

INSTITUT PASTEUR DE COTE D'IVOIRE  
01 BP.490 ABIDJAN 01.

---

DETECTION DES IGM ANTIAMARILES  
SPECIFIQUES POUR LE DIAGNOSTIC  
ET LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE  
DE LA FIEVRE JAUNE

(1) (2) (3)  
LHULLIER M, MONTENY N et SARTHOU J.L.

25ème CONFERENCE TECHNIQUE BOBO-DIOULASSO  
DU 15 AU 19 AVRIL 1985

N° 8.718/85/DOC.TECH.OCCGE

- 
- (1) Chef du Laboratoire des Arbovirus - IPCI  
(2) Virologue ORSTOM - IPCI  
(3) Chef du Laboratoire d'Immunochimie - IPCI

## DEFINITION DU DIAGNOSTIC RAPIDE

" PROCESSUS FOURNISSANT DES RESULTATS ACCEPTABLES EN MOINS DE TEMPS QUE NE LE FERAIENT LES METHODES CLASSIQUES ET PERMETTANT D'AGIR AVEC SUCCES POUR TRAITER LES MALADES ET LEURS CONTACTS OU COMBATTRE LA MALADIE DANS LA COLLECTIVITE ".

### Groupe Scientifique OMS GENEVE 1980.

Le diagnostic des infections virales reposait il y a encore peu de temps sur deux méthodes :

- d'une part l'isolement du virus,
- et d'autre part sur la détection d'un titre croissant d'anticorps.

La première méthode, quoique sensible était souvent longue, car il fallait non seulement cultiver le virus mais également l'identifier. Dans le meilleur des cas, une semaine était nécessaire pour caractériser le virus en cause.

Attendre l'apparition des anticorps, n'était pas une meilleure méthode : là aussi, il fallait du temps, prélever le sang à plusieurs jours d'intervalle et par ailleurs, les réactions anamnestiques en zone d'endémie limitaient singulièrement les interprétations à l'échelon individuel.

Le groupe scientifique OMS réuni à Genève en 1980 a défini le diagnostic rapide :

" PROCESSUS FOURNISSANT DES RESULTATS ACCEPTABLES EN MOINS DE TEMPS QUE NE LE FERAIENT LES METHODES CLASSIQUES ET PERMETTANT D'AGIR AVEC SUCCES POUR TRAITER LES MALADES ET LEURS CONTACTS OU COMBATTRE LA MALADIE DANS LA COLLECTIVITE ".

Les méthodes de diagnostic rapide des affections virales sont plus utiles - pour le moment - dans l'adoption de mesures de protection individuelles ou collectives que pour les soins aux malades eux-mêmes.

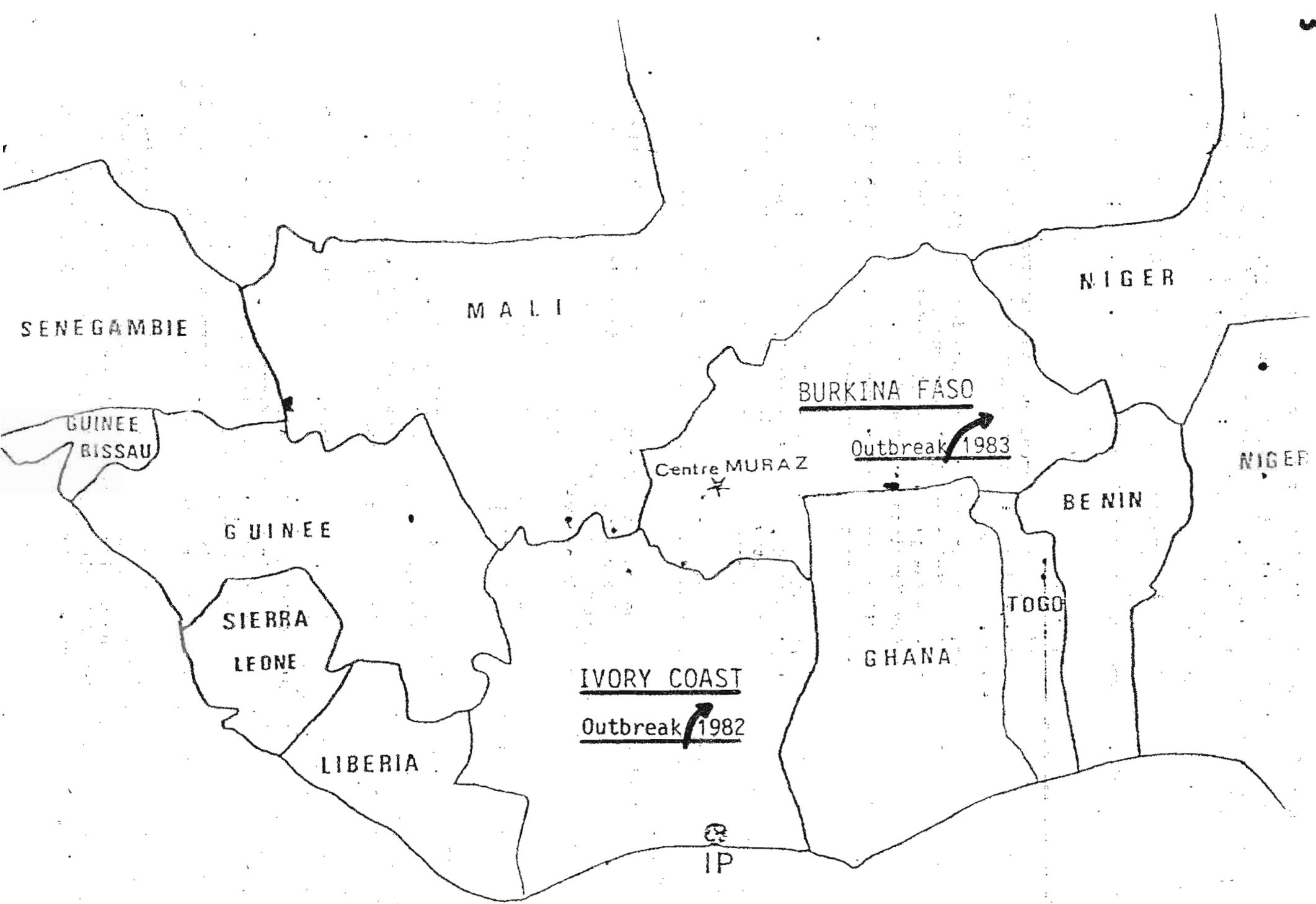
Parmi les méthodes de diagnostic rapide, la détection des IgM spécifique a acquis une place prépondérante grâce au développement des méthodes immunoenzymatiques en particulier ELISA. Les autres techniques : ultracentrifugation ou filtration ne se prêtant pas au traitement des grandes séries. De plus les méthodes immunoenzymatiques sont fiables, relativement peu coûteuses et réalisables sur le terrain.

Ainsi, sont actuellement réalisés en routine la détection des IgM spécifiques pour les hépatites virales A et B, la rubéole, l'herpès etc...

Lors de deux épidémies récentes de fièvre jaune en Afrique de l'Ouest, nous avons pu d'une part en Côte d'Ivoire préciser la cinétique de ces immunoglobulines et plus récemment lors de l'épidémie du Burkina Faso confirmer leur intérêt.

### MATERIEL ET METHODES

Dans cette communication, nous ne donnerons que les résultats obtenus à partir de sérums récoltés en Côte d'Ivoire. La seconde communication uniquement consacrée à la part prise par l'INSTITUT PASTEUR de Côte d'Ivoire à l'épidémie du Burkina Faso traitera notamment des résultats des IgM spécifiques antiamariles.



SENEGAMBIE

MALI

NIGER

GUINEE  
BISSAU

GUINEE

BURKINA FASO

Centre MURAZ

Outbreak 1983

BENIN

NIGER

SIERRA  
LEONE

TOGO

IVORY COAST

GHANA

Outbreak 1982

LIBERIA

IP

Ces sérums de Côte d'Ivoire ont deux origines :

Lors de l'épidémie de M'Bahiakr<sup>4</sup> en 1982 où nous avons estimés à 600 le nombre de personnes touchées, 216 sujets ont été étudiés. Les prélèvements ont été réalisés à plusieurs reprises : à J0, J8, J30 et J60. Des éléments indépendants de notre volonté ne nous ont pas permis de poursuivre au delà l'étude de la cinétique.

Une seconde série de 22 sujets a été étudiée en 1982 lors de polyémergences survenues dans la région de OUEREGUEKAHA. Pour cette série, les prélèvements ont été réalisés à J0, J30, J60, J90 et J120.

### TITRAGE ELISA DES IGM ANTIAMARILES

La technique est réalisée en microplaques de polystyrène spéciales pour l'ELISA. Toutes les incubations sont de une heure à 37°C suivies de trois lavages en tampon PBS-Tween.

Les IGM sériques, sont dans un premier temps immuno-captées par des IgG anti chaîne u humaines fixées préalablement sur la phase solide. On introduit ensuite dans la réaction l'antigène amaril purifié et dilué en tampon tween pour éviter les fixations non spécifiques.

L'anticorps anti fièvre jaune préparé sur souris, et le Fab anti IgG de souris marqué à la peroxydase sont ensuite successivement introduits dans les cupules.

L'activité peroxydasique est révélée par le chromogène : ORTHOTOLIDINE + PEROXYDE D'HYDROGENE. On obtient ainsi, une belle couleur bleue lorsque la réaction est positive. Elle est suffisamment facile à lire à l'oeil nu pour que l'on puisse notamment sur le terrain se passer d'un spectrophotomètre.

La coloration peut également être stoppée par l'acide sulfurique 4N et les absorbances peuvent alors être lues au spectrophotomètre automatique à 450 nm.

Le titrage ELISA des IgG est effectué après captation de l'antigène fièvre jaune sur la phase solide revêtue d'IgG de souris antiamariles. Les différentes dilutions de sérums sont ajoutées et les IgG sont révélées par du Fab anti IgG humaines couplé à la peroxydase.

La coloration est la même que la précédente.

Le titrage des anticorps inhibant l'hémagglutination est pratiqué selon le protocole habituel après élimination des inhibiteurs non spécifiques.

### RESULTATS

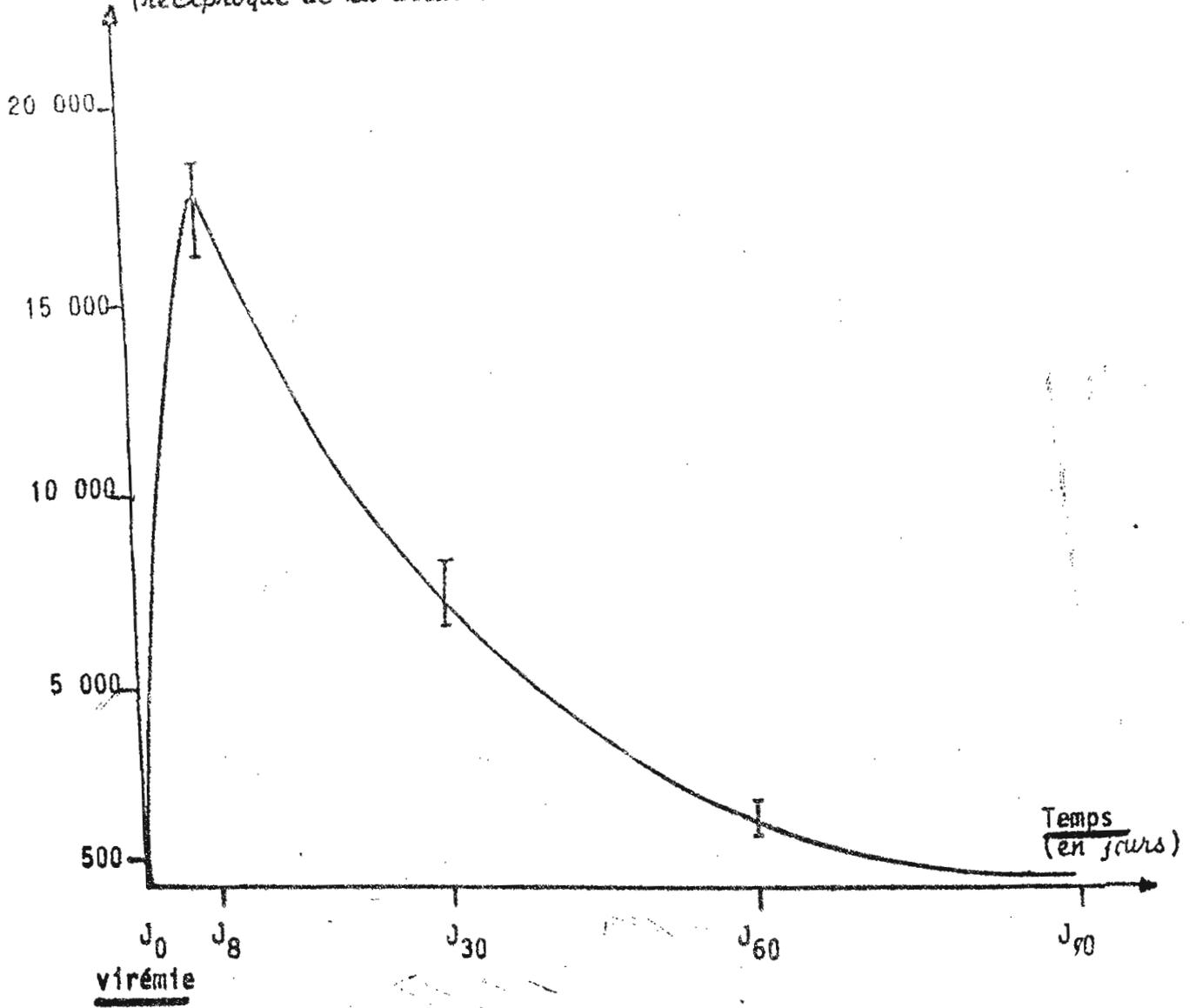
Parmi les 216 sujets étudiés lors de l'épidémie, le virus a été isolé à 27 reprises. 24 de ces malades étaient dépourvues d'IgM spécifiques à la phase de virémie alors que 3 en possédaient. Nous n'avons retenu pour l'étude initiale de la cinétique des IGM antiamariles que les sérums de ces 24 malades.

1. Le titre maximum est atteint dès le 8ème jour, pour ensuite décroître d'une manière continue jusqu'au 90ème jour.

La réaction d'inhibition de l'hémagglutination permet de distinguer des réponses primaires et secondaires pour les flavivirus. Parmi les 27 sujets virémiques étudiés lors de l'épidémie, pour 21 d'entre-eux, il s'agissait d'un premier contact avec un flavivirus, alors que 6 autres avaient déjà des anticorps contre un ou plusieurs virus du groupe. Le type de réaction primaire ou secondaire n'a pas paru avoir d'influence sur le résultat des isolements de virus.

Pour les IGM, que la réponse soit de type primaire ou secondaire, le taux maximum est atteint dès le 8ème jour. Il est plus élevé dans le cas d'une réaction primaire avec un titre moyen de l'ordre de 20.000, que lors d'une réaction secondaire où le titre moyen n'est que d'environ 10.000. Néanmoins, dans les deux cas, les courbes ont une allure générale identique.

Titre ELISA  
(réciproque de la dilution des sérums)



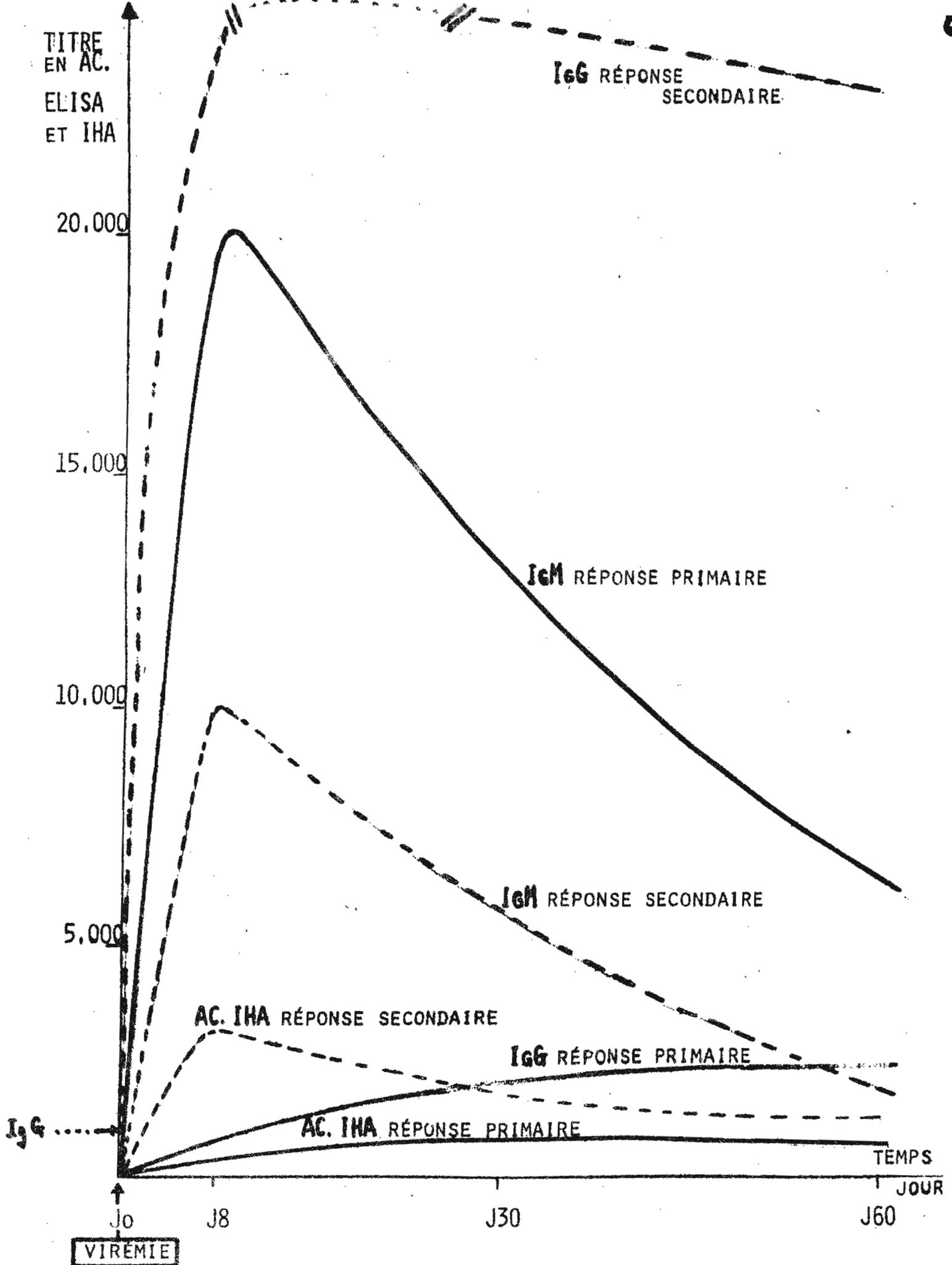


FIG.1. CINÉTIQUE DES IgM, DES IgG ET DES AC. IHA ANTIAMARILS CHEZ LES SUJETS VIRÉMIQUES À J0.

2. Les courbes des cinétiques des anticorps inhibant l'hémagglutination sont très différentes selon que l'on est en présence d'une réaction de type primaire ou de type secondaire. Dans le premier cas, on observe un plateau avec des titres inférieurs à 640. Dans le cas d'une réaction de type secondaire, dès le 8ème jour le maximum est atteint à un taux moyen de 2560 pour ensuite décroître rapidement.

3. Pour les IgG, les deux courbes sont totalement différentes. Dans le cas d'une réaction primaire, le titre maximum est atteint au 30ème jour avec un plateau jusqu'au 60ème-90ème jour. Les titres obtenus sont peu élevés, la maximum se situant à 2.000. Lors d'une réponse de type secondaire, l'ascension est brutale et maximum dès le 8ème jour avec des titres moyens dans notre échantillonnage, supérieurs au 50.000ème. Les titres sont plus faibles à J30 et J60 amorçant une décroissance de la courbe.

Déjà, lors de l'épidémie de Côte d'Ivoire, nous avons pu mettre en évidence à trois reprises la présence simultanée du virus et des IgM spécifiques. Cette observation nous avait fait évoquer l'existence d'immuns complexes circulants avec excès d'antigène. Nous reviendrons sur ce problème avec l'épidémie du Burkina Faso au cours de laquelle nous avons fréquemment retrouvé l'antigène viral associé aux IgM spécifiques.

Par ailleurs, lors de cette première épidémie, nous avons porté le diagnostic de fièvre jaune sur des arguments exclusivement sérologiques. 38 sujets avaient des IgM antiamariles lors du premier prélèvement et à des titres variant entre 800 et 25.600. 16 de ces malades présentaient alors un ictère alors que parmi les 25 autres individus ayant acquis leurs IgM spécifiques par la suite, 2 seulement développèrent ultérieurement un ictère.

On peut donc en déduire que la recherche des IgM antiamariles permet donc un diagnostic de présomption dans 89% des ictères dus au virus de la fièvre jaune.

### SPECIFICITE

On sait fort bien que l'un des problèmes en matière de sérologie des ARBOVIRUS est celui de la spécificité.

Nous avons étudié la spécificité des IgM antiamariles vis à vis d'un Alphavirus : CHIKUNGUNYA et de 3 Flavivirus d'intérêt local : DENGUE 2, ZIKA et WEST NILE.

Les antigènes ont été purifiés par chromatographie selon le même protocole que pour la détection des IgM anti fièvre jaune.

Les résultats résumés dans la figure intéressent les sérums de sujets présentant des réactions de type secondaire en inhibition d'hémagglutination. On observe une légère réaction croisée avec l'antigène WEST NILE, mais les absorbances restent toujours au moins trois fois inférieures à celles obtenues avec l'antigène fièvre jaune.

Quant à la spécificité par rapport aux antigènes CHIKUNGUNYA, DENGUE et ZIKA, elle est excellente. Notons que pour ces sérums la seule inhibition de l'hémagglutination ne permettait pas de conclure avec certitude en faveur d'une étiologie amarile.

Nous avons pu vérifier que l'immunocaptation par l'antichaine u permettait un titrage spécifique des IgM même en présence d'IgG à un taux élevé. C'est ainsi que des sérums présentant une réaction de type secondaire étaient dépourvus d'IgM alors que le titre en IgG atteignait déjà 6400.

CAS DE FIEVRE JAUNE AUTHENTIFIES  
EN COTE D'IVOIRE DE 1982 A 1985

<u>ANNEE</u>	<u>MOYENS DIAGNOSTIQUES</u>			<u>TOTAL DES CAS</u>
	<u>HISTOPATHOLOGIE</u>	<u>ISOLEMENT</u>	<u>ICM ANTIAMARILES</u>	
1982	1	28	117	121
1983	0	0	0	0
1984	0	1	12	13
1985	0	0	1	1
Total général	1	29	<u>130</u>	<u>135</u>

DISCUSSION :

Peu de travaux ont été réalisés précédemment sur les IgM antiamariles. Ceux de Thomas MONATH l'ont été sur des sujets primo-vaccinés par le vaccin 17D. Pour cet auteur, les IgM apparaissent au 8ème jour et atteignent leur maximum entre le 14ème et le 17ème jour puis tendent à diminuer graduellement.

Ces résultats sont tout à fait concordants avec les nôtres puisque le pic que nous avons obtenu à J8 concernait des sujets virémiques qui avaient donc été infectés probablement une semaine auparavant.

Depuis cette étude, nous avons en Côte d'Ivoire basé toute la surveillance humaine de la fièvre jaune sur la détection des IgM spécifiques. Grâce à des contacts avec des médecins en poste dans tout le pays : médecins hospitaliers ou des Secteurs de Santé Rurale, nous disposons d'un réseau national de correspondants.

Dès réception des sérums, nous sommes en mesure de caractériser une activité antiamarile en quelques heures. Si le test est positif, les autorités sanitaires et administratives sont informées, tandis que les moyens virologiques et entomologiques sont mobilisés. L'enquête réalisée sur le terrain est destinée d'une part, à mettre en évidence la circulation du virus dans les populations humaines, simiennes et chez les arthropodes, et d'autre part de préciser les modalités épidémiologiques de l'infestation.

Les résultats des cas de fièvre jaune authentifiés en Côte d'Ivoire de 1982 à 1985 sont résumés dans le tableau 6. Sur 135 cas, 130 ont pu être diagnostiqués grâce aux seules IgM antiamariles. Le nombre des cas diagnostiqués par histopathologie peut paraître faible, mais l'on connaît les difficultés d'obtention des prélèvements, notamment en milieu musulman.

La détection des IgM est également une méthode sensible : A une occasion, nous avons mis en évidence des IgM antiamariles à un titre de 3.200 chez une fillette de 7 ans qui présentait un tableau typique de fièvre jaune avec ictère, température et syndrome hémorragique dont elle devait d'ailleurs décéder. Le diagnostic avait été fait par les IgM 24 heures avant le décès. L'examen histopathologique du foie ne permettait pas de conclure en faveur d'une étiologie amarile. Cependant, nous avons pu isoler la souche virale à partir d'un fragment hépatique conservé dans la partie supérieure d'un simple réfrigérateur domestique. L'enquête permet de montrer qu'il s'agissait d'une émergence endémique et aucune autre souche ne put être isolée. A cette occasion, le titrage ELISA des IgM a pu être effectué sur le terrain, à température ambiante, à l'aide de plaques préfixées au laboratoire et grâce à la coloration bleue à l'orthotolodine qui permet aisément une lecture à l'oeil nu.

La recherche des IgM antiamariles peut également permettre le diagnostic rétropectif. Nous avons ainsi pu redresser l'étiologie du décès survenu 3 mois plus tôt chez un malade et attribué à une hépatite virale fulminante.

Actuellement, dans le cadre de l'étude générale des ictères en Côte d'Ivoire, nous couplons systématiquement la détection des IgM antiamariles avec celle des marqueurs des hépatites virales A et B.

CONCLUSION

D'apparition généralement postérieure à la phase de virémie, les IgM antiamariles permettent de combler le "silence biologique" entre la disparition du virus dans le sang et l'apparition des anticorps en sérologie classique.

L'intérêt à l'échelle de la collectivité réside en un diagnostic précoce, assurant d'une part le dépistage des premiers cas sans avoir recours à un test post mortem comme l'histopathologie et permettant d'autre part, un bilan d'extension de l'infection sur un seul sérum.

Au plan individuel, la détection des IgM antiamariles est une technique de diagnostic préemptif, particulièrement au stade de l'ictère.

C'est en fonction des qualités de la méthode qu'une mission technique de l'OMS l'a recommandé comme moyen de diagnostic rapide et de surveillance pour la fièvre jaune.

TABLEAU 4

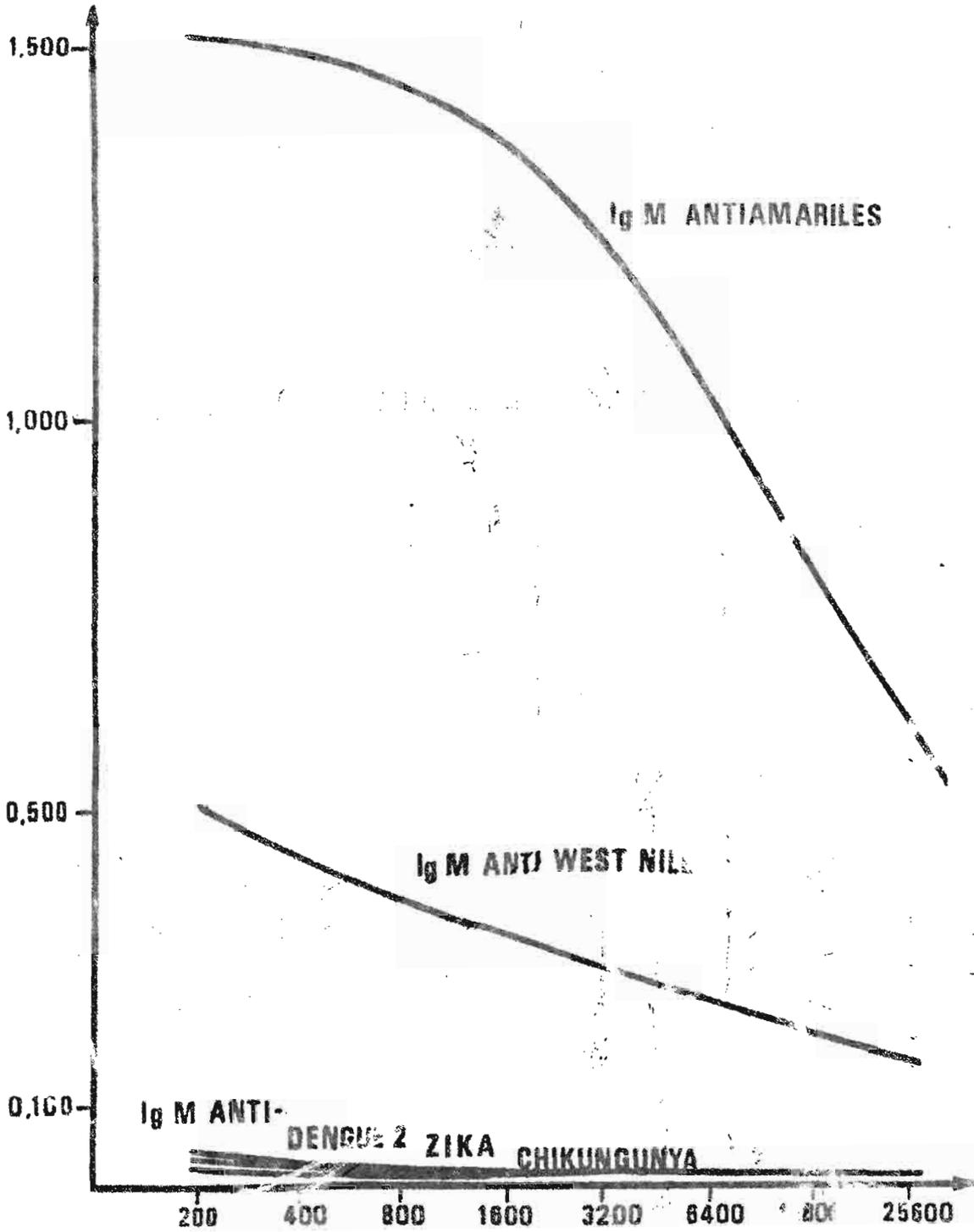
EPIDEMIE DE FIEVRE JAUNE, MAI 1982, M'BAHIKRO, COTE D'IVOIRE

NOMBRE DE SUJETS ETUDIES		216
A Jo, J8, J30 ET J60.		:
<hr/>		
NOMBRE DE SUJETS INFESTES AVEC <u>PREUVE VIROLOGIQUE ET SEROLOGIQUE :</u>		
		27
	<u>IgM NEGATIVES</u>	<u>IgM POSITIVES</u>
A Jo	24	3
A J8, J30, J60 :	0	27

EPIDEMIE DE FIEVRE JAUNE. MAI 1982. M'BAHIAKRO. COTE D'IVOIRE.

NOMBRE DE SUJETS ETUDIES		216	
A Jo, J8, J30 ET J60.		:	
NOMBRE DE SUJETS INFESTES AVEC UNIQUEMENT UNE PREUVE SEROLOGIQUE :		63	
		IgM NEGATIVES	IgM POSITIVES
A Jo	:	25	38
DONT ICTERIQUES:		2	15
A J8, J30, J60	:	0	63

ABSORBANCE ELISA



TITRE ELISA (Echelle logarithmique)