

Vers une capacité de diagnostic régionale améliorée et standardisée de la rage en Afrique

Claude Sabeta, PhD

17 Février 2021

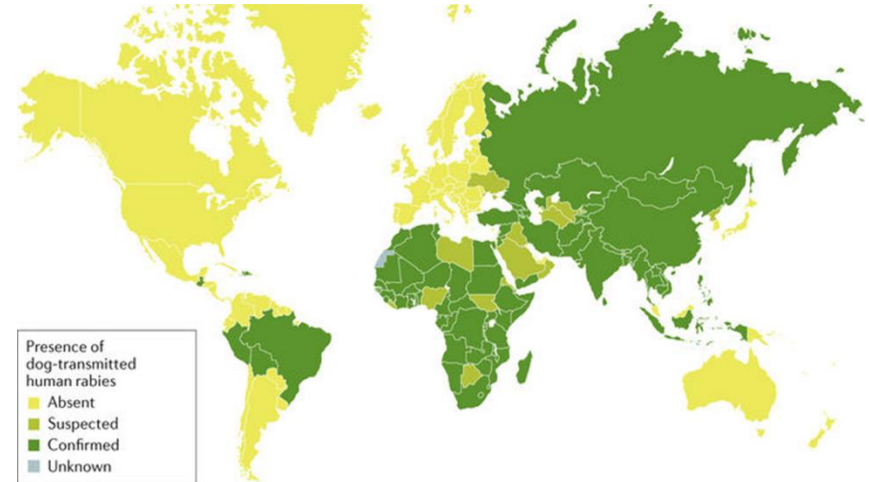
**Laboratoire de référence OIE pour la Rage
Institut de recherche vétérinaire Onderstepoort
Pretoria, République d'Afrique du sud**

Résumé de la présentation

- Fardeau mondial de la rage
 - Genre Lyssavirus
- Analyse de la rage en Afrique du sud
- **Renforcement des capacités de diagnostic régionales**
- Formation théorique et pratique
 - Soumission de prélèvements
 - Protocoles harmonisés
 - Essais d'aptitude interlaboratoires
 - Missions de soutien (évaluation de la qualité)
 - Jumelage de laboratoires OIE
- Résumé et remarques finales

La rage est une maladie tropicale négligée et constitue une menace pour la santé vétérinaire et publique

- Fréquemment rencontrée dans les populations canines des régions endémiques d'Asie et d'Afrique
 - le fardeau de la maladie y est le plus élevé,
- Au moins 60 000 morts humaines surviennent chaque année (l'Inde seule - 20 000 décès par an).
 - 50% des décès humains sont des enfants de moins de 15 ans
- Sous-déclaration des cas humains en raison de:
 - Capacité du laboratoire [en tant que Laboratoire de référence de l'OIE, nous essayons d'intervenir]
 - Personnel qualifié
 - Infrastructure médical et vétérinaire

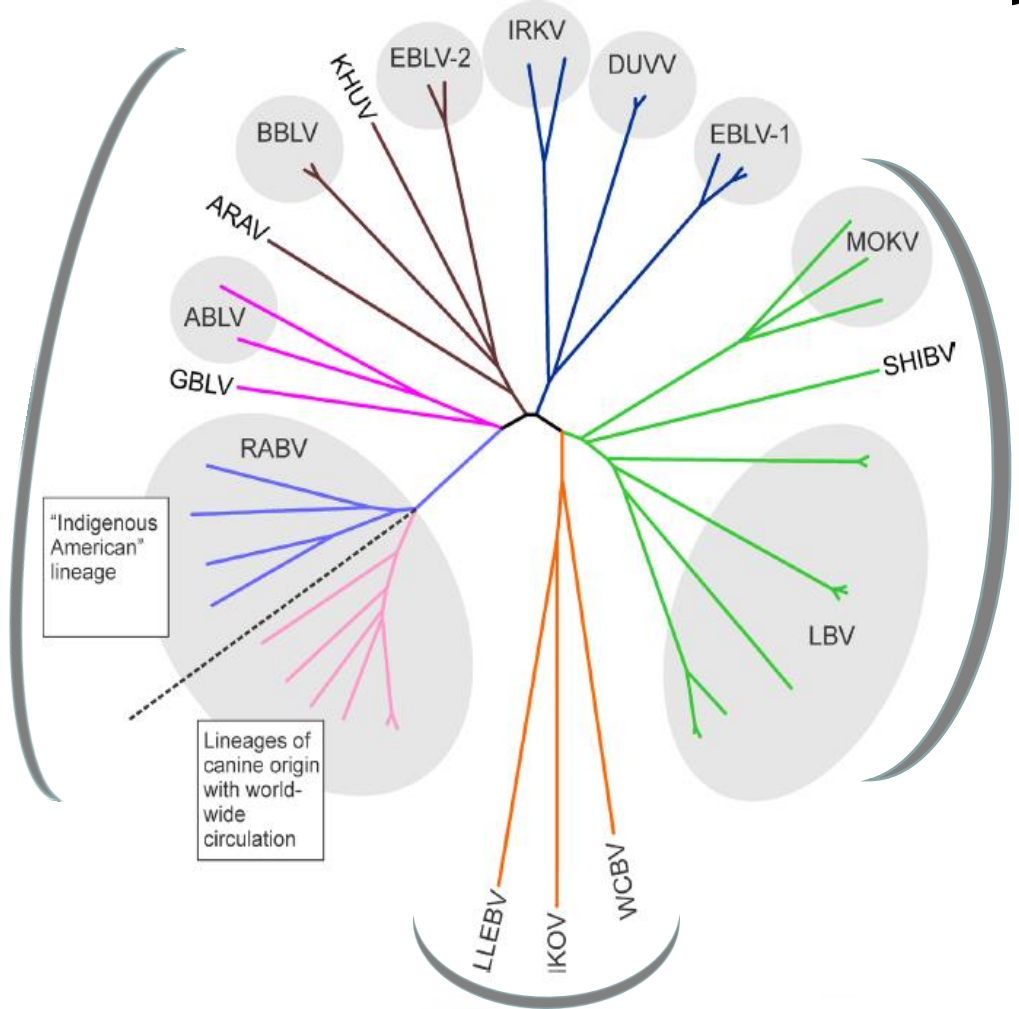


Nature Reviews | Disease Primers



Fooks et al., 2017

Les lyssavirus sont divisés en phylogroupes



Rupprecht et al., 2017

- Pathogénicité– intracérébrale (i.c) et intramusculaire (i.m.)
- Protection croisée: vaccins actuels à base de virus du phylogroupe I

Diagnostic de la rage en Afrique du Sud ...



1. Laboratoires de diagnostic animal

Onderstepoort (Pretoria)

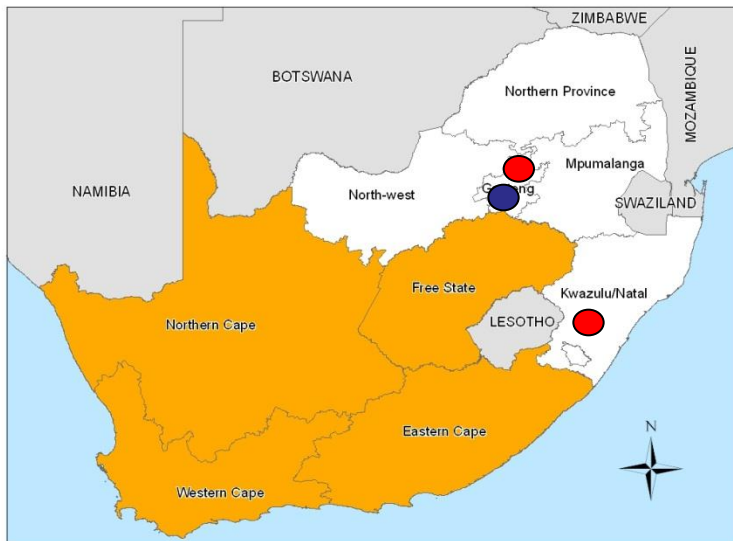
Allerton Provincial Laboratory (Pietermaritzburg)

2. Diagnostic de la rage humaine

The National Health Laboratory Service (NHLS)

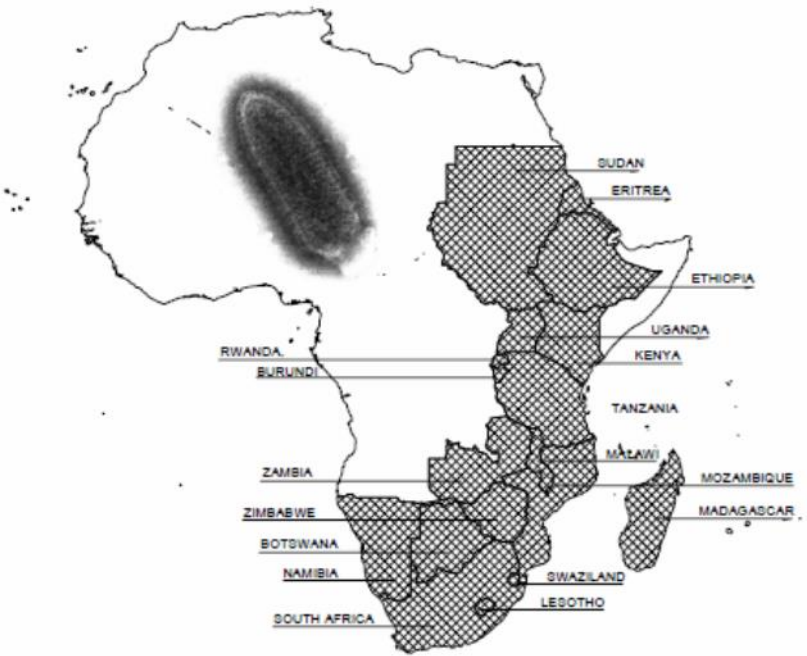
3. Échantillons formolés :

Immunohistochimie (IHC) conduite au département de pathologie (Faculté des Sciences vétérinaires, Université de Pretoria)



Renforcement des capacités de diagnostic régionales

Formation régionale sur le dépistage de la rage (Juillet 2009)



Objectifs du cours

- **Théorie:**

- Décrire les propriétés de base du virus de la rage, sa transmission et son évolution en Afrique.
- Recommander des pratiques sûres pour ceux qui travaillent dans le diagnostic de la rage ou qui expédient des échantillons de laboratoire.
- Résumer les procédures de contrôle et d'assurance qualité pour le laboratoire de diagnostic de la rage.
- Comprendre le concept One health et le positionnement de la rage comme zoonose négligée.

- **Discussions:**

- Évaluer le rôle du laboratoire de la rage en termes de capacité de diagnostic et d'interprétation des résultats de laboratoire.
- Revoir les différents outils de surveillance (typage antigénique, analyse phylogénétique et données générales de surveillance des cas) dans le contrôle de la rage.

- **Pratique:**

- Identifier et préparer les échantillons appropriés pour le diagnostic de la rage.
- Démontrer sa compétence dans l'observation des lames de test d'anticorps fluorescents, détecter l'antigène du virus lorsqu'il est présent et interpréter correctement les résultats de tests difficiles
- Comprendre le rôle de l'écologie canine dans le contexte du contrôle de la rage.

L'IFD et le dRIT sont les méthodes de test de première ligne approuvées par l'OIE / OMS pour l'antigène du lyssavirus dans le cerveau et les tissus nerveux centraux.

- Frottis d'empreintes cérébrales fixés dans de l'acétone froide (le formol **masque** l'antigène RABV).
- Coloré avec un conjugué polyclonal (**Mok + ERA**)
- Visualisation des lames sous un microscope fluorescent
- Méthode la plus rapide et la plus fiable à des fins de diagnostic et de recherche
- La sensibilité de l'IFD dépend de la **qualité** de l'échantillon et du degré d'**autolyse** du tissu cérébral.

Dean, D.L., Abelseth, M.K. & Atanasiu, P. (1996). The fluorescent antibody test. In: Laboratory Techniques in Rabies (F.X. Meslin, M.M. Kaplan & H. Koprowski, eds). Geneva, WHO, 88-95.



Diagnostic de la rage (IFD / dRIT) et lecture des résultats des tests



Deux lecteurs [1] fournissent des notes quantitatives (intensité de fluorescence et distribution de l'antigène)

Problèmes de contrôle qualité et discussions

- La qualité de tous les réactifs (acétone, conjugué, tampons de lavage) doit être optimale [stockage, pH].
- Utilisation de routine des contrôles pos et nég (utiliser des souches de terrain / de laboratoire)
- Microscope à fluorescence fonctionnant correctement, pH-mètre, hotte de sécurité biologique
- Le conjugué doit être à large spectre
 - Les dilutions concentrées doivent être mélangées avec du glycérol, aliquotées.
 - Déterminer la dilution de travail optimale du nouveau lot de conjugué



Leçons de la formation?

- Des domaines spécifiques de formation continue ont été mis en évidence (ci-dessus) et seraient poursuivis.
- **Le Laboratoire de Référence:**
 - devrait coordonner un test de compétence annuel pour tous les pays membres de la CDAA.
 - devrait fournir des produits biologiques clés tels que le conjugué pour tous les pays membres de la CDAA. Le bureau sous-régional de l'OIE devrait examiner une telle proposition.
- Les laboratoires individuels au sein de la CDAA doivent être évalués pour leur capacité à effectuer ces tests (humains, infrastructure, etc.).
- La formation devrait être élargie pour inclure d'autres pays non membres de la CDAA **[Nigéria, pays du bassin du Congo, Éthiopie]**.

Le processus d'harmonisation du protocole IFD

Dates: 26-28 Août, 2010.

Lieu: Onderstepoort, Afrique du sud

- Standardisation des protocoles de diagnostic dans les laboratoires vétérinaires et animaux
 - Facilité d'évaluation des compétences du personnel impliqué dans le diagnostic de la rage
 - Données de surveillance fiables



REVISION 1 17 December 2015



SADC Harmonized SOP of the rabies fluorescent antibody test (FAT)

Edition 1.0

Date Issued: 1 October 2010

Revision 1: 17 December 2015

Withdrawal Date:

Prepared by:

Dr. Claude Sabeta^{1*}

Dr. Wonderful Shumba¹

Dr Siegfried Khaiseb²

Dr Chanasa Mpelumbe-Ngeleja³

¹OIE Rabies Reference Laboratory, ARC-OVI, 100 Old Soutpan Road, Onderstepoort, Pretoria, South Africa;

²Central Veterinary Laboratory, Head of Pathology, Parasitology & Rabies, Private Bag 13187, Windhoek, Namibia

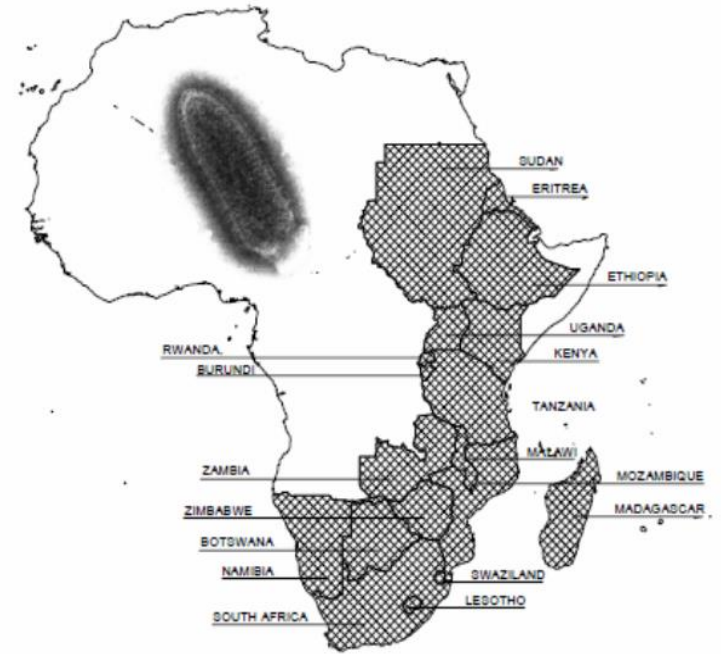
³Central Veterinary Laboratory, Virology Department, P.O. Box 9254, Dar-es-Salaam, Tanzania.

3. Pourquoi des tests de compétence interlaboratoires?

- Déterminer la capacité du laboratoire à effectuer un test spécifique
- Vérifier :
 - La performance des opérateurs individuels
 - Calibration des instruments
- Harmonisation des méthodes d'essai existantes
- Évaluation de nouvelles méthodes de test
- Attribuer des valeurs et des plages aux réactifs standards
- Résolution des différences inter-laboratoires

Pays participants ...

Pays	Code	Participé
Angola	L01	N
Botswana	L02	Y
Democratic Republic of Congo	L03	Y
Lesotho	L04	Y
Madagascar	L05	N
Malawi	L06	Y
Mauritius	L07	N
Mozambique	L08	Y
Namibia	L09	Y
Seychelles	L10	N
South Africa	L11 & L12	Y
Swaziland	L13	Y
Tanzania	L14	Y
Zambia	L15	Y
Zimbabwe	L16	Y



Sélection d'un panel d'échantillons

Virus	Référence de laboratoire no.	Espèce de Lyssavirus	Dilution
Lagos bat virus	RA390	Lagos bat lyssavirus	Undiluted
Mokola virus	173/06	Mokola lyssavirus	Diluted (1:5, 1:100 and 1:400)
Duvenhage virus	SA06	Duvenhage lyssavirus	Undiluted
Mongoose rabies virus	1164/10	Mongoose rabies virus	Undiluted
Negative (bovine)	366/11	None	Undiluted
Positive A	341/11	Mongoose rabies virus	Undiluted
Positive B	341/11	Dog rabies virus	Undiluted
Positive C	343/11	Dog rabies virus	1:5
Positive D	173/06	Mokola lyssavirus	1:400
Positive E	351/11	Dog rabies virus	1:100
Negative	367/11	None	Undiluted

Envoi des échantillons aux laboratoires participants



- **Autorisation d'importation**
- Validation du transport d'échantillons
- Envoi d'échantillons (température ambiante selon réglementation internationale) [**UN2814**]
 - Formulaire d'accusé de réception (à réception des échantillons, état)
 - Stocker les échantillons à 4 degrés jusqu'à l'analyse
 - La stabilité sera testée avant l'envoi des échantillons (10 jours à température ambiante)
- Délai (un mois à compter de la réception des échantillons)
- Formulaire de résultats
- Questionnaire technique (non diffusé)
- Instructions pour diluer le conjugué

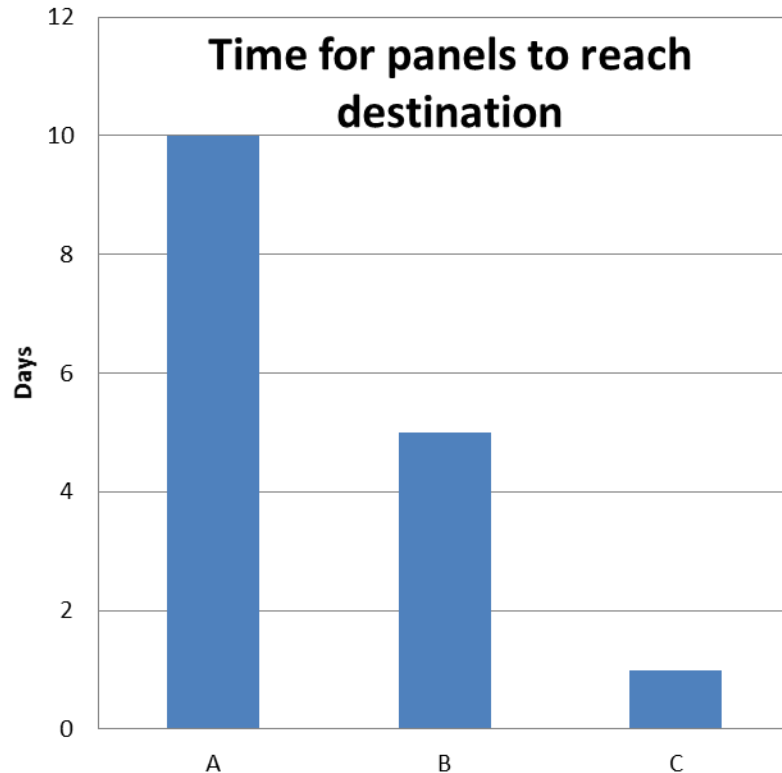
Interpretation des résultats

- **Divergence** : résultat donné par un laboratoire différent du résultat attendu (positif ou négatif)., incluent également les faux positifs / faux négatifs.
- **Sensibilité**: [Nbre d'échantillons vrais pos. trouvés par les laboratoires / Nombre total d'échantillons pos (Vrai pos. + faux nég)] x 100
- **Spécificité**: [Nbre d'échantillons vrais négatifs trouvés par les laboratoires / Nombre total. d'échantillons négatifs (vrai nég + faux pos)] x 100
- **Remarque**: La sensibilité et la spécificité du test d'aptitude interlaboratoires ne peuvent être comparées à celles de la sensibilité et de la spécificité classiques d'une technique (calculées sur la base d'un échantillonnage aléatoire).

Résultats des laboratoires

- La plupart des laboratoires ont produit des résultats satisfaisants, bien que collectivement les résultats faux négatifs (**n=23**) et faux positifs (**n=9**) étaient préoccupants.
- 1:400 (échantillon dilué) a posé de nombreux problèmes au laboratoire.
 - Problème de microscopie [d'équipement]?
 - Lecteurs inexpérimentés?
 - Adhésion au protocole? par exemple. utilisation du bleu EVANS dans le test.
- Pour ce test de compétence, la spécificité et la sensibilité (65.4% & 80%)
[**100% & 99.2% pour l'IFD et pour l'essai interlaboratoire de l'Anses, n=3 (4.6% des échantillons négatifs, et n=7 [8% des échantillons positifs]**]

CDAA + Pays du Bassin Congo



Deux problèmes:

Coût du courrier des échantillons très élevé (frais) et

Les échantillons prennent trop de temps pour être acheminés vers les laboratoires.

- A 1-5 days
- B 6-10 days
- C >10 days



SADC REGIONAL INTER-LABORATORY PROFICIENCY TESTING EXERCISE FOR **RABIES DIAGNOSIS**

29 NOVEMBER 2011

3. Jumelage avec NVRI - Comment et quand la collaboration a-t-elle commencé?

- Dr Florence Ogo inscrite pour un MSc avec à la Faculté des sciences vétérinaires (UP) en 2006.
 - A étudié l'épidémiologie moléculaire de la rage canine au Nigéria (gènes N et G d'isolats de virus)
 - A apporté un panel d'environ 100 virus pour l'étude
- Écart entre les résultats des tests d'anticorps fluorescents directs et la PCR
 - Méthode de diagnostic de la rage a raté certains cas positifs (moins sensibles)



Formation en culture cellulaire 2009.....

- Soutenu financièrement par le SGM (UK)
 - £5000,00 (International Development Funds)
- 8 scientifiques (avec un intérêt pour la virologie ont été impliqués):
 - Vétérinaires
 - Chercheurs
 - Personnel technique



Résultats de la formation ...

- reconstitution des milieux de culture cellulaire (Eagle's minimum essential media (EMEM)
 - Culture cellulaire BHK-21 et MNA
 - Congélation et récupération des cellules
- reconstitution du standard de référence OIE pour chien
- conjugué anti-lyssavirus,
- Production de CVS sur cellules BHK
- Test d'isolement sur culture cellulaire (IVCC) sur un panel d'échantillons.
- Le test FAVNT n'a pas été réalisé comme c'était prévu
 - Situations simulées / exemples de résultats FAVNT typiques pour travailler (individuellement) en utilisant la formule de Spearman-Kärber
- Immunofluorescence directe (IFD) a été démontré sur un panel de 6 échantillons (temps de test réduit).

Vers le jumelage

- Absence d'un microscope à fluorescence.
- Installations non disponibles dans une localité.
- Aucun individu affecté à l'entretien de l'équipement.
- Masse critique pour entreprendre le diagnostic de la rage et la recherche disponible [épidémiologie moléculaire, pathologie, culture et surveillance cellulaires, diagnostic (P)].
- Canaux de communication fiables et rapides (P).
- Support de gestion pour la formation et la collaboration (P).
- Masse critique pour entreprendre le diagnostic de la rage et la recherche disponible [épidémiologie moléculaire, pathologie, culture et surveillance cellulaires, diagnostic (P)]

Work packages dans le projet de jumelage avec le Nigéria

- Introduire de nouvelles méthodes de diagnostic: le test des anticorps fluorescents (IFD),
- Test d'isolement de culture tissulaire de la rage (peut éliminer l'inoculation sur souris)
- Différenciation des souches (utilisation des anticorps monoclonaux)
- Test de neutralisation virale des anticorps fluorescents (FAVNT)
- Mise en place et maintenance de lignées de culture cellulaire,
- Production de CVS

Mab	canid	mongoose	Lagos bat	Mokola virus	Duv
1C5	----	----	----	----	----
26AB7	+++	var	----	----	----
26BE2	+++	var	----	----	----
32GD12	var	var	----	----	----
38HF2	+++	+++	+++	+++	+++
M612	----	----	+++	----	----
M837	----	----	----	----	+++
M850	----	var	----	----	+++
M853	+++	----	----	----	+++
M1001	----	----	----	+++	----
M1335	----	var	----	var	----
M1386	----	+++	----	----	----
M1400	----	var	----	----	----
M1407	++	var	----	----	----
M1412	++	var	----	----	----

Formation IFD (OVI et NVRI)

- Dilution de conjugué biologique humide et lyophilisé
 - Conservation et dilution
- Point de titrage final du conjugué humide et lyophilisé et test sur les tissus cérébraux d'origine
- Évaluation des compétences
 - Deux panels (4 et 10 échantillons)
 - **Panel 1:** Échantillons préalablement testés dans le laboratoire d'OVI (374/10 **neg**, 386/10 **pos**, 381/10 **neg** and 387/10 **pos**)
 - **Panel 2:** 10 échantillons (essai interlaboratoire en anneau de l'Anses (France))

Les résultats obtenus pour les deux panels étaient comme prévu.

Comparaison interlaboratoire (échantillons de NVRI)

Ref échantillon#	Espèces d'origine	Résultat OVI	Prévu
CD1612	canine	neg	<u>neg</u>
CD945	Cat	Pos4	<u>pos</u>
CD875	bovine	Pos4	<u>pos</u>
CD1606	canine	Neg	<u>neg</u>
CD1620	canine	pos4	<u>pos</u>
CD422	canine	pos4	<u>pos</u>

Évaluation

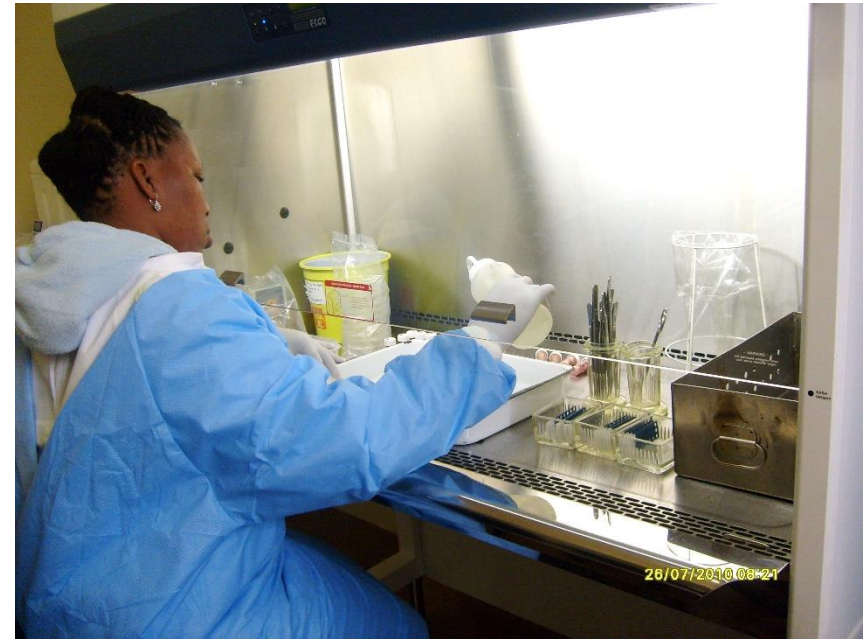
- IFD
 - Dossier de soumission et d'inscription disponible et bon.
 - La salle d'autopsie est bonne. Journal de bord pour microscope
 - Formulaire d'enregistrement IFD bon.
- Documentation et traçabilité à améliorer
 - Aucune plage définie sur les tableaux de température du réfrigérateur / incubateur
 - Journal de bord pour microscope
 - Une hotte fonctionnelle appropriée est requise.
 - Bouteille d'acétone non étiquetée
 - Tableau de dilution pour le conjugué non disponible
- Technique
 - Les résultats IFD doivent être notés
 - Utilisation de bleu d'Evans à considérer
 - Trop de fond (en particulier pour les échantillons négatifs)
- Sécurité
 - Conteneur pour objets tranchants non disponible
 - Réservoir d'essence non enchaîné

Que peut apporter le projet de jumelage aux laboratoires régionaux?

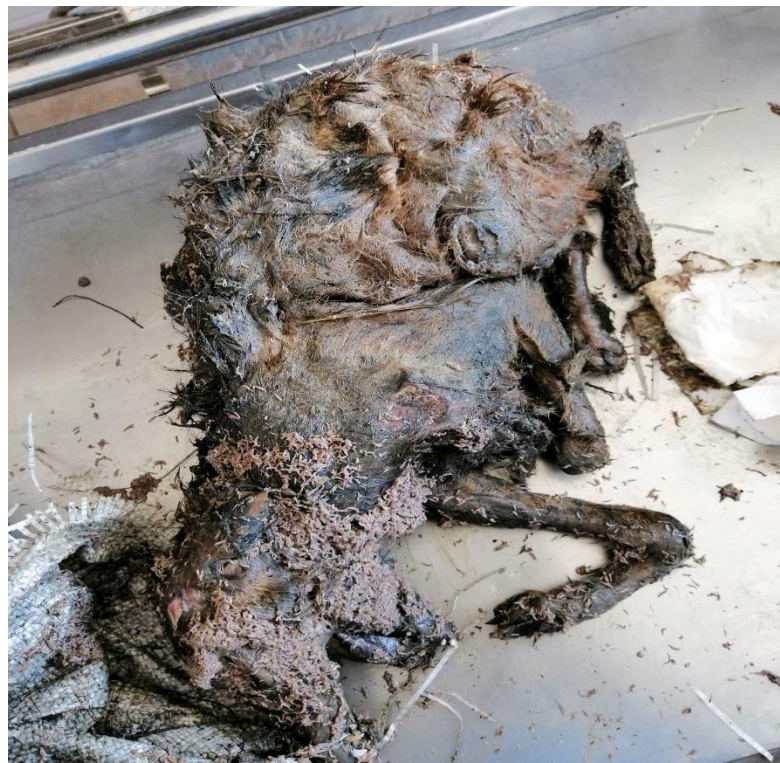
- Collaboration Sud-Sud et potentiel pour plus de réseautage
- Visibilité accrue de l'ARC sur le continent africain
 - **Accomplissement de l'un des mandats de l'OIE**
- Des diagnostics améliorés soulignés par une approche de contrôle qualité,
- Travail d'équipe amélioré,
- Nécessité de pratiques de sécurité appropriées (hottes de sécurité biologique)
- Une opportunité pour de nouvelles collaborations de recherche entre scientifiques des deux laboratoires,
- Le processus d'apprentissage va dans les deux sens.

Quels sont nos objectifs de renforcement des capacités dans la région africaine?

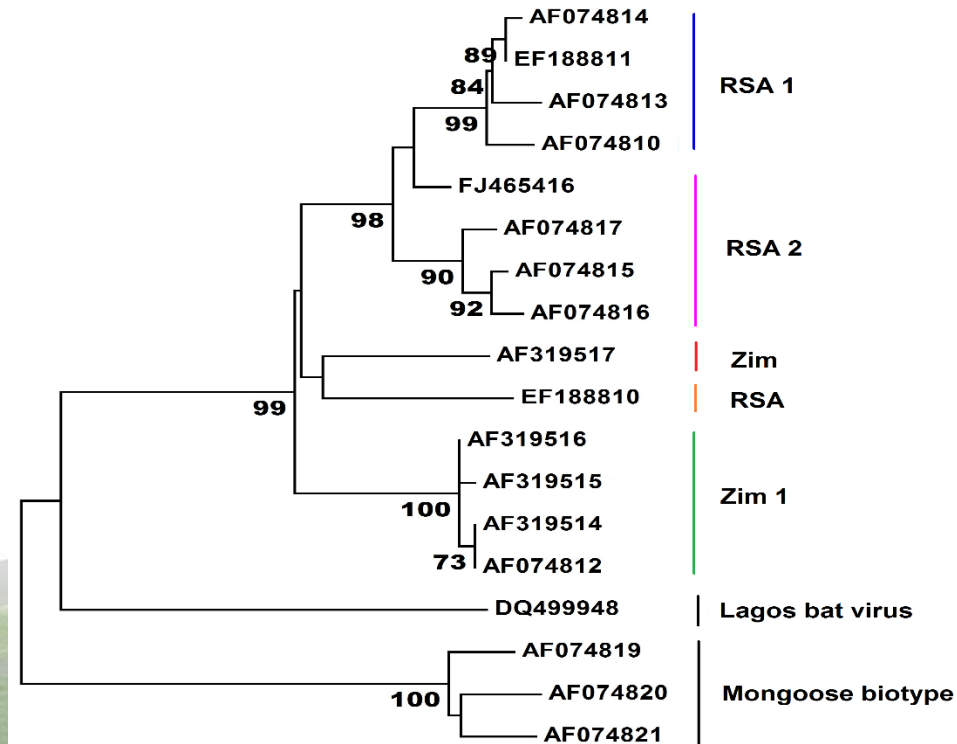
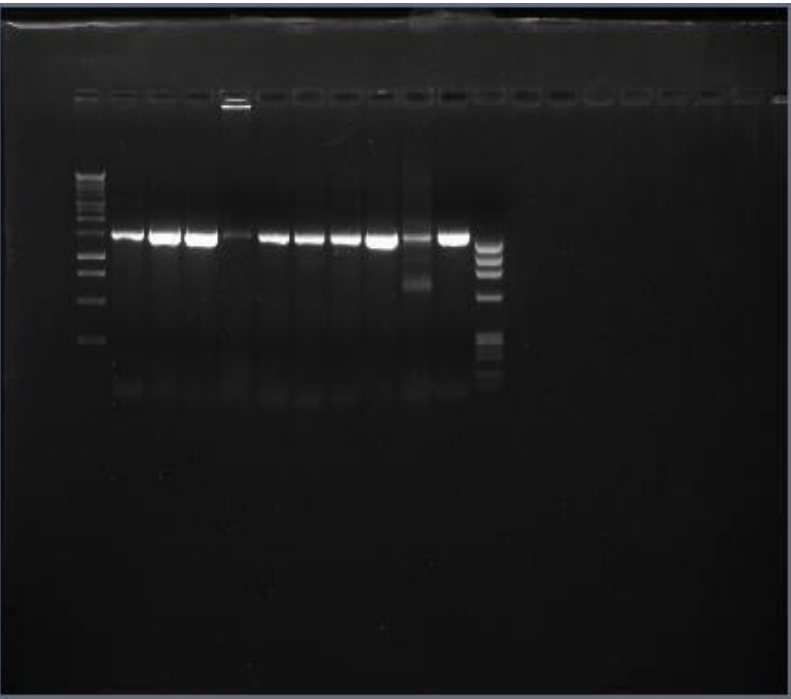
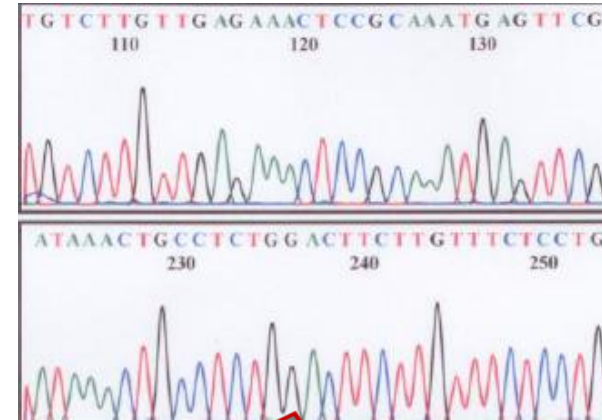
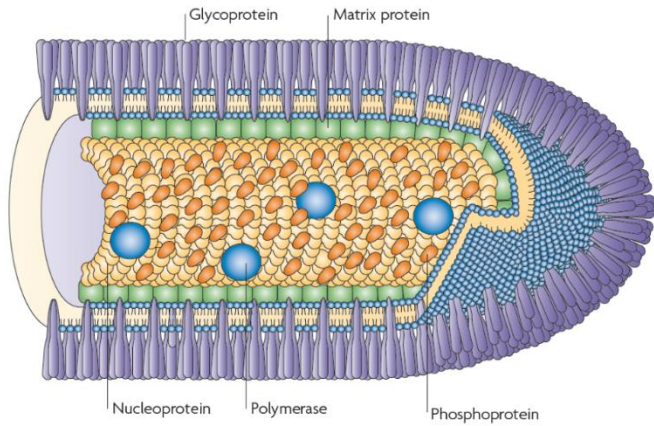
Traitement des échantillons et diagnostic de la rage sur les tissus nerveux centraux...



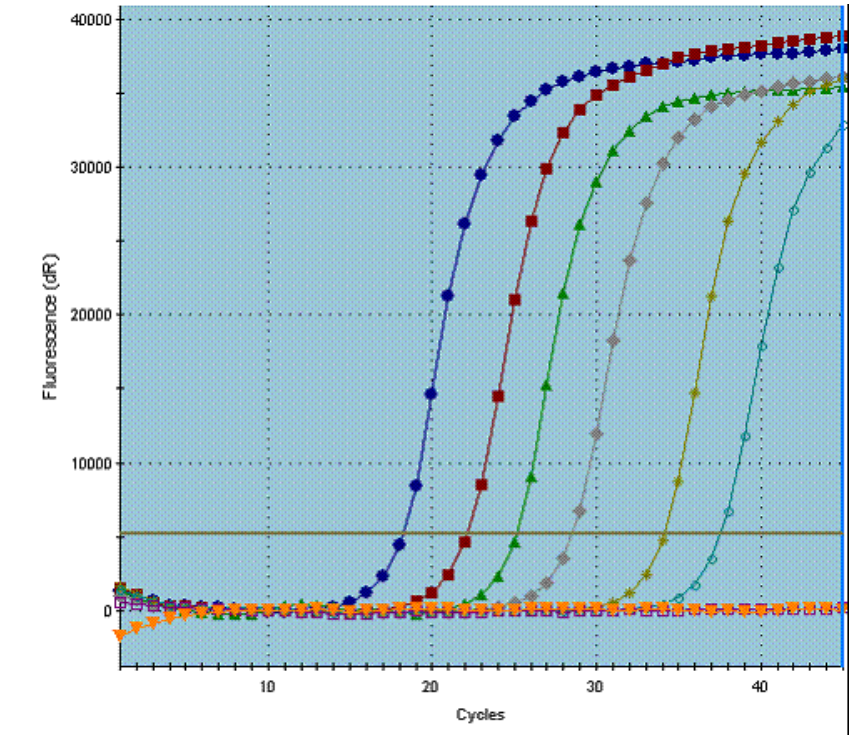
Envoi d'échantillons



Déterminer l'origine des flambées / relations



Moléculaire (PCR) désormais recommandée pour le diagnostic de confirmation de la rage



Méthodes d'essai disponibles pour le diagnostic de la rage et leur objectif

Méthode	Population indemne d'infection	Contribution aux politiques d'éradication	Confirmation des cas cliniques	Prévalence de l'infection – surveillance	Statut immunitaire de certains animaux ou populations après la vaccination
IFD	+++	+++	+++	+++	n/a
dRIT	+++	+++	+++	+++	n/a
Culture cellulaire (isolement viral)	+	+++	+++	+++	n/a
Inoculation sur souris (isolement viral)	n/a	+++	+++	+	n/a
RT-PCR conventionnelle (détection d'ARN)	+++	+	+++	+++	n/a
Real-time PCR (détection d'ARN)	+++	+++	+++	+++	n/a

- **Projets de jumelage et autres activités:**
 - Centre national de diagnostic et d'investigation zoosanitaires, Ethiopie [2021-2023]
 - Test de compétence interlaboratoires pour IFD et dRIT pour les pays membres régionaux.

- **Formation des étudiants de troisième cycle**
 - MSc (Botswana, Nigeria, South Korea)
 - PhD (Mozambique, Nigeria, Ethiopia)
 - Research scientists (Nigeria)

- **Remerciements:**

- University of Pretoria
- European Union Reference Laboratory for Rabies
- OIE Regional Office (Gaborone, Botswana)
- Global Alliance for Rabies Control
- FAO-ECTAD
- Agricultural Research Council
- Rabies Advisory Group

Merci de votre attention