEE)	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	encéphalite	moustiques	Amériques
▢ Chikungunya	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	syndrome fébrile algique	<i>Culex</i> sp.	Afrique, Asie
▢ O'Nyong-nyong	<i>Alphavirus</i>	syndrome fébrile	<i>Anopheles</i> sp.	Afrique
▢ <i>Ross river</i>	<i>Alphavirus</i> (Togaviridae)	syndrome fébrile algique	moustiques	Australie
▢ <i>California encephalitis</i>	<i>Bunyavirus</i> (Bunyaviridae)	encéphalite	moustiques	Amérique du Nord
▢ fièvre de la vallée du Rift	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	syndrome fébrile	moustiques	Afrique
▢ SF Naples	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre à phlébotomes	phlébotomes	Bassin méditerranéen, Asie
▢ SF Sicile	<i>Phlebovirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre à phlébotomes	phlébotomes	Bassin méditerranéen, Asie
▢ CHF Congo	<i>Nairovirus</i> (Bunyaviridae)	fièvre hémorragique de Crimée-Congo	tiques	Europe, Afrique, Asie
▢ <i>Colorado tick fever</i>	<i>Coltivirus</i> (Reoviridae)		tiques	Amérique du Nord

Figure 18. Fiche de renseignements pour le diagnostic biologique de la dengue

**Fiche de renseignements
À joindre à toute demande
De sérologie ou de RT-PCR de dengue**

Cette fiche est à remplir entièrement afin de permettre l'interprétation des résultats et la mise en œuvre rapide des actions de démoustication

<input type="checkbox"/> Demande de sérologie dengue Le prélèvement doit être effectué au minimum <u>6</u> jours après les premiers symptômes (Les IgM apparaissent au plus tôt 6 jours après les premiers signes)	<input type="checkbox"/> Demande de RT-PCR dengue Le prélèvement doit être effectué <u>au</u> maximum 4 jours après les premiers symptômes (Passé ce délai, le virus ne pourra plus être détecté)
--	---

Identification du demandeur

Nom du médecin :

Centre Hospitalier et Service :

Téléphone et Fax :

Renseignement concernant la suspicion de dengue

Date de début des signes cliniques :
 (Sans cette information, aucune interprétation des résultats ne sera disponible)

Date de réalisation du prélèvement :
 (Information indispensable, à compléter impérativement par le préleveur)

Présence d'au moins un signe de gravité Oui Non

Préciser s'il s'agit du 2^{ème} prélèvement concernant cette suspicion : Oui Non

Caractéristiques du Patient
 (Indispensables pour l'intervention des services de démoustication)

NOM : Prénom :

Sexe : H F O Date de naissance :/...../.....

Adresse :

N° de téléphone : Commune :

Si autre(s) lieu(x) de contamination possible dans les 15 jours précédant les signes, préciser (*Travail, Loisirs, Séjour hors Guadeloupe...*) :

Si le patient réside habituellement hors Guadeloupe, préciser :

DSDS DE LA GUADELOUPE – CELLULE DE VEILLE SANITAIRE (CVS)
 TEL 0590 99 49 27 ou 23 – TELECOPIE 0590 99 49 24
 BISDARY – 97113 GOURBEYRE

Figure 33. Place des différents tests de diagnostic biologique de la dengue, indépendamment de la zone géographique [130]

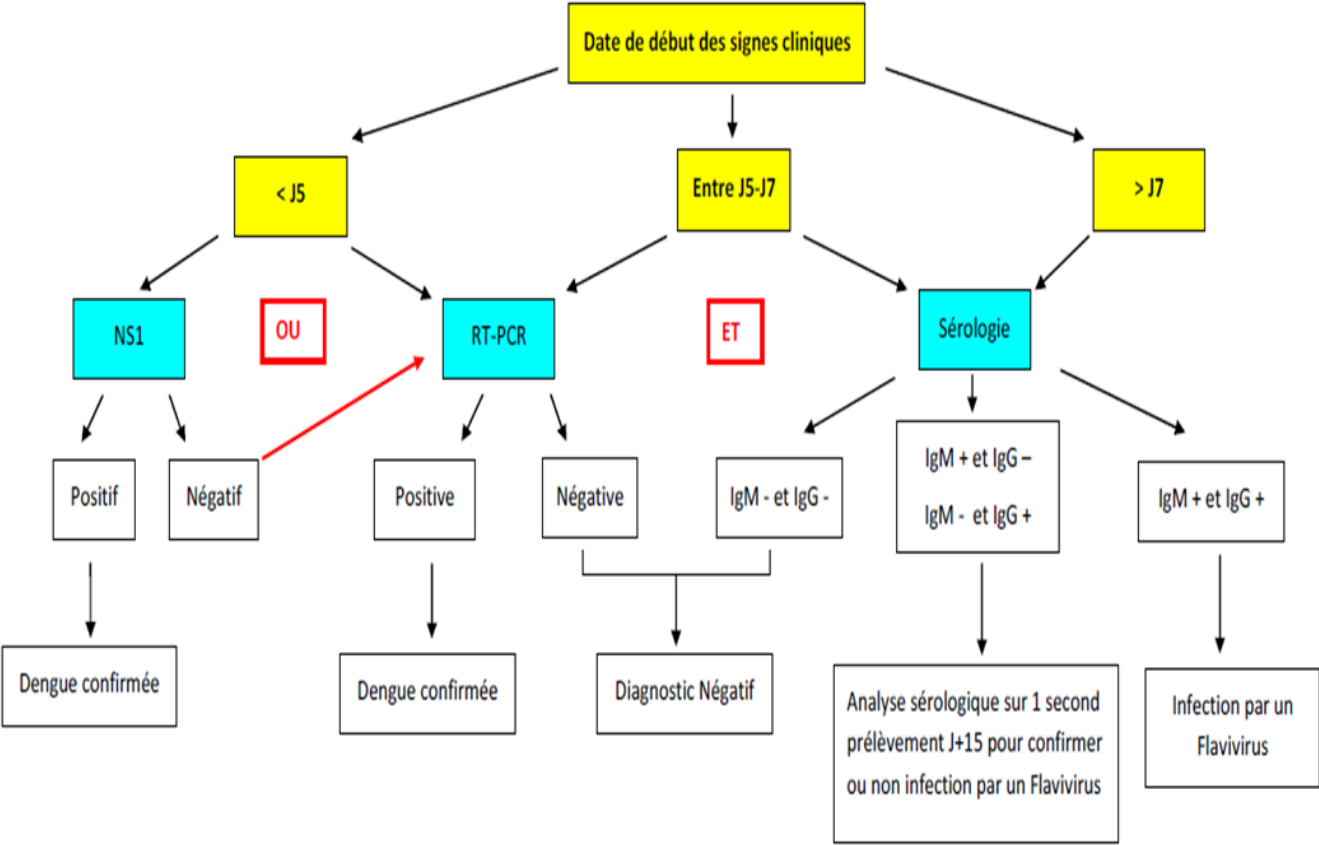


Figure 35. Fiche de validation de la méthode de détection de l'Ag NS1 de la dengue

*Note : le laboratoire se réfèrera au tableau du § 9.1.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale***

<p>EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :</p> <p>Antigène NS1 de la dengue</p>

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Réactivité d'un anticorps monoclonal avec la protéine NS1 des virus de la dengue
Principe de la Mesure :	Technique immuno-enzymatique en une étape de type sandwich, en format microplaque, pour la détection qualitative ou semi-quantitative de l'antigène NS1 du virus de la dengue dans le sérum ou le plasma humain.
Méthode de mesure :	Les cupules des microplaques sont sensibilisées par des anticorps monoclonaux de souris AcM anti-protéine NS1. Les sérums à tester sont incubés en même temps que des anticorps AcM marqués à une peroxydase. Une réaction de type sandwich AcM marqué-AgNS1-AcM sur microplaque se produira. Après lavages, le substrat de la peroxydase sera ajouté produisant une couleur bleue. La solution acide d'arrêt de la réaction fera passer la coloration du bleu au jaune. La DO (densité optique) sera déterminée par un spectrophotomètre à 450/620nm. Le ratio DO échantillon/DO moyenne des calibrateurs permettra de donner un résultat positif, équivoque ou négatif.
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Sérum
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Tube sec avec ou sans gel séparateur
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation après coagulation spontanée 2200g, 10min
Unités :	Ratio
Intervalles de référence¹ :	<0,5 négatif ; ≥1 positif ; sinon équivoque
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui fiche technique code 881040
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Méthode manuelle : Pipette de précision
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Biorad® 72830 notice v 12/2008
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Calibrateur sérum albumine bovine avec antigène NS1
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	CO = DO moyenne des calibrateurs > 0,2 Ratio DO témoin positif /CO > 1,5 Ratio DO témoin négatif /CO < 0,4

¹ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MISE EN ŒUVRE	
Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Technicienne référent du poste de sérologie microbiologie
Procédure de validation :	Quantitative
Procédure de gestion de la portée flexible :	Portée A
Période d'évaluation :	Juillet 2014 - septembre 2015
Date de mise en service :	Année 2008 (commercialisation)
Autorisation de mise en service par :	Chef de service

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sérum tube sec Quantité suffisante	Catalogue des analyses consultables sur le site intranet par les préleveurs Vérification à la réception
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Centrifugation à 2200g pendant 10min, après coagulation spontanée, décantation dans les 4h, aliquotage et conservation à -80°C Poolage puis dilution du pool au 1/100 dans du sérum de veau fœtal	Programme de centrifugation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.		Habilitation au poste de sérologie niveau 1 incluant les sérologies dengue et l'AgNS1 étendue à 4 techniciennes
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Température ambiante entre 20 et 28°C	Surveillance centralisée par le service biomédical
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Platelia TM Dengue NS1 Ag Biorad Ref 72830 V 12/2008	Vérification de la date de péremption et de la date limite d'utilisation après ouverture CIQ pool de sérum Un niveau dans la zone positif faible
Matériau de référence :	Aucun	NA
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Pipettes 50µL et 100µL Spectrophotomètre	Vérification annuelle Calibration

* item à renseigner si nécessaire

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :

Répétabilité:

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)	Conclusion ⁴
Echantillon Positif faible	30	1,28	0,18	14	6,2*	NA	Non conforme

*CV niveau faible positif de moyenne 1,32

Conclusions : CIQ non conforme aux données fournisseurs. Ces résultats sont à mettre en relation avec le type de technique (semi-quantitative). Toutes les valeurs de répétabilité restent dans la zone des positifs faibles, ce qui nous permet de valider ce CIQ.

Fidélité intermédiaire :

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ³)	Conclusion ⁴
Echantillon Positif faible	25	1,54	0,32	20,8	17,8*	NA	Conforme

*CV niveau faible positif de moyenne 1,17

Conclusions : Conforme aux données fournisseurs

Justesse (approche de la) :

Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo ²	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ³	Conclusion ⁴
Echantillon CIQ niveau 1	NA							
Echantillon CIQ niveau 2	NA							

Conclusions : Impossible à l'heure actuelle, dans l'attente d'un CIQ externalisé avec le laboratoire de l'Institut Pasteur de Cayenne.

² Nombre de chiffres significatifs

³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁴ Conforme/non conforme

Exactitude :Cas des contrôles externes ponctuels

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo ⁵	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ⁶	Conclusion
Echantillon CQN								
Echantillon ponct xy								
Echantillon ponct zy								

Conclusions :**INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :**

Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	
Interprétation :	

Conclusions :**COMPARAISON DE METHODES :**

Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	
Nombre de mesures :	
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	
Equation de la droite de régression :	
Diagramme des différences et/ou des rapports :	
Conclusions et dispositions ⁷ :	

⁵ Nombre de chiffres significatifs

⁶ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

⁷ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

**INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B)
(si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :**

Mode de détermination :	
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	
Limite supérieure de linéarité :	

INTERFERENCES

(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :

Vérification bibliographique :	
Vérification :	

CONTAMINATION

(indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG) :	
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides) :	
Vérification bibliographique :	
Vérification :	

Commentaires éventuels :

Figure 36. Fiche de validation de la méthode de détection des anticorps IgM de la dengue

*Note : le laboratoire se référera au tableau du § 9.1.1 du Document Cofrac SH GTA 04 pour connaître les paramètres à déterminer dans le cadre d'une vérification sur site (portée A) ou d'une validation (portée B) et complètera **une fiche par examen de biologie médicale***

<p>EXAMEN DE BIOLOGIE MEDICALE :</p> <p>Anticorps IgM Dengue</p>
--

DESCRIPTION DE LA METHODE	
Analyte/Mesurande :	Réactivité d'un pool concentré d'antigènes de la dengue avec les anticorps IgM spécifique de la dengue
Principe de la Mesure :	Technique immuno-enzymatique ELISA de type capture, pour la détection qualitative des anticorps IgM dirigés contre l'antigène de la dengue dans le sérum.
Méthode de mesure :	Les anticorps IgM spécifiques de la dengue, s'ils sont présents dans le sérum, se fixent sur les IgM anti-humains fixés à la surface en polystyrène des bandelettes de test des micropuits. Un pool concentré d'antigènes de la dengue des sérogroupes 1 à 4, mélangé à volume égal avec des anticorps monoclonaux conjugués à de la HRP (complexes antigènes-anticorps monoclonaux) est ensuite ajouté à la plaque d'analyse. Après lavages, l'ajout du substrat produira une couleur bleue, puis jaune après ajout de la solution acide d'arrêt. La DO (densité optique) sera déterminée par un spectrophotomètre à 450/620nm. La valeur index, égale au ratio DO échantillon/valeur seuil, donnera un résultat positif, équivoque ou négatif
Type d'échantillon primaire (urine, sang, ...) :	Sérum
Type de récipient, Additifs (tubes, ...) :	Tube sec avec ou sans gel séparateur
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Coagulation à température ambiante (20-25°C) puis centrifugation 2500tr/10min, et décantation dès que possible
Unités :	Valeur d'index ou unités Panbio
Intervalles de référence⁸ :	<0,9 négatif ; >1,1 positif ; sinon Equivoque
Marquage CE (Oui/Non) :	Oui
Codage C.N.Q. (s'il existe) :	NA
Instrument (analyseur automatique, etc.) :	Méthode manuelle : pipette de précision
Référence du réactif (référence fournisseur, version notice) :	Panbio® Cat.No. 01PE20/01PE21 Rev.1 2013/12
Matériau d'étalonnage (références)/ Raccordement métrologique :	Calibrateur sérum humain
Type d'étalonnage, nombre de niveaux et valeurs :	Valeur seuil = Absorbance moyenne du calibrateur x facteur d'étalonnage (propre à chaque lot) Valeur d'index = absorbance de l'échantillon / valeur seuil Unités Panbio = valeur d'index x 10

⁸ Indiquer les valeurs de référence si différentes en fonction de l'anticoagulant. Tenir compte du sexe, âge...

MISE EN ŒUVRE

Opérateur(s) habilité(s) ayant réalisé la vérification de méthode :	Technicienne référent du poste de sérologie microbiologie
Procédure de validation :	Quantitative (Semi-quantitative)
Procédure de gestion de la portée flexible :	Portée A
Période d'évaluation :	Juillet 2014 - Septembre 2015
Date de mise en service :	
Autorisation de mise en service par :	Chef de service

MAITRISE DES RISQUES		
Données d'entrée	Points critiques à maîtriser	Modalités de maîtrise
Type d'échantillon primaire (urine, sang, Type de récipient (tubes, ...), Additifs :	Sérum Tube sec avec ou sans gel séparateur Quantité suffisante	Catalogue des analyses consultables sur le site intranet par les préleveurs Vérification à la réception
Prétraitement de l'échantillon (centrifugation, dilution, ...) :	Coagulation à T°C ambiante Centrifugation 2500tr/10min Décantation puis pooling Dilution au dans du sérum de veau foetal Dilution au 1/100 dans du diluant échantillon	Programme de centrifugation
Main d'œuvre (habilitation du personnel) : Préciser les références des procédures et enregistrements.	Formulaire d'habilitation FO/PBIO/0099/01/2012	Habilitation au poste de sérologie niveau 1 incluant les sérologies dengue et l'AgNS1 étendue à 4 techniciennes
Conditions ambiantes requises (ex : Température, organisation des locaux, éclairage,...) :	Température ambiante entre 20 et 25°C	Vérification quotidienne
Référence du réactif (référence fournisseur, version) :	Panbio Dengue IgM Capture ELISA Cat. No. 01PE20/01PE21 Rev.1 2013/12	Vérification de la date de péremption et de la date limite d'utilisation après ouverture CIQ pool de sérum Un niveau dans la zone positif faible
Matériau de référence :	Aucun	NA
Equipements : Exigences métrologiques* (définir les paramètres critiques) Exigences informatiques* spécifiques	Pipettes 50µL et 1000µL Spectrophotomètre	Vérification annuelle Calibration

* item à renseigner si nécessaire

EVALUATION DES PERFORMANCES DE LA METHODE

Préciser le type et référence d'échantillon (échantillon contrôle, pool de sérum, ...) :

Répétabilité:

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ⁹	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur	CV (%) limite (hors fournisseurs ¹⁰)	Conclusion ¹¹
Echantillon positif faible	28	2,11	0,09	4	4,3*	NA	Conforme

*CV pour un échantillon positif de moyenne 2,87

Conclusions : Conforme aux données fournisseurs

Fidélité intermédiaire :

Echantillons	Nombre (N)	Moyenne ²	Ecart-type	CV (%)	CV (%) fournisseur		CV (%) limite (hors fournisseurs ³)	Conclusion ⁴
					Inter-jours	Inter-lots		
Echantillon positif faible	19	1,93	0,26	13,8*	Inter-jours	Inter-lots	NA	Conforme
					1,9/1,7**	5,4/21,6**		

*CV moyen (inter-jours et inter-lots)

**CV pour un échantillon positif de moyenne 1,33/2,87

Conclusions : Conforme aux données fournisseurs

Justesse (approche de la) :

Cas des contrôles internes externalisés

Echantillons	Nombre (N)	Valeurs Labo ²	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ³	Conclusion ⁴
Echantillon CIQ niveau 1	NA							
Echantillon CIQ niveau 2	NA							

Conclusions :

⁹ Nombre de chiffres significatifs

¹⁰ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

¹¹ Conforme/non conforme

Exactitude :Cas des contrôles externes ponctuels

Echantillons	Nombre (N)	Valeur Labo ¹²	Cible (groupe de pairs)	Moyenne générale (toutes techniques)	Biais (%) /groupe de pairs	Biais (%) /moyenne générale	Biais (%) limite ¹³	Conclusion
Echantillon CQN								
Echantillon ponct xy								
Echantillon ponct zy								

Conclusions :

INCERTITUDES (niveaux, choix du mode de calcul, interprétation) :	
Mode de calcul (cf. SH GTA 14) :	
Quantification de l'incertitude (niveau 1) :	
Quantification de l'incertitude (niveau 2) :	
Interprétation :	

Conclusions :

COMPARAISON DE METHODES :	
Données bibliographiques (fournisseurs, publications,...) :	
Méthode précédente, autre méthode utilisée dans le laboratoire, appareil en miroir ou EBMD :	
Nombre de mesures :	
Intervalle de comparaison adaptée à l'activité du laboratoire :	
Méthode d'exploitation des résultats :	
Equation de la droite de régression :	
Diagramme des différences et/ou des rapports :	
Conclusions et dispositions ¹⁴ :	

¹² Nombre de chiffres significatifs

¹³ Sociétés savantes, publications (SFBC, GEHT, RICOS, QUALAB, CLIA...). Préciser la référence utilisée.

¹⁴ Le laboratoire précise les dispositions mises en œuvre (par exemple : utilisation **transitoire et documentée** d'un facteur de correction).

INTERVALLE DE MESURE (indispensable en portée B)
(si possible et pertinent, ex : troponine, micro albumine, plaquettes, PSA, TSH) :

Mode de détermination :	
Limite inférieure de linéarité (de quantification)/ Profil de fidélité :	
Limite supérieure de linéarité :	

INTERFERENCES

(ex : Hémolyse, turbidité, bilirubine, médicaments - à prendre en compte dans les facteurs de variabilité - à évaluer si nécessaire) :

Vérification bibliographique :	
Vérification :	

CONTAMINATION

(indispensable en portée B et pour les paramètres sensibles en portée A)

Inter échantillon pour les paramètres sensibles (par exemple Ag HBS, β HCG) :	
Inter réactif si nécessaire (par exemple : LDH et ALAT, cholestérol et phosphate, lipase et triglycérides) :	
Vérification bibliographique :	
Vérification :	

Commentaires éventuels :

VI – REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. OMS. Dengue et dengue hémorragique [Internet]. WHO. 2014. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/>
2. Cassadou, Gustave, Fauré, Chaud, Yébakima. Programme de surveillance, d'alerte et de gestion des épidémies de dengue en Guadeloupe continentale et îles proches. Institut de veille sanitaire. 2007.
3. Musso V-MC-L. Diagnostic biologique de la dengue. Rev Francoph Lab. 2012;2012(447):53-62.
4. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. Emerg Infect Dis. juin 1995;1(2):55-7.
5. Sabin AB. Research on Dengue during World War II. Am J Trop Med Hyg. 1 janv 1952;1(1):30-50.
6. Hammon WM, Rudnick A, Sather GE. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. Science. 15 avr 1960;131(3407):1102-3.
7. Gubler DJ. COMMENTARY: Ashburn PM, Craig CF. Experimental Investigations Regarding the Etiology of Dengue. J Infect Dis 1907; 4:440–75. J Infect Dis. 5 janv 2004;189(9):1744-83.
8. Morens DM, Venkateshan CN, Halstead SB. Dengue 4 virus monoclonal antibodies identify epitopes that mediate immune infection enhancement of dengue 2 viruses. J Gen Virol. janv 1987;68 (Pt 1):91-8.
9. Meltzer MI, Rigau-Pérez JG, Clark GG, Reiter P, Gubler DJ. Using disability-adjusted life years to assess the economic impact of dengue in Puerto Rico: 1984-1994. Am J Trop Med Hyg. août 1998;59(2):265-71.
10. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. World Health Stat Q Rapp Trimest Stat Sanit Mond. 1997;50(3-4):161-9.

11. Cire Antilles Guyane. Spécial dengue aux Antilles : bilan des épidémies de 2010. 2011.
12. InVS. Dengue : les contextes épidémiologiques [Internet]. 2011. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Dengue/Les-contextes-epidemiologiques>
13. InVS. Chikungunya et dengue - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2014 [Internet]. 2014. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Chikungunya/Donnees-epidemiologiques/France-metropolitaine/Chikungunya-et-dengue-Donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-France-metropolitaine-en-2014>
14. InVS. Bilan épidémiologique Dengue Monde [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.gesundes-reisen.eu/datei?id=1052>
15. ICTV Virus Taxonomy [Internet]. 2012. Disponible sur: <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2012>
16. Modifié de Roby JA, Pijlman GP, Wilusz J, Khromykh AA. Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA: Multiple Functions in West Nile Virus Pathogenesis and Modulation of Host Responses. *Viruses*. 27 janv 2014;6(2):404-27.
17. Chippaux A. Généralités sur arbovirus et arboviroses. *Médecine Mal Infect*. 2003;33(8):377-84.
18. Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, et al. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*. 8 mars 2002;108(5):717-25.
19. Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, et al. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 28 mars 2008;319(5871):1830-4.
20. Marianneau P. La dengue. *Virologie*. 19 juin 1998;2(3):199-204.

21. Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nat Rev Microbiol.* juill 2007;5(7):518-28.
22. Wengler G, Czaya G, Färber PM, Hegemann JH. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids. *J Gen Virol.* avr 1991;72 (Pt 4):851-8.
23. Kuo MD, Chin C, Hsu SL, Shiao JY, Wang TM, Lin JH. Characterization of the NTPase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *J Gen Virol.* sept 1996;77 (Pt 9):2077-84.
24. Tan BH, Fu J, Sugrue RJ, Yap EH, Chan YC, Tan YH. Recombinant dengue type 1 virus NS5 protein expressed in *Escherichia coli* exhibits RNA-dependent RNA polymerase activity. *Virology.* 15 févr 1996;216(2):317-25.
25. Kurosu T, Chaichana P, Yamate M, Anantapreecha S, Ikuta K. Secreted complement regulatory protein clusterin interacts with dengue virus nonstructural protein 1. *Biochem Biophys Res Commun.* 3 nov 2007;362(4):1051-6.
26. Avirutnan P, Punyadee N, Noisakran S, Komoltri C, Thiemmecca S, Auethavornanan K, et al. Vascular leakage in severe dengue virus infections: a potential role for the nonstructural viral protein NS1 and complement. *J Infect Dis.* 15 avr 2006;193(8):1078-88.
27. Chung KM, Liszewski MK, Nybakken G, Davis AE, Townsend RR, Fremont DH, et al. West Nile virus nonstructural protein NS1 inhibits complement activation by binding the regulatory protein factor H. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12 déc 2006;103(50):19111-6.
28. Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, et al. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med.* 12 avr 2010;207(4):793-806.

29. Halstead SB, O'Rourke EJ, Allison AC. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. II. Identity of blood and tissue leukocytes supporting in vitro infection. *J Exp Med.* 7 janv 1977;146(1):218-29.
30. Navarro-Sanchez E, Altmeyer R, Amara A, Schwartz O, Fieschi F, Virelizier J-L, et al. Dendritic-cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin is essential for the productive infection of human dendritic cells by mosquito-cell-derived dengue viruses. *EMBO Rep.* 1 juill 2003;4(7):723-8.
31. Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids.* nov 2011;41(5):1159-63.
32. Adapté de Samuel CE. Host genetic variability and West Nile virus susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 sept 2002;99(18):11555-7.
33. Parida M, Horioke K, Ishida H, Dash PK, Saxena P, Jana AM, et al. Rapid detection and differentiation of dengue virus serotypes by a real-time reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay. *J Clin Microbiol.* juin 2005;43(6):2895-903.
34. Rodhain F. [The situation of dengue in the world]. *Bull Société Pathol Exot* 1990. 1996;89(2):87-90.
35. Huang J-H, Liao T-L, Chang S-F, Su C-L, Chien L-J, Kuo Y-C, et al. Laboratory-based Dengue Surveillance in Taiwan, 2005: A Molecular Epidemiologic Study. *Am J Trop Med Hyg.* 11 janv 2007;77(5):903-9.
36. Bancroft TL. On the aetiology of dengue fever. 1906;25:17-8.
37. Cleland JB, Bradley B. Dengue Fever in Australia. *J Hyg (Lond).* janv 1918;16(4):317-418.
38. Rogers DJ, Wilson AJ, Hay SI, Graham AJ. The global distribution of yellow fever and dengue. *Adv Parasitol.* 2006;62:181-220.
39. Guillaumot L. Les moustiques et la dengue [internet]. 2005. Disponible sur : <http://www.endemia.nc/pub/Moustiques.pdf>

40. Gathany J. Details - Public Health Image Library (PHIL) [Internet]. 2006. Disponible sur: http://phil.cdc.gov/phil/details_linked.asp?pid=9261
41. Ménard B. Évolutions et expansion géographique de la dengue. Cah Détudes Rech Francoph Santé. 1 avr 2003;13(2):89-94.
42. Bourbonnais. Les moustiques [internet]. 2013. Disponible sur : http://www.cegep-ste-foy.qc.ca/profs/gbourbonnais/entomo/11_moustique.pdf (Cégep de Sainte-Foy)
43. INPES Guyane. Dossier questions-réponses sur la dengue en Guyane établi par l'INPES, Document validé par la DGS, l'AFSSAPS, le SDD et la DSDS de la Guyane. 2006.
44. Aubert Marine. Illustration pour l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie [Internet]. 2012. Disponible sur: http://www.hygiene-publique.gov.pf/IMG/pdf/memo_FR_version_compressée.pdf
45. Feraudet A. Aedes albopictus : actualités. Université de Paris-Sud. Faculté de pharmacie (Châtenay-Malabry, Hauts-de-Seine); 2013.
46. Direction Générale de la Santé. Surveillance du moustique exotique Aedes albopictus en France métropolitaine [Internet]. 2013. Disponible sur: <http://www.ars.aquitaine.sante.fr>
47. Centers for Disease Control and Prevention. 2012. Disponible sur: <http://www.cdc.gov/dengue/resources/30Jan2012/comparisondenguevectors.pdf>
48. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Global Transport Networks and Infectious Disease Spread. Adv Parasitol. 2006;62:293-343.
49. Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific (Diptera, Culicidae). Univ Calif Press Berkeley Los Angel Calif. 1962;1:608.
50. Rodhain F, Rosen L. Mosquito vectors and dengue virus-vector relationships. Gubler DJ Kuno G Ed Dengue Dengue Haemorrhagic Fever N Y CAB Int. 1997;45-60.

51. Black WC, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barillas-Mury CV, Fernández-Salas I, de Lourdes Muñoz M, et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch Med Res.* août 2002;33(4):379-88.
52. Woodring JL, Higgs S, Beaty BJ. Natural cycles of vector-borne pathogens. 1996;51-72.
53. Rosen L, Roseboom LE, Gubler DJ, Lien JC, Chaniotis BN. Comparative susceptibility of mosquito species and strains to oral and parenteral infection with dengue and Japanese encephalitis viruses. *Am J Trop Med Hyg.* mai 1985;34(3):603-15.
54. Khin MM, Than KA. Transovarial transmission of dengue 2 virus by *Aedes aegypti* in nature. *Am J Trop Med Hyg.* mai 1983;32(3):590-4.
55. Hull B, Tikasingh E, de Souza M, Martinez R. Natural transovarial transmission of dengue 4 virus in *Aedes aegypti* in Trinidad. *Am J Trop Med Hyg.* nov 1984;33(6):1248-50.
56. Joshi V, Singhi M, Chaudhary RC. Transovarial transmission of dengue 3 virus by *Aedes aegypti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* déc 1996;90(6):643-4.
57. Shroyer DA. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc.* juin 1990;6(2):312-4.
58. Joshi V, Mourya DT, Sharma RC. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* août 2002;67(2):158-61.
59. Vazeille M, Mousson L, Rakatoarivony I, Villeret R, Rodhain F, Duchemin JB, et al. Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am J Trop Med Hyg.* nov 2001;65(5):491-7.
60. Rosen L, Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg.* nov 1974;23(6):1153-60.

61. Halstead SB. Dengue virus-mosquito interactions. *Annu Rev Entomol.* 2008;53:273-91.
62. Chen LH, Wilson ME. Nosocomial Dengue by Mucocutaneous Transmission. *Emerg Infect Dis.* mai 2005;11(5):775.
63. Basurko C, Carles G, Youssef M, Guindi WEL. Maternal and fetal consequences of dengue fever during pregnancy. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* nov 2009;147(1):29-32.
64. Barthel A, Gourinat A-C, Cazorla C, Joubert C, Dupont-Rouzeyrol M, Descloux E. Breast milk as a possible route of vertical transmission of dengue virus? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* août 2013;57(3):415-7.
65. Lavergne A, Lacoste V, Germain A, Matheus S, Dussart P, Deparis X, et al. [Dengue virus infection in neotropical forest mammals: incidental hosts or potential reservoirs?]. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon.* août 2009;69(4):345-50.
66. World Health Organization. WHO | Dengue and severe dengue [Internet]. WHO. 2014. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
67. Ledrans M, Blateau A, Bousser V, Cassadou S, Chappert J, Larrieu S, et al. Description des épidémies de dengue en Guadeloupe et en Martinique survenues en 2009-2010 : éléments disponibles en septembre 2010. 2010.
68. Cire Antilles Guyane. Le point épidémio : surveillance de la dengue - Bulletin du 17 février au 9 mars 2014. 2014.
69. Gharbi M, Quenel P, Gustave J, Cassadou S, La Ruche G, Girdary L, et al. Time series analysis of dengue incidence in Guadeloupe, French West Indies: forecasting models using climate variables as predictors. *BMC Infect Dis.* 2011;11:166.
70. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Curr Opin Infect Dis.* oct 2006;19(5):429-36.

71. Schmidt AC. Response to dengue fever--the good, the bad, and the ugly? *N Engl J Med.* 29 juill 2010;363(5):484-7.
72. Vincent D. Utilisation de proteines d'enveloppe recombinantes pour le diagnostic du virus de la dengue. WO1999009414 A1, 1999.
73. Beltramello M, Williams KL, Simmons CP, Macagno A, Simonelli L, Quyen NTH, et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. *Cell Host Microbe.* 16 sept 2010;8(3):271-83.
74. Chastel C. Réflexions sur deux viroses d'actualité : la fièvre jaune et la dengue. *Ann Biol Clin (Paris).* 12 sept 1997;55(5):415-24.
75. Moreno-Altamirano MMB, Sánchez-García FJ, Muñoz ML. Non Fc receptor-mediated infection of human macrophages by dengue virus serotype 2. *J Gen Virol.* mai 2002;83(Pt 5):1123-30.
76. Halstead SB, Mahalingam S, Marovich MA, Ubol S, Mosser DM. Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. *Lancet Infect Dis.* oct 2010;10(10):712-22.
77. Deparis X, Maréchal V, Matheus S. [Pathophysiological mechanisms of dengue fever: critical review of current concepts]. *Médecine Trop Rev Corps Santé Colon.* août 2009;69(4):351-7.
78. Alen MMF, De Burghgraeve T, Kaptein SJF, Balzarini J, Neyts J, Schols D. Broad Antiviral Activity of Carbohydrate-Binding Agents against the Four Serotypes of Dengue Virus in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *PLoS ONE.* 30 juin 2011;6(6):e21658.
79. Borgherini. Conduite à tenir en cas de patient suspect de dengue. 2012; Service de Maladies infectieuses - CHU Saint Pierre.
80. Rico-Hesse R. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* févr 1990;174(2):479-93.

81. Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba?
1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):816-20.
82. Deparis, Murgue, Roche, Cassar, Chungue. Changing clinical and biological manifestations of dengue during the dengue-2 epidemic in French Polynesia in 1996/97 – description and analysis in a prospective study. *Trop Med Int Health.* 1 nov 1998;3(11):859-65.
83. Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, et al. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis.* août 1997;176(2):313-21.
84. Blanchon C. Dengue et leptospirose en Nouvelle-Calédonie : recherche de facteurs discriminatifs à l'admission. Paris, Université Paris VII - Denis Diderot; 2000.
85. Laur F, Murgue B, Deparis X, Roche C, Cassar O, Chungue E. Plasma levels of tumour necrosis factor alpha and transforming growth factor beta-1 in children with dengue 2 virus infection in French Polynesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* déc 1998;92(6):654-6.
86. Murgue B, Cassar O, Deparis X. Plasma concentrations of sVCAM-1 and severity of dengue infections. *J Med Virol.* sept 2001;65(1):97-104.
87. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol.* déc 2010;8(12 Suppl):S7-16.
88. OMS. Guide pour la prise en charge clinique de la dengue [Internet]. 2013. Disponible sur: www.who.int
89. Crouzat maryse, Chef de service de dermatologie, CHT G. Bourret, Nouvelle Calédonie. Photo : Eruption cutanée caractéristique touchant le dos.
90. Cire Antilles Guyane. Dengue aux Antilles : retour d'expérience pour le diagnostic, la surveillance épidémiologique et la prise en charge des cas (Bulletin de veille sanitaire N°6-7) [Internet]. 2013. Disponible sur:

<http://www.cnev.fr/index.php/32-uncategorised/1526-dengue-aux-antilles--retour-dexperience-pour-le-diagnostic-la-surveillance-epidemiologique-et-la-prise-en-charge-des-cas>

91. World Health Organization. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. World Health Organization; 2009. 159 p.
92. Cabié A, Strobel M. Chapitre 8 : Le rôle de la recherche dans la prise en charge de la dengue : La recherche sur les mécanismes physiopathologiques des formes sévères de la dengue peut-elle améliorer la prise en charge de la maladie ? In: Corriveau R, Philippon B, Yébakima A, éditeurs. La dengue dans les départements français d'Amérique : Comment optimiser la lutte contre cette maladie ? [Internet]. Montpellier: IRD Éditions; 2013. p. 95-9. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/2719>
93. Guirakhoo F, Arroyo J, Pugachev KV, Miller C, Zhang ZX, Weltzin R, et al. Construction, safety, and immunogenicity in nonhuman primates of a chimeric yellow fever-dengue virus tetravalent vaccine. *J Virol.* août 2001;75(16):7290-304.
94. Villar L, Dayan GH, Arredondo-García JL, Rivera DM, Cunha R, Deseda C, et al. Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Children in Latin America. *N Engl J Med.* 8 janv 2015;372(2):113-23.
95. Capeding MR, Tran NH, Hadinegoro SRS, Ismail HIHM, Chotpitayasunondh T, Chua MN, et al. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet.* 10 juill 2014;
96. Guy B, Saville M, Lang J. Développement d'un vaccin tétravalent contre la dengue. *Virologie.* 1 sept 2010;14(5):311-21.
97. Hidayati H, Nazni WA, Lee HL, Sofian-Azirun M. Insecticide resistance development in *Aedes aegypti* upon selection pressure with malathion. *Trop Biomed.* août 2011;28(2):425-37.

98. Sulaiman S, Pawanchee ZA, Othman HF, Shaari N, Yahaya S, Wahab A, et al. Field evaluation of cypermethrin and cyfluthrin against dengue vectors in a housing estate in Malaysia. *J Vector Ecol J Soc Vector Ecol*. déc 2002;27(2):230-4.
99. Parreira R, Centeno-Lima S, Lopes A, Portugal-Calisto D, Constantino A, Nina J. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 2014;19(10).
100. Simon F, Javelle E, Oliver M, Leparc-Goffart I, Marimoutou C. Chikungunya virus infection. *Curr Infect Dis Rep*. juin 2011;13(3):218-28.
101. Staples JE, Breiman RF, Powers AM. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. *Clin Infect Dis*. 15 sept 2009;49(6):942-8.
102. Najjioullah F, Viron F, Paturel L, Césaire R. Diagnostic biologique de la dengue. *John Libbey - Virologie*. févr 2012;
103. WHO | Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2nd edition. Geneva : World Health Organization. [Internet]. WHO. Disponible sur:
<http://www.who.int/csr/resources/publications/dengue/Denguepublication/en/>
104. Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. *Bull World Health Organ*. 1985;63(2):279-86.
105. De Paula SO, Fonseca BAL da. Dengue: a review of the laboratory tests a clinician must know to achieve a correct diagnosis. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. déc 2004;8(6):390-8.
106. Oliveira De Paula S, Malta Lima D, Clotteau M, Pires Neto Rd R da J, Lopes da Fonseca BA. Improved detection of dengue-1 virus from IgM-positive serum samples using C6/36 cell cultures in association with RT-PCR. *Intervirol*. 2003;46(4):227-31.

107. Perret C, Abarca K, Ovalle J, Ferrer P, Godoy P, Olea A, et al. Dengue-1 virus isolation during first dengue fever outbreak on Easter Island, Chile. *Emerg Infect Dis.* nov 2003;9(11):1465-7.
108. Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* mars 1992;30(3):545-51.
109. Gonzalez J-P, Chaud P. Chapitre 7 : Optimisation de la lutte contre la fièvre dengue dans les DFA : Méthodes et outils de détection du virus et de surveillance de son activité. In: Corriveau R, Philippon B, Yébakima A, éditeurs. *La dengue dans les départements français d'Amérique : Comment optimiser la lutte contre cette maladie ?* [Internet]. Montpellier: IRD Éditions; 2013. p. 72-94. Disponible sur: <http://books.openedition.org/irdeditions/2718>
110. Ameziane N., Bogard M, Lamoril J. *Principes de biologie moléculaire en biologie clinique.* Elsevier,Paris; 2006.
111. Callahan JD, Wu SJ, Dion-Schultz A, Mangold BE, Peruski LF, Watts DM, et al. Development and evaluation of serotype- and group-specific fluorogenic reverse transcriptase PCR (TaqMan) assays for dengue virus. *J Clin Microbiol.* nov 2001;39(11):4119-24.
112. Ito M, Takasaki T, Yamada K-I, Nerome R, Tajima S, Kurane I. Development and Evaluation of Fluorogenic TaqMan Reverse Transcriptase PCR Assays for Detection of Dengue Virus Types 1 to 4. *J Clin Microbiol.* déc 2004;42(12):5935-7.
113. Chien L-J, Liao T-L, Shu P-Y, Huang J-H, Gubler DJ, Chang G-JJ. Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. *J Clin Microbiol.* avr 2006;44(4):1295-304.
114. Levi JE, Tateno AF, Machado AF, Ramalho DC, de Souza VAUF, Guilarde AO, et al. Evaluation of a commercial real-time PCR kit for detection of dengue virus in samples collected during an outbreak in Goiania, Central Brazil, in 2005. *J Clin Microbiol.* juin 2007;45(6):1893-7.

115. Thomas L, Verlaeten O, Cabié A, Kaidomar S, Moravie V, Martial J, et al. Influence of the dengue serotype, previous dengue infection, and plasma viral load on clinical presentation and outcome during a dengue-2 and dengue-4 co-epidemic. *Am J Trop Med Hyg.* juin 2008;78(6):990-8.
116. Sadon N, Delers A, Jarman RG, Klungthong C, Nisalak A, Gibbons RV, et al. A new quantitative RT-PCR method for sensitive detection of dengue virus in serum samples. *J Virol Methods.* oct 2008;153(1):1-6.
117. Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol.* oct 2005;43(10):4977-83.
118. Houg HS, Chung-Ming Chen R, Vaughn DW, Kanesa-athan N. Development of a fluorogenic RT-PCR system for quantitative identification of dengue virus serotypes 1-4 using conserved and serotype-specific 3' noncoding sequences. *J Virol Methods.* juin 2001;95(1-2):19-32.
119. Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. *J Clin Microbiol.* août 1999;37(8):2543-7.
120. Thai KTD, Phuong HL, Thanh Nga TT, Giao PT, Hung LQ, Van Nam N, et al. Clinical, epidemiological and virological features of Dengue virus infections in Vietnamese patients presenting to primary care facilities with acute undifferentiated fever. *J Infect.* mars 2010;60(3):229-37.
121. Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla AA, Poloni DF, et al. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. *Virol J.* 2010;7:22.
122. Matheus S, Chappert JL, Cassadou S, Berger F, Labeau B, Brémand L, et al. Surveillance virologique de la dengue en territoires insulaires via le recueil de sang sur papier buvard. 2013 juin; CNR Arbovirus.

123. Matheus S, Meynard J-B, Lacoste V, Morvan J, Deparis X. Use of Capillary Blood Samples as a New Approach for Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J Clin Microbiol.* mars 2007;45(3):887-90.
124. Matheus S, Meynard J-B, Lavergne A, Girod R, Moua D, Labeau B, et al. Dengue-3 outbreak in Paraguay: investigations using capillary blood samples on filter paper. *Am J Trop Med Hyg.* nov 2008;79(5):685-7.
125. Alcon S, Talarmin A, Debruyne M, Falconar A, Deubel V, Flamand M. Enzyme-linked immunosorbent assay specific to Dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J Clin Microbiol.* févr 2002;40(2):376-81.
126. Libraty DH, Young PR, Pickering D, Endy TP, Kalayanarooj S, Green S, et al. High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *J Infect Dis.* 15 oct 2002;186(8):1165-8.
127. Xu H, Di B, Pan Y, Qiu L, Wang Y, Hao W, et al. Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J Clin Microbiol.* août 2006;44(8):2872-8.
128. Young PR, Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *J Clin Microbiol.* mars 2000;38(3):1053-7.
129. TECHNIQUES IMMUNOLOGIQUES [Internet]. Disponible sur: <http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/lafont/dosages/D3.html>
130. HCSP. Stratégie de diagnostic biologique de la dengue. 2011.
131. Dussart P, Petit L, Labeau B, Bremand L, Leduc A, Moua D, et al. Evaluation of Two New Commercial Tests for the Diagnosis of Acute Dengue Virus Infection Using NS1 Antigen Detection in Human Serum. *PLoS Negl Trop Dis.* 20 août 2008;2(8):e280.

132. Ty Hang V, Minh Nguyet N, The Trung D, Tricou V, Yoksan S, Minh Dung N, et al. Diagnostic Accuracy of NS1 ELISA and Lateral Flow Rapid Tests for Dengue Sensitivity, Specificity and Relationship to Viraemia and Antibody Responses. *PLoS Negl Trop Dis.* 20 janv 2009;3(1):e360.
133. World Health Organization. WHO | Diagnostics Evaluation Series No. 3 [Internet]. WHO. 2009. Disponible sur: <http://www.who.int/tdr/publications/tdr-research-publications/diagnostics-evaluation-3/en/>
134. Dussart P, Labeau B, Lagathu G, Louis P, Nunes MRT, Rodrigues SG, et al. Evaluation of an enzyme immunoassay for detection of dengue virus NS1 antigen in human serum. *Clin Vaccine Immunol CVI.* nov 2006;13(11):1185-9.
135. Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, et al. Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(8).
136. Chen WJ, Hwang KP, Fang AH. Detection of IgM antibodies from cerebrospinal fluid and sera of dengue fever patients. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* déc 1991;22(4):659-63.
137. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol.* mai 1998;36(5):1189-92.
138. Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S, Suntayakorn S, et al. Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J Infect Dis.* août 1997;176(2):322-30.
139. Shu P-Y, Huang J-H. Current advances in dengue diagnosis. *Clin Diagn Lab Immunol.* juill 2004;11(4):642-50.
140. Modifié de Huraux J.-M., Nicolas J.-C., Agut H., Peigue-Lafeuille H. *Traité de virologie médicale.* Estem De Boeck Diffusion. Paris, France (UCL-bibliothèque de Médecine); 2003. 699 p.

141. Modifié de Overview of ELISA [Internet]. Disponible sur:
<http://www.piercenet.com/method/overview-elisa>
142. 77th XiaoBianTai's Medical Street: 14th Week of SIP -
Microbiology/Immunology [Internet]. 2007. Disponible sur:
<http://sevensseven77.blogspot.com/2007/09/14th-week-of-sip-microbiologyimmunology.html>
143. Takasaki T, Nawa M, Yamada KI, Harada M, Takeda A, Kurane I. Evaluation of dengue IgM detection tests using sera from patients with autoimmune diseases. *J Virol Methods*. avr 2002;102(1-2):61-6.
144. Talarmin A, Labeau B, Lelarge J, Sarthou JL. Immunoglobulin A-specific capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue fever. *J Clin Microbiol*. mai 1998;36(5):1189-92.
145. Balmaseda A, Guzmán MG, Hammond S, Robleto G, Flores C, Téllez Y, et al. Diagnosis of dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. *Clin Diagn Lab Immunol*. mars 2003;10(2):317-22.
146. Yap G, Sil BK, Ng L-C. Use of saliva for early dengue diagnosis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(5):e1046.
147. Koraka P, Murgue B, Deparis X, Setiati TE, Suharti C, van Gorp ECM, et al. Elevated levels of total and dengue virus-specific immunoglobulin E in patients with varying disease severity. *J Med Virol*. mai 2003;70(1):91-8.
148. Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, Kusalerdchariya S, Chongswasdi V, Suntayakorn S, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg*. avr 1989;40(4):418-27.
149. Matheus S, Deparis X, Labeau B, Lelarge J, Morvan J, Dussart P. Discrimination between Primary and Secondary Dengue Virus Infection by an Immunoglobulin G Avidity Test Using a Single Acute-Phase Serum Sample. *J Clin Microbiol*. juin 2005;43(6):2793-7.

150. DPROD/Dr AFK/Dr LR/BB. Biologie médicale Nomenclature des actes. Caisse Nationale de l'Assurance Maladie des Travailleurs Salariés; 2014.
151. HAS. Diagnostic biologique direct précoce de la dengue par détection génomique du virus avec RT-PCR. 2013.
152. Cofrac. Guide technique d'accréditation : contrôle de qualité en biologie médicale SH GTA 06 (Révision 00). 2012.
153. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. Med J Armed Forces India. janv 2015;71(1):67-70.

SUMMARY : Problematic diagnosis of dengue virus infection in endemo-epidemic zone (Guadeloupe) and elaboration of internal quality controls for AgNS1 and IgM tests.

Dengue virus, the most widespread arbovirolosis on earth, circulates in the Caribbean and in particular in Guadeloupe in an endemo-epidemic mode. Vectors for disease are *Aedes* mosquitoes among which, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* are the two most important. Clinical signs of dengue virus infection are often nonspecific and their clinical evolution is unpredictable. Usually mild, serious or even fatal forms may occur. Currently, the three diagnostic methods used are the detection of the viral genome using nucleic acids amplification technology (RT-PCR), detection of dengue virus specific antigens NS1 and indirect serological diagnosis. Using them together or individually depends on the clinical stage of the disease, the date of onset of clinical signs and the epidemiological context. There is no specific antiviral treatment or vaccine available at this time. Treatment is symptomatic.

Issuing reliable biological results for the dengue diagnosis requires implementing internal quality control (IQC). For that purpose, in the laboratory of virology of the teaching hospital of Pointe-à-Pitre, we have developed an in house CIQ for the NS1 antigen detection and a CIQ for dengue IgM serological detection from human sera. Three matrices have been used for dilutions : Phosphate-Buffered Saline, Fetal Bovine Serum and human serum. This study showed that the Fetal Bovine Serum presented more reliable results in terms of repeatability (Coefficient of variation CV 14 % for the AgNS1 and 4 % for the IgM anti-dengue) and of reproducibility (CV 20,8 % for the AgNS1 and 13,8 % for the IgM anti-dengue). Even if they seem rather high, these values of CV have to be linked with the type of techniques used and expectations of reproductibility (semi-quantitative methods for both studied parameters).

RESUME

Arbovirose la plus répandue sur la planète, la dengue circule dans la Caraïbe et notamment en Guadeloupe selon un mode endémo-épidémique. Les vecteurs de la maladie sont des moustiques du genre *Aedes*, les deux principaux étant *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Aucun signe clinique de la dengue n'est spécifique et son évolution est imprévisible. Généralement bénigne, des formes graves voire fatales peuvent survenir. Les trois méthodes diagnostiques utilisées en routine sont la détection du génome viral par biologie moléculaire (RT-PCR), la recherche de l'antigène NS1 et le diagnostic indirect sérologique. Leurs utilisations conjointes ou isolées dépendent du stade clinique de la maladie, de la date de début des signes cliniques et du contexte épidémiologique. Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique, ni de vaccin disponible à l'heure actuelle. Le traitement est symptomatique. La délivrance de résultats biologiques fiables lors d'un diagnostic de dengue nécessite l'élaboration de contrôles internes de la qualité (CIQ). Pour cela, nous avons mis en place au laboratoire de virologie du CHU de Pointe-à-pitre un CIQ pour la détection de l'antigène NS1 et un CIQ pour la détection sérologique des IgM de la dengue à partir de sérums humains. Trois matrices ont été utilisées pour effectuer les dilutions : le tampon phosphate salin, le sérum de veau fœtal et le sérum humain. Cette étude a montré que le sérum de veau fœtal présentait des résultats plus fiables en termes de répétabilité (Coefficient de variation CV de 14% pour l'AgNS1 et de 4% pour les IgM anti-dengue) et de reproductibilité (CV de 20,8% pour l'AgNS1 et de 13,8% pour les IgM anti-dengue). Ces valeurs de CV toutefois élevées sont à mettre en relation avec le type de technique utilisée et les attentes en matière de reproductibilité des interprétations (méthodes semi-quantitatives pour les deux paramètres étudiés).

DISCIPLINE administrative : PHARMACIE – BIOLOGIE MEDICALE

MOTS-CLES : VIRUS DE LA DENGUE – ARBOVIROSE – MOUSTIQUE – EPIDEMIE – DIAGNOSTIC VIROLOGIQUE – ANTIGENE NS1 – SEROLOGIE – CONTRÔLE INTERNE DE LA QUALITE

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :

UNIVERSITE BORDEAUX 2 SEGALEN, FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES
146 RUE LEO SAIGNAT 33076 BORDEAUX CEDEX

Directeur de thèse : Docteur Cécile HERRMANN-STORCK

