

Optimisation d'une technique ELISA indirecte pour la détection des IgG humaines anti-Sindbis virus (SinV).



Temani Merbouha ⁽¹⁾; Badji Karima ⁽²⁾; Bouredjoul Nesrine ⁽¹⁾; Khardine Fayez ⁽¹⁾; Hachid Aissam ⁽¹⁾⁽³⁾

(1) Laboratoire des Arbovirus et virus émergents ; département de virologie; institut pasteur d'Algérie

(2) Université Saad dahleb Blida 1

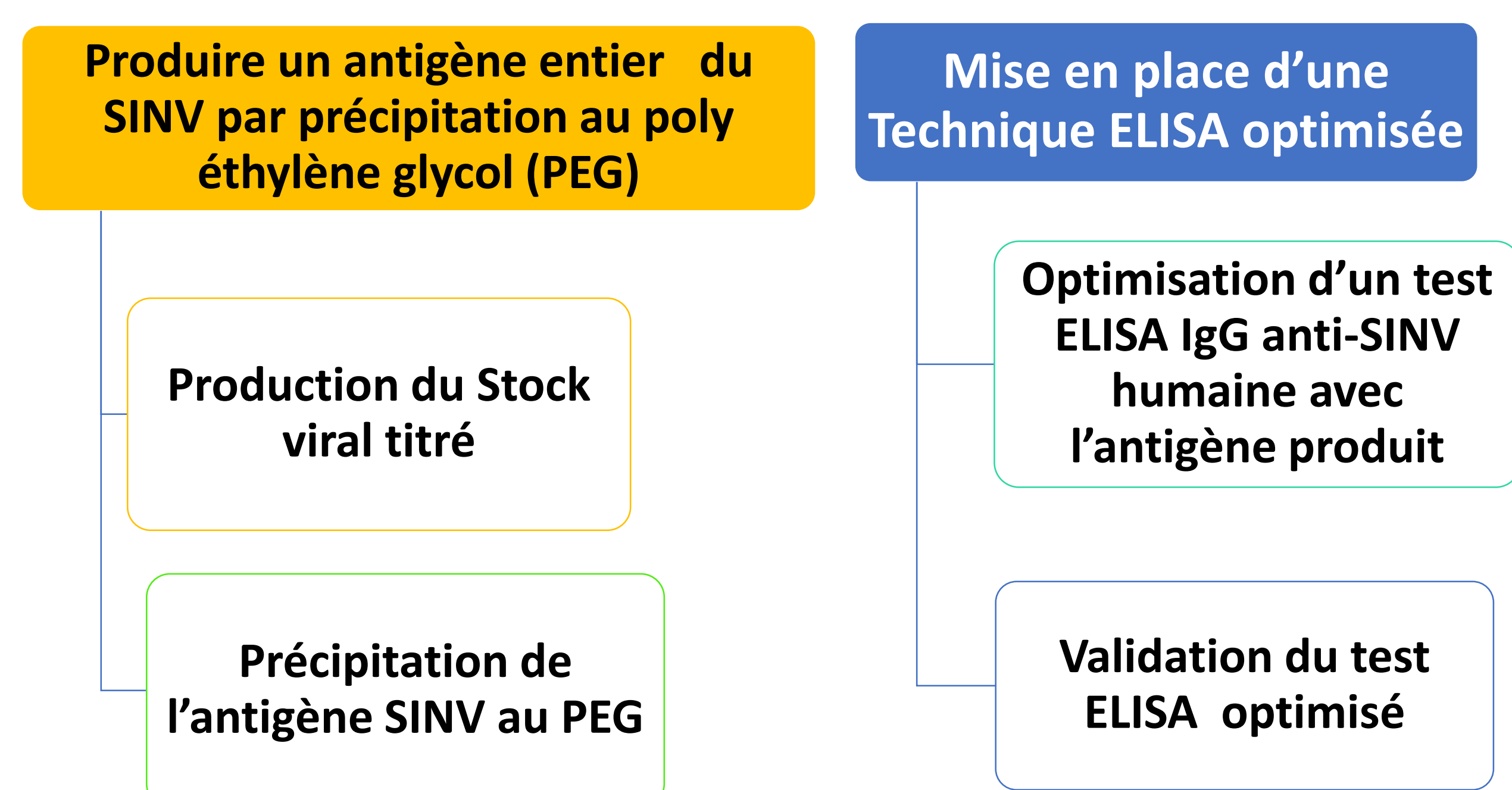
(3) Université d'Alger 1

Introduction

Le virus Sindbis (SINV) est un arbovirus du genre Alphavirus de la famille des Togaviridae qui peut infecter l'homme accidentellement via les piqûres de moustiques (Culex ou Aedes). L'infection chez l'homme se manifeste par une fièvre aiguë avec arthralgie, myalgie et une éruption cutanée.

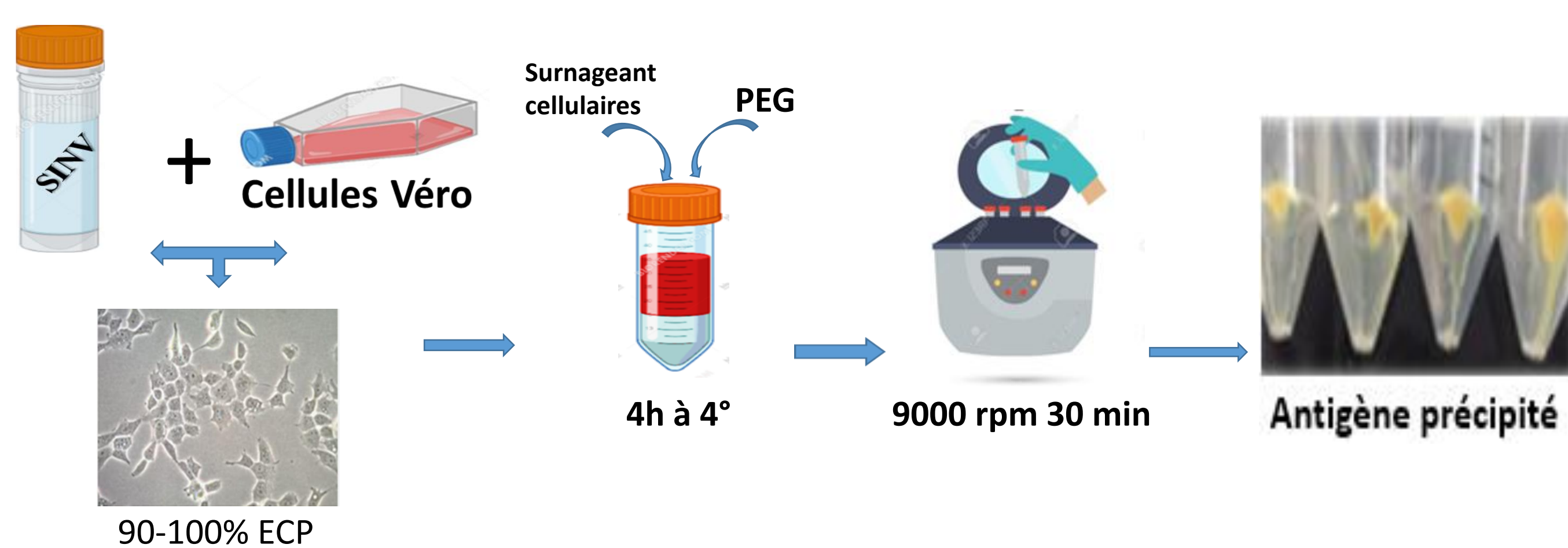
En 2017, le virus Sindbis a été identifié pour la première fois dans la région de Timimoune au sud d'Algérie et les données épidémiologiques sur ce virus restent mal connues dans notre pays, d'où l'intérêt des enquêtes sérologiques par des tests simples, rapides et moins coûteux, tel que ELISA, pour apprécier l'étendue de la circulation de ce virus en Algérie.

Objectif de ce travail

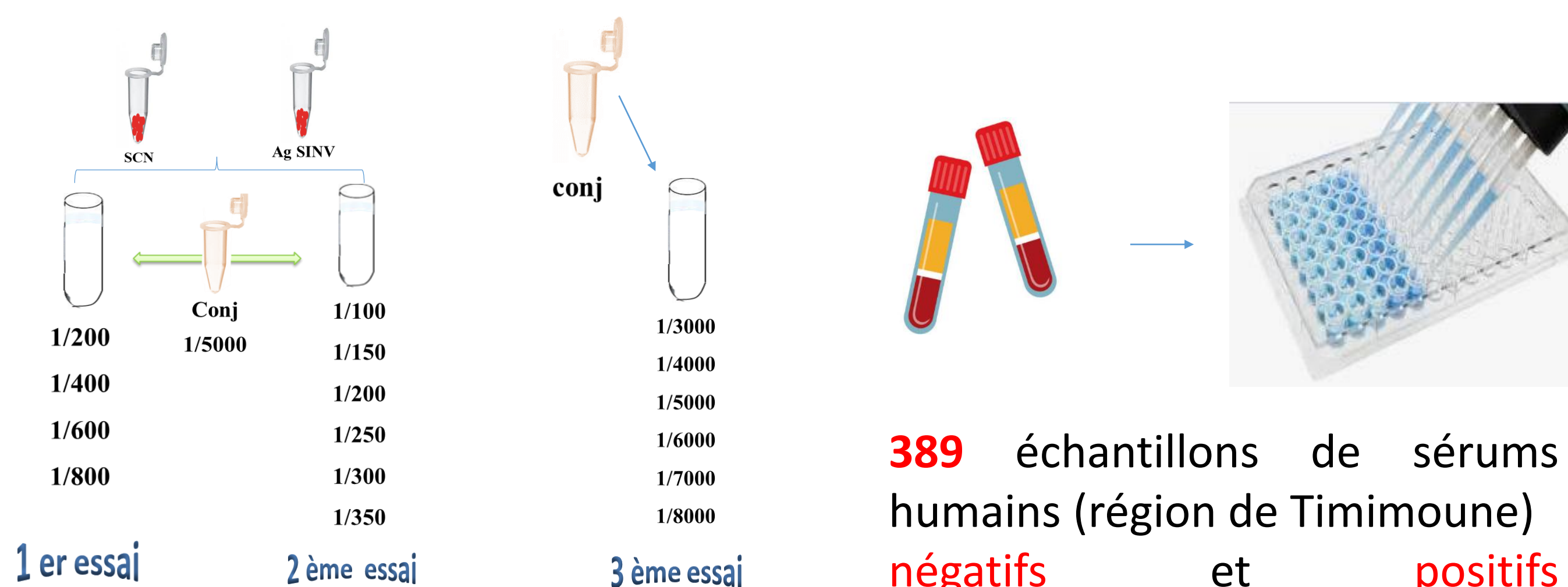


Matériel et Méthodes

Production d'antigène entier du SINV



Mise en place d'une Technique ELISA optimisée



389 échantillons de sérums humains (région de Timimoune) négatifs et positifs préalablement confirmé par technique de séroneutralisation

Optimisation de la technique ELISA

Validation analytique de la technique ELISA

SCN: Surnageant Contrôle négatif, Ag: Antigène produit, Conj: Conjugué (Ac anti-IgG humaine marqué à la peroxydase, CN: sérum contrôle négatif, CP: sérum contrôle positif)

Références bibliographiques

- Ayhan, N., Hachid, A., Thirion, L., Benallal, K., Pezzi, L., Khardine, FA., Benbetka, C., Benbetka, S., Harrat, Z & Charrel, R. (2022). Détection et isolement du virus Sindbis à partir de moustiques collectés sur le terrain à Timimoun, Algérie. *Virus*, 14(5), 894. <https://doi.org/10.3390/v14050894>
- Colombet, J., Robin, A., Lavie, L., Bettarel, Y., Cauchie, H. M., & Sime-Ngando, T. (2007). Viroplankton 'pegylation': use of PEG (polyethylene glycol) to concentrate and purify viruses in pelagic ecosystems. *Journal of microbiological methods*, 71(3), 212-219.
- Kennedy, N. (2019, 1 février). *Development of in house assays for detection of Sindbis virus infections*. <https://scholar.ufs.ac.za/items/84ab6a22-8a60-4286-87bc-d0bb31708d10>
- Koren, R., Bassal, R., Shohat, T., Cohen, D., Mendelson, E., & Lustig, Y. (2019b). Presence of Antibodies against Sindbis Virus in the Israeli Population: A Nationwide Cross-Sectional Study. *Viruses*, 11(6), 542. <https://doi.org/10.3390/v11060542>
- Kurkela, S., Manni, T., Myllynen, J., Vaheri, A., & Vapalahti, O. (2005). Clinical and laboratory manifestations of sindbis virus infection: Prospective study, Finland, 2002-2003. *Journal of Infectious Diseases*, 191(11), 1820-1829.
- Minić, R., & Živković, I. (2021). Optimization, Validation and Standardization of ELISA. Dans *IntechOpen eBooks*. <https://doi.org/10.5772/intechopen.94338>
- Payment, P. & Trudel, M. (1989). *manuel de techniques virologiques, isolement et identification des virus*, 21-44.
- Simard, C., Kibenge, M. T., Singh, P., & Dixon, P. (2001). Simple and rapid method for production of whole-virus antigen for serodiagnosis of caprine arthritis-encephalitis virus by enzyme-linked immunosorbent assay. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8(2), 352-356. <https://doi.org/10.1128/CDLI.8.2.352-356.2001>

Résultats et discussion

Tableau 1. La dilution optimal d'antigène

Dilutions Ag & SCN	1/100	1/150	1/200	1/250	1/300
ΔDO CN	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02
ΔDO CP	1.79	1.25	1.07	0.88	0.82

ΔDO = DO Ag SINV - DO Ag SCN CN: sérum contrôle négatif CP: sérum contrôle positif

Tableau 2. La dilution optimal du conjugué

Dilution conjugué	1/3000	1/4000	1/5000	1/6000	1/7000	1/8000
ΔDO CN	0.03	0.00	0.04	0.02	0.04	-0.02
ΔDO CP	0.69	0.59	0.54	0.44	0.36	0.29

➤ La dilution SCN/Ag au 1/100 est celle qui donnait la meilleure saturation de l'essai. On constate une baisse graduelle à raison de 0,25 en ΔDO pour les dilutions suivantes.

➤ on constate une stabilité des valeurs des ΔDO avec CP jusqu'à la dilution du conjugué au 1/5000, ce qui correspond à la dilution de saturation de l'essai ELISA.

Détermination du cut-off

➤ La valeur seuil du test ELISA a été déterminée en utilisant une série de 129 sérums négatifs en IgG SINV confirmés par la méthode de référence (séroneutralisation). Ce Cut-off permet de classer les résultats en positifs et négatifs en IgG anti-SINV

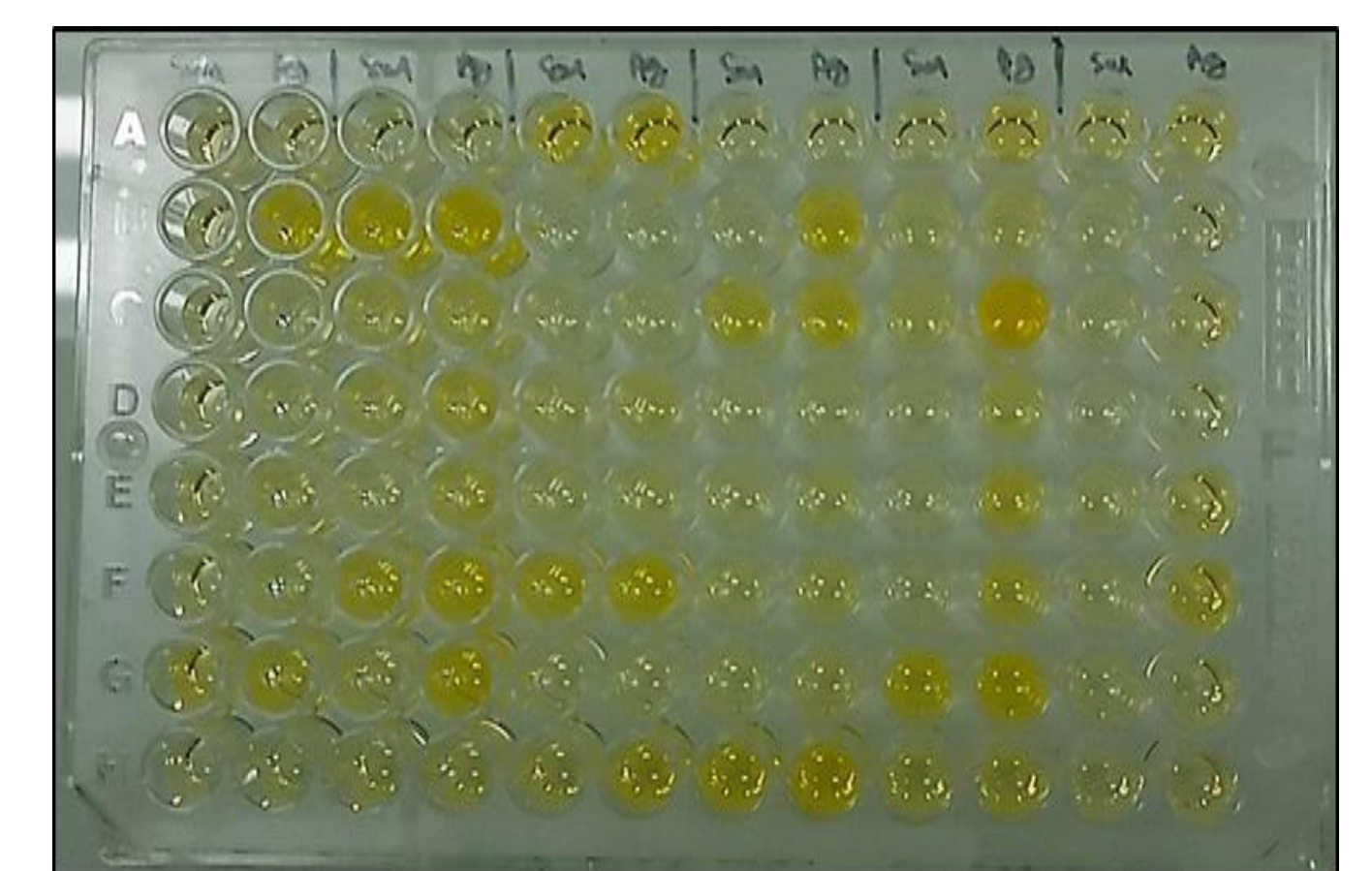


Figure 1. plaque de microtitration des sérums testés par la technique ELISA maison optimisée.

Cut off = moyenne ΔDO + 2 écart-types

Validation analytique de la technique ELISA

	Paramètres	Formule	Résultats
ELISA/ Séroneutralisation	Concordance	$(VN + VP) / N$	86%
	Sensibilité	$VP / (VP + FN)$	60%
	Spécificité	$VN / (VN + FP)$	92%

N: nombre totale d'échantillons ; VN: Vrais Négatifs, VP: Vrais positifs, FN: Faux Négatifs, FP: Faux Positifs

➤ Les résultats des tests de performances de l'ELISA optimisés comparé à ceux de la technique de référence (séroneutralisation) ont révélé une concordance de 86% qui est considérée comme une bonne corrélation entre les deux techniques

➤ Malgré la très bonne spécificité du test ELISA optimisé (92%), la sensibilité réduite de notre test (60%) peut être considéré comme une limitation à l'utilisation de ce test en pratique comme test screening en première intention, en raison de la proportion assez élevé des faux négatifs.

Conclusion et perspectives

➤ l'application de la technique de concentration au PEG pour produire l'antigène entier de SINV a permis d'obtenir des résultats intéressants.

➤ Les optimisations techniques qui ont été réalisées pour la mise en place d'un test ELISA indirecte pour la détection des IgG Humaines anti-SINV ont été prometteuses.

➤ les résultats obtenus constituent une base solide pour continuer le développement du test ELISA SINV, avec en perspective l'amélioration de la sensibilité de la technique par des optimisations pour d'autres paramètres expérimentaux tel que ; la dilution du sérum, temps d'incubation, ou bien l'amélioration de la concentration de l'antigène SINV par ajout des sels monovalent au PEG; afin de permettre d'envisager des applications en diagnostic clinique et les enquêtes séro-épidémiologiques.