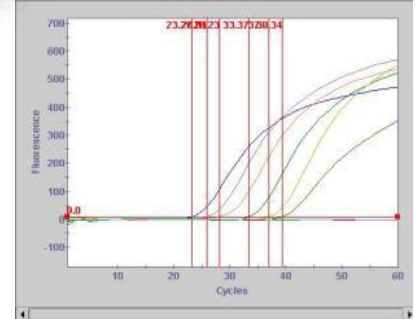
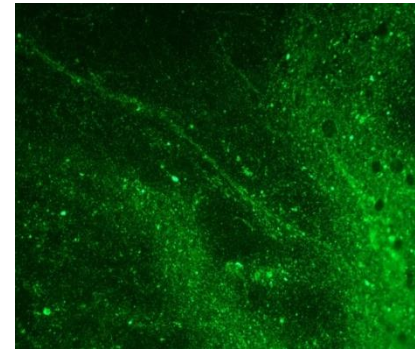


# Techniques/méthodes de diagnostic de la rage et surveillance chez l'animal



Dr Florence Cliquet



Nancy laboratory  
for rabies  
and wildlife



WHO Collaborating Centre  
for Research and Management  
in Zoonoses Control



OIE  
Reference Laboratory  
for Rabies



European Union  
Reference Laboratory  
for Rabies



European Union  
Reference Institute for  
Rabies Serology



National  
reference laboratory  
for rabies



Webinaire sur la rage en Afrique pour commémorer la Journée mondiale contre la rage 2020

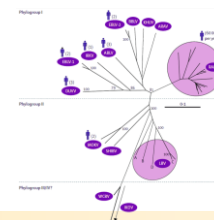
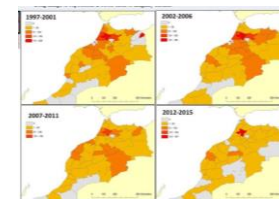
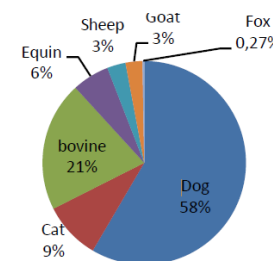
«Partager nos progrès sur l'élimination de la rage en Afrique»

23 Septembre 2020

# DE LA SURVEILLANCE AU CONTRÔLE DE LA RAGE

- Animal suspect de rage :
  - Animal à l'origine d'une morsure, griffure ou léchage sur peau abimée.
  - Animal ayant un comportement évocateur de la rage.
  - Animal trouvé mort.

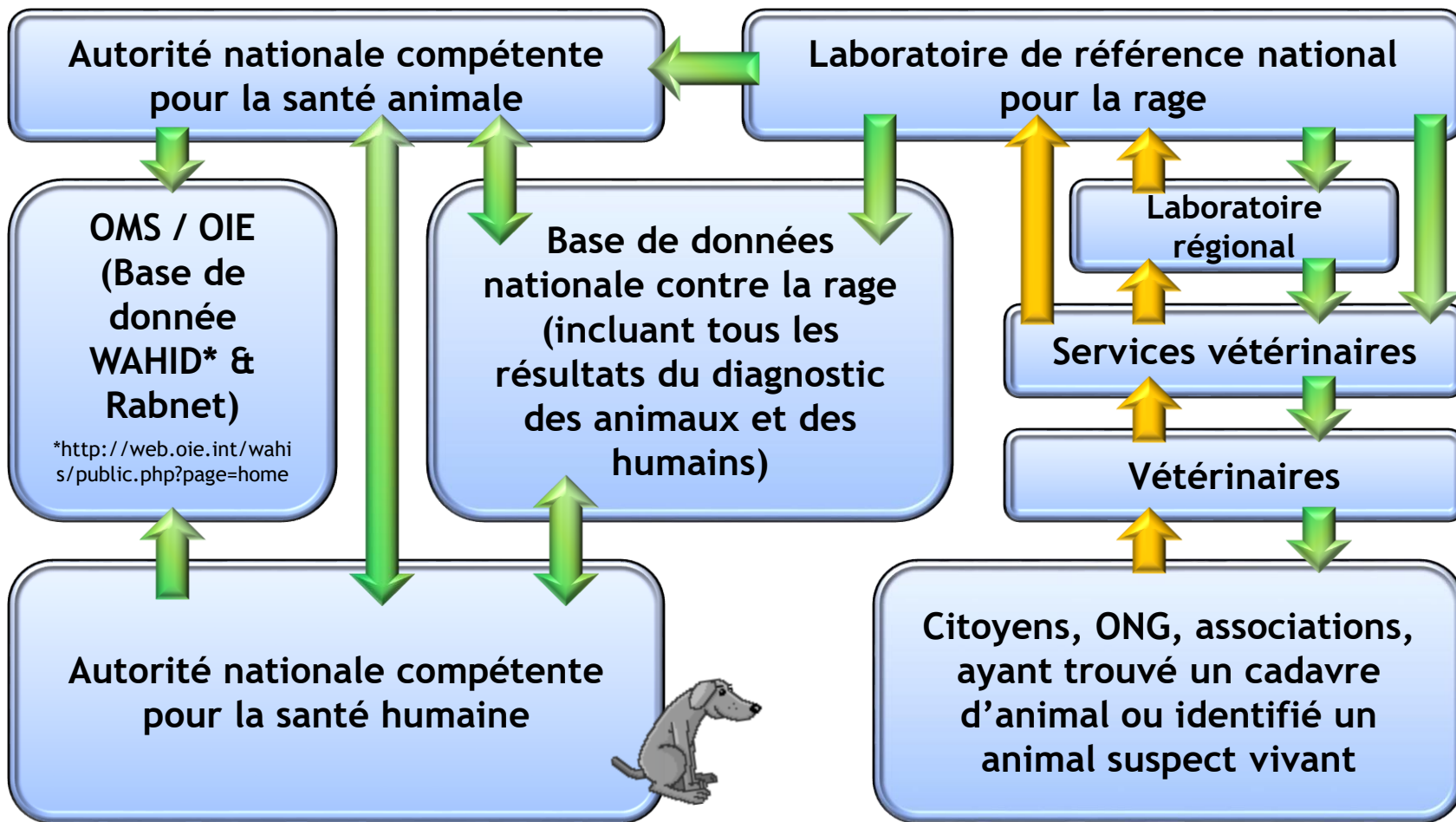
- Identifier les espèces touchées.
- Déterminer les zones où circulent le virus.
- Estimer le risque de transmission chez l'homme et l'animal.
- Etudier la diversité génétique des souches circulantes.



Mise en place des mesures de contrôle chez l'animal (vaccination de masse des chiens) et de prévention chez l'homme.

# EXEMPLE DE RÉSEAU DE SURVEILLANCE DE LA RAGE : DEUX PILIERS : LA POPULATION ET LE LABORATOIRE

UN TEL RÉSEAU DOIT AVOIR DES BASES LÉGALES (ARTICLE DE LOI)



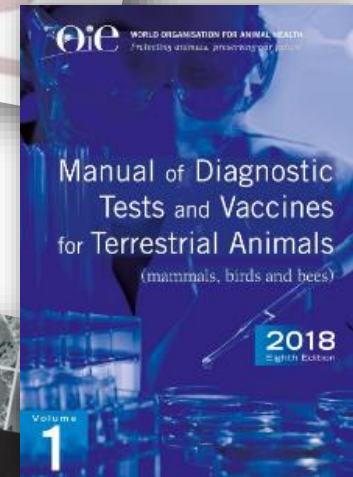
Légende

Envoi des résultats

Envoi des échantillons

# MÉTHODES DE DIAGNOSTIC DE RAGE : DOCUMENTS CLÉS

- Charles E. Rupprecht; Anthony R. Fooks; Bernadette Abela-Ridder, Laboratory techniques in rabies, Fifth edition, two volumes in 2018 (304 pages) and 2019 (202 pages), World Health Organization, Geneva.
- OIE, 2018, Manual of diagnostic tests and vaccines, Rabies (infection with rabies virus and other Lyssaviruses, Chapter 3.1.17. 35 pages.
- Rupprecht C, Nagarajan T., 2015, Current Laboratory Techniques in Rabies Diagnosis, Research and Prevention, 366 pages.



# METHODES DE DIAGNOSTIC RECOMMANDÉES PAR L'OIE (2018)

*Table 1. Test methods available for the diagnosis of rabies and their purpose*

Method	Purpose					
	Population freedom from infection	Individual animal freedom from infection prior to movement	Contribute to eradication policies	Confirmation of clinical cases	Prevalence of infection – surveillance	Immune status in individual animals or populations post-vaccination
<b>Agent identification</b>						
DFA (antigen detection)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
dRIT (antigen detection)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
ELISA (antigen detection)	+	n/a	+	+	+	n/a
Cell culture (virus isolation)	+	n/a	+++	+++	+++	n/a
MIT <sup>1</sup> (virus isolation)	n/a	n/a	+	+	+	n/a
Conventional RT-PCR (RNA detection)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a
Real-time RT-PCR (RNA detection)	+++	n/a	+++	+++	+++	n/a



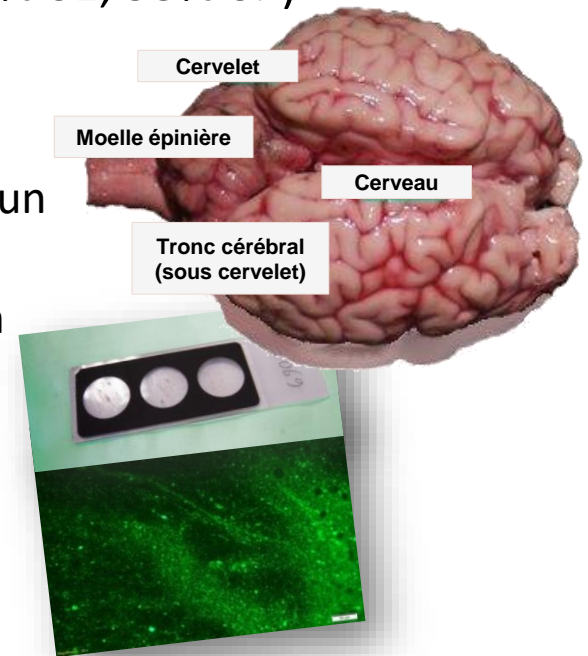
<sup>1</sup> “Once a validated and reliable cell culture unit exists in the laboratory, consideration should be given to replace the mouse inoculation test with cell culture whenever possible as it avoids the use of live animals, is less expensive and gives more rapid results”.

Source : OIE, 2018, Manual of standards for diagnostic tests and vaccines, Rabies (infection with rabies virus and other Lyssaviruses, Chapter 3.1.17. 35 pages.

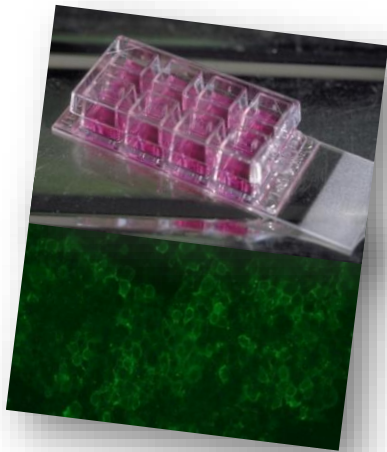
# LES MÉTHODES D'ISOLEMENT D'ANTIGÈNES OU DE PARTICULES VIRALES

## Le test d'immunofluorescence (FAT): gold standard (99% SE; 95% SP)

- Détecte les antigènes du virus à partir de tissu frais, congelé ou fixé.
- Basé sur la coloration d'une empreinte de cerveau avec un conjugué fluorescent.
- L'empreinte colorée et rincée dans un tampon est lue en lumière UV à l'aide d'un microscope équipé pour la fluorescence.



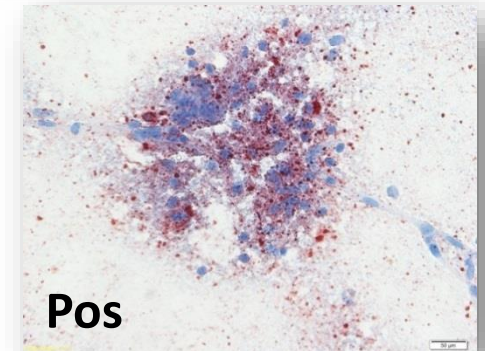
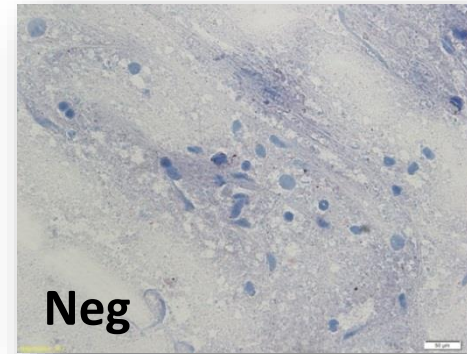
## Le test rapide d'inoculation aux cellules N2a (RTCIT) (96% SE; 97% SP)



- Détecte les particules virales infectieuses.
- De moins en moins utilisé, test de confirmation en particulier en cas de résultats douteux ou négatif au FAT, et pour les animaux mordeurs.
- Les cellules peuvent être détruites (bactéries, toxines) si le prélèvement est en mauvais état de conservation.
- Utilisé pour isoler le virus.

# LE DIRECT RAPID IMMUNOHISTOCHEMICAL TEST (DRIT)

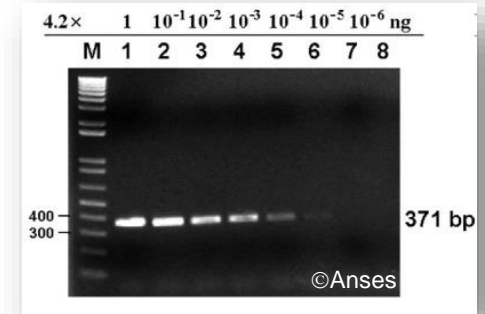
- Test développé au CDC dans les années 2000.
- Détecte les antigènes viraux avec une sensibilité et spécificité comparables à celles du FAT.
- Principe similaire à celui du FAT, sauf la coloration faite avec un conjugué biotine-streptavidine peroxydase. Les anticorps sont monoclonaux ou polyclonaux.
- Pas de microscope à fluorescence.
- Utilisé en routine en Amérique du Nord pour le diagnostic dans le cadre du suivi des programmes de vaccination orale.



- Ne nécessite pas d'équipement sophistiqué ; besoin d'obtenir le conjugué (pas commercialisé) et de formation.
- Peut être utile dans les laboratoires décentralisés (régionaux) pour permettre d'augmenter la pression de la surveillance.

# LES TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE : RT-PCR ET QPCR

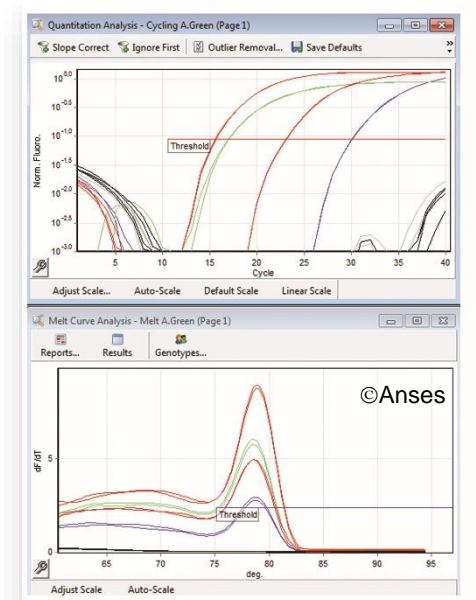
- Tests les plus utilisés après le FAT.
- Capables de détecter l'ARN viral même dans des échantillons dégradés. La RT-qPCR quantifie les ADN.
- Permettent d'identifier l'espèce virale (amorces spécifiques et séquençage).
- Très hautes sensibilité et spécificité.
- Beaucoup d'analyses en un temps court.
- Nombreux protocoles et équipements.



- Risques de contaminations croisées et de résultats faussement positifs:



- ✓ Organisation des laboratoires à penser (marche en avant, séparation des pièces, etc...),
- ✓ Assurance qualité.



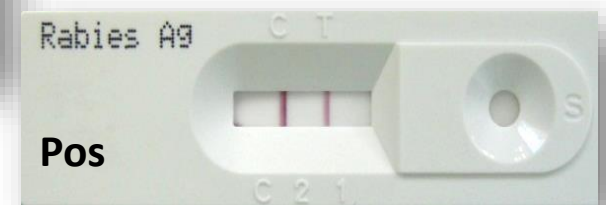
Ref : Crepin *et al.*, 1998; Dacheux *et al.*, 2008, 2010, 2016; Faye *et al.*, 2017; Hayman *et al.*, 2011; Hoffmann *et al.*, 2010; Mani *et al.*, 2014, 2016; Nadin-Davis *et al.*, 2009; Picard-Meyer *et al.*, 2004; Wacharapluesadee *et al.*, 2008; Wadhwa *et al.*, 2017; Wakeley *et al.*, 2006



# LES TESTS RAPIDES IMMUNOCHROMATOGRAPHIQUES (LFA/LFD)\*

- Développés dans les années 1960s. Le plus connu est le home test de grossesse.
- Adaptation à la rage peu après 2000.
- Détecte l'antigène du virus rabique (RABV seulement).
- Le résultat se lit à l'oeil nu en 5 à 20 min selon le test utilisé.
- Rapides, relativement peu chers.
- Pas besoin d'équipements particuliers et peuvent être utilisés sur le terrain facilement.

- Beaucoup de kits apparaissent sur le marché, certains pas bien validés : les laboratoires doivent absolument les valider avant leur utilisation.
- Certains kits sont hétérogènes en fonction des lots produits.
- Les kits sont validés en analysant des échantillons négatifs et positifs par le FAT en parallèle.
- Ne peuvent pas remplacer les techniques recommandées par l'OIE et l'OMS.
- Peuvent être utiles dans certaines pays (où les tests classiques ne peuvent être disponibles).



\* Non recommandés par l'OIE

Ref : Eggerbauer *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2007; Lechenne *et al.*, 2016; Nishizono *et al.*, 2008; Servat *et al.*, 2012; Voehl *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009.

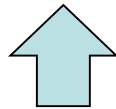
# CONFIRMATIONS DE CAS: INTERACTION ENTRE LNR ET LABORATOIRES RÉGIONAUX

Dans un même pays, tous les tests ne sont pas forcément maîtrisés par l'ensemble des laboratoires qui réalisent le diagnostic de rage.

Exemple

## Laboratoire National de Référence

Validation des cas négatifs par FAT et RT-PCR



Envoi de prélèvements

## Laboratoire regional de diagnostic

Collecte des échantillons sur le terrain testés par dRIT ou LFA/LFD

# POINTS CLÉS

## Quel que soit le statut du pays (libre de rage ou infecté):

- La rage doit être une maladie à déclaration obligatoire.
- Réseau national de surveillance effectif pour la rage humaine et animale.
- Laboratoire National de Référence (LNR) et éventuellement laboratoires régionaux.
  - Tests recommandés (OIE/OMS) pour le diagnostic de rage (équipement, réactifs, personnel formé et régulièrement “évalué”).
  - Collaboration entre LNR et laboratoires régionaux.
  - Assurance qualité sous 17025 ou système équivalent pour garantir la traçabilité.
  - Arbre de décision (en fonction des méthodes utilisées).
  - Déclarations rapides des cas positifs (et aussi négatifs) à l’autorité compétente.
  - Implication régulière dans des tests inter-laboratoires d’aptitude.



- Données du laboratoire fiables = pas d’erreur dans le PEP; bonne gestion des animaux mordeurs et de leur surveillance; cartographie de l’incidence de la rage fiable.
- Données du laboratoire: à analyser rapidement (= données épidémiologiques).

# CONCLUSION

- ❖ Le diagnostic de la rage est basé sur une analyse au laboratoire de tous les animaux (connus ou non) suspects de rage ou trouvés morts.
- ❖ Il est crucial de mettre en œuvre des techniques recommandées par l'OIE et l'OMS : techniques rapides et fiables : le FAT demeure le « gold standard ».
- ❖ Du résultat de diagnostic dépendra la conduite à tenir rapidement en cas d'exposition humaine (morsure par exemple).
- ❖ Les résultats de la surveillance sont exploités régulièrement par les décideurs pour définir les méthodes de contrôle chez l'animal (vaccination de masse des chiens) et de prévention adaptées chez l'homme.

# MERCI POUR VOTRE ATTENTION!



## Unité des Lyssavirus