

**REPUBLIQUE DU RWANDA**

**MINISTERE DE L'EDUCATION**

**INSTITUT D'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR DE RUHENGARI**

**(INES RUHENGARI)**

**FACULTE DES SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES**

**DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE**

**APPORT DE LA PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ET DES TESTS RAPIDES DANS LE DIAGNOSTIC PRECOCE DU VIH CHEZ LES ENFANTS EXPOSES (NES DES MERES SEROPOSITIVES AU VIH): CAS DU RWANDA**

PAR : KABALISA Emmanuel

TRAVAIL DE FIN DE CYCLE PRESENTE ET DEFENDU EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME DE LICENCE EN SCIENCES FONDAMENTALES ET APPLIQUEES

DEPARTEMENT DE BIOTECHNOLOGIE

DIRECTEUR : Dr HABUMUREMYI Sosthène

Mai 2010

## **DEDICACE**

A Dieu notre père ;

A nos regrettés parents qui nous ont mis au monde et ont guidé nos premiers pas ;

A notre épouse UMUTESI Clarisse et à nos deux fils KABALISA GANZA Dickson et KABALISA HIRWA Anderson qui ont accepté notre absence durant cette formation ;

A nos amis avec qui nous avons partagé le bien et le mal pendant notre formation ;

Je dédie ce travail.

## **REMERCIEMENTS**

Aux autorités de notre pays pour avoir accepté la fondation de l'INES ;

A l'INES Ruhengeri pour nous avoir donné une bonne formation ;

A Dr HABUMUREMYI Sosthène qui a accepté de diriger ce présent travail malgré ses multiples responsabilités ;

Nous témoignons notre gratitude à la Directrice Générale du LNR Dr MUKABAYIRE Odette et à tout son personnel pour avoir facilité notre recherche.

Que tous ceux qui nous ont aidé de près ou de loin trouvent ici notre profonde reconnaissance.

Nous vous adressons nos grands remerciements.

KABALISA Emmanuel

## TABLE DES MATIERES

DEDICACE .....	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
TABLE DES MATIERES .....	iv
SIGLES ET ABBREVIATIONS .....	vii
RESUME .....	viii
CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE .....	1
I.1. PROBLEMATIQUE .....	1
I.2. HYPOTHESE.....	2
I.3 OBJECTIF DE L'ETUDE.....	2
I.3.1.Objectif général .....	2
I.3.2.Objectifs spécifiques.....	2
I.4. DELIMITATION DU SUJET .....	2
I.5. CHOIX ET INTERET DU SUJET.....	2
I.6. METHODOLOGIE .....	2
I.7. SUBDIVISION DU TRAVAIL .....	2
CHAPITRE II : CADRE THEORIQUE PRESENTANT LE VIH/SIDA.....	3
II.1. HISTORIQUE.....	3
II.2. BIOLOGIE DU VIH.....	3
II.3. PHYSIOPATHOLOGIE ET REPLICATION DU VIH.....	5
II.4.MODES DE TRANSMISSION DU VIH .....	7
II.6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION A VIH.....	9
II.6.1.Le diagnostic indirect .....	9
II.6.1.1. Immunofluorescence .....	9
II.6.1.2. Techniques immuno-enzymatiques.....	10
II.6.1.2.1.Technique «sandwich » ou indirect.....	10
II.6.1.2.2 Technique par compétition.....	10
II.6.1.3.Technique par capture antigénique .....	11
II.6.1.4.Technique d'agglutination.....	11
II.6.1.5. Radio-immunoprécipitation (RIPA).....	11
II.6.1.6. Western Blot (ou immuno-transfert).....	11
II.6.2. Le diagnostic direct .....	12
II.6.2.1. La détection des antigènes du VIH .....	12
II.6.2.2. La culture virale .....	12
II.6.2.3. La détection des acides nucléiques viraux .....	12
II.7. Traitement du VIH .....	13
II.8. Prévention de l'infection à VIH .....	14
CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES .....	15
III.1. METHODOLOGIE DU TRAVAIL .....	15
III.1.1. Milieu du travail.....	15
III.1.1.1. Description et Situation Géographique du LNR.....	15
III.2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE .....	15
III.3 METHODES.....	16
III.3.1.ECHANTILLONAGE .....	16

III.3.2.LES CRITERES D'INCLUSION .....	17
III.3.3 LES CRITERES D'EXCLUSION.....	17
III.3.4. PRELEVEMENT DE L'ECHANTILLON .....	17
III.4.DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE .....	18
III.4.1.DIAGNOSTIC PAR LA PCR .....	18
III.4.1.1.Les étapes du diagnostic par la technique de PCR .....	18
III.4.1.2 PRINCIPE DU TEST .....	18
III.4.1.3. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRE POUR LE TEST DE PCR .....	18
III.4.1.3.1 Matériel fourni .....	18
III.4.1.3.1.1.Réactifs de préparation des échantillons.....	18
III.4.1.3.1.2 Réactifs d'amplification.....	19
III.4.1.3.1.3. Réactif de détection.....	19
III.4.1.3.1.4. Appareils nécessaires pour la PCR .....	19
III.4.1.4 La préparation de l'échantillon .....	20
III.4.1.5 Amplification au thermocycler .....	20
III.4.1.6. La détection.....	21
III.4.2. DIAGNOSTIC PAR LES TESTS RAPIDES.....	21
III.4.2.1. Les tests utilisés : .....	21
III.4.2.1.1.Détermine.....	21
III.4.2.1.2.Unigold .....	22
III.4.2.1.3.Cappillus .....	23
III.5.COLLECTE TRAITEMENT ET ANALYSE DES DONNEES .....	23
CHAPITRE IV : PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS .....	24
CONCLUSION.....	29
RECOMMANDATIONS .....	30
ANNEXES .....	31
BIBLIOGRAPHIE.....	34

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les échantillons selon la provenance.....	16
Tableau 2: La fréquence des échantillons selon l'âge de l'enfant (en mois). .....	16
Tableau 3: La fréquence des échantillons selon le sexe de l'enfant .....	17
Tableau 4: Les résultats des échantillons avec les tests rapides .....	24
Tableau 5: Résultats des tests rapides selon les tranches d'âges .....	24
Tableau 6: Les résultats des échantillons avec test de PCR.....	25
Tableau 7: Résultats de la PCR selon les tranches d'âges .....	26
Tableau 8: Analyse qualitative des résultats des tests rapides par la technique de PCR .....	26

## LISTE DES FIGURES

Figure 1: Structure du VIH .....	4
Figure 2: Infection d'un lymphocyte T4 Par le VIH.....	5
Figure 3: La cinétique des résultats positifs des tests rapides selon les tranches d'âge.....	25

## LISTE DES ANNEXES

Annexe 1: Protocole de Préparation et lavage de l'échantillon de DBS .....	31
Annexe 2: Préparation de la solution d'extraction.....	31
Annexe 3: Protocole de la détection .....	32
Annexe 4: Algorithme national de dépistage du VIH.....	33

## **SIGLES ET ABBREVIATIONS**

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

PCR : Polymerase Chain Reaction

SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Humaine

TRAC: Treatment and Research Aids Center

PMTCT: Prevention of Mother To Child Transmission (of HIV)

LTR: Long Terminal Repeat

CD4: Cluster of Differentiation: sont des protéines présentes à la surface des lymphocytes définies par les anticorps spécifiques qui les reconnaissent. Il en existe un très grand nombre (plus de 100) dont les CD4, les CD8, les CD3, etc....

ADN : Acide Désoxyribonucléique

ARN : Acide Ribonucléique

ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assays

RIPA: Radio-immunoprecipitation Assay

DBS: Dried Blood Spot

PBS: Phosphate Blood Spot

ARV: Antirétroviraux

LNR : Laboratoire National de Référence

PVV : Personnes vivants avec le VIH

LAV: Lymphadenopathy Associated Virus

HTLVIII: Human T-cell Leukemia Virus III

MVK: Mairie de la Ville de Kigali

## **RESUME**

Depuis des années, nous assistons à la croissance de l'infection à VIH/SIDA au Rwanda tant au milieu urbain qu'au milieu rural et au niveau de toutes les catégories humaines.

Le constat est que l'infection à VIH/SIDA diminue dans notre pays et qu'à ce jour, les mesures efficaces mises en place par notre pays sont efficaces pour lutter contre ce fléau.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes proposé de mener une étude objective sur cette question en faisant une étude prospective dans un laboratoire qui fait les diagnostics précoces des enfants exposés dans notre pays.

Le choix du LNR comme lieu d'étude nous a permis de mener notre travail avec les tests souhaités dans un bref délai.

Hypothèse a été vérifiée et les objectifs fixés ont été atteints. Nos résultats ont été obtenus grâce au diagnostic biologique utilisant les tests rapides de dépistage du VIH et les techniques de la biologie moléculaire (PCR).

Au terme de notre étude nous avons pu montrer l'importance de la technique de PCR dans le diagnostic précoce des enfants exposés à VIH (nés des mères séropositives au VIH)

## **SUMMARY**

Since many years we have the growth of HIV/AIDS infection in Rwanda in rural as in town and in different categories of people.

The observation is that the VIH/AIDS infection is in decrease in our country because of efficacy of measures in place against VIH.

Is in that context that we conducted a study in specialized laboratory were the early infant diagnosis is done in our country.

The choice of NRL as area of the study helped us to find tests to use in order to have laboratory results.

Our hypothesis was verified and the fixed objectives were achieved. We have our results with rapid tests and molecular technics (PCR).

At the end of our study we were able to show the importance of PCR in early infant diagnosis.

## CHAPITRE I: INTRODUCTION GENERALE

### I.1. PROBLEMATIQUE

Depuis qu'a commencé la pandémie du VIH, on estime que 5,1 millions d'enfants ont contracté l'infection dans l'ensemble du monde, presque toujours par transmission mère-enfant. En 2000, plus de 600000 enfants ont contracté l'infection, dont 90 % en Afrique. (<http://www.sogc.org/health/pregnancy-hiv>) [www.genie-bio.ac-](http://www.genie-bio.ac-))

Au Rwanda on estime un nombre de 6600 d'enfants qui sont sous traitement antirétroviraux. (*TRAC plus, 2009*)

Tout nouveau-né de mère séropositive au VIH est « séropositif au VIH » à la naissance, qu'il soit ou non infecté. Cela est dû au transfert passif des anticorps maternels de type IgG à travers la barrière placentaire. De ce fait, la sérologie reste positive jusqu'à la disparition des anticorps maternels (environ 18 - 24 mois) quel que soit le statut de l'enfant. Le diagnostic d'infection transmise le plus précoce possible repose sur la mise en évidence directe du virus ou de son génome dans l'organisme de l'enfant.

Une femme infectée au VIH peut transmettre le virus à son enfant pendant la grossesse, la naissance ou l'allaitement. On estime que la transmission par l'allaitement représente entre un quart et une moitié de toutes les infections par le VIH de la mère à l'enfant, selon la durée de l'allaitement. Et pourtant, parmi les bébés qui sont nés sans être infectés et qui sont allaités par des mères séropositives qui ne suivent pas de traitement, 80 % d'entre eux en moyenne ne sont pas infectés lorsque l'allaitement continue pendant deux ans.

Sans traitement, un tiers environ des mères séropositives pour le VIH transmettent le virus à leurs nouveau-nés pendant la grossesse, l'accouchement ou l'allaitement. En l'absence de toute intervention, 16 pour cent environ des nourrissons nés de mères séropositives seront infectés par l'allaitement maternel. La transmission du VIH peut se poursuivre tant que l'enfant est allaité au sein.

Il est plus ou moins impossible de rechercher une infection par le VIH chez les enfants nés d'une mère séropositives pour le VIH à l'aide du test ELISA ou un autre test qui cherche les anticorps en raison du passage transplacentaire des anticorps maternels. Pour cette raison, l'utilisation de la PCR est recommandée chez les enfants de moins de 18 mois, le test ELISA étant utilisé chez les enfants plus âgés, les anticorps maternels ayant disparu.

Sans la technique de PCR les enfants exposés attendraient 18 mois pour confirmer ou infirmer l'infection, alors connaître le statut de l'enfant, le mettre sous traitement le plus tôt possible m'a poussé de mener une étude pour montrer l'importance de la PCR chez les enfants exposés.

## **I.2. HYPOTHESE**

La technique de PCR serait importante dans le diagnostic du VIH chez les enfants nés des mères à VIH.

## **I.3 OBJECTIF DE L'ETUDE**

### **I.3.1.Objectif général**

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'apport des techniques de laboratoire utilisées au Rwanda dans le diagnostic du VIH chez les enfants exposés (nés des mères séropositives à VIH).

### **I.3.2.Objectifs spécifiques**

- Montrer l'apport de la technique de PCR dans le diagnostic précoce des enfants exposés à VIH.
- Montrer la sensibilité et la spécificité des tests rapides utilisés dans le diagnostic précoce des enfants exposés à VIH.

## **I.4. DELIMITATION DU SUJET**

Notre étude s'est limitée sur les premiers 100 échantillons venant de tous les coins du pays qui sont reçus au LNR durant la période du Janvier 2010.

## **I.5. CHOIX ET INTERET DU SUJET**

- Vu la problématique du VIH/SIDA au Rwanda, nous avons jugé nécessaire d'aborder ce sujet pour apporter notre contribution au diagnostic précoce des enfants exposés à VIH/SIDA.
- Ce travail entre également dans une ligne de formation que nous avons reçue dans l'application des techniques de la biologie moléculaire et d'immunologie.

## **I.6. METHODOLOGIE**

C'est une étude prospective menée pendant un mois au LNR. Les 100 premiers échantillons de DBS du moins de Janvier ont été testés par la technique de PCR et celle des tests rapides en vue de trouver les informations recherchées.

## **I.7. SUBDIVISION DU TRAVAIL**

Notre travail est subdivisé en 3 parties : la première partie représente une brève introduction de ce travail. La deuxième partie représente la partie théorique sur les différents aspects du VIH. La troisième partie représente la partie expérimentale de notre étude qui montre la méthodologie, la présentation et l'analyse des résultats, la conclusion et les recommandations proposées.

## **CHAPITRE II : CADRE THEORIQUE PRESENTANT LE VIH/SIDA**

### **II.1. HISTORIQUE**

En 1981, le centre de contrôle des maladies d'Atlanta aux Etats-Unis d'Amérique publie des observations cliniques particulières dues à des agents pathogènes inconnus.

Ce syndrome était observé dans la majorité des cas chez les homosexuels et les jeunes drogués de New York ainsi que les ressortissants de Haïti et du Zaïre. On a observé chez certains malades des pneumonies dues à pneumocystis carinii et le sarcome de Kaposi. Il semble que des cas cliniques semblables ont été observés bien avant cette date et que ce n'était pas le seul continent nord American qui était visé mais aussi l'Europe et l'Afrique. C'est en 1983 que fut découvert l'agent responsable du SIDA.

La découverte fut réalisée par une équipe française du professeur Luc MONTANGIER qui envoyant une souche à une équipe américaine conduite par professeur Robert GALLO pour confirmer l'agent trouvé. L'appellation donnée par l'équipe française est LAV (Lymphadenopathy Associated Virus). Tandis que celle des Américains est HTLV III (Human T-Cell Leukemia Virus II).

Pour mettre fin à la polémique entre les deux équipes et surtout pour éviter plusieurs appellations pour un même virus, le Comité International de Taxonomie Virale a décidé d'appeler le virus découvert VIH (Virus de l'Immunodéficience Humaine pour les francophones) et Anglo-saxons HIV (Human Immunodeficiency Virus). (*Gentilini .,1989*)

Un peu plus tard, un deuxième virus fut isolé chez les ressortissants de l'Afrique occidentale. Ce virus était semblable à bien des égards au premier, mais à la différence de celui-ci, ce deuxième virus était cantonné en Afrique. Ce virus « ouest Africain » fut baptisé VIH 2 ou HIV2 ainsi donc le premier devient VIH1 ou HIV1. Suite aux mouvements migratoires très actifs, les deux virus semblent cohabiter un peu partout mais avec une prédominance du VIH1 (*Gentilini .,1989*)

### **II.2. BIOLOGIE DU VIH**

Les virus appartiennent à la famille des rétrovirus. Ces rétrovirus sont des virus à enveloppe qui mesurent un dix-millième de millimètre et qui ont la particularité de posséder un ARN qui, grâce à une enzyme spécifique « La transcriptase reverse » est transcrit en une copie d'ADN à l'intérieur de la cellule. C'est cette copie qui parvient à s'intégrer au sein des longs rubans LTR de l'ADN cellulaire qui constituent les chromosomes.

Le VIH est un rétrovirus à ARN

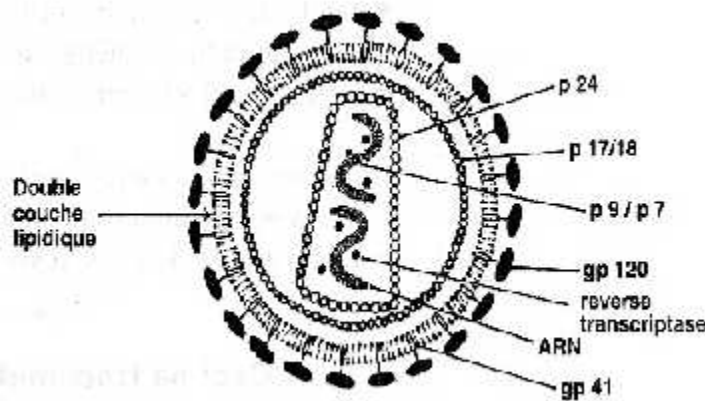
L'enveloppe externe comprend 2 glycoprotéines majeures, gp120 et gp41

Le core du virus comprend 2 copies d'ARN viral et 3 enzymes essentielles pour la réplication virale:

- La reverse transcriptase
- L'intégrase
- La protéase

### Structure Antigénique du VIH

- Protéines de structure interne (matrice, capsid)
  - Gènes gag: VIH-1 = p17, p24, p55
- Protéines d'enveloppe (les plus exposées),
  - Gènes env: VIH-1 = gp160, gp120, gp41
- Protéines enzymatiques (cibles des ARV): Reverse Transcriptase, Protéase, Intégrase)
  - gènes pol: VIH-1 = p66, p51



**Figure 1:** Structure du VIH

**Source :** ([www.genie-bio.ac-versailles.fr/.../L\\_infection\\_par\\_le\\_VIH.doc](http://www.genie-bio.ac-versailles.fr/.../L_infection_par_le_VIH.doc))

L'ADN du virus ou provirus comporte un ensemble de gènes qui sont à nouveau transcrits en ARN dit messager, parce qu'ils induisent la synthèse des protéines du virus, qui s'assemblent pour former des particules virales qui bourgeonnent à la surface de la cellule et le cycle alors recommence.

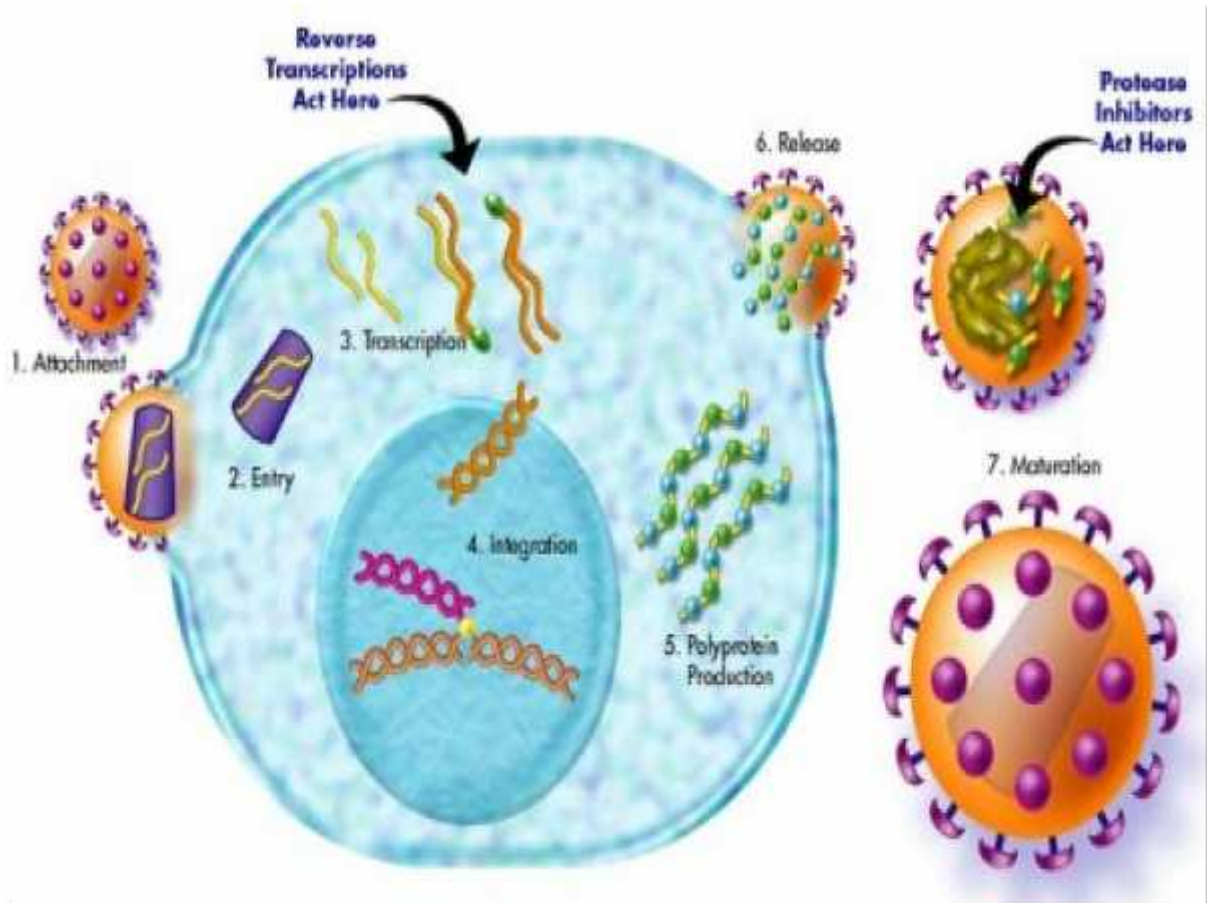
La phase d'intégration du provirus aux chromosomes de la cellule peut être «muette» : la bande magnétique du virus peut ne pas être lue, et la cellule peut se diviser en transmettant les gènes viraux à sa descendance. Le VIH est associé à des pathologies lentes et dégénératives : il a une affinité particulière pour certaines composantes du système immunitaire, les lymphocytes T4 ayant des récepteurs membranaires spécifiques pour le VIH et ces récepteurs sont codés sous CD4.

### II.3. PHYSIOPATHOLOGIE ET REPLICATION DU VIH

Les VIH sont des virus qui s'attaquent principalement à certaines populations lymphocytaires et à d'autres cellules ayant à leur surface le récepteur viral (CD4)

Une fois arrivé dans la cellule hôte, le virus transcrit son matériel génétique qui est sous forme d'ARN en ADN grâce à la transcriptase reverse, puis cet ADN est intégré dans l'ADN de la cellule infectée. Ainsi donc, cette dernière héberge désormais le provirus VIH.

Ce provirus sera dans la suite transcrit et traduit en même temps que l'ADN de la cellule infectée. De ceci résultera la synthèse des protéines virales (protéines et glycoprotéines) qui finiront par s'assembler et produire des nouvelles particules virales.



**Figure 2:** Infection d'un lymphocyte T4 Par le VIH

**Source :** (LNR 2009)

Le génome viral possède 2 sortes de gènes :

- Gène de structure
- Gène de régulation

Les gènes de structure sont responsables de la synthèse des protéines et des glycoprotéines qui donnent au virus des caractéristiques morphologiques.

Les gènes de régulations stimulent la synthèse des protéines. Celles-ci sont capables d'influencer les activités des autres composants viraux. Ces protéines souvent agissent sous forme d'enzymes et activent ou inactivent d'autres gènes. On assiste ainsi à l'augmentation ou à la diminution de la réplication et de l'activité virale. Un portage asymptomatique prolongé du VIH proviendrait d'une part de cette régulation négative.

Un fait important à signaler est que le virus est capable de changer ses composants structurels notamment les antigènes d'enveloppe, ce qui rend impuissante la réaction immunitaire à enrayer l'infection. ([www.vih.org/.../dépistage-recommandations-has-1257](http://www.vih.org/.../dépistage-recommandations-has-1257))

Une fois que le génome viral est intégré à l'ADN de la cellule hôte, le provirus commence à commander la formation des nouveaux virions. A ce moment, certaines sont détruites, d'autres fusionnent (syncita) et d'autres continuent à exister sans aucune perturbation visible.

Les VIH s'attaquent principalement aux lymphocytes T4 or ce sont ces cellules qui sont chargées de l'organisation des différents mécanismes de la défense de l'organisme.

On comprend alors très bien pourquoi les VIH entraînent un effondrement de ces mécanismes, lequel effondrement va se caractériser par des infections ou maladies opportunistes. Normalement les lymphocytes T (T4 et T8) représente 70 à 90% de tous les lymphocytes.

Leur nombre absolu se situe aux environs d'un millier de cellules par millimètre cube.

La diminution des lymphocytes T4 s'accompagne d'une augmentation des lymphocytes T8.

En outre, la destruction des T4 se fait progressivement (50 à 100 cellules par /mm<sup>3</sup>/an)

Lorsque le nombre des lymphocytes T4 devient inférieur à 500, les signes cliniques commencent à apparaître.

Au laboratoire on détermine souvent le rapport T4/T8 pour évaluer l'état clinique du patient, car T4 est à peu près 60% et T8 à peu près 30% alors normalement ce rapport doit être supérieur à 1.5.

Quand ce rapport est au dessous de 1, on parle d'une inversion du rapport et dans ce cas le pronostic est défavorable. (*Hervé., 2009*)

## **II.4.MODES DE TRANSMISSION DU VIH**

Les différentes études épidémiologiques ont montré trois modes de transmission du VIH :

- La transmission sexuelle
- La transmission parentérale
- La transmission verticale

### **Transmission sexuelle**

Le sperme et les sécrétions vaginales contiennent chez les personnes infectées le virus.

Les risques de transmission du VIH augmentent en présence de lésions ulcérées des muqueuses génitales, et le stade de la maladie. Les relations homosexuelles avec pénétration anale constituent le mode de transmission le plus aisé du VIH.

Selon les études, on estime que la transmission homme-femme est entre 50 et 60% et femme-homme entre 10 et 15%.

### **Transmission parentérale**

Pour ce cas de transmission, on peut évoquer la transfusion sanguine mais actuellement au niveau mondial ce risque d'acquisition du virus par transfusion a fortement diminué parce que le sang est testé avant la transfusion.

### **Transmission verticale**

Dans la majorité des cas, la transmission du VIH de la mère à l'enfant s'effectue pendant la grossesse, surtout au cours de l'accouchement. Le risque de transmission de la mère à l'enfant est également lié à l'état clinique et immunologique de la mère. Plus une mère est malade ou immunodéprimée, plus elle est susceptible de transmettre le virus à son enfant. La transmission au moment de l'accouchement est aussi possible.

### **Transmission par le lait maternel**

Le lait maternel peut contenir aussi le VIH si un enfant est né de mère séropositive à VIH sans transmission verticale, cet enfant peut être contaminé par le lait maternel favorisé par la présence de petites ulcérations au niveau de la bouche et du tube digestif.

## **II.5. LES SIGNES CLINIQUES ASSOCIES A L'INFECTION A VIH**

*(Gentilini, 1989)*

Suite à la destruction de la défense de l'organisme par le VIH, des maladies de tout genre et d'origines diverses profitent de l'occasion pour attaquer l'homme séropositif.

Alors certains germes saprophytes chez un individu normal deviennent pathogènes chez les immunodéprimés.

Certains malades supportent l'infection pendant un temps plus ou moins long, d'autres tombent malades plus rapidement. Les signes cliniques apparaissent progressivement. On note également plusieurs aspects différents chez les malades.

### **Parasitaires**

- Cryptosporidiose avec diarrhée > 1 mois ;
- Pneumocystose pulmonaire ;
- Anguillulose pulmonaire, cérébrale, disséminée ;
- Toxoplasmose pulmonaire, cérébrale.

### **Fongiques**

- Candidose œsophagienne ;
- Cryptococcose pulmonaire, neuro-méningée, disséminée ;
- Aspergillose pulmonaire, cérébrale, disséminée.

### **Bactériennes**

- Mycobacterium tuberculosis

### **Virales**

- Cytomegalovirose pulmonaire, digestive, encéphalite ;
- Herpes, virose cutaneo-muqueuse chronique, digestive, disséminée ;
- Leucoencéphalite multifocale progressive.

### **Néoplasies**

- Sarcome de kaposi
- Lymphome malin cérébral isolé.

## **LES SIGNES CLINIQUES DU SIDA DE L'ENFANT EN AFRIQUE**

- Critères majeures :

-Amaigrissement > 10%  
-Diarrhée > 1mois  
-Fièvre > 1mois (continue ou intermittente) ;

- Critères mineurs  
-Toux persistante ;

- Candidose oropharyngée ;
- Infections banales récidivantes (otite, pharyngite) ;
- Infection à VIH confirmé chez la mère ;
- Lymphoadénopathie

- Critères d'exclusion ;
- Cancer ;
- Malnutrition sévère ;
- Autres étiologies.

N.B La présence d'au moins 2 critères majeures et d'au moins 2 critères mineurs permet de poser le diagnostic de SIDA

## II.6. DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE L'INFECTION A VIH

Dans l'état actuel de nos connaissances, l'infection humaine par le VIH est un processus chronique qui fait coexister, dans l'organisme infecté, le virus et la réponse immunitaire dirigée contre lui.

Le diagnostic biologique de l'infection à VIH repose sur la mise en évidence des anticorps spécifiques dirigés contre ce virus. (Diagnostic sérologique ou indirect), et sur la détection du virus lui-même ou certains de ses composants (diagnostic direct).

De nos réalisations plus simples, le diagnostic sérologique suffit dans la majorité des cas pour affirmer l'infection par le VIH. Il y a des situations cependant où le diagnostic indirect est en échec, ce qui exige le recours aux techniques plus lourdes du diagnostic direct. (Klase.,2009.)

### II.6.1.Le diagnostic indirect

Les protéines virales sont immunogènes, donc inductrices d'anticorps chez le sujet infecté. De nombreuses méthodes sont à la disposition des laboratoires pour le dépistage de ces anticorps.

#### II.6.1.1. Immunofluorescence

L'immunofluorescence est une excellente technique de détection des anticorps dirigés contre les glycoprotéines membranaires et transmembranaires spécifiques de l'infection par le VIH.

**Principe :** Des cellules lymphocytaires infectées par le virus sont déposées et fixées sur des lames de microscope, des cellules identiques non infectées servent de témoins et permettent d'éliminer les fixations non spécifiques. Le sérum à étudier est incubé ; les anticorps présents se fixent sur les cellules et sont relevés par une anti-globuline humaine marquée

à l'isothiocyanate de fluorescéine, une réaction se traduit par une fluorescence visible uniquement à la périphérie des cellules infectées.

### II.6.1.2. Techniques immuno-enzymatiques

La technique immuno-enzymatique la plus utilisée actuellement pour la recherche des anticorps anti VIH est ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assays). C'est une méthode simple, sensible spécifique, destinée au dépistage de grandes séries de sérums. Dans cette réaction l'antigène viral est fixé par absorption physique à un support solide (microplaque ou bille de polystyrène). On dispose de plusieurs variétés d'ELISA qui servent à la détection des anticorps anti-VIH. Elles sont classées en 3 catégories ; indirecte, par compétition et par capture antigénique. (*Hervé.,.2009*)

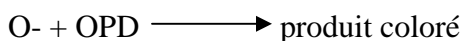
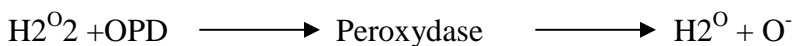
#### II.6.1.2.1. Technique «sandwich » ou indirect

**Principe :** Le sérum à étudier est mis d'abord à incuber en présence du support sensibilisé : microplaque ou bille ; des complexes antigènes-anticorps se forment et leur présence est révélée dans un second temps, par l'adjonction d'un sérum anti-globuline humaine marqué par une enzyme ; après une phase de lavage minutieux, le substrat de cet enzyme donnera une réaction colorée d'autant plus intense que le sérum est riche en anticorps. Des témoins positifs et négatifs inclus dans chaque réaction permettent de déterminer par un calcul légèrement différent selon les trousseaux. La valeur seuil ou limite ; les sérums dont la densité optique lue au spectrophotomètre est supérieure à cette valeur sont considérées comme positifs

#### II.6.1.2.2 Technique par compétition

La première étape peut être celle de l'ELISA indirect ou celle de l'ELISA par capture antigénique .Au moment de l'addition du sérum du malade, on ajoute simultanément l'anticorps anti VIH marqué à l'enzyme, puis les autres étapes sont identiques que dans les épreuves précédentes. La différence va se trouver à la lecture ou un résultat positif se révèle par l'absence de la coloration.

**Remarque :** Chaque ELISA a ses avantages et ses inconvénients. Cependant il est important de viser toujours la spécificité et la sensibilité. Une méthode qui a à la fois une sensibilité et une spécificité est une méthode efficace. Seulement les résultats de ces épreuves qui sont par ailleurs des épreuves de dépistage, doivent être confirmés par une méthode plus performante. L'enzyme utilisée dans les ELISA est soit une phosphatase alcaline, soit une peroxydase de raifort. Cet enzyme modifie le substrat en présence du chromogène qui produit un résultat coloré selon la réaction suivante :



### **II.6.1.3. Technique par capture antigénique**

Pour rendre les ELISA plus spécifiques, des anticorps monoclonaux (anticorps anti – antigènes viraux) sont d’abord fixés sur la phase solide et on y ajoute des antigènes viraux qui sont capturés par les anticorps monoclonaux. Le reste de la réaction peut se faire comme un ELISA indirect ou un ELISA par compétition.

### **II.6.1.4. Technique d’agglutination**

Certains réactifs sont basés sur le principe d’agglutination passive : des billes de polystyrène ou des hématies humaines servent de support aux protéines virales du VIH (naturelles ou produites par génie génétique) ; mise en présence d’anticorps anti VIH elles forment un réseau d’agglutination visible à l’œil nu ; ces tests peuvent s’effectuer sur lame (test au latex) ou sur plaque de micro-agglutination (hemagglutination passive avec lecture du culot de sédimentation des hématies). Cette technique d’agglutination présente quelques avantages par rapport aux autres techniques : son exécution est facile, simple ne nécessite aucun appareillage, elle d’un coût accessible et est facile et sensible. (Villanova., 2007)

### **II.6.1.5. Radio-immunoprécipitation (RIPA)**

Elle utilise un virus marqué par un isotope radioactif (en général cystéine 35) ; le lysat viral contenant les antigènes à l’état nocif est incubé avec le sérum à tester. Les complexes immuns formés sont alors captés sur un support d’affinité telle que des billes de protéines. A-cepharose.

Les antigènes viraux retenus par les anticorps spécifiques sont ensuite élués et séparés en fonction de leurs poids moléculaire sur un gel polyacrylamide. La révélation est effectuée par autoradiographie.

### **II.6.1.6. Western Blot (ou immuno-transfert)**

Il est considéré aujourd’hui comme la technique de référence pour la confirmation d’une séropositivité VIH.

**Principe :** Dans un premier temps, les protéines virales sont séparées selon leur masse moléculaire par une électrophorèse sur gel de polyacrylamide et en milieu dissociant, puis transférées sur une bande de nitrocellulose ; cette dernière est ensuite découpée en bandes longues et étroites.

Dans un second temps, les sérums à tester sont mis à incuber en présence des bandelettes de nitrocellulose ; les anticorps présents se fixent en fonction de leur spécificité sur les

protéines virales préalablement séparées ; on relève leur présence par addition d'une antiglobuline humaine marquée par une enzyme, puis d'un substrat chromogène.

La présence d'anticorps anti-protéines constitutives du virus dans les échantillons étudiés se traduit par l'apparition de bandes spécifiques colorées dont la position correspond aux masses moléculaires des protéines majeures du virus.

On connaît au niveau du VIH :

- Les gp160, gp120 et gp41 correspondant aux glycoprotéines d'enveloppe (gène env.) ;
- Les P66, P55, P51, P31, P24, P17, et P15 correspondant aux gènes Pol et gag

## **II.6.2. Le diagnostic direct**

### **II.6.2.1. La détection des antigènes du VIH**

La détection des antigènes du VIH est réalisée par une méthode ELISA dans le sérum, le plasma, le liquide céphalo-rachidien ou tout autre liquide biologique.

Le principe général de cette technique est le suivant : les anticorps d'un sérum polyclonal anti-VIH, fixés sur le fond des puits d'une microplaque ou sur des billes de polystyrène, sont mis en présence du sérum humain à tester et se lient à l'antigène viral éventuellement présent.

Après des lavages répétés, la présence de l'antigène est révélée par des anticorps anti-VIH de lapin ou de chèvre (l'antigène est donc associé « en sandwich » avec deux types d'anticorps), eux-mêmes révélés par une réaction colorimétrique grâce à l'adjonction anti-chèvre ou anti-lapin conjuguée à une enzyme.

La présence de l'antigène se traduit par l'apparition de la coloration spécifique du produit de la réaction enzymatique et l'intensité de la coloration permet une quantification de cet antigène.

### **II.6.2.2. La culture virale**

L'isolement viral est une technique coûteuse en temps et en moyens, du fait de la durée de la culture et des moyens mis en œuvre pour détecter le virus. De plus, le risque lié à la multiplication d'un virus hautement pathogène impose de travailler dans des conditions de sécurité bien codifiées, au sein des laboratoires spécialement équipés de façon à protéger aussi bien, les manipulateurs que les personnes de l'environnement.

### **II.6.2.3. La détection des acides nucléiques viraux**

La détection d'un acide nucléique viral est réalisée par hybridation moléculaire, la spécificité est excellente, liée à la stricte complémentarité des bases entre la sonde marquée et l'acide nucléique recherché. L'analyse peut être pratiquée sur du matériel biologique, dont l'infectiosité virale a été perdue du fait que les acides nucléiques sont en général

beaucoup plus résistants que les structures protéiques virales impliquées dans l'infection des cellules.

Enfin il existe la possibilité d'étudier non seulement la présence du virus mais également son niveau d'expression par la quantification de ses ARN messagers, ce qui permettrait de mieux évaluer l'évolutivité de l'infection, l'amplification de séquence, encore appelée PCR (Polymerase Chain Reaction).

**Principe :** Son principe est de synthétiser in vitro de multiples copies d'une courte séquence des acides nucléiques viraux contenus dans le prélèvement, ce procédé facilite de façon spectaculaire la détection de cette séquence, la réaction d'amplification se fait à partir de l'ADN, dans le cas du VIH, on recherche directement la présence de l'ADN proviral intégré dans l'ADN cellulaire ou la présence des ARN génomiques en faisant procéder à l'amplification d'une étape de transcription inverse qui transforme l'ARN en ADN. En pratique, on utilise une paire d'oligonucléotides, chacun étant complémentaire d'un des brins d'ADN viral et correspondant à une des extrémités de la séquence (longue en règle de 200 à 1000 bases) que l'on a choisi d'amplifier.

Ces oligonucléotides servent d'amorces pour une synthèse de brin complémentaire de cette séquence et cette synthèse est recommencée en grand nombre de fois. L'amplification de la séquence choisie est non pas linéaire mais exponentielle car les brins d'ADN nouvellement synthétisés servent à leur tour de matrice pour les synthèses suivantes, on peut aussi obtenir une amplification de séquences d'un million de fois au bout de 20 cycles de réaction. Le produit d'amplification est alors analysé par électrophorèse et la séquence amplifiée apparaît sous la forme d'une bande après coloration au bromure d'ethidium ou après hybridation avec une sonde correspondant à cette séquence.

## II.7. Traitement du VIH

Depuis 1987, date de l'introduction de la première thérapie anti-VIH (la zidovudine ou l'AZT) les perspectives thérapeutiques ont radicalement changées. Nous disposons aujourd'hui d'un large éventuel d'antirétroviraux appartenant à quatre classes différentes :

- Les inhibiteurs nucleosidiques de la transcriptase reverse ;
- Les inhibiteurs non nucleosidiques de transcriptase reverse ;
- Les inhibiteurs de la fusion
- Les inhibiteurs de la protéase.

Le nombre de substances disponibles n'a cessé de croître et en 1998 près d'une quinzaine de composés sont utilisables et aujourd'hui il existe une vingtaine. Les trithérapies contenant des antiprotéases permettent d'inhiber presque totalement la réplication virale, faisant penser qu'un jour l'éradication du virus sera possible. Même sans éradication, la survie des patients ne sera peut être plus affectée que marginalement par l'infection à VIH et celle-ci sera dès lors une maladie chronique (**Laurent ., 1998**).

## **II.8. Prévention de l'infection à VIH**

Toute fois, à cause de l'absence de vaccin et de traitement efficace, la lutte contre l'infection à VIH repose sur l'information et l'éducation de la population, on peut évoquer aussi la formation et l'information des professionnels de santé sur la prise en charge des personnes infectées par le VIH. L'abstinence et l'utilisation du condom pendant les rapports sexuels restent les meilleurs outils de la prévention de l'infection à VIH.

## **II.9. Situation épidémiologique du VIH/SIDA au Rwanda**

Le Rwanda est un pays situé en Afrique Centrale, entouré par l'Ouganda au Nord, la Tanzanie à l'Est, la République Démocratique du Congo à l'Ouest et le Burundi au sud. Avec une superficie de 26.338 Km<sup>2</sup> et une population estimée à 10.000.000 habitats en 2010, sa densité est d'environ 336 habitats au Km<sup>2</sup> et figure parmi la plus élevée d'Afrique.

Le Rwanda est caractérisé par une population jeune. En effet 49% de la population a moins de 15 ans et 60% a moins de 20 ans. Les personnes âgées de plus de 65 ans ne représentent que 3% de la population. De ce fait on pourrait conclure que notre pays est à haut risque car ce sont des jeunes qui représentent la grande majorité de la population.

La pauvreté, la mobilité géographique des forces armées, la migration scolaire, la mobilité des routiers et les migrations volontaires ou forcées suite à la guerre et au génocide de 1994, ont contribué à exposer un grand nombre des différentes personnes aux comportements à risque d'infection par le VIH/SIDA (*CNLS, 2002.*)

Au Rwanda, les données épidémiologiques recueillies auprès du TRAC plus indiquent une prévalence de 3% dans la population rwandaise. (*MINISANTE, 2005*)

## **CHAPITRE III. MATERIEL ET METHODES**

### **III.1. METHODOLOGIE DU TRAVAIL**

#### **III.1.1. Milieu du travail**

##### **III.1.1.1. Description et Situation Géographique du LNR**

Le Laboratoire National de Référence (LNR) a été établi en 2003, par l'arrêté ministériel. Il est situé dans la Mairie de la Ville de Kigali, District de NYARUGENGE, plus précisément à côté du CHUK (Centre Hospitalier Universitaire de Kigali), et en face de l'hôtel SERENA. Le LNR est formé de cinq Unités : IMMUNOVIROLOGIE, BIOCHIMIE –HEMATOLOGIE CLINIQUE, MICROBIOLOGIE, ADMINISTRATION et ICT.

Le LNR a pour missions de :

- Assurer les formations et un appui technique au personnel des laboratoires des hôpitaux de références, hôpitaux de district et de centres de santé.
- Mettre en place un réseau fonctionnel des laboratoires nationaux.
- Etablir un programme national et spécifique d'assurance qualité.
- Faire des tests de laboratoire spécialisés, tel que la charge virale du VIH, la DNA-PCR pour le diagnostic précoce des enfants nés de mères séropositives, les cultures et antibiogrammes de mycobacterium tuberculosis, etc.
- Soutenir la surveillance épidémiologique des maladies prioritaires ainsi que les maladies émergentes et ré émergentes ainsi que de faire des études de recherche.

#### **III.2. TYPE ET PERIODE D'ETUDE**

C'est une étude prospective et expérimentale menée en Janvier 2010 au LNR.

La technique de PCR et celle des tests rapides de dépistage du VIH sont utilisées pour trouver les résultats de laboratoire.

L'extraction est faite dans un milieu stérile en utilisant la hotte à flux laminaire

L'amplification est faite en utilisant l'appareil Thermocycler

Le lavage par laveur, la détection par spectrophotomètre.

Les tests rapides utilisés sont : Détermine, Unigold et Cappillus

### III.3 METHODES

#### III.3.1.ECHANTILLONAGE

Les 100 premiers échantillons de DBS du mois de Janvier 2010 des enfants de tranche d'âge de 6 semaines à 9 mois nés des mères séropositives au VIH sont testés en vues de trouver les informations recherchées.

#### Répartition des échantillons

##### Tableau 1 : Les échantillons selon la provenance

Le tableau numéro 1 montre le nombre des échantillons selon la provenance, on observe grand nombre venant de la province du Sud(29) et un petit nombre venant de la Mairie de la Ville de Kigali(11)

No	Province	Nombre
1	MVK	11
2	Nord	22
3	Sud	29
4	Est	16
5	Ouest	22
	<b>Total</b>	<b>100</b>

##### Tableau 2: La fréquence des échantillons selon l'âge de l'enfant (en mois).

Le tableau 2 montre la population de notre étude selon l'âge des cas. Nous observons un grand nombre d'échantillons issus des enfants de 6 à 8 mois, pour voir si les enfants exposés ont été infectés par le lait maternel enfin de faire le sevrage en étant sûr que l'enfant n'est pas contaminé par le lait maternel.

	Fréquence	Pourcentage
Tranche d'Age =<1.5	16	16.0
1.6 - 2.0	23	23.0
2.1 - 4.0	12	12.0
4.1 - 6.0	12	12.0
6.1 - 8.0	33	33.0
=> 8.1	4	4.0
Total	100	100.0

On observe aussi une grande fréquence à 1.5 - 2 mois. Ceci peut être dû à la préoccupation du personnel de santé dans l'intérêt de connaître le statut des enfants exposés enfin de les mettre sous traitement si nécessaire mais aussi à la curiosité des mères dans le but de connaître le statut de leurs enfants.

### **Tableau 3: La fréquence des échantillons selon le sexe de l'enfant**

Le tableau 3 nous montre que 45 pourcent de notre population d'étude est de sexe masculin et que 55 pourcent de notre population d'étude est de sexe féminin.

		Fréquence	Pourcentage
Sexe de l'enfant	Masculin	45	45.0
	Féminin	55	55.0
	Total	100	100.0

#### **III.3.2.LES CRITERES D'INCLUSION**

- Du sang prélevé et séché sur un papier buvard (DBS)
- Echantillon d'enfant né d'une mère séropositive à VIH
- Tranche d'âge de 6 semaines à 9 mois

#### **III.3.3 LES CRITERES D'EXCLUSION**

- Echantillon mal prélevé
- Echantillon venant d'enfant dont l'âge est supérieur à 9 mois et inférieur à 6 semaines

#### **III.3.4. PRELEVEMENT DE L'ECHANTILLON**

Du sang capillaire recueilli soit au niveau du talon, du doigt ou du gros orteil de l'enfant est déposé sur un papier buvard. Chaque papier buvard doit être bien sec et protégé (pochette plastique ou film cellophane) afin d'éviter tout contact entre les échantillons lors du transport. On a donné les codes de labo du premier jusqu'à cent pour les premiers échantillons qui remplissaient les conditions dressées.

### **III.4.DIAGNOSTIC AU LABORATOIRE**

#### **III.4.1.DIAGNOSTIC PAR LA PCR**

##### **III.4.1.1.Les étapes du diagnostic par la technique de PCR**

Pour cette technique nous avons utilisé la PCR classique qui comprend les étapes suivantes : préparation de l'échantillon, extraction de l'ADN viral, amplification et la détection.

##### **III.4.1.2 PRINCIPE DU TEST**

AMPLICOR HIV-1 DNA Test, version 1.5 est un test d'analyse qualitative in vitro, pour la détection d'ADN du VIH-1 dans le sang. Ce test utilise l'amplification d'ADN cible par la réaction en chaîne de polymérase (PCR) et l'hybridation de l'acide nucléique pour la détection de l'ADN du VIH-1 dans le sang.

AMPLICOR HIV-1 DNA Test, version 1.5 est basé sur quatre opérations principales : Préparation de l'échantillon, amplification de l'ADN cible par la PCR, utilisant l'amorce complémentaire spécifique, hybridation des produits amplifiés à l'aide des sondes oligonucléotidiques spécifiques à la zone cible ; et enfin la détection des produits amplifiés par détermination de la densité optique à l'aide du spectrophotomètre.

Le test AMPLICOR HIV-1 DNA Test, version 1.5 fait simultanément l'amplification par PCR de VIH-1 cible et l'ADN de contrôle interne de VIH-1. Le mélange réactionnel contient une paire d'amorce biotinylisées spécifiques pour VIH-1 cible et pour l'ADN de contrôle interne du HIV-1. La détection de produits d'ADN amplifié est accomplie par l'utilisation de sondes nucléotidiques spécifiques aux cibles qui permettent l'identification indépendante de l'amplicon du VIH-1 cible est l'amplicon du contrôle interne. (**Driver GA.,2007**)

##### **III.4.1.3. MATERIEL ET REACTIFS NECESSAIRE POUR LE TEST DE PCR**

###### **III.4.1.3.1 Matériel fourni**

###### **III.4.1.3.1.1.Réactifs de préparation des échantillons**

- BLW WASH : solution de lavage de l'échantillon ou Blood wash

- HIV-1 EXT : réactif d'extraction du HIV-1 contenant la protéinase K.

#### **III.4.1.3.1.2 Réactifs d'amplification**

- HIV-1 MMX : Mélange réactionnel du HIV-1 Master Mix
- HIV-1 Mn<sup>2+</sup> : Solution de manganèse
- HIV-1 (+) C : Contrôle positif du VIH-1
- HVI-1 (-) C : Contrôle négatif du VIH-1
- HIV-1 IC
- Contrôle interne du VIH-1

#### **III.4.1.3.1.3. Réactif de détection**

- HIV-1 MWP : Plaque à micro puits du HIV-1 dans les quels sont fixés les sondes.
- DN : Denaturation solution ou solution de dénaturation.
- HIV-1 HYB : Tampon d'hybridation du HIV-1.
- AV HRP: Avidin-horseradish peroxydase conjugate ou Avidine-peroxydase de sabots du cheval.
- SUB A : Substrat A contenant le peroxyde d'hydrogène.
- SUB B : Substrat B contenant le 3'3'5'5' tetramethylbenzidide (TMB)
- STOP : Stop reagent ou réactif d'arrêt de réaction contenant 4,9% d'acide sulfurique.

#### **III.4.1.3.1.4. Appareils nécessaires pour la PCR**

- Thermocycler
- Hotte à flux laminaire
- Etuve
- Laveur
- Spectrophotomètre

#### **III.4.1.4 La préparation de l'échantillon**

L'ADN du VIH-1 est isolé par le lavage de l'échantillon du sang total afin pour détruire tous les composants du sang et pour rester avec les lymphocytes les quelles sont ensuite lysées dans une solution de détergent contenant la protéinase K pour extraire l'ADN

#### **III.4.1.5 Amplification au thermocycler**

Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle.

Pour avoir la réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes : la dénaturation, l'hybridation et l'élongation. Il faut dénaturer l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ; borner et amorcer la réplication de la séquence à amplifier à l'aide d'oligonucléotides amorces spécifiques ; réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire. À la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin. Ce sont ces étapes qui constituent un cycle de PCR.

Les trois étapes, constituant un cycle de PCR, sont effectuées à des températures différentes permettant de contrôler l'activité enzymatique :

L'étape de dénaturation, est réalisée à 95°C, pour une dissociation complète des deux brins d'ADN.

L'étape d'hybridation se fait à une température qui sera définie selon la nature des amorces (cette température varie de 50 à 60°C). Cette température va déterminer la stabilité des hybrides une fois que l'appariement amorces / matrice est réalisé.

L'étape de polymérisation ou élongation est à environ 72°C, température de « travail » de l'ADN polymérase thermorésistant utilisée. Au cours de cette étape, les brins complémentaires d'ADN sont synthétisés à partir des extrémités 3'OH libre des amorces hybridées.

### **III.4.1.6. La détection**

La détection se fait par la technique ELISA. (BIO Tek à 450 nm) et les résultats sont donnés en densité optique.

## **III.4.2. DIAGNOSTIC PAR LES TESTS RAPIDES**

### **III.4.2.1. Les tests utilisés :**

Pour notre étude nous avons utilisé les tests rapides suivant l'algorithme national utilisé au Rwanda, qui utilise Détermine, Unigold et Capillus  
L'échantillon utilisé c'est la solution venant de l'élution des DBS avec la solution de PBS diluée à un dixième.

- Détermine comme screening test
- Unigold comme confirmatory test
- Capillus comme tie breaker

#### **III.4.2.1.1. Détermine**

- Dénomination et domaine d'application

Abbot détermine est un test immunologique qualitatif in vitro à lecture visuelle pour la détection des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 dans le sérum, le plasma ou le sang total humain. Ce test sert à la détection des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 chez les sujets infectés.

- Principes biologiques de la méthode

Détermine est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2.

L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt et migre vers la zone du conjugué, il se reconstitue et se mélange avec le conjugué colloïdale de sélénium antigène. Ce mélange continue à migrer sur la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobilisés et aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre patient ou il aura un complexe anticorps-antigène et se révèle par une coloration rouge.

- Si les anticorps anti-VIH1 et/ou anti-VIH2 sont présents dans l'échantillon, ils se lient à l'antigène du conjugué antigène colloïde de sélénium et l'antigène de la fenêtre patient en formant une ligne rouge.
- Si les anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 sont absents, le conjugué antigène colloïde de sélénium traverse la fenêtre patient sans former de ligne rouge ;
- Une bande de contrôle de la procédure est incluse dans ce système de test afin d'assurer la validité du test.

- Procédure

On dépose 50 microlitres de l'échantillon sur la zone de dépôt.  
Et il faut attendre 15 minutes pour lire le résultat

- Interprétation des résultats

-Un trait rouge dans la fenêtre de contrôle indique que le résultat est négatif.  
-deux traits indiquent que le résultat est positif  
- Si aucun trait n'apparaît dans la fenêtre de contrôle, le test est alors invalide et doit être recommencé.

### **III.4.2.1.2.Unigold**

- Dénomination et domaine d'application

Unigold est un test immunologique qualitatif in vitro à lecture visuelle pour la détection des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 dans le sérum, le plasma ou le sang total humain. Ce test sert à la détection des anticorps anti-VIH1 et anti-VIH2 chez les sujets infectés.

- Principes biologiques de la méthode

Unigold est un test immunochromatographique pour la détection qualitative des anticorps anti-VIH1 et anti VIH2.

L'échantillon est déposé sur la zone de dépôt et migre vers la zone du conjugué, il se reconstitue et se mélange avec le conjugué colloïdale de sélénium antigène. Ce mélange continue à migrer sur la phase solide jusqu'aux antigènes recombinants immobilisés et aux peptides synthétiques au niveau de la fenêtre patient ou il aura un complexe anticorps-antigène et se révèle une coloration rouge.

- **Procédure**

- A l'aide d'une pipette fournie à cette fin ajouter 2 (60 microlitres) gouttes de sérum, de plasma ou de sang total dans la fenêtre spot pour échantillon ;
- Après absorption total, ajouter 2(60 microlitres) gouttes de solution de diluant ;
- Attendre 10 minutes pour la lecture des résultats ;
- Les résultats sont stables pendant 20 minutes.

- **Interprétation des résultats**

- Résultat négatif : une seule bande rouge apparaît dans la fenêtre correspondant au contrôle marqué par la lettre ;
- Résultats positif : deux bandes rouges apparaissent dans les positions C (contrôle) et dans la position T (test) ;
- Résultat invalide : - Aucune bande rouge n'apparaît  
- Une seule bande dans T (test) sans bande dans C.

### **III.4.2.1.3.Cappillus**

- **Principe**

Capillus est un test unitaire dont le principe est basé sur l'agglutination des particules sensibilisés pour la détection des anticorps dans le sérum, le sang total et le plasma produits par les personnes infectées par les virus de l'immunodéficience humaine VIH1 et VIH2 .

- **Procédure**

- Les échantillons inactivés sont impropres à l'analyse ;
- Mettre les réactifs (et les échantillons si conservés au frigo) à la température du labo 15 minutes avant usage ; les réactifs sont toujours conservés au frigo ;
- Placer les lames en verre sur les plaques noires d'interprétation avec identification du patient ;
- Mélanger le réactif de latex en homogénéisant sans agiter pour éviter la formation de la mousse ;
- Ajouter une goutte de latex (120 microlitres) dans la fenêtre prévue à cette fin en évitant la formation des bulles d'air ;
- A l'aide d'une pipette prélever 10 microlitres de l'échantillon et mélanger avec le réactif de latex en faisant des mouvements circulaires 5 fois. Les contrôles positifs et négatifs sont traités de la même façon que les échantillons ;
- Par capillarité le mélange va couler dans la lame de verre cela prend 3 à 7 minutes.

- **Interprétation des résultats**

- Résultat négatif : absence d'agglutination
- Résultats positif : Présence d'agglutination

### **III.5.COLLECTE TRAITEMENT ET ANALYSE DES DONNEES**

- La saisie du texte a été faite en utilisant le logiciel Microsoft Word 2003
- La confection de graphique par le Microsoft Excel 2003
- L'analyse des données par SPSS 11.0.

## CHAPITRE IV : PRESENTATION ET ANALYSE DES RESULTATS

Notre étude a porté sur 100 premiers échantillons de DBS reçus au LNR pendant la période de Janvier 2010.

### IV.1 Résultats des tests rapides

Le tableau suivant récapitule des résultats obtenus après avoir conduit les tests rapides sur les 100 échantillons.

**Tableau 4: Les résultats des échantillons avec les tests rapides**

Ce tableau montre que les 59 échantillons ont été négatifs aux tests rapides ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu de transfert des anticorps maternels

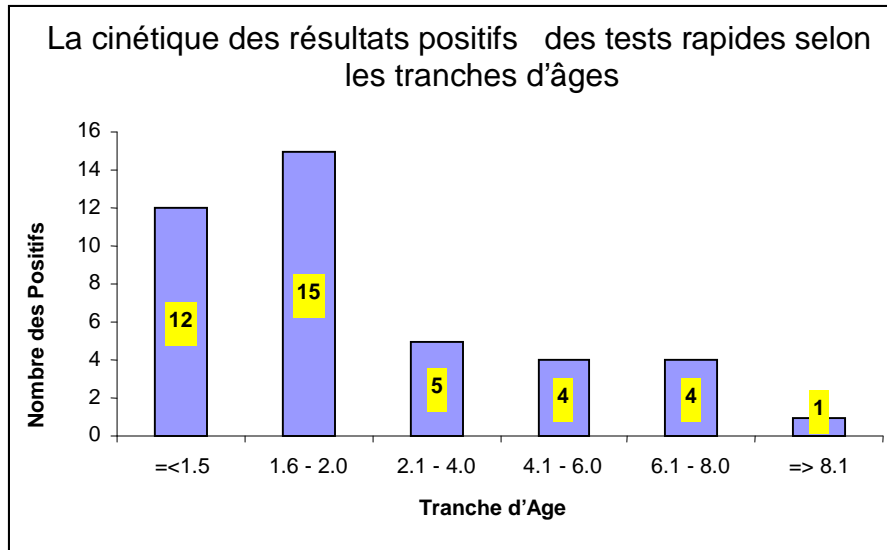
		Fréquence	Pourcentage
Résultats des échantillons avec Tests rapides	Négatif	59	59.0
	Positif	41	41.0
	Total	100	100.0

Les 41 échantillons ont été positifs ce qui veut dire qu'il y a eu de transfert des anticorps maternels mais ici on ne peut pas distinguer les enfants infectés et non infectés car beaucoup d'enfants sont nés avec les anticorps maternels de type IgG car elles sont capables de traverser le placenta.

**Tableau 5: Résultats des tests rapides selon les tranches d'âges**

Sur le tableau suivant et sur le graphique ci-après, nous constatons une grande positivité chez les enfants de 1.5 à 2 mois. En effet, il y a une diminution progressive du taux des anticorps maternels avec la croissance en âge de l'enfant. Il y a aussi une diminution progressive de la positivité avec la croissance en âge. Les kits utilisés détectent alors de moins en moins la présence des anticorps anti-VIH dans les échantillons issus des enfants de cette tranche d'âge.

	Résultats des échantillons avec Tests rapides		Total
	Négatif	Positif	
Tranche d'Age			
=<1.5	4	12	16
1.6 - 2.0	8	15	23
2.1 - 4.0	7	5	12
4.1 - 6.0	8	4	12
6.1 - 8.0	29	4	33
=> 8.1	3	1	4
Total	59	41	100



**Figure 3: La cinétique des résultats positifs des tests rapides selon les tranches d'âge**

#### IV.2 Résultats de la PCR

**Tableau 6: Les résultats des échantillons avec test de PCR**

Ce tableau nous montre que réellement un nombre satisfaisant d'enfants exposés ne sont pas contaminés durant la grossesse, l'accouchement ou pendant l'allaitement maternel.

		Fréquence	Pourcentage
Résultats des échantillons avec PCR	NEGATIF	93	93.0
	POSITIF	7	7.0
	Total	100	100.0

### Tableau 7: Résultats de la PCR selon les tranches d'âges

Le tableau numéro 7 nous montre que la PCR est très importante dans le diagnostic du VIH chez les enfants nés des mères séropositives au VIH car elle montre un pourcentage des résultats positifs de 7% alors que les tests rapides ont montré un grand pourcentage de 41%, ce qui montre que beaucoup d'enfants exposés sont nés avec les anticorps maternels.

	Résultats des échantillons avec PCR		Total
	NEGATIF	POSITIF	
Tranche d'Age =<1.5	16		16
1.6 - 2.0	22	1	23
2.1 - 4.0	10	2	12
4.1 - 6.0	11	1	12
6.1 - 8.0	31	2	33
=> 8.1	3	1	4
Total	93	7	100

Pour faire un bon diagnostic du VIH chez les enfants exposés il faut alors utiliser la PCR car elle cherche le virus soit même (le matériel génétique) et montre l'état de l'enfant le plus tôt possible ce qui va aussi faciliter la prise en charge de ces enfants exposés selon leurs résultats de VIH.

### VI.3 Comparaison des résultats des tests rapides et de la PCR

#### Tableau 8: Analyse qualitative des résultats des tests rapides par la technique de PCR

Ce tableau montre que chez les enfants nés des mères séropositives au il ne faut pas utiliser les tests rapides car la sensibilité (43%) et la spécificité (59%) sont très basses ce qui donne un grand nombre de résultats faux négatifs et faux positifs.

	Résultats des échantillons avec PCR		Total
	NEGATIF	POSITIF	
Résultats des échantillons avec Tests rapides Négatif	55	4	59
Positif	38	3	41
Total	93	7	100

La performance diagnostic des tests rapides

Sensibilité :  $3/7 \times 100 = 43\%$

Spécificité:  $55/93 \times 100 = 59\%$

Pour 59 échantillons négatifs aux tests rapides 4 ont été positifs à la PCR, ces échantillons sont un de 6 mois, un de 2 mois et 2 de 3 mois. C'est à dire qu'à ce stade leurs anticorps étaient indétectables par les tests rapides alors qu'il y a eu déjà une infection à VIH.

Pour les 55 échantillons qui sont restés négatifs à la PCR il n'a pas eu un transfert des anticorps maternels n'ont pas eu aussi l'infection à VIH.

Pour 41 échantillons positifs aux tests rapides seulement 3 échantillons sont positifs à la PCR Ces échantillons sont 2 de 8 mois et un de 9 mois. L'explication est qu'à ces mois cités comme la PCR est positif en même temps que les tests rapides sont positifs ce qui veut dire que les tests rapides ont détecté les anticorps fabriqués par l'enfant lui-même ou maternels et que la PCR confirme l'infection à VIH.

Pour les 41 échantillons positifs aux tests rapides 38 ont été négatifs à la PCR ce qui veut dire que chez ces 38 enfants il y a eu un transfert passif des anticorps maternels de type IgG à travers la barrière placentaire alors que ces enfants n'ont pas eu l'infection à VIH malgré les mères séropositives à VIH.

## VI 4.DISCUSSION

Le tableau 4 montre que les 59 échantillons ont été négatifs aux tests rapides ce qui veut dire qu'il n'y a pas eu de transfert des anticorps maternels tandis que 41 échantillons ont été positifs ce qui veut dire qu'il y a eu de transfert des anticorps maternels mais ici on ne peut pas distinguer les enfants infectés et non infectés car beaucoup d'enfants sont nés avec les anticorps maternels de type IgG qui sont capables de traverser le placenta.

Sur le tableau 5 et sur le graphique 3, nous constatons une grande positivité chez les enfants de 1.5 à 2 mois. En effet, il y a une diminution progressive du taux des anticorps maternels avec la croissance en âge de l'enfant. Il y a aussi une diminution progressive de la positivité avec la croissance en âge. Les kits utilisés détectent alors de moins en moins la présence des anticorps anti-VIH dans les échantillons issus des enfants de cette tranche d'âge.

Le tableau 6 nous montre que réellement un nombre satisfaisant d'enfants exposés ne sont pas contaminés durant la grossesse, l'accouchement ou pendant l'allaitement maternel.

Le tableau numéro 7 nous montre que la PCR est très importante dans le diagnostic du VIH chez les enfants nés des mères séropositives au VIH car elle montre un pourcentage des résultats positifs de 7% alors que les tests rapides ont montré un grand pourcentage de 41%, ce qui montre que beaucoup d'enfants exposés sont nés avec les anticorps maternels.

Pour faire un bon diagnostic du VIH chez les enfants exposés il faut alors utiliser la PCR car elle cherche le virus soit même (le matériel génétique) et montre l'état de l'enfant le plus tôt possible, ce qui va aussi faciliter la prise en charge de ces enfants exposés selon leurs résultats de VIH.

Le tableau 8 montre que chez les enfants nés des mères séropositives il ne faut pas utiliser les tests rapides car la sensibilité (43%) et la spécificité (59%) sont très basses, ce qui donne un grand nombre de résultats faux négatifs et faux positifs.

Pour 59 échantillons négatifs aux tests rapides 4 ont été positifs à la PCR, ces échantillons sont un de 6 mois, un de 2 mois et 2 de 3 mois. C'est à dire qu'à ce stade leurs anticorps étaient indétectables par les tests rapides alors qu'il y a eu déjà une infection à VIH.

Pour les 55 échantillons qui sont restés négatifs à la PCR il n'y a pas eu un transfert des anticorps maternels et n'ont pas eu aussi l'infection à VIH.

Pour 41 échantillons positifs aux tests rapides seulement 3 échantillons sont positifs à la PCR. Ces échantillons sont 2 de 8 mois et un de 9 mois. L'explication est qu'à ces mois comme la PCR est positive en même temps que les tests rapides sont positifs, ce qui veut dire que les tests rapides ont détecté les anticorps fabriqués par l'enfant lui-même ou maternels et que la PCR confirme l'infection à VIH.

Pour les 41 échantillons positifs aux tests rapides, 38 ont été négatifs à la PCR ce qui veut dire que chez ces 38 enfants il y a eu un transfert passif des anticorps maternels de type IgG à travers la barrière placentaire alors que ces enfants n'ont pas eu l'infection à VIH malgré les mères séropositives au VIH.

## CONCLUSION

Notre travail de fin d'étude intitulé «Apport de la PCR (Polymerase Chain Reaction) et des tests rapides dans le diagnostic précoce du VIH chez les enfants exposés (nés des mères séropositifs au VIH) : cas du Rwanda» ; s'est déroulé dans le Laboratoire National de Référence. Les échantillons de DBS ont été analysés selon 2 techniques : PCR et tests rapides. Nous nous sommes servis des tableaux d'EXCEL pour faire un graphique et du logiciel de SPSS 11.0 pour l'analyse statistique des résultats.

Les résultats de notre étude nous ont permis de retenir notre hypothèse stipulant que

«La technique de PCR est importante dans le diagnostic du VIH chez les enfants nés des mères séropositifs au VIH».

Les résultats de notre étude montrent une importance des programmes de PMTCT au Rwanda car il y a une faible transmission du VIH chez les enfants nés des mères séropositives

En effet, les analyses des échantillons avec les tests rapides nous ont montré que pour 100

échantillons on a eu 41 séropositifs à VIH alors que par la technique de PCR on a une

positivité de 7% ce qui montre qu'il ne faut pas utiliser les tests rapides car il y a beaucoup de résultats faussement positifs, ce qui montre aussi une importance de faire le diagnostic du VIH par la technique de PCR.

Cependant, nous avons remarqué les échantillons positifs aux tests rapides et à la PCR ce qui montre que même les résultats des tests rapides doivent être confirmés par la PCR car on pourrait se tromper avec les anticorps maternels.

Enfin, nous avons remarqué aussi les échantillons négatifs aux tests rapides alors qu'ils sont positifs à la PCR, pour cela il y a 2 choses soit l'enfant a été contaminé durant l'accouchement ou par le lait maternel ou bien les anticorps été indétectables au moment de collecte de l'échantillon.

Considérant la technique d'actualité la PCR que nous avons utilisée pour notre étude, il serait important de l'utiliser pour différencier les enfants infectés pendant les 3 niveaux de contamination : pendant la grossesse, l'accouchement et pendant l'allaitement maternel.

## **RECOMMANDATIONS**

### **Ministère de Santé**

1. Rendre accessible La technique de PCR dans le diagnostic précoce des enfants nés des mères séropositives à VIH.
2. De sensibiliser le personnel de la santé sur l'utilisation de la PCR dans le diagnostic précoce des enfants exposés à VIH.

### **A L'INES**

Equiper le laboratoire des travaux pratiques des techniques de biologie moléculaire pour que les étudiants et professeurs puissent y mener des recherches scientifiques.

### **Aux PVV**

Suivre les conseils de programme de PMTCT pour protéger leurs enfants contre l'infection à VIH.

## **ANNEXES**

### **Annexe 1: Protocol de Préparation et lavage de l'échantillon de DBS**

1. Utiliser un coup de point de trou portatif propre frapper pour laisser tomber le disque dans un tube de la casquette de la vis.
2. Ajouter 0,7 ml de BLD WS dans tous les tubes par la pipette avec une barrière de l'aérosol.
3. Mélanger au rotateur pendant 30 minutes à la température ambiante.
4. Centrifuger le tube à la vitesse maximale une minute à 13.200 tours par minute
5. Enlever le surnageant
6. Laver encore et répéter l'étape 2, 3, 4, et 5.
7. Après aspiration complète de dernier tempon, enlever tout le tampon du lavage, à ce stade la procédure peut être arrêtée et les échantillons sont gardés à -80°C si on ne peut pas directement continuer à faire l'extraction

### **Annexe 2: Préparation de la solution d'extraction (Prepare working extraction solution buffer)**

1. Pour 24 tests on a besoin de 3ml de réactif d'extraction (extraction buffer) et 24µl de contrôle interne (IC) dans un tube (falcon 15)
2. Mélanger pendant 15 secondes.
3. Ajouter 100µl de working extraction reagent dans chaque tube contenant le papier filtre contenant les cellules.
4. Préparer le contrôle positif et négatif en ajoutant 100µl de working extraction reagent dans 25 µl de contrôle positif ou négatif d'ADN dans les tubes appropriés.

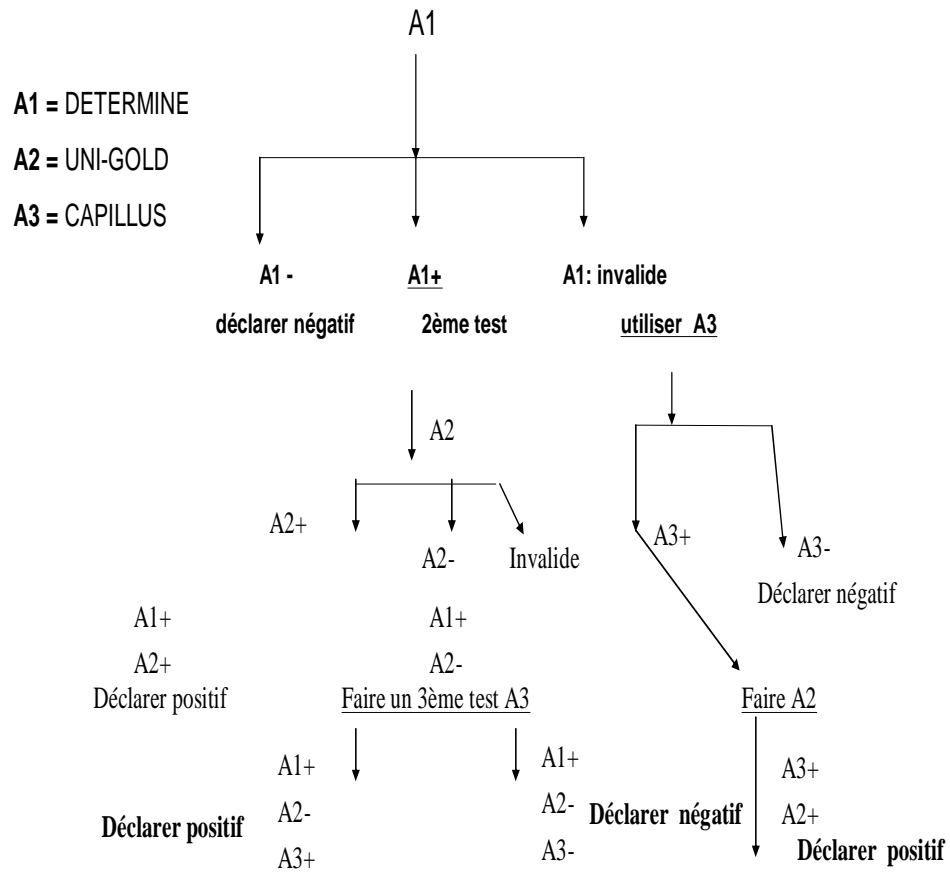
5. Incuber tous les tubes dans la plaque chauffante à 60°C pendant 1 heure et vortexer après 30 minutes.
6. Incuber tous les tubes à 100°C pendant 30 minutes et vortexer après 15 minutes.
7. Vortexer brièvement et micro centrifuger à vitesse maximale pendant 2 minutes.
8. Préparation de réactif de master mix en prenant 100 µl de manganèse et les ajouter au flacon de master mix
9. Distribuer 50 µl dans chaque tube d'amplification
10. Ajouter 50 µl de chaque échantillon et contrôle négatif et positif
11. Passer à l'amplification en utilisant le thermocycler

### **Annexe 3: Protocol de la détection**

La détection se fait par la technique ELISA. (BIO Tek à 450 nm)

1. Mettre 100µl de HIV-1 HYB dans les microcupules de la plaque utilisé.
2. Mélanger le matériel amplifié avec 100µl de solution de dénaturation (Stop DNA).
3. Retirer 25 µl du mélange d'amplicon (échantillon – stop DNA) qu'on va mettre dans les cupules contenant 100µl de HIV-1 HYB.
4. Incuber pendant 1 heure à 37°C. pour permettre l'hybridation
5. Laver 5 fois par MWP Washer.
6. Ajouter le conjugué AV-HRP 100µl.
7. Incuber pendant 15 minute à 37°C.
8. Préparer le substrat en mélangeant 2 ml de SUB A et 0,5 ml de SUB B.
9. Laver 5 fois par MWP Washer automatique.
10. Ajouter 100µl substrat préparée
11. Permettre l'action du substrat de développer une coloration pendant 10 minutes à la température ambiante à l'obscurité. (20-25)
12. Stopper la réaction par l'ajout de stop solution
13. Mesurer la densité optique de la couleur trouvée à 450 nm ne pas dépasser une heure après l'ajout de la solution d'arrêt.

## Annexe 4: Algorithme national de dépistage du VIH



## **BIBLIOGRAPHIE**

### **1. LIVRES.**

1. Bernard H.L. ; Le SIDA Guide du praticien, Diagnostic, Traitement, Prise en charge, Edition médecine + Hygiène, 1998
2. Driver GA., Patton JC., Moloi J., Stevens WS., and Sherman GG.: Low risk of contamination with automated and manual excision of dried blood spots for HIV DNA PCR testing in the routine laboratory”,2007
3. Klase Z., Winograd R., Davis J., Carpio L., Hildreth R., Heydariam M., Fu S., McCaffrey T., Meiri E., Ayash-Rashkovsky M., Gilad S., Bentwich Z., Kashanche F.; "HIV-1 TAR miRNA protects against apoptosis by altering cellular gene expression". Retrovirology, 2009
4. Marc G ; SIDA infection à VIH aspects en zone tropicale, Ellipses 32rue Bague 75015 Paris, 1989.
5. Richmond, J.Y.; et al., Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. HHS Publication Number ((CDC) 93-8395.), 1999
6. Villanova.; Clinical Laboratory and Standards Institute. Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue. Approved Guidelines, 1997
7. Hervé, J.A. Virologie Humaine. 5<sup>e</sup> édition, Fleurie, 2009

### **5. RAPPORTS ET REVUES**

8. CNLS : Cadre stratégique National de lutte contre le SIDA, 2002-2006, Mai 2002.
9. LNR, Manuel de formation sur le diagnostic précoce des enfants exposés, 2009
10. Rapport : MINISANTE, 2005
11. TRAC plus : Rapport Annuel 2009

### **6. REFERENCES ELECTRONIQUES**

12. (<http://www.sogc.org/health/pregnancy-hiv>) [www.genie-bio.ac-](http://www.genie-bio.ac-versailles.fr/.../L_infection_par_le_VIH.doc)
13. [versailles.fr/.../L\\_infection\\_par\\_le\\_VIH.doc](http://www.genie-bio.ac-versailles.fr/.../L_infection_par_le_VIH.doc)
14. [www.vih.org/.../dépistage-recommandations-has-1257](http://www.vih.org/.../dépistage-recommandations-has-1257)