

## **Cadre géographique, période et population d'étude**

### **I. 1. Cadre géographique et période d'étude**

#### **I. 1. 1. Enquête et prélèvements**

L'ensemble de nos enquêtes et prélèvements se sont déroulés durant la période allant du 10 Février au 10 Décembre 2007. Ils ont eu pour cadre :

- L'unité de bactériologie du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide le Dantec.

Ce laboratoire constitue le centre national de référence pour le diagnostic du SIDA et des IST. Il est également le laboratoire de référence OMS pour le VIH2 et centre collaborateur ONUSIDA. Il assure le contrôle de qualité des laboratoires de la sous région et constitue un centre de formation et d'expertise pour les laboratoires régionaux ainsi que ceux des pays limitrophes.

Il comprend : une unité de bactériologie, une unité de virologie, une unité d'Immunologie et une unité de biologie moléculaire.

- Les locaux des instituts d'hygiène sociale de Dakar, Thiès, Mbour et Saint-Louis.
- Quelques sites confidentiels disséminés sur le territoire national.

#### **I. 1. 2. Traitement des échantillons**

L'étude de nos prélèvements et données d'enquêtes s'est faite à l'unité de Biologie moléculaire du Laboratoire de Bactériologie-Virologie de l'Hôpital Aristide Le Dantec entre le 23 Octobre 2007 et le 19 Mars 2008.

### **I. 2. Population d'étude**

La population d'étude est constituée de 168 sujets Sénégalais, répartis comme suit :

- 60 femmes provenant de la population générale, venues consulter pour un bilan gynécologique au laboratoire de Bactériologie-Virologie.
- 48 travailleuses du sexe recensées dans le cadre de l'Enquête Nationale de Surveillance Combinée des IST et du VIH/SIDA (ENSC) 2007.
- 60 Sujets provenant de la population des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes recensés dans le cadre de l'enquête sur les MSM 2007.

Le choix des travailleuses du sexe (TS) et des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes se justifie par leur comportement à haut risque de contamination et de

transmission des infections sexuellement transmissibles. Quant à la population générale, elle constitue un groupe à moindre risque, mais elle est néanmoins concernée.

Il est constitué de :

- 60 prélèvements d'urines provenant des femmes de la population générale.
- 13 prélèvements par écouvillonnage endocervical provenant aussi de ces femmes.
- 48 prélèvements par écouvillonnage endocervical chez les travailleuses du sexe.
- 60 prélèvements d'urines en provenance des hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes.

## **II. 2. Matériel et réactifs de laboratoire (détails annexe 1)**

### **II. 2.1. Matériel pour la technologie Cobas Amplicor**

- Analyseur Cobas Amplicor (annexe 3 et 4)

### **II. 2. 2. Réactifs pour la technologie Cobas Amplicor**

- Réactifs de préparation des échantillons
- Réactifs d'amplification
- Réactifs de détection

### **II. 2. 3. Matériel pour la technologie m2000**

- Extracteur automatique m2000sp (annexe 5)
- Analyseur m2000rt (annexe 6)

### **II. 2. 4. Réactifs pour la technologie m2000**

- Réactifs d'extraction de l'ADN
- Réactifs d'amplification
- Réactifs de contrôles

## **Chapitre III : Méthodes d'étude**

Pour la population générale, les participants à l'étude étaient des patients qui se présentaient au laboratoire pour un bilan gynécologique. Ils étaient avertis pour respecter les principes suivants :

- Pas de toilette intime, pas de règles et pas de rapport sexuels la veille du prélèvement.
- Les urines sont prélevées au moins une heure après miction.

### **III. 1. Population générale**

#### **III. 1. 1 Accueil et enquête**

Les patients étaient accueillis à l'unité de bactériologie et soumis à questionnaire portant sur les caractéristiques sociodémographiques, le motif de la prescription, le suivi ou non d'un traitement et les produits utilisés, l'événement auquel sont liés les symptômes locaux, les symptômes généraux et les contraceptifs utilisés.

#### **III. 1. 2. Prélèvement, transport et conservation des échantillons**

Avant prélèvement, une fiche d'examen est remplie pour chaque patient.

Pour la population générale, le prélèvement a été fait comme suit :

- Les patients étaient en position gynécologique.
- Un spéculum vaginal était introduit dans le vagin pour visualiser le col. Puis, on introduit un écouvillon dans le col et on imprime à celui-ci un mouvement de rotation pendant quelques secondes pour lui permettre de s'imprégner de la sécrétion. A la sortie, l'écouvillon est immédiatement placé dans un tube de 5 ml contenant un liquide de transport. La mesure du pH a été faite à l'aide d'un papier pH mis en contact avec la sécrétion vaginale sur le spéculum et reporté sur les fiches.

Il est ensuite demandé au patient de se rendre dans les toilettes pour sa toilette intime avant de recueillir le premier jet d'urines dans un pot en plastique. Les urines sont alliquotées sur place à l'aide de pipettes de transfert dans des tubes de 5ml contenant le liquide de transport.

Tous ces prélèvements sont ensuite immédiatement transportés dans des glacières à l'unité de biologie moléculaire. Ils sont congelés à -20°C.

### **III. 2. Travailleuses du sexe (TS) et hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (MSM)**

L'enquête et les prélèvements chez les travailleuses du sexe ont été faits lors de l'Enquête Nationale de Surveillance Combinée des IST et du VIH/ SIDA (ENSC) 2007 et les échantillons étaient conservés au laboratoire à -80°C.

De même pour les MSM, enquête et prélèvements ont été faits lors de l'enquête sur les MSM en 2007 et les échantillons étaient également gardés au laboratoire à -20°C.

### **III. 3. Détection avec le Cobas Amplicor**

#### **III. 3. 1. Principe du Cobas Amplicor**

Le test Cobas Amplicor CT/NG est un test multiplex qui permet d'amplifier simultanément l'ADN de *C. trachomatis*, de *N. gonorrhoeae* et du contrôle interne.

Il comporte quatre opérations principales : la préparation des échantillons, l'amplification de l'ADN cible par PCR à l'aide d'amorces complémentaires spécifiques de *C. trachomatis* et *N. gonorrhoeae*, Hybridation de l'ADN amplifié avec des sondes oligonucléotides spécifiques des cibles et détection de l'ADN amplifié lié aux sondes par développement d'une coloration.

#### **III. 3. 2. Mode opératoire (détails annexe 8)**

##### **III. 3. 2. 1. Préparation des échantillons**

La préparation des échantillons a été manuellement faite et la procédure est la suivante :

➤ Les échantillons d'urines

Les échantillons d'urines sont d'abord décongelés à la température ambiante, lavés puis centrifugés pour concentrer les cellules au fond des tubes. Après avoir enlevé le surnageant, une solution de lyse a été ajoutée pour libérer le matériel génétique. Une solution de diluant a été ajoutée puis les échantillons sont centrifugés une deuxième fois.

➤ Les échantillons d'écouvillons endocervicaux

Les échantillons ont été d'abord décongelés à la température ambiante puis une solution de lyse a été ajoutée pour libérer le matériel génétique et en fin une solution de diluant a été ajoutée.

### **III. 3. 2. 2. Préparation des contrôles**

Nous avons mélangé chaque contrôle avec une solution de diluant pour préparer des solutions dites intermédiaires. A ces solutions a été ajoutée une solution de lyse et les contrôles étaient ainsi préparés. Le contrôle positif de CT équivaut au contrôle négatif de NG et vice versa.

### **III. 3. 2. 3. Préparation du mélange réactionnel**

Au mélange réactionnel du kit a été ajouté son activateur.

### **III. 3. 2. 4. Préparation des cassettes**

A chaque cassette a été ajouté l'activateur correspondant si c'est nécessaire.

### **III. 3. 2. 5. Préparation de la solution de lavage**

Nous avons ici dilué la solution de lavage et rempli le réservoir de l'appareil avec la solution diluée.

### **III. 3. 2. 6. Mise en plaque**

Dans les tubes d'amplifications des couronnes A, nous avons mélangé chaque échantillon avec le mélange réactionnel activé.

### **III. 3. 2. 7. Transfert des couronnes A et des cassettes à l'analyseur Cobas Amplicor**

Les couronnes et les cassettes sont identifiées par code barre.

Les couronnes prêtes pour analyse PCR et les cassettes contenant les réactifs adéquats sont chargées dans le système (figures 12, 13 et 14.). Les données de liste de travail et les ordres sont introduits par l'utilisateur et le système est lancé.

Le système comporte un mécanisme de transfert. Celui-ci comprend une pointe de transfert qui assure le pipetage de quantités spécifiées d'échantillons amplifiés et de réactifs (figure 15), et mesure les niveaux des différents réactifs. Cette pointe de transfert est lavée minutieusement avant et après chaque pipetage. Le mécanisme de transfert comprend également un manipulateur de cuvette D qui transfère les cuvettes D vers le portoir à cuvette D, l'incubateur, la station de lavage et le photomètre.



Figure : 12. Chargement des couronnes d'échantillons. Figure : 13 Couronne chargée dans le module d'amplification.



Figure:14 Identification par code barre des cassettes. Figure : 15 Pipetage de réactif.

### III. 3. 3. Recherche de CT/NG par l'appareil

#### III. 3. 3. 1. Régions cibles

- *C. trachomatis* : le test Cobas Amplicor utilise les amorces biotinylés CP24 et CP27 pour définir une séquence d'ADN de 207 nucléotides localisés dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis* qui est commun à tous ces sérotypes.
- *N. gonorrhoeae* : la cible définie par les amorces SS01 et SS02 est constituée de 201 nucléotides situés dans le gène de l'ADN méthyltransférase de *N. gonorrhoeae*. Cette séquence est présente chez toutes les souches de *Neisseria* pathogènes pour l'homme.

#### III. 3. 3. 2. Déroulement du test avec l'appareil Cobas Amplicor (annexe 11)

Le Cobas Amplicor fait une amplification sélective pour détruire toute trace d'ADN et une amplification de l'ADN cible. Les amplicons de l'ADN cible sont ensuite dénaturés puis hybridés avec des particules magnétiques revêtues de sondes. La détection se fait par le développement d'une coloration et mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 660 nm.

### III. 3. 3. 3. Contrôle de qualité interne

Deux témoins CT positif et NG positif sont inclus dans chaque série PCR. Les témoins positifs pour CT et NG servent respectivement de contrôles négatifs pour NG et CT. Il y a également un contrôle interne pour une éventuelle inhibition.

### III. 3. 3. 4. Validité des résultats

Pour les témoins négatifs, la densité optique doit être inférieure à 0.2.

Pour les témoins positifs, la densité optique doit être supérieure à 2.00.

### III. 3. 3. 5. Interprétation des résultats

Des plages de valeurs sont intégrées dans le système qui fait l'interprétation selon celles-ci et donne directement les résultats

Ces plages de valeurs sont consignées dans les tableaux 2 et 3

➤ Tableau 2 : Interprétation des résultats pour *C. trachomatis* avec le Cobas

Résultats DO		Interprétation des résultats	Manipulation supplémentaire lorsque c'est nécessaire
CT	IC		
<0.2	≥0.2	Résultat CT négatif	
<0.2	<0.2	Résultat non interprétable (inhibiteur)	Reprendre procédure en simple.
≥0.2 et<0.8	Tous	Résultat douteux	Reprendre procédure en duplicata
≥0.8	Tous	Résultat CT positif	

➤ Tableau 3 : Interprétation des résultats pour *N. gonorrhoeae* avec le Cobas

Résultats DO		Interprétation des résultats	Manipulation supplémentaire lorsque c'est nécessaire
NG	IC		
<0.2	≥0.2	Résultat NG négatif	
<0.2	<0.2	Résultat non interprétable (inhibiteur)	Reprendre procédure en simple
≥0.2	Tous	Résultat NG positif	Reprendre procédure en duplicata

Reprise de la procédure en simple : il faut reprendre l'analyse après chauffage. Si le résultat de IC reste le même, l'échantillon est ininterprétable. Par ailleurs, se référer aux tableaux précédents.

Reprise de la procédure en duplicata : il faut laisser un espace sur le portoir en y remettant l'échantillon préparé. Si au moins 2 des 3 résultats sont  $\geq 0.2$ , l'échantillon est positif. Si seul le premier résultat est  $\geq 0.2$ , l'échantillon est négatif à condition que pour IC, DO soit  $\geq 0.2$ .

Résultats NG positifs et repris en duplicata : si 2/3 des résultats sont  $< 0.2$  l'échantillon est négatif à condition que les résultats des tests IC soient  $\geq 0.2$ . Si 2/3 ou l'ensemble des résultats sont  $\geq 2.00$  l'échantillon est positif. Si 2/3 ou l'ensemble des résultats sont  $\geq 0.2$  mais sans rencontrer le critère précédent, le résultat est douteux.

### **III. 4. Détection avec le m2000 Abbott real time**

#### **III. 4. 1. Principe du m2000**

Le test m2000 Abbott real time est un test entièrement automatisé et se déroule dans deux appareils : le m2000sp et le m2000rt (annexe 5, 6, et 7).

L'appareil m2000sp automatise entièrement l'extraction de l'ADN. Le système utilise la technologie des particules magnétiques pour capter les acides nucléiques et lave les particules afin d'éliminer tout composant non lié de l'échantillon. Les acides nucléiques liés sont élués et transférés avec le mélange réactionnel automatiquement préparé vers une plaque à 96 puits profonds.

La PCR se déroule à l'intérieur du m2000rt. Les séquences cibles CT/NG présentes à chaque cycle d'amplification sont amplifiées et détectées à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées par fluorescence, sans qu'il y ait besoin d'ouvrir la plaque scellée. Les sondes ne génèrent aucun signal, à moins d'être spécifiquement liées au produit amplifié.

#### **III. 4. 2. Mode opératoire**

##### **III. 4. 2. 1. Etapes manuelles dans la préparation des échantillons (annexe 9)**

Les échantillons sont décongelés et chacun est mis dans une cupule réactionnelle.

Les cupules et tubes de contrôles sont placés dans les portoirs d'échantillons selon un ordre bien défini. En respectant cet ordre les numéros des échantillons sont entrés par l'utilisateur dans le centre de contrôle.

Les solutions de lyse, de microparticules, de lavages, et d'éluion utilisables une seule fois sont mises dans des cuvettes de réactifs placées dans leurs portoirs. Le contrôle interne est ajouté dans le tampon de lyse et l'alcool dans la solution de lavage 2. Le portoir de l'unité de traitement 1ml est chargé de cupules réactionnelles vides. Les portoirs d'échantillons (figure 16 n°1), de cuves de réactifs (figure 16 n°2) et l'unité de traitement 1ml (figure 16 n°3) sont chargés dans le système m2000sp. Une plaque à 96 puits profonds est placée sur la plateforme de déchargement. Des embouts à filtre de 1000 et de 200 sont chargés sur les portoirs d'embouts et dans les étagères aussi comme réserve. L'appareil possède un lecteur code barre qui lie les codes des échantillons et des réactifs. Il possède également un bras manipulateur du portoir de l'unité de traitement 1ml dans les différentes zones de cette unité (zone de chauffage 1, zone de chauffage 2, zone à température ambiante et zone magnétique) et de boîtes d'embouts. Le bras distributeur d'échantillons et de réactifs, terminé par 8 Diti cône saisit à chaque fois 8 embouts différentes de sorte que pour chaque échantillon est utilisé un embout unique pour une addition quelconque de réactif. On lance d'abord une procédure d'extraction de l'ADN des échantillons à partir du centre de contrôle puis une procédure d'addition du mélange réactionnel après avoir placé une plaque de réaction optique à 96 puits sur la plateforme de déchargement, le mélange réactionnel et un tube de mélange réactionnel dans le coffret réactif de dosage (figure 16 n°4).



Figure16 : Transfert des portoirs et des plaques dans le système m2000sp.

Légende :

1. Transfert des portoirs d'échantillons.
2. Transfert des portoirs de cuves de réactifs.
3. Transfert du portoir de l'unité de traitement 1ml.
4. Placement de la plaque à 96 puits profonds, de la plaque de réaction optique à 96 puits et du coffret réactif de dosage.

Après extraction et préamplification, cette plaque est scellée (figure 17 n°5') et transférée dans le m2000rt où elle est placée sur le plateau de la plaque à PCR du m2000rt (figure 17 n°5).



Figure 17 : Transfert de la plaque de réaction optique à 96 puits au système m2000rt.

5'. La plaque est scellée.

5. Pose de la plaque de réaction optique sur le plateau. .

### III. 4. 3. Recherche de CT/NG par PCR

#### III. 4. 3. 1. Régions cibles

- Pour *C. trachomatis* : Le test M200 cible une séquence de 102 paires de bases localisées dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Ce plasmide est hautement conservée dans tous les sérovirs de *C. trachomatis* mais ne se trouvent pas dans d'autres espèces.
- Pour *N. gonorrhoeae* : les deux amorces ciblent une région des gènes Opa. La séquence comprenant 122 paires de bases a été sélectionnée comme ADN cible car elle est conservée dans toutes les souches de *N. gonorrhoeae* étudiées et n'est pas présente dans les *Neisseria* qui causent des maladies non sexuellement transmissibles.

#### III. 4. 3. 2. Déroulement du test avec le m2000 (annexe 10)

L'appareil m2000sp procède d'abord à une extraction de l'ADN, puis prépare le mélange réactionnel et en fin fait la préamplification dans une plaque de réaction optique à 96 puits.

La plaque est transférée au m2000rt où se déroule l'amplification et la détection de l'ADN cible par fluorescence.

#### III. 4. 3. 3. Contrôle de qualité interne

Un contrôle interne, un contrôle négatif et deux contrôles seuils sont introduits dans chaque série de PCR et subissent l'intégralité de la procédure.

#### III. 4. 3. 4. Validité des résultats

Le nombre de cycle du contrôle interne doit être compris dans une plage de valeurs établie dans l'appareil. Le nombre de cycle moyen des deux contrôles seuils doit aussi être compris dans une plage de valeurs établie également dans l'appareil.

### **III. 4. 3. 5. Interprétation des résultats**

Pour chaque substance analysée (CT ou NG), le logiciel calcule le nombre de cycles (NC) moyen des deux contrôles seuils, puis ajoute à cette moyenne un nombre prédéterminé de cycles de façon à générer le cycle de décision seuil (CO) ; si l'échantillon testé génère un NC inférieur ou égal au CO, une interprétation positive et un résultat numérique supérieur ou égal à zéro sont rapportés. Le résultat numérique (cycle delta ou CD) correspond à la différence en nombre de cycles entre le CO et le NC. Les échantillons négatifs ne génèrent aucune amplification et la valeur de CD qui est égale à -1 est affichée par défaut par l'appareil. Les échantillons qui génèrent un NC strictement supérieur au CO sont accompagnés d'un code d'erreur et doivent être retestés.

### **III. 5. Traitement des résultats**

#### **III. 5. 1. Appréciation des tests**

Cette appréciation de la validité intrinsèque des tests a été faite par le calcul de la sensibilité et de la spécificité des tests qui sont exprimées en pourcentage. Les tests très sensibles sont utiles pour s'assurer qu'une maladie n'est pas présente (peu de faux-négatifs) et les tests très spécifiques sont utiles pour s'assurer qu'une maladie est absente (peu de faux-positifs).

Nous avons également mesuré la capacité des tests à prédire si la maladie est présente par le calcul des valeurs prédictive positive et prédictive négative également exprimées en pourcentage.

#### **III. 5. 1. 1. Définitions**

La sensibilité (Se) d'un test représente le pourcentage de vrais positifs (VP) parmi les malades. Elle correspond à la probabilité que le test soit positif chez les malades.

La spécificité (Sp) d'un test représente le pourcentage de vrais négatifs (VN) parmi les non malades. Elle correspond à la probabilité que le test soit négatif chez les non malades.

La valeur prédictive positive (VPP) est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif.

La valeur prédictive négative (VPN) est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif.

### III. 5. 1. 2. Expressions littérales.

Les résultats de tests quelconques sont inscrits dans le tableau suivant 4

Tableau 4 : Résultats des tests quelconques.

	Positifs	Négatifs
Microorganisme présent	Vrais-positifs (VP)	Faux-négatifs (FN)
Microorganisme absent	Faux-positifs (FP)	Vrais-négatifs (VN)

Les expressions littérales sont données par les relations suivantes :

$$Se = VP / (VP + VN) \times 100 \text{ et } Se \text{ moyenne (Sem)} = 1/n \sum Sei$$

$$Sp = VN / (VN + FP) \times 100 \text{ et } Sp \text{ moyenne (Spm)} = 1/n \sum Spi$$

$$VPP = VP / (VP + FP) \times 100 \text{ et } VPP \text{ moyenne (VPPm)} = 1/n \sum VPPi$$

$$VPN = VN / (FN + VN) \times 100 \text{ et } VPN \text{ moyenne (VPNm)} = 1/n \sum VPNi$$

n = effectif de Se, Sp, VPP ou de VPN.

### III. 5. 2. Analyse statistique.

Nous avons une variable qualitative à deux modalités. Le test  $\pi^2$  n'est pas applicable à nos résultats puisque les effectifs théoriques ( $n_{ij}$ ) ne sont pas tous supérieurs ou égal à cinq.

C'est le test kappa que nous avons utilisé. Le test kappa permet de déceler l'accord ou le désaccord entre des jugements qualitatifs appariés et de chiffrer l'intensité ou la qualité de celui-ci.

Dans le cas d'une étude d'accord entre deux observateurs statistiquement indépendants ayant r modalités de jugements, avec r supérieur ou égale à deux comme dans notre cas, le coefficient kappa est applicable et s'écrit :

$$K = (P_o - P_e) / (1 - P_e)$$

$P_o$  = la proportion d'accord observée.

$P_e$  = la proportion d'accord aléatoire ou concordance attendue sous l'hypothèse d'indépendance des jugements.

Les tableaux 5 et 6 présentent la notation utilisée lorsque les données sont présentées dans un tableau de contingence.

Tableau 5 : Proportions jointes des jugements de deux juges sur une échelle avec r catégories.

Catégories.	Technique A.				Total
	1	2	...	r	
1	P11	p12	...	p1r	p1.
2	p21	p22	...	p2r	p2.
r	pr1	pr2	...	pr	pr.
Total	p.r	p.2	...	p.r	1

Tableau 6 : Effectifs joints des jugements de deux juges sur une échelle avec r catégories.

Catégories.	Technique A.				Total
	1	2	...	r	
1	n11	n12	...	n1r	n1.
2	n21	n22	...	n2r	n2.
r	nr1	nr2	...	nrr	nr.
Total	n.r	n.2	...	n.r	n

On appelle concordance observée  $P_o$  la proportion des individus classés dans les cases diagonales de concordance du tableau de contingence, soit la somme de ces effectifs diagonaux divisée par la taille de l'échantillon (n).

$$P_o = \sum_{i=1}^r P_{ii} = (1/n) \sum_{i=1}^r n_{ii}$$

Et la concordance aléatoire  $P_e$  qui est égale à la somme des produits des effectifs marginaux divisée par le carré de la taille de l'échantillon.

$$Pe = \sum_{i=1}^r Pi.P.i = (1/n^2) \sum_{i=1}^r ni.n.i$$

L'analyse statistique des résultats avec le test Kappa se fera de la façon suivante:

- Hypothèses :
  - ✓ Ho : pas accord entre les deux techniques (K= 0).
  - ✓ H1 : accord inter techniques (K>0).
- Calcul de K.
- Conclusion statistique.
- Appréciation de K en utilisant le classement de l'accord en fonction de la valeur kappa proposé par Landis et Koch (tableau 7)

Tableau 7 : Degré d'accord et valeur de Kappa.

Accord	Kappa
Excellent	≥ 0,81
Bon	0,80-0,61
Modéré	0,60-0,41
Médiocre	0,40-0,21
Mauvais	0,20-0,0
Très mauvais	< 0,0