

LISTE DES ABBREVIATIONS

ARV : anti-rétroviral

CAOE : centre d'accueil et d'orientation des enfants

CDC : Center for Diseases Control aux USA

CES : Certificat d'Etudes Spécialisées

CESAC : Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseil

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

DEAP : Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires

IST : Infection Sexuellement Transmissible

NI : non infection

ND : non déterminé

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : polymerase chain reaction

PVVIH : personne vivant avec le VIH

USAC : Unité de Soins, d'Accueil et de Conseil

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Crypto : cryptosporidies

ESTHER : Ensemble pour une Solidarité Thérapeutique Hospitalière En Réseau

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
II. OBJECTIFS	25
A. Objectif général.....	25
B. Objectifs spécifiques	25
III. GENERALITES	26
A. Historique.....	26
B. Morphologie.....	27
C. Classification.....	28
D. Cycle Biologique	31
E. Mode de contamination.....	35
F. Facteurs favorisants	35
G. Résistance des cryptosporidies	36
H. Réservoir de parasites	38
I. Facteurs de la réceptivité	39
J. Répartition géographique	39
K. Etude clinique	39
L. Diagnostics.....	42
M. Traitement	46
N. Prophylaxie	53
IV. PATIENTS ET METHODES.....	55
A. Cadre et lieu d'étude	55
B. Période d'étude et Type d'étude	60
C. Population d'étude	60
D. Critères d'inclusion :.....	60
E. Critères de non inclusion :	60
F. Collecte de données	60
G. Problèmes éthiques	61
H. Gestion, analyse et saisie des données	61
V. RESULTATS.....	63
A. Caractéristiques Sociodémographiques	63
B. Caractéristiques biologiques et thérapeutiques	66
C. Résultats parasitaires.....	68
D. Résultats analytiques.....	71
VI. COMMENTAIRES ET DISCUSSION.....	74
VII. CONCLUSION	78
VIII. RECOMMANDATIONS	79
IX. REFERENCES	80
X. FICHE SIGNALÉTIQUE.....	85
IDENTIFICATION SHEET	86

INTRODUCTION

Le SIDA (Syndrome de l'Immunodéficience Acquise) est défini par la survenue d'une ou de plusieurs affections témoignant d'une immunodépression majeure [1].

En Afrique il s'agit essentiellement d'infections digestives opportunistes parmi lesquelles la cryptosporidiose occupe une place importante.

La cryptosporidiose est une parasitose due à un protozoaire intracellulaire du genre *Cryptosporidium*, infectant l'épithélium digestif de l'homme et de nombreuses espèces animales. Chez les sujets immunocompétents le *Cryptosporidium* est responsable de diarrhées bénignes spontanément résolutive. En revanche, chez l'immunodéprimé, il est responsable de diarrhées sévères et incoercibles, menaçant gravement le pronostic vital.

A côté de la symptomatologie diarrhéique chez l'immunodéprimé, le *Cryptosporidium* est responsable d'infections respiratoires à type de trachéite, de bronchite, de déciliation et de métaplasie de l'épithélium respiratoire ; de cholécystites aiguës voire de gastrite chronique.

L'épidémie de Milwaukee (Wisconsin, USA) de 1993 témoigne de l'importance de ce parasite puisqu'il y avait eu plus de 400000 malades, pas moins de 54 décès et les frais d'hospitalisation de 4000 personnes s'élevèrent à environ 54 millions de dollars [2].

Des organismes tels que le CDC (Center for Diseases Control aux USA) et l'OMS définissent désormais la cryptosporidiose comme une zoonose émergente posant un réel problème de santé publique, aussi bien pour l'homme que pour l'animal, avec des conséquences économiques et zootechniques non négligeables.

En France, de janvier 2006 à décembre 2007 sur 36 laboratoires hospitaliers de parasitologie répartis sur tout le territoire national, 179 cas de cryptosporidiose ont été notifiés (96 en 2006 et 83 en 2007) dont 60 % des cas sont survenus chez des patients immunodéprimés (principalement par le VIH, 48%) [3].

En Afrique chez les personnes vivant avec le VIH, la prévalence de la maladie varie entre 8,7% et 48% [4].

A Bamako au Mali avant la trithérapie, la prévalence de la cryptosporidiose était de 38,3% en 1989 [5] et tous les malades en sont décédés dans les deux semaines d'hospitalisation. A l'avènement de la trithérapie, une étude effectuée entre janvier 2002 et décembre 2002 trouvait une prévalence de 25,71% [6]. La plus récente étude était concomitante de la période de début de la gratuité de la trithérapie au Mali (juillet 2004) et a lieu entre janvier 2004 et décembre 2005 avec une prévalence de 13,3% [7].

Cette baisse chronologique de la prévalence sous la trithérapie nous laisse entrevoir son impact sur l'incidence de la maladie. Il nous apparaît donc important de savoir le profil épidémiologique de la cryptosporidiose intestinale à Bamako après la mise à échelle de la trithérapie.

Ce travail a été rendu possible grâce à la mise en place d'un laboratoire de diagnostic des infections opportunistes, qui a bénéficié de l'appui financier et technique du programme **E**nsemble pour une **S**olidarité **T**hérapeutique **H**ospitalière **E**n **R**éseau (ESTHER).

I . OBJECTIFS

Les objectifs de cette étude sont :

A. Objectif général

Evaluer la place de la cryptosporidiose chez les patients VIH diarrhéiques dans les sites de prise en charge du VIH à Bamako.

B. Objectifs spécifiques

- Déterminer le taux moyen de CD4 des patients atteints de la cryptosporidiose intestinale ;
- Déterminer la fréquence globale et par site de prise en charge de la cryptosporidiose intestinale au cours du VIH-SIDA à Bamako ;
- Déterminer la fréquence de la cryptosporidiose intestinale des patients sous traitement ARV.

II. GENERALITES

A. Historique

Ce parasite a d'abord été une découverte vétérinaire. C'est Tyzzer qui en a rapporté le premier cas en 1907 chez la souris [8]. Il décrit alors *Cryptosporidium muris* dont il étudia le développement dans les glandes gastriques de souris de laboratoire. Par la suite, de nombreuses publications ont fait état d'infections chez plusieurs espèces animales [9-11].

En 1955 Slavin découvre l'importance pathogénique de *Cryptosporidium sp* en décrivant *Cryptosporidium meleagridis* dans les intestins de dindes qui présentaient une diarrhée aiguë [12].

Le parasite est cependant resté ignoré ou considéré comme un organisme commensal jusqu'à sa reconnaissance par les vétérinaires dans les années 70 où il fût tenu pour responsable d'épidémies de diarrhées parfois mortelles dans les élevages des jeunes veaux [13].

Chez l'Homme, son dépistage est d'acquisition récente puisque le premier cas n'a été diagnostiqué, par biopsie intestinale, qu'en 1976 chez un enfant de trois ans présentant une gastro-entérite [14].

Ce n'est qu'au début des années 80 que la cryptosporidiose a fait une bruyante émergence en pathologie humaine après l'apparition du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) qui lui a conféré un regain d'intérêt.

B. Morphologie

- Oocystes: Parmi les coccidies, les oocystes du *Cryptosporidium* sont les plus petits, ils sont sphériques à ovoïdes et contiennent quatre sporozoïtes libres agencés autour d'un corps résiduel mesurant un micron de diamètre. Le micropyle et les granules polaires qui caractérisent les autres coccidies n'ont pas été retrouvés. La paroi est lisse, composée de deux membranes séparées par un espace clair et contient une suture qui se dissout durant l'excystation [8].

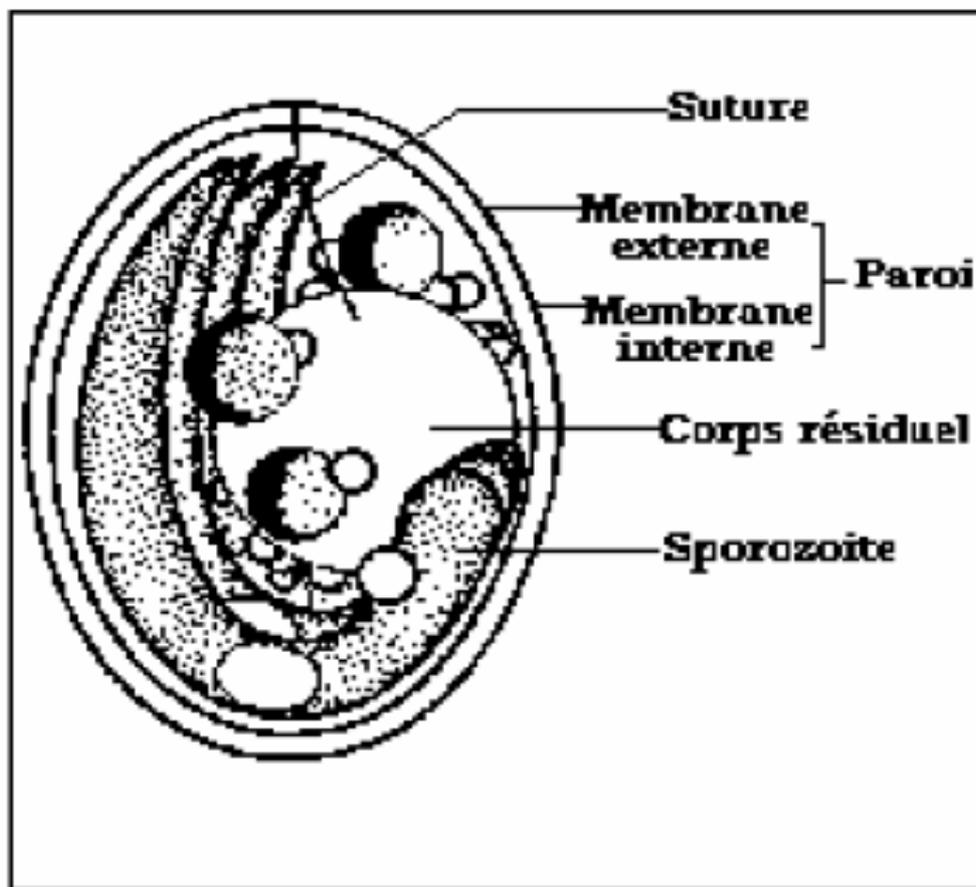


Figure I : Schéma d'un oocyste (Fayer, et coll., 1986)

- Sporozoïtes : Ils sont en forme de croissant avec une partie antérieure grêle et une partie postérieure arrondie et renferme un noyau proéminent au niveau du tiers postérieur. Douze microtubules sub-pelliculaires sont observées sur des sections transversales [15,16]. Leur taille varie selon l'espèce.
- Trophozoïtes : Ils sont caractérisés par un grand noyau (1-1,3 μ) contenant un gros nucléole, par la présence d'un organite de nutrition bien développé et par l'absence du complexe apical qui caractérise les sporozoïtes et les mérozoïtes [15,16].
- Mérontes I et II : Les deux types de mérontes mesurent entre 4 et 5 μ de diamètre. Le type I se développe à partir du trophozoïte ou des mérozoïtes de première génération. Il renferme six à huit mérozoïtes contrairement au méronte de type II qui ne renferme que quatre mérozoïtes [15,16].
- Mérozoïtes I et II : Ils sont morphologiquement identiques et recouverts par une pellicule caractéristique. Leurs extrémités antérieure et postérieure sont arrondies, leur noyau est dépourvu de nucléole et contiennent une variété de granules denses non identifiés. Chaque mérozoïte contient 28 microtubules sub-pelliculaires [15].
- Macrogamontes : Ils sont caractérisés par la présence de granules d'amylopectine qui les différencient des trophozoïtes et par la présence d'une vacuole et d'un grand noyau excentrique [15].
- Microgamontes : Ils sont rarement observés à cause probablement de leur vie brève. Ils renferment 14 à 16 microgamètes aflagellés et un corps résiduel [17].

C. Classification

Le genre *Cryptosporidium* est inclus dans le phylum des Apicomplexa, l'ordre des Eucoccidiorida, sous-ordre des Eimeriorina et la famille des Cryptosporidiidae.

Tableau I: Taxonomie de *Cryptosporidium* sp[12]

Classification	Nom	Caractéristiques
Règne	Protiste	Eucaryote unicellulaire
Phylum	Apicomplexa	- Présence d'un complexe apical (intervenant dans la pénétration du parasite). - Parasite intracellulaire obligatoire
Classe	Sporozoasida	- Multiplication asexuée et reproduction sexuée. - Formation d'oocystes
Sous-Classe	Coccidiasina	- Cycle de développement comprenant des stades de schizogonie, gamétogonie et sporogonie. - Gamonte de petite taille.
Ordre	Eucoccidiorida	Mérogonie toujours présente
Sous-Ordre	Eimeriorina	- Développements indépendants des micro et macrogamètes. - Zygote non mobile
Famille	Cryptosporidiidae	- Quatre sporozoïtes nus (sans sporocystes contrairement aux autres Eimeriidae) dans chaque oocyste. - stade endogène de développement comportant un organelle de d'attachement. - Cycle homoxène (contrairement au Sarcocystidae qui nécessite un hôte intermédiaire.

Le genre *Cryptosporidium* se caractérise, parmi les autres coccidies, à la fois par :

- L'absence du stade sporocyste ;
- L'absence de spécificité vis-à-vis de l'hôte (152 espèces) ;
- Des microgamètes non flagellés ;
- Un développement dans une vacuole parasitophore ;

Une vingtaine d'espèces a été découverte dont trois sont rencontrées chez l'homme :

- *Cryptosporidium muris* (estomac)
- *Cryptosporidium parvum* (intestin)
- *Cryptosporidium hominis* (intestin) = *C. parvum* génotype 1

Aujourd'hui, pour valider et nommer *Cryptosporidium sp.*, il faut tenir compte de critères morphologiques et biologiques (comme Tyzer) mais aussi, grâce au développement de la biologie moléculaire, de critères génétiques :

- Critères morphologiques : Taille, forme et structure des différents stades de développement.

- Critères biologiques : site de prédilection de l'infection, durée des périodes pré-patentes, intensité de l'excrétion ookystale, spectre (espèce, âge et statut immunitaire) des hôtes infectés naturellement, infectiosité et virulence pour d'autres espèces ou hôtes en cas de transmission croisée.

- Critères génétiques : différences dans la séquence nucléotidique de gènes bien connus (codant pour l'ARN ribosomal, des protéines structurelles et/ou fonctionnelles), homogénéité des isolats d'une même espèce dans l'analyse phylogénétique, absence de recombinaison entre deux espèces supposées différentes.

Les espèces retenues et répondant à ces critères sont regroupées dans le tableau ci-dessous :

Tableau II: Différences biologiques entre les espèces de *Cryptosporidium sp* [12] .

Espèces	Hôtes	Site(s) de prédilection de l'infection	Dimensions ookystales en μm (extrêmes et moyenne)	
			Longueur	Largeur
<i>C. parvum</i>	Mammifères	Intestin	4.8 – 5.6 [5.2]	4.2 – 4.8 [4.6]
<i>C. wrairi</i>	Porc de Guinée	Intestin	4.8 – 5.6 [5.4]	4.0 – 5.0 [4.6]
<i>C. meleagridis</i>	Oiseau	Intestin	4.5 – 6.0 [5.2]	4.2 – 5.3 [4.6]
<i>C. saurophilum</i>	Lézard	Intestin	4.4 – 5.6 [5.0]	4.2 – 5.2 [4.7]
<i>C. felis</i>	Chat	Intestin	3.2 – 5.1 [4.6]	3.0 – 4.0 [4.0]
<i>C. baileyi</i>	Oiseau	Intestin, cloaque, trachée, bourse de Fabricius	6.0 – 7.5 [6.6]	4.5 – 5.7 [5.0]
<i>C. muris</i>	Rongeur	Estomac	8.0 – 9.2 [8.4]	5.8 – 6.4 [6.2]
<i>C. andersoni</i>	Ruminant	Abomasum	6.0 – 8.1 [7.4]	5.0 – 6.5 [5.5]
<i>C. serpentis</i>	Serpent	Estomac	5.6 – 6.6 [6.2]	4.8 – 5.6 [5.3]
<i>C. natorum</i>	Poisson	Estomac et intestin	3.5 – 4.7 [4.3]	2.5 – 4.0 [3.3]

D. Cycle Biologique

Les Cryptosporidies ont un cycle de développement complexe débutant par l'ingestion de sa forme de résistance : l'oocyste sporulé, directement infestant et éliminé dans les selles de tout individu ou animal hôte ; ce cycle est monoxène : toutes les étapes du développement parasitaire se déroulent chez un même hôte.

❖ Etapes et chronologie [12,18]

Le cycle se décompose en plusieurs parties : l'excystation, des phases de multiplications asexuées (schizogonie ou mérogonie) et sexuées (gametogonie), suivie d'une fécondation et enfin de la sporogonie (ou sporulation).

❖ **L'excystation**

Une fois ingéré et sous les effets combinés de la température (idéal : 37°) et pH (entre 6,8 et 7,4 in vitro), les enzymes et les sels biliaires, l'oocyste libère les 4 sporozoites qu'il contient.

Les sporozoites s'attachent alors à l'épithélium de la bordure en brosse des entérocytes et se transforment en trophozoites en s'enfermant dans une vacuole parasitophore qui leur confère une position intracellulaire mais extra cytoplasmique (d'où la difficulté des traitements, les médicaments atteignant difficilement le parasite).

Ce trophozoite se caractérise également par une organelle d'attachement participant apparemment à sa nutrition.

❖ **Les schizogonies (ou mérogonie)**

Ces trophozoites se transforment en mérontes de type I (schizontes de type I) contenant 8 merozoites de type I formés par des divisions nucléaires successives.

Une fois libérés, ces merozoites I ont deux devenir possibles : soit ils envahissent les cellules épithéliales voisines pour former des mérontes de type II, soit ils participent à un phénomène de rétro infection en reformant des mérontes de première génération. Ce recyclage permettant d'allonger la période d'excrétion, d'augmenter le nombre d'oocystes excrétés et d'amplifier la pathogénicité, même si un petit nombre d'oocystes a été ingéré (dose infectieuse faible). Enfin, ces mérontes II forment 4 merozoites.

L'expérimentation sur la souris a permis d'estimer que les mérontes I apparaissent 8 à 16 heures après l'infection contre 24 heures pour les mérontes II.

❖ La gametogonie

Chaque mérozoïte II pénètre dans une nouvelle cellule pour s'y différencier en micro (36 heures post-infection) ou macro gamonte (48 heures post-infection) qui évolueront respectivement en micro et macro gamète.

❖ La fécondation

Les micro-gamontes libèrent 12 à 16 microgamètes cunéiformes et non flagellés qui vont féconder le macro gamète mature pour former le zygote.

La formation de la paroi de l'oocyste et la sporogonie (ou sporulation) :

En même temps qu'une enveloppe kystique résistante se forme autour du zygote, celui-ci subit la sporulation qui donne, par méiose, 4 sporozoïtes. Ainsi se forme l'oocyste (72 heures post-infection) de *Cryptosporidium sp* qui, contrairement aux autres coccidiens, est directement infectant. En réalité, il se forme deux types d'oocystes :

- 80% d'oocystes à paroi épaisse (2 couches de chitine et 3 membranes) qui constitueront la forme de résistance et de transmission éliminée dans les selles de l'hôte.
- 20 % d'oocystes à paroi fine (une membrane) qui libéreront rapidement leurs sporozoïtes dans le tractus digestif et participeront au phénomène d'auto-infection donnant lieu à un nouveau cycle de développement chez le même hôte.

La durée totale de ce cycle, qui correspond à la durée pré patente (intervalle de temps entre le début de l'infection et le début de l'excystation des oocystes dans les selles), est d'environ 4 jours, donc assez rapide.

La période patente, qui correspond à la durée d'excrétion des oocystes, varie entre 6 et 10 jours chez les immunocompétents, avec un pic d'excrétion après 7 à 8 jours, et peut se prolonger considérablement, voire être illimitée chez les immunodéprimés.

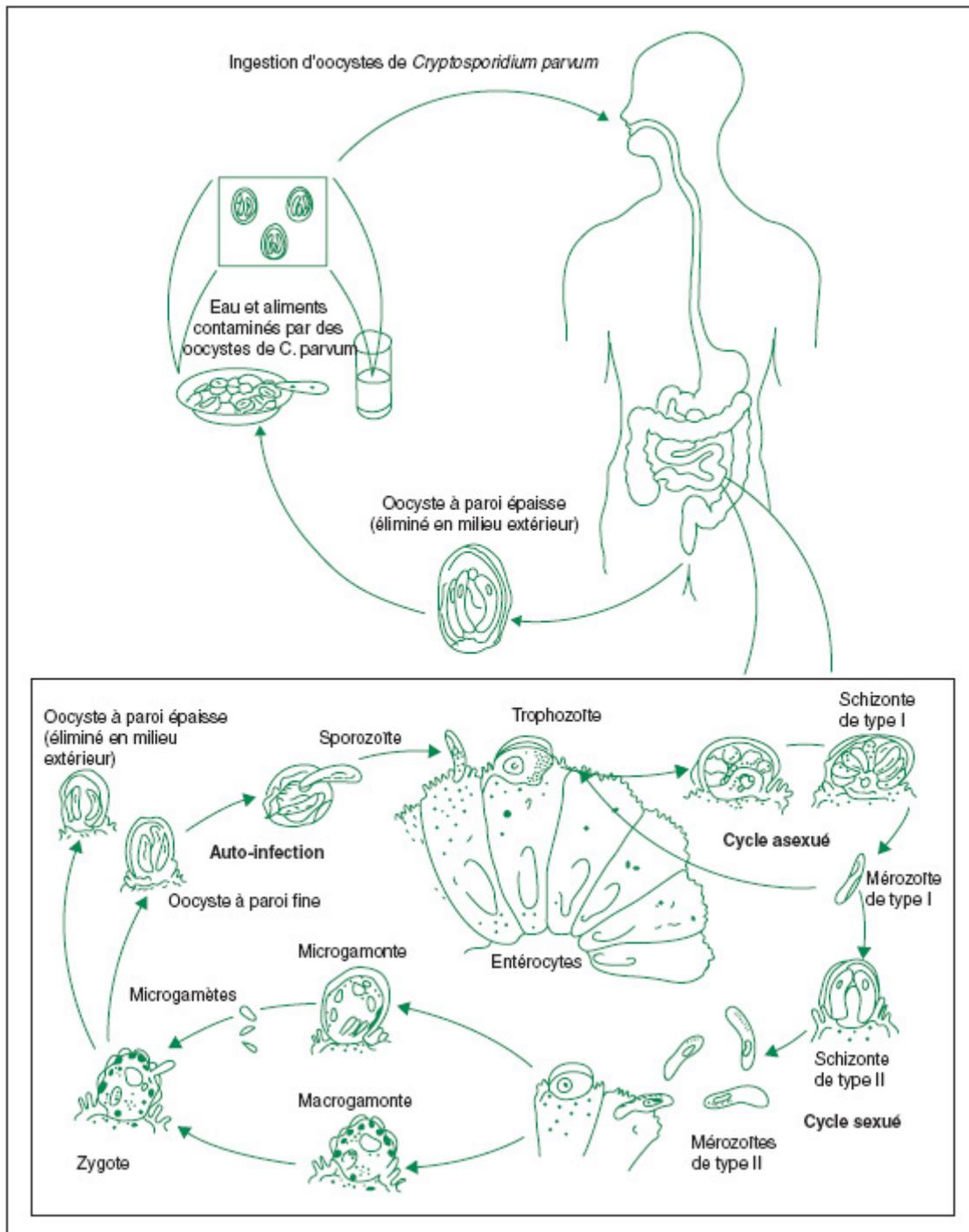


Figure II : Cycle évolutif de *Cryptosporidium sp* [19]

E. Mode de contamination

La contamination est orale par l'ingestion d'oocystes.

Le premier cas de cryptosporidiose humaine rapporté par Nime et coll. en 1976 est un exemple de contamination par des bovins car l'enfant avait séjourné dans une ferme d'élevage.

Une contamination humaine a été rapportée chez un enfant de 13 mois à partir d'un chat infecté [20], et il a été suggéré que les chatons, les chiots et les rongeurs sont des réservoirs du parasite [4,21].

La présence de plusieurs cas dans une même famille souligne le caractère familial de la maladie[22].

Plusieurs cas d'infections nosocomiales ont été rapportés [23,24].

La cryptosporidiose est donc une anthroozoonose.

La contamination humaine se fait au contact d'hommes ou d'animaux infectés, malades ou porteurs sains, soit directement par les mains sales, soit indirectement par l'intermédiaire d'aliments ou de boissons souillés [25,26]. Des infections expérimentales ont clairement montré que la transmission s'effectue par les oocystes à paroi épaisse qui, après une sporulation endogène, sont potentiellement infestants dès leur élimination dans l'environnement [4,27].

F. Facteurs favorisants

Les groupes de populations à haut risque sont les sujets en contact professionnel avec des animaux [8], le personnel médical, vétérinaire, ou de laboratoire [23,28], l'entourage familial des malades et les enfants âgés de moins de cinq ans particulièrement dans les crèches où des épidémies ont été décrites [29,30].

Cependant, la contamination par les animaux n'explique pas le nombre des infections parmi la population urbaine dont le contact avec les animaux est moins important. En effet, les circonstances épidémiologiques ont permis d'incriminer la distribution d'eau provenant d'une source unique et ce, malgré la désinfection par le chlore [31,32].

G. Résistance des cryptosporidies

En matière de résistance de cryptosporidies, les antiseptiques usuels (crésyl, dérivés iodés, hypochlorite, dérivés de benzylkonium.....) sont inefficaces [33,34]. Seuls l'ammoniac à 5% et le formaldéhyde à 10% ainsi que les températures de -20°C et de +60° C peuvent les détruire [35,36].

Par contre, les oocystes peuvent garder leur pouvoir infectant pendant 9 mois lorsqu'ils sont stockés à 4° C dans une solution de bichromate de potassium à 2,5%[33].

Tableau III : Résistance des oocystes de *Cryptosporidium* sp aux contraintes physiques et aux conditions environnementales (Claude Bernard, 2003).

	Contraintes	Conditions	Résultats	Références
EAU	Stockage	T° ambiante, 176 j (1) Submergé ds rivière	Réduction de 96%	Robertson <i>et al.</i> , 1992
		A t° ambiante, 176 j (2)	Réduction de 94%	
		4°C, 35 j (3)	Réduction de 38%	
	Chaleur	0,5,10,15 et 20°C, 24 sem (1)	I	Fayer <i>et al.</i> , 1998a
		59,7°C, 5 min	I	Fayer, 1994
		64,2°C, 5 min	NI	
		67,5°C, 1 min	I	
		72,4°C, 1 min	NI	
		55°C, 30 s	NI	
		60°C, 15 s	NI	
70°C, 5 s	NI			
Congélation	-196°C, 10 min	NI	Sherwood <i>et al.</i> , 1982	
	-20°C, 3 j	NI	Fayer et Nerad, 1996	
	-70°C, 1 h	NI		
	-20°C, 8 h; 1 j	I; NI		
	-15°C, 24 h; 1 sem	I; NI	Fayer <i>et al.</i> , 1998a Robertson <i>et al.</i> , 1992	
	-10°C, 1 sem	I		
	Azote liquide	Réduction de 100%		
Dessiccation	-22°C, < 32 j	Réduction de 98%	Deng et Cliver, 1999	
	-20°C, 24 h	Réduction de 92%		
	Air sec, 2 h	Réduction de 97%		
Salinité	Air sec, 4 h	Réduction de 100%	Robertson <i>et al.</i> , 1992	
	10-30% Na, 10°C, 1-12 sem	I	Fayer <i>et al.</i> , 1998b	
	10% Na, 20°C, 1-12 sem	I		
20-30%, 20°C, 12 sem	NI			
Fèces	Stockage	T° ambiante, 176 j (4)	Réduction de 66%	Robertson <i>et al.</i> , 1992
		4°C, 178 j (5)	Réduction de 78%	Jenkins <i>et al.</i> , 1997
		4°C, 410 j (4)	Réduction de 90%	
Congélation	-20°C; 2, 7 et 30 j	Réduction De 66 à 88%	Kim et Healey, 2001	
Dessiccation	Air sec, 1 à 4 j	NI	Anderson, 1986	

I= infectieux; NI= non-infectieux

(1) : eau du robinet; (2) : eau de rivière; (3) : eau de mer

(4) : fèces bovins; (5) : fèces humains

H. Réservoir de parasites

Les porteurs asymptomatiques ou porteurs sains, parmi les animaux ou les humains (non immunodéprimés), constituent des réservoirs insidieux de la maladie puisqu'ils excrètent des oocystes sans présenter de signes cliniques.

Le principal réservoir jouant un rôle important dans l'entretien du cycle de *Cryptosporidium sp* est constitué par les ruminants qui contaminent l'environnement avec de grosses quantités d'oocystes.

D'autres animaux peuvent véhiculer ou accumuler le parasite dans leur organisme sans présenter de signes cliniques car ils ne sont pas des habituels de *cryptosporidium sp*. Les mollusques et les oiseaux migrateurs en font partie :

- Les mollusques (moule, huître, palourde...) concentrent par filtration les oocystes dans leur hémolymphe où le parasite reste viable et conserve son infectiosité sans porter atteinte à son hôte [37]. L'homme se contamine alors par leur consommation.
- Les oiseaux migrateurs comme les oies peuvent transporter des oocystes et leur infectiosité est conservée après le transit intestinal. Les déplacements de ces oiseaux permettent de disséminer le parasite et contaminer les environnements lacustres[38].
- On a même détecté des oocystes sur les exosquelettes et dans l'appareil digestif de mouches [39], de bousiers et cafards [40].

I. Facteurs de la réceptivité

Les facteurs qui favorisent la réceptivité de la cryptosporidiose sont liés au statut immunitaire, à l'âge et à l'espèce hôte.

Chez l'Homme, les sujets immunodéficients et les enfants semblent avoir une plus grande réceptivité: 62,4% des cas concernent les enfants âgés de moins de 14 ans [41], et les cas chez les personnes atteintes de SIDA représentaient le tiers des cas entre 1981 et 1984 [42].

J. Répartition géographique

La prévalence de la cryptosporidiose est importante dans les pays en développement du fait de la malnutrition, du manque d'eau potable et d'hygiène de la population, de la présence de nombreux animaux à proximité des habitations.

Contrairement au pays industrialisés, la prévalence semble être plus élevée dans les zones urbaines surpeuplées que dans les zones rurales.

K. Etude clinique

❖ Pathogénie

Les mécanismes moléculaires expliquant l'action pathogène de *Cryptosporidium sp* sont inconnus mais on sait que le parasite est mécaniquement responsable d'une atrophie des villosités et d'une hypertrophie des cryptes intestinales [43]. Chez l'Homme, l'utilisation des marqueurs de la phase liquide du contenu intestinal chez des personnes infectées par le virus du SIDA et par les cryptosporidies a permis de constater une importante augmentation des sécrétions au niveau du duodénum et du jéjunum, et une absorption normale d'eau et de sodium dans l'iléon et dans le côlon [44].

❖ Les étapes importantes de l'infection

▪ Période d'incubation ou pré patente

Elle correspond au délai des symptômes après ingestion des oocystes ; cette période dure 2 à 10 jours chez l'homme, avec une moyenne de 7 jours [45].

▪ **Période patente** : qui correspond à la durée d'observation des symptômes (diarrhée) dure 1 à 3 semaines [45] chez les individus immunocompétents mais peut devenir illimitée dans le temps chez des individus immunodéprimés.

▪ **Excrétion** : L'excrétion des oocystes peut continuer pendant 1 à 4 semaines (voire plus) après disparition des symptômes.

❖ Manifestations cliniques :

La symptomatologie classique de la cryptosporidiose chez un individu immunocompétent comprend : une diarrhée liquide, moyenne à profuse et s'auto-limitant (fréquence des selles : jusqu'à 10 par jour, et volume des selles : jusqu'à 17 litres par jour [46]), des crampes abdominales, des nausées, des malaises, une fièvre modérée ($< 39^{\circ}\text{C}$), des maux de tête, de l'anorexie et une perte de poids.

La diarrhée peut être particulièrement grave, voire mortelle pour des personnes au système immunitaire immature, déprimé ou déficient.

On distingue :

- Les immunodéficiences acquises, comme dans le cas du SIDA.
- Les immunodéficiences congénitales lors de défauts génétiques du système immunitaire (défiance ou perte d'activité innée de certaines immunoglobulines par exemple).

-Les immunodépressions iatrogènes induites par des traitements immunodépresseurs (corticothérapie massive accompagnant une chimiothérapie) ou immunosuppresseurs (traitements anti-rejets après une greffe).

Chez les nouveaux-nés et les jeunes enfants (qui sont immatures immunitairement), la diarrhée est souvent accompagnée d'une déshydratation sévère, d'un déséquilibre ionique et de carences engendrant des troubles de la croissance.

Chez les individus immunodéprimés, le tableau clinique est un peu plus complexe et directement lié à l'efficacité résiduelle de leur immunité cellulaire, avec l'apparition de symptômes liés à des formes extra-intestinales de la maladie : ictère, douleur importante au niveau du cadran supérieur droit de l'abdomen et surtout une diarrhée d'intensité variée, dépendant de l'état immunitaire : elle peut devenir volumineuse, cholériforme, transitoire, chronique ou fulminante.

❖ **Formes cliniques**

L'infection de l'appareil respiratoire : semble être secondaire à une infection de l'intestin et serait causée par les vomissements. Le parasite entraîne une trachéite, une bronchite avec hypersécrétion dans la trachée, une déciliation et une métaplasie de l'épithélium respiratoire [47,48].

Au niveau biliaire, le parasite a été mis en évidence dans la bile et serait incriminé dans la pathogénie des cholécystites aiguës. Les symptômes sont des nausées, des vomissements et un ictère avec élévation du taux de la phosphatase alcaline et de la bilirubine [49,50].

Les cryptosporidies sont aussi responsables de gastrite chronique révélant un carcinome à petites cellules bronchiques [51].

L. Diagnostics

1- Technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz (1981) :

Dans cette technique nous nous servons du culot obtenu à partir de la technique de Ritchie (voir SOP en annexe) pour faire nos étalements de lames.

➤ Principe : Les oocystes sont colorés en rouge fuchsia malgré l'action de l'acide et de l'alcool.

➤ Résultat et interprétation :

Cette variante se rapproche le plus possible du Ziehl Neelsen utilisé en bactériologie.

Les oocystes de *Cryptosporidium* sp sont colorés en rouge Fuchsia sur un fond vert pâle. Le degré et la proportion de couleur varient avec les oocystes. En outre, les structures internes prennent le colorant de façon variable. Certains peuvent apparaître vides alors que d'autres peuvent contenir les éléments en croissant caractéristiques des sporozoïtes. Les oocystes de *Cryptosporidium* sp apparaissent sous la forme de disques de 5 à 8 µm de diamètre. Les levures et les débris fécaux se colorent en rouge terne. Certaines spores de bactéries peuvent également se colorer en rouge mais elles sont trop petites pour prêter à confusion.

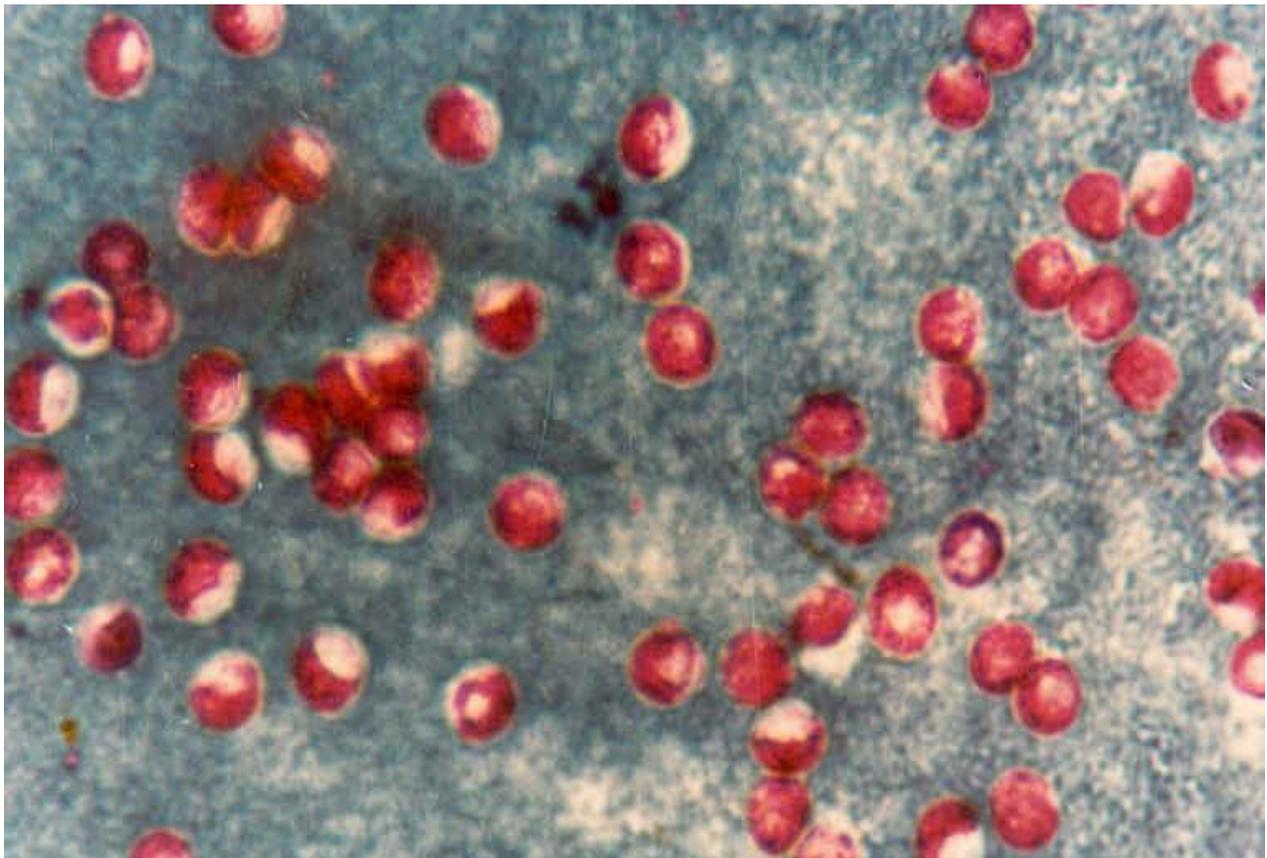


Figure III : Oocystes du *Cryptosporidium* colorés par la technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

2- Méthodes de Biologie Moléculaire (PCR) :

Elle permet de poser le diagnostic d'espèce.

➤ Principe : La réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro* une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier.

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.

➤ Résultat et interprétation :

La technique de PCR permet de différencier les deux espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme : *Cryptosporidium parvum* et *Cryptosporidium Hominis*. En effet, la discrimination de ces deux espèces permet des études épidémiologiques.

Pour chaque prélèvement présentant des oocystes de *Cryptosporidium sp* en microscopie optique, une PCR nichée suivie d'une digestion enzymatique (PCR /RFLP) sera systématiquement réalisé pour le diagnostic d'espèce

PCR : Cryptosporidies

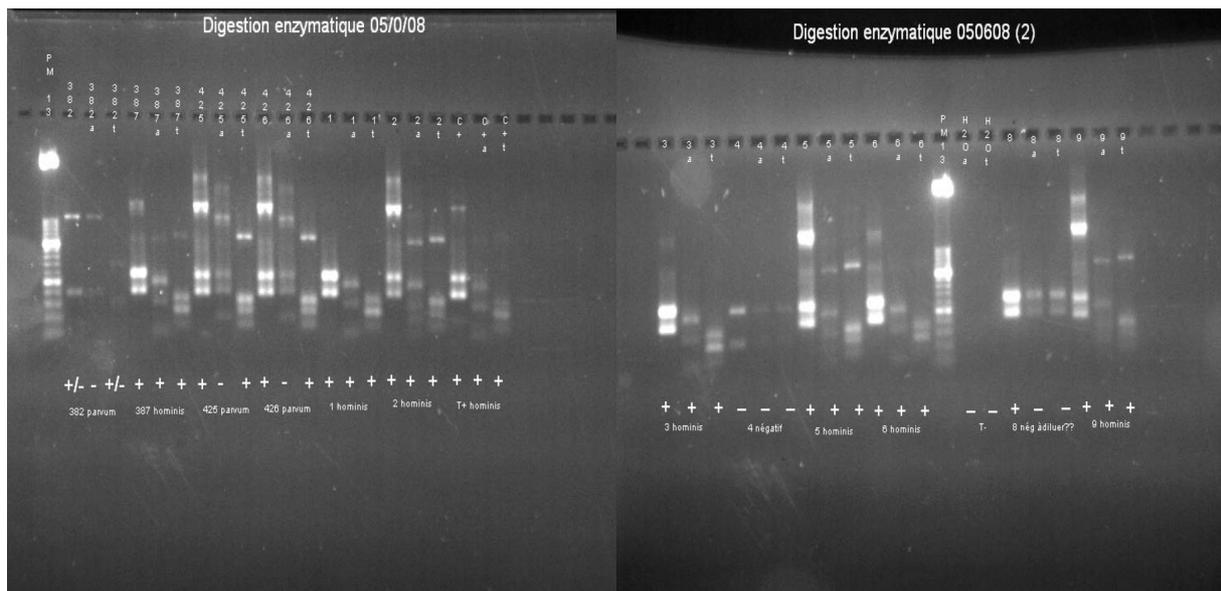


Figure IV : Diagnostic d'espèce de 10 de nos échantillons positifs par PCR

3- Microscopie électronique

La microscopie électronique à transmission et à balayage a permis de préciser que les stades parasitaires se déroulent dans une vacuole parasitophore dont la membrane dérive de la cellule hôte. Le parasite aurait donc une localisation intracellulaire mais extra-cytoplasmique [52].

4- Histopathologie

Le diagnostic de la cryptosporidiose était initialement basé sur l'identification des stades endogènes par un examen histologique dont l'intérêt est de localiser les zones infectées et d'évaluer l'étendue des lésions. Les traits pathologiques observés sont identiques chez l'Homme et chez l'animal.

- Au niveau intestinal, la parasitose détermine une réaction inflammatoire de la muqueuse avec infiltration lymphoplasmocytaire, une hyperplasie des cryptes et une atrophie villositaire [42,53]. Ces lésions sont similaires à celles qui accompagnent une réponse immunitaire à médiation cellulaire[54].

- Dans l'appareil respiratoire, les changements histopathologiques sont représentés par une métaplasie de la muqueuse des bronches et de la trachée, une déciliation et une infiltration par des lymphocytes, des cellules plasmiques et des histiocytes [55,56].

M. Traitement

- 1- **But** : Le traitement vise à neutraliser les parasites.
- 2- **Moyens** : Le traitement est mal codifié et les produits disponibles sont inconstamment actifs. Il utilise les antibiotiques, les antiparasitaires, les ARV, les antalgiques, les antiémétiques, la réhydratation.
- 3- **Indications** : Diarrhée dont l'examen parasitologique des selles a mis en évidence le *Cryptosporidium sp* et mal supportée par le patient.

❖ Chez l'immunocompétent

Il est symptomatique (réhydratation, antalgique, antiémétique...)

❖ Chez l'immunodéprimé

Le traitement utilise les antibiotiques de la classe des macrolides (Azithromycine, Spiramycine), des aminosides (Paromomycine), des imidazolés (Nitazoxanide) et les anti-rétroviraux.

a- Les Macrolides :

❖ **Azithromycine ou Zythomax^R** : comprimé de 250mg, 500mg, suspension 200mg/5ml

➤ **Posologie** : 500 mg, 1 000 ou 1 500 mg x 1/j Puis 500 mg x 3/semaine pendant 20-50jours jusqu'à 1 an.

➤ **Indications** : Elles sont limitées aux infections dues aux germes définis comme sensibles :

- Angines documentées à streptocoque A bêta-hémolytique, en alternative au traitement par bêtalactamines, particulièrement lorsque celui-ci ne peut être utilisé ;
- Surinfections des bronchites aiguës ;
- Exacerbations des bronchites chroniques ;
- Infections stomatologiques ;
- Cryptosporidiose.

➤ Contre indication: Ce médicament NE DOIT JAMAIS ETRE UTILISE en cas de :

- Antécédents de réaction allergique à l'azithromycine, à tout autre macrolide ou à l'un des excipients ;
- Association avec les alcaloïdes de l'ergot de seigle : dihydroergotamine, ergotamine (voir rubrique interactions) ;
- Association avec le cisapride ;
- En raison de la présence de lactose, ce médicament est contre-indiqué en cas de galactosémie congénitale, de syndrome de malabsorption du glucose et du galactose ou de déficit en lactase.

DECONSEILLE : Ce médicament NE DOIT GENELEMENT PAS ETRE UTILISE en cas de :

- Association avec les agonistes dopaminergiques : Bromocriptine, cabergoline, pergolide (voir rubrique interactions) ;
- La prescription d'azithromycine n'est pas recommandée chez les patients avec une insuffisance hépatique importante ni chez les patients atteints de cholestase sévère ;
 - Allaitement : absence de données sur le passage dans le lait maternel. L'innocuité de l'azithromycine chez la femme allaitante n'ayant pas été établie, la prescription ne sera effectuée que si les bénéfices attendus apparaissent supérieurs aux risques encourus.

➤ Effets secondaires :

- Cutanéomuqueux et allergiques : rash, photosensibilité, arthralgies, urticaire, prurit, rarement œdème de Quincke, réactions anaphylactiques. De rares cas de réactions cutanées sévères ont été rapportés.

- Gastro-intestinaux : nausées, vomissements, dyspepsie, diarrhée (rarement sévère), douleurs abdominales, pancréatite. De rares cas de colites pseudomembraneuses ont été rapportés.

- Hépatiques : augmentation des enzymes hépatiques réversible à l'arrêt du traitement. Rares cas de nécrose hépatique et d'insuffisance hépatique ayant rarement engagé le pronostic vital. Cependant, aucun lien de causalité n'a pu être établi.

Des cas isolés d'hépatite cholestatique ont été rapportés.

- Neurologiques : sensations vertigineuses ; de rares cas de convulsions ont été rapportés.

- Hématologiques : des cas isolés de thrombocytopénie ont été rapportés.

- Psychiatriques : de rares cas de comportement agressif, nervosité, agitation et anxiété ont été rapportés.

-Génitaux: vaginite.

- Auditifs : de rares cas de troubles de l'audition avec acouphène ou surdité ont été rapportés.

- Généraux : candidoses.

❖ **Spiramycine ou Rovamycine^R**: comprimé de 250 mg et 500 mg

➤ Posologie : 100 mg/kg/j pendant 10jours.

➤ Indications : Elles sont limitées aux infections dues aux germes définis comme sensibles :

- Angines documentées à streptocoque A bêta-hémolytique, en alternative au traitement par bêtalactamines, particulièrement lorsque celui-ci ne peut être utilisé.

- Sinusites aiguës. Compte tenu du profil microbiologique de ces infections, les macrolides sont indiqués lorsqu'un traitement par une bêtalactamine est impossible.

Rapport-gratuit.com

LE NUMERO 1 MONDIAL DU MÉMOIRES



- Surinfections des bronchites aiguës.
- Exacerbations des bronchites chroniques.
- Pneumopathies communautaires chez des sujets : Sans facteurs de risque, sans signes de gravité clinique, en l'absence d'éléments cliniques évocateurs d'une étiologie pneumococcique.
En cas de suspicion de pneumopathie atypique, les macrolides sont indiqués quels que soient la gravité et le terrain.
- Infections cutanées bénignes : impétigo, impétiginisation des dermatoses, ecthyma, dermo-hypodermite infectieuse (en particulier, érysipèle), érythrasma.
- Infections stomatologiques.
- Infections génitales non gonococciques.
- Chimio prophylaxie des rechutes du rhumatisme articulaire aigu en cas d'allergie aux bêtalactamines.
- Toxoplasmose de la femme enceinte.
- Prophylaxie des méningites à méningocoque en cas de contre-indication à la rifampicine :

Le but est d'éradiquer le germe (*Neisseria meningitidis*) du nasopharynx, la spiramycine n'est pas un traitement de la méningite à méningocoque, elle est préconisée en prophylaxie chez :

Le malade après son traitement curatif et avant sa réintégration en collectivité, les sujets ayant été exposés aux sécrétions oropharyngées dans les dix jours précédant son hospitalisation.

Il convient de tenir compte des recommandations officielles concernant l'utilisation appropriée des antibactériens.

➤ CONTRE-INDIQUE : Ce médicament NE DOIT JAMAIS ETRE UTILISE en cas d'allergie à la spiramycine ou à l'un des excipients.

DECONSEILLE :

Ce médicament est généralement déconseillé en cas d'allaitement : le passage de la spiramycine dans le lait maternel est non négligeable. Des troubles digestifs ont été décrits chez le nouveau-né. En conséquence, l'allaitement est déconseillé en cas de traitement par ce médicament.

- De très rares cas d'anémie hémolytique ayant été rapportés chez les patients ayant un déficit en Glucose-6-Phosphate-Déshydrogénase, l'utilisation de la spiramycine dans cette population de patients n'est pas recommandée.

➤ Effets secondaires :

- Système gastro-intestinal: Gastralgies, nausées, vomissements, diarrhée et très rares cas de colites pseudomembraneuses.

- Peau et annexes : éruptions, urticaire, prurit. Très rarement oedème de Quincke, chocs anaphylactiques. Très rares cas de pustulose exanthématique aiguë généralisée.

- Système nerveux central et périphérique : Paresthésies occasionnelles et transitoires.

- Manifestations hépatiques : très rares cas d'anomalies des tests hépatiques.

- Lignée sanguine : De très rares cas d'anémie hémolytique ont été rapportés.

b- Les Aminosides :

❖ **Paromomycine ou Humatin^R**: capsule de 250mg

➤ Posologie : 25-35 mg/kg/jour.
1000 mg x2/j durant 1 mois. Puis 500 mg x 2/jour en traitement d'entretien pouvant durer jusqu'à 14 mois.

➤ Indications : La paromomycine est prescrite dans le traitement de certaines infections intestinales provoquées par des organismes appelés *amibes*.

➤ Contre indication : La paromomycine est contre-indiquée dans les cas suivants :

Sensibilité ou allergie à la paromomycine ;
Occlusion intestinale.

➤ Effets secondaires :

Effets secondaires peu fréquents

- Diarrhées (bénignes) ;
- Nausées ;
- Douleurs à l'estomac.

Effets secondaires rares

- Eruptions cutanées ;
- Tintement d'oreilles ;
- Troubles de l'audition ;
- Etourdissements ;
- Diarrhées (importantes).

c- Anti-rétroviraux : La gravité de la cryptosporidiose est corrélée en partie à un taux de lymphocytes T CD4 peu élevé. C'est pourquoi, un traitement anti-rétroviral efficace permettant de restaurer les capacités immunitaires peut améliorer le pronostic de la cryptosporidiose [57].

Parmi les antirétroviraux utilisés dans l'infection à VIH, les inhibiteurs de protéases ou IP (nelfinavir, indinavir, ritonavir) semblent présenter un intérêt dans le traitement de la cryptosporidiose. En effet, en plus de leur activité inhibitrice sur la multiplication du VIH, ils interfèrent dans le cycle de développement de *Cryptosporidium sp.* Le parasite a besoin de certaines protéases pour les étapes d'excystation et d'invasion cellulaire, qui peuvent être neutralisées via l'action des IP [58].

d- Les imidazolés

❖ **Nitazoxanide** : **Alinia^R** : Suspension 100mg/5ml (flacon de 60ml), comprimé 500mg.

Dérivé du nitrothiazole- salicylamide, est actif sur de nombreux parasites. Son efficacité au cours de la cryptosporidiose chez les immunocompétents est inconstante, alors que chez les patients VIH+, l'efficacité dépend du degré d'immunosuppression et de la posologie [59,60].

➤ Posologie : 500mg X 2/j pendant 14jours.

➤ Indications : Alinia est tout à fait efficace dans la prophylaxie pour la diarrhée dans le cas des enfants et des adultes, si le symptôme est provoqué par lamblia de Giardia ou d'autres types de protozoaires (*Cryptosporidium*).

➤ Contre indication :

- Troubles de la fonction rénale ;
- Troubles de la fonction hépatique.

➤ Effets secondaires :

Réaction allergique graves:

- Fermeture de gorge ;
- Difficultés de respiration ;
- Ronflement ;
- Rougeurs.

Moins graves :

- Mal de tête ;
- Vomissant ;

- Diarrhée ;
- Nausée ;
- Douleur abdominale.

N. Prophylaxie

La petite taille et la résistance des oocystes de *Cryptosporidium sp* lui permettent d'échapper aux traitements classiques.

❖ Individuelle

Bouillir l'eau, se laver les mains avec du savon, désinfection des aliments consommés crus, hygiène féco-orale, limiter les contacts animaux.

❖ Générale

Les oocystes sont résistants à de nombreux facteurs environnementaux mais aussi à de nombreux désinfectants classiques utilisés pour traiter l'eau de boisson.

Le chlore et ses dérivés comme les chloramines, aux doses et temps de contact admissibles, sont insuffisants pour les inactiver. L'utilisation seule de l'hypochlorite de sodium ne permet pas une maîtrise correcte du risque de cryptosporidiose [61].

Aliments : Bien qu'une congélation classique à -20° C inactive une grande partie des oocystes, seule une surcongélation poussée des aliments et non une simple congélation habituelle, permet de réduire fortement le risque de transmission du parasite [62].

- Une congélation soudaine par l'utilisation d'azote liquide, permet une destruction totale du parasite [63].

- Les oocystes sont détruits ou perdent leur viabilité de l'ordre de 99,99 % à une température de 71,7° C maintenue pendant 5 secondes [64].

Eaux : - La filtration conventionnelle n'est pas adaptée car elle possède un maillage qui varie entre 5 et 100 µm. Ce qui laisse passer les oocystes.

- L'ozonation semble être le traitement chimique le plus efficace : elle peut effectivement détruire les protozoaires si la dose et le temps de contact sont suffisants [65].

- Le rayonnement ultraviolet est un traitement physique atteignant 100 % d'inactivation des oocystes [66].

III. PATIENTS ET METHODES

A. Cadre et lieu d'étude

L'étude a été réalisée dans l'unité des infections opportunistes parasitaires du Département d'Epidémiologie des Affections Parasitaires (DEAP) de la FMPOS de l'Université de Bamako, en collaboration avec les trois principaux sites de prise en charge du VIH/SIDA notamment le CHU du point G, le CHU de Gabriel Touré et le Centre d'Ecoute, de Soins, d'Animation et de Conseil (CESAC).

❖ Bamako

C'est la capitale du Mali située à califourchon sur le fleuve Niger en pleine zone soudanienne. En 2009, la ville compte 2 209 225 habitants (Bamakois). Elle s'étend d'ouest en est sur 22 km et du nord au sud sur 12 km, pour une superficie de 267 km² [67].

Administrativement, Bamako est composée de six communes dont les quatre premières sont situées sur la rive gauche (les communes I, II, III et IV). Les deux autres sont sur la rive droite (les communes V et VI) avec un accès difficile au centre ville. Le premier responsable du district est le gouverneur du district et les autorités municipales sont représentées par une mairie dont le premier responsable est le maire central.

❖ Description générale de l'hôpital du Point G

Le CHU du Point G est une structure de troisième référence et se place au sommet de la pyramide sanitaire du Mali. Distant de 8km environ du centre ville, il est situé sur la colline du point G.

Aussi, bien des patients du district de Bamako que du reste du pays viennent s'y faire soigner. Il est doté de 6 blocs opératoires et 18 services dont :

- 11 services de médecine et de spécialités médicales : Cardiologie A, Cardiologie B, Hémato oncologie, Maladies infectieuses, Médecine interne, Neurologie, Néphrologie, Pneumo-phtisiologie, Psychiatrie, Rhumatologie, Urgence.
- 5 services de chirurgie et de spécialités chirurgicales : Anesthésie réanimation, chirurgie A, chirurgie B, Gynéco Obstétrique, Urologie.
- 1 service d'imagerie médicale.
- 1 laboratoire multifonctionnel.

Le service de maladies infectieuses baptisé **pole d'excellence de la prise en charge du VIH/SIDA** a été notre principal collaborateur au sein de cet hôpital. Il est situé à l'Est de l'hôpital entre le service de Neurologie et de la cardiologie B. C'est un grand bâtiment d'un étage qui comporte :

Au rez-de-chaussée 2 salles de consultations, 16 salles d'hospitalisations avec 36 lits (4 salles de 4lits, 8 salles de 2 lits, 4 salles de 1 lit), une salle de 2 lits pour l'hôpital du jour, une salle des internes, une salle des infirmiers, une salle de CES non fonctionnelle, le bureau du major et un salon des accompagnants comportant un placard pour chaque accompagnant.

Ce service rayonne par la présence 24H/24H d'une équipe sentinelle de soins intensifs composée de médecins et d'infirmiers pour la prise en charge adéquate des patients hospitalisés et ceux reçus en urgence. Environ 90-95 % des lits sont occupés par des patients séropositifs pour le VIH, d'où l'importance de l'étude.

❖ Description générale de l'hôpital Gabriel Touré

Le CHU Gabriel Touré de par sa situation géographique demeure le plus sollicité. Il est situé au centre de Bamako en commune III avec à l'Est le quartier Médine à l'Ouest l'école nationale des ingénieurs (ENI), au Nord la garnison de l'état major de l'armée de terre, au Sud le TRANIMEX (Société de dédouanement et de transit). Il comporte plusieurs services :

- Un service de chirurgie orthopédique et traumatologique ;
- Un service de chirurgie pédiatrique ;
- Un service de pédiatrie ;
- Un service d'urologie ;
- Un service des urgences chirurgicales ;
- Un service de gynécologie obstétrique ;
- Un service d'anesthésie et Réanimation ;
- Un service d'oto- Rhino- Laryngologie ;
- Un service d'hépto gastro-entérologie ;
- Un service de cardiologie ;
- Un service de diabétologie ;
- Un service d'imagerie médicale et de radiologie ;
- Un laboratoire d'analyse médicale polyvalent.

Dans cette structure le service d'hépto gastro-entérologie a été d'une participation importante. Il comporte 3 salles d'hospitalisation avec 18 lits. Un bureau pour le major, une salle pour les infirmiers, une salle pour les externes et une salle pour les internes et CES. C'est dans ce service que le premier cas de VIH a été découvert au Mali et depuis lors il est devenu l'un des services de référence pour la prise en charge des malades.

❖ Description générale du CESAC

Le Centre d'Ecoute de soins d'Animation et de Conseil (CESAC) a été créé en septembre 1996 afin d'apporter une réponse médicale et psychosociale adaptée aux problèmes de la prise en charge des personnes vivant avec le **VIH/SIDA (PV-VIH)**.

Le CESAC à été réalisé grâce au soutien financier de la coopération française en collaboration avec le Ministère de la Santé, des Personnes Agées et de la Solidarité de l'époque et l'Association de Recherche de Communication et d'Accompagnement à domicile des PV-VIH (ARCAD/SIDA) qui assure la gestion et l'animation.

La situation géographique : Le CESAC est une structure de prise en charge située en commune III et au centre commercial de Bamako. II est au bord de la rue Archinard dans la même cours que le service social du district, contigu au Centre d'Accueil et d'Orientation des Enfants (CAOE) et à l'Est du Ministère de l'Administration Territoriale et des Collectivités locales.

Les Locaux :

Le CESAC se compose de :

- Une pièce d'accueil et de secrétariat ;
- Une salle de documentation faisant aussi fonction de salle d'attente ;
- Une salle de soins et de prélèvements avec une salle d'observation de jour contiguë possédant cinq lits ;
- Une salle d'Archives contenant les dossiers médicaux des patients ;
- Quatre bureaux pour les consultations médicales et de conseil ;
- Deux bureaux pour les travailleurs sociaux ;

- Une salle de réunions ;
- Deux bureaux de pharmacie ;
- Un Laboratoire biologique.

Le personnel : Le personnel est pluridisciplinaire et est placé sous la responsabilité du médecin directeur du centre.

Les objectifs de CESAC :

Le CESAC a pour objectifs de :

- Promouvoir une prise en charge de qualité dans le respect de l'éthique et des droits des personnes ;
- Faciliter l'accès au conseil et aux soins ;
- En offrant aux personnes et aux familles infectées par le VIH/SIDA un lieu d'accueil, de rencontre, d'orientation, d'information, de soutien psychosocial.
- En servant de lieu de prélèvements pour le dépistage volontaire et d'observation journalière pour les **PVVIH**.
- Permettre aux intervenants du domaine de disposer d'un espace de rencontre, d'échange, d'information et de formation ;
- Améliorer la qualité de vie et de bien être des PVVIH/ offrir aux PVVIH une prise en charge globale en milieu extrahospitalier (accompagnement, soins à domicile ...).

Il a ouvert une succursale dans chacune des autres communes de Bamako au niveau de leur centre de santé de référence. Ces unités sont appelées USAC (unité de soins, d'accompagnement et de conseil des personnes vivant avec le VIH/SIDA) suivi du nom de la commune correspondante.

Elles sont chargées avec le CESAC du suivi ambulatoire des personnes vivant avec le VIH.

B. Période d'étude et Type d'étude

Il s'est agi d'une étude transversale qui s'est déroulée sur une période de trois ans, de Juillet 2007 à Janvier 2010.

C. Population d'étude

Ont été inclus dans l'étude tous les patients VIH positif et diarrhéiques, hospitalisés ou ambulatoires, suivis dans ces structures de santé et pour lesquels il nous a été adressé une demande d'examen des selles pour la recherche d'infections opportunistes parasitaires digestives.

D. Critères d'inclusion :

- Avoir une sérologie VIH positive et faire une diarrhée ;
- Etre suivi dans l'une des structures de santé.

E. Critères de non inclusion :

- Avoir une sérologie VIH négative ;
- Patient présentant des infections opportunistes dont la sérologie n'a pu être connue.

F. Collecte de données

La collecte des prélèvements se faisait soit par passage systématique d'un étudiant du lundi au Vendredi entre 09h et 10h, soit en cas d'appel téléphonique des sites d'études, soit par acheminement au laboratoire par le patient ou par l'accompagnant à l'hôpital.

Chaque prélèvement a bénéficié des techniques d'examen direct, de Ritchie et de Ziehl Neelsen modifiée par Henricksen et Pohlenz. A ces techniques s'ajoutent les techniques de Kato Katz et de Baerman pour les selles moles et moulées.

Dans le cas spécifique des cryptosporidies notre arsenal diagnostic a porté sur les techniques de Ritchie, de Ziehl Neelsen modifiée par Henricksen et Pohlenz et l'envoi de quelques échantillons en France pour l'identification d'espèce par PCR.

Pour les patients remplissant nos critères d'inclusion nous avons réalisé le recueil des données grâce à une fiche technique contenant des variables cliniques, biologiques et sociodémographiques.

G. Problèmes éthiques

Ce travail a bénéficié de l'accord du **haut conseil de lutte contre le SIDA**.

Au cours de notre étude, nous avons utilisé des matériels stériles à usage unique pour le prélèvement des selles.

Les données cliniques et biologiques ont fait l'objet d'une stricte confidentialité.

Les résultats ont été transmis aux cliniciens prescripteurs pour une prise en charge appropriée.

H. Gestion, analyse et saisie des données

Le résultat de l'analyse des selles était consigné sur la fiche de demande d'examen, ainsi que dans le cahier de laboratoire et dans le registre.

La saisie des données a été faite avec le logiciel Microsoft Office Access 2003, et l'analyse avec le logiciel StataSE 10.

Dans l'interprétation des résultats une probabilité (p) inférieure ou égale à 0,05 était en faveur d'une relation statistiquement significative entre les variables mesurées.

IV. RESULTATS

A. Caractéristiques Sociodémographiques

❖ Sexe

Tableau IV : Répartition des patients selon le sexe

SEXE	Effectifs	Fréquence
Féminin	173	51,80
Masculin	161	48,20
Total	334	100

Le sex-ratio était de 1,07 en faveur des femmes.

NB : Le sexe d'un patient n'a pu être connu.

❖ Age

Tableau V: Répartition des patients selon l'âge.

Age	Effectifs	Fréquence
0-10	14	4,68
11-20	16	5,35
21-30	61	20,40
31-40	116	38,80
41-50	64	21,40
51-60	22	7,36
61-80	6	2,01
Total	299	100
Ages manquant	36	36/335 =10,75

La tranche d'âge 31-40 ans était la plus représentée avec 34,63% de l'effectif. Les percentiles 25, 50 et 75 étaient respectivement à 28, 35 et 45 ans, avec une moyenne d'âge de $35,37 \pm 12,44$ ans, le mode était 35 ans, la médiane 35 ans, avec un minimum de 2 ans et un maximum de 75 ans.

NB : Les âges manquant n'ont pas été pris en compte par l'analyse.

❖ Site de collecte des données

Tableau VI: Répartition des patients selon le site de prescription.

Structure sanitaire	Effectifs	Fréquence
CHU GT	90	26,87
CHU PG	161	48,06
CESAC	84	25,07
Total	335	100

Le CHU du Point G avait la fréquence la plus élevée avec 48,06%.

B. Caractéristiques biologiques et thérapeutiques

a. Taux de CD4

Tableau VII: Répartition des patients selon le taux de CD4

Taux de CD4 (Cellules/mm ³)	Effectifs	Fréquence
<200	160	68,67
200-499	47	20,17
≥500	26	11,16
Total	233	100
ND	102	102/335 =30,45

68,67% des patients avaient un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm³. Les percentiles 25, 50 et 75 étaient de 16, 89 et 274 cellules/mm³, avec une moyenne de 206 ± 416 cellules/mm³, la médiane de 89 cellules/mm³ avec un minimum de 0 cellules/mm³ et un maximum de 5220 cellules/mm³.

NB : L'analyse a fait fi des taux de CD4 inconnus.

b. Traitement ARV

Tableau VIII: Répartition des patients selon la prise d'ARV

Traitement ARV	Effectifs	Fréquence
Oui	200	62,89
Non	118	37,11
Total	318	100
ND	17	17/335 = 5

Les patients sous ARV étaient de 62,89%.

C. Résultats parasitaires

Tableau IX: La fréquence globale de la cryptosporidiose suivant la technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz

Patients	Effectifs	Fréquence
Positifs	36	10,75
Négatifs	299	89,25
Total	335	100

10,75% des patients étaient positifs au **Ziehl Neelsen modifiée par Henriksen et Pohlenz**

Tableau X: Répartition des patients positifs selon l'espèce de cryptosporidies

Espèces	Effectifs	Fréquence
<i>Cryptosporidium hominis</i>	10	55,56
<i>Cryptosporidium parvum</i>	8	44,44
Total	18	100

Parmi nos échantillons positifs 18 ont bénéficié de la PCR et *Cryptosporidium hominis* était l'espèce la plus dominante.

PCR : Cryptosporidies

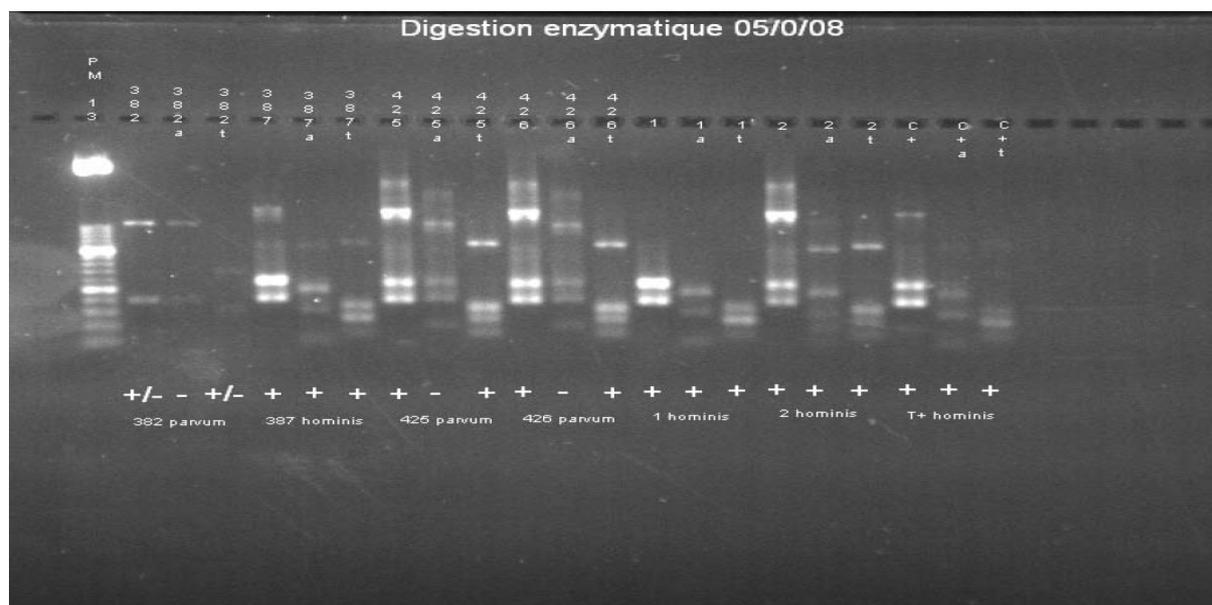


Figure IV : Diagnostic d'espèce de 10 de nos échantillons positifs par PCR

Tableau XI: Prévalence de la cryptosporidiose selon le site de prescription

Structure sanitaire	Fréquence		Pourcentage
	n	+	
CHU GT	83	7	7,78
CHU PG	140	21	13,04
CESAC	76	8	9,52
Total	299	36	10,75

La fréquence d'excrétion des oocystes de *Cryptosporidium sp* était de 13,04% au CHU du point G, de 9,52% dans la population des malades du CESAC et de 7,78% au CHU Gabriel Touré (p=0,4) [chi² de Pearson]

D. Résultats analytiques

Tableau XII: Répartition des patients positifs aux cryptosporidies selon la prise des ARV.

Cryptosporidiose ARV	Positif		Négatif		Total	
	n	%	n	%	n	%
Oui	20	10	180	90	200	100
Non	15	8.8	103	87,29	118	100
Total	35	11,02	283	88,99	318	100

Parmi les patients sous traitement ARV, 10% excrétaient des oocystes de cryptosporidies.

Selon que les patients soient sous ARV ou non, les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative en terme de portage de cryptosporidies ($p=0,455$) [chi² de Pearson].

Tableau XIII : Associations ARV recommandées préférentiellement

Zidovudine (AZT) + Lamivudine (3TC)	}	+	Indinavir
Stavudine (d4T) + Didanosine (ddI)			Nelfinavir
Stavudine (d4T) + Lamivudine (3TC)			Ritonavir
Zidovudine (AZT) + Didanosine (ddI)			Lopinavir
			Efavirenz
			Névirapine
			Abacavir

Tableau XIV: Répartition des patients positifs ou non aux cryptosporidies selon le taux de CD4

Cryptosporidies Taux de CD4	Positifs	Négatifs	Total
	n %	n %	n %
<200	26	134	160
	96,3	65	68,67
≥200	1	72	73
	3,7	35	31,33
Total	27	206	233
	100	100	100

L'analyse de ce tableau montre une association statistiquement significative entre le taux de CD4 et l'excrétion d'oocystes de *Cryptosporidium* sp. Les malades ayant un taux de CD4 < 200/mm³ excrétaient plus d'oocystes (p=0,001) [chi² de Pearson].

V. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

Les infections opportunistes digestives au cours du VIH-SIDA restent un problème d'actualité au Mali, à l'heure où de nombreux efforts sont réalisés par les autorités nationales et la communauté internationale pour rendre disponible et accessible la trithérapie [68].

Notre étude est une première à plus d'un titre car elle a regroupé les trois principaux sites de prise en charge du VIH-SIDA du district de Bamako ; a permis le diagnostic d'espèce des cryptosporidies et par son fort contingent de malades depuis l'avènement de la gratuité du traitement anti-rétroviral.

❖ Méthodologie

Notre étude transversale de Juillet 2007 à Janvier 2010 s'est déroulée dans deux CHU et un centre de prise en charge de malades ambulants du district de Bamako.

Cette étude a connu quelques faiblesses entre autres les informations manquantes sur certains patients, la PCR n'a pu être réalisée chez tous les patients de l'étude et un défaut de suivi de tous les patients.

❖ Caractéristiques de base de la population d'étude

Dans notre étude le portage était plus élevé chez les femmes avec 51,80% et un sex-ratio de 1,07. Ceci met en exergue l'exposition et la vulnérabilité des femmes d'où la nécessité de renforcer la lutte contre les infections sexuellement transmissibles (IST) particulièrement chez les femmes.

Ce résultat rejoint celui de l'OMS qui affirme que les femmes représentaient la moitié de toutes les personnes vivant avec le

VIH dans le monde et 61% des infections à VIH en Afrique subsaharienne (ESDIV).

A.Konaté et al. en 2001 à Bamako et A.A. Oumar et al. en 2005 à Bamako trouvèrent respectivement sur des effectifs de 70 et 115 patients des sex-ratio de 1,12 et 1,05 en faveur des hommes. Cette différence de sexe résiderait dans la petite taille de leur échantillon.

La tranche d'âge 31 à 40 ans a été la plus affectée soit 38,80% avec des extrêmes allant de 2 ans à 75ans. La prédominance de cette tranche d'âge est en accord avec la dynamique de l'épidémie du VIH-SIDA au Mali et est probablement liée à une plus grande tendance de cette tranche d'âge à une activité sexuelle plus élevée.

Le CHU du point G (Service de maladies infectieuses) a engrangé le plus grand effectif de malades soit 48,06%, sans doute du à son statut de service spécialisé dans la prise en charge du VIH (95% des lits) avec l'accueil des patients d'une immunodépression avancée (probablement infectés par des agents opportunistes) et sa proximité de notre laboratoire d'étude.

❖ **Caractéristiques biologiques et thérapeutiques**

Taux de CD4 :

La majorité de nos patients (68,67%) avait un taux de CD4 inférieur à 200 cellules/mm³, la médiane 89 cellules/mm³. Cette baisse de l'immunité pourrait s'expliquer par le dépistage des patients à un stade avancé de la maladie ou une éventuelle résistance virale. Dans les pays d'Afrique subsaharienne on note une proportion importante de patients très immunodéprimés (45 à 79% de patients avec moins de 200cellules/mm³) à l'inclusion sous trithérapie [69,70].

Traitement ARV :

Dans notre étude 62,89% des patients étaient sous traitement ARV. Notre série était comparable à l'étude de Oumar A.A. et al en 2005 à Bamako qui trouvait 67,8% de patients sous traitement ARV ($p=0,72$) [7].

❖ **Caractéristiques parasitaires**

Nous avons trouvé une prévalence de 10,75% de cryptosporidiose par la technique de Ziehl Neelsen modifiée par Henricksen et Pohlenz. Ce résultat concorde avec la prévalence de cette maladie dans les pays en développement entre 8,7 et 48%[4]. En effet, les études de F.Loko et al en 2000 au Bénin et Oumar A. et al en 2005 à Bamako ont apporté des prévalences respectives de 10,80% ($p=0,83$) [71] et 13,3% ($p=0,01$) [7]. Cette différence statistique avec l'étude de Bamako serait liée à l'action de la trithérapie sur l'incidence de la maladie.

Dans notre étude, *Cryptosporidium hominis* était l'espèce la plus dominante avec 55,56% et *Cryptosporidium parvum* représentait 44,44%. Zavvar et al trouvaient 71% de *cryptosporidium hominis* en Iran en 2008 [73].

La technique de la PCR (polymérase chaîne réaction) utilise des sondes spécifiques pour deux espèces notamment *Cryptosporidium hominis* et *Cryptosporidium parvum*. Les autres espèces de cryptosporidies n'ont pas pu être identifiées.

Dans notre série sept échantillons n'ont pas pu bénéficier de la PCR car ils étaient conservés dans du formol qui est une contre indication à la PCR.

Le CHU du Point G s'est distingué des autres sites de prise en charge avec la plus forte prévalence de cryptosporidiose 13,04%. Ce profil serait lié à son plus grand effectif de malades VIH alités (95% des lits).

Notre série révélait un patient (3,37%) atteint de cryptosporidiose avec un taux de CD4 supérieur à 200

cellules/mm³ et les taux de CD4 des autres y étaient inférieurs (p=0,001).

La cryptosporidiose constitue un témoin clinique de l'infection à VIH au Mali puisque 85,7% des patients sont à la phase SIDA suivant les critères de Bangui [1].

Des cas aberrants de cryptosporidiose ont été rapportés chez l'immunocompétent avec une symptomatologie moins bruyante.

Les patients sous traitement ARV ont présenté la cryptosporidiose dans 10% des cas (p=0,455). Ce résultat laisse entendre que la prise des ARV n'interfère pas dans la survenue de la cryptosporidiose du moins au début de l'instauration de la trithérapie. Dans notre série, nous n'avons pas analysé l'impact de la trithérapie sur l'état général de nos patients. Cependant nous savons qu'un traitement ARV efficace permet de restaurer les capacités immunitaires et d'améliorer le pronostic de la cryptosporidiose [57]. Il semble que les inhibiteurs de protéase auraient une activité sur des protéases spécifiques dont le parasite a besoin pour les étapes d'excystation et d'invasion cellulaire [72]. La tendance thérapeutique par les ARV est de deux inhibiteurs nucléosidiques et un inhibiteur non nucléosidique chez les sujets naïfs. Elle fait recours aux inhibiteurs de protéases pour les cas de résistance ou de VIH2 qui n'est pas assez fréquent.

En ce qui concerne, le suivi thérapeutique la moitié de nos patients atteints de cryptosporidiose, suivis et sous traitement ARV, a évolué vers une amélioration de leur état général.

Les traitements spécifiques de la cryptosporidiose n'ont été retrouvés dans aucune prise en charge chez nos patients.

VI. CONCLUSION

Les résultats de ce travail montrent que la cryptosporidiose demeure la première cause de diarrhée chez les patients VIH-SIDA au Mali avec une fréquence de 10,75%.

Le CHU du point G était le site qui avait enregistré la plus forte prévalence 13,04% devant le CESAC 9,52% et le CHU Gabriel Touré 7,78%. La cryptosporidiose est un marqueur clinique de mauvais pronostic de l'infection par le VIH car 96,3% de nos patients positifs avaient un taux de $CD4 < 200$ cellules/mm³ avec une moyenne de 56,59.

L'avènement de la gratuité de la trithérapie et sa diffusion ont permis la réduction de cette parasitose digestive opportuniste au Mali.

VII . RECOMMANDATIONS

❖ **Aux autorités sanitaires**

- Renforcer les mesures de préventions de la transmission de l'infection à VIH ;
- Informer et éduquer le public du risque que présente la consommation des légumes, des fruits et du lait et ses dérivés crus ;
- Ajouter les médicaments utilisés dans le traitement de la cryptosporidiose dans la liste des médicaments opportunistes disponibles chez les patients VIH/SIDA.

❖ **Aux prescripteurs**

- Introduire dans le bilan du dépistage et du suivi des patients VIH/SIDA la recherche de cryptosporidies.

❖ **Aux patients**

- Respecter les consignes par rapport au mode de transmission du VIH.

VIII . REFERENCES

1. Gentilini M, Duflo B, Danis M: **SIDA tropical**. In *Médecine tropicale*. Flammarion edition Paris: 1989:401-414.
2. Mackenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, et al: **A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply**. *N Engl J Med* 1994, **331**: 161-167.
3. Deroin F: **Epidémiologie de la cryptosporidiose en France en 2006 et 2007: données du réseau cryptosporidies**. *Anofel* 2009.
4. Current WL, N.C.Reese, J.V.Ernst, W.S.Bailey, et al: **Human cryptosporidiosis in immunocompetent and immunodeficient persons: studies of an outbreak and experimental transmission**. *N Engl J Med* 1983, **308**: 1252-1257.
5. Pichard E, Doumbo O, Minta D, Traore HA: **Role of cryptosporidiosis in diarrhea among hospitalized adults in Bamako**. *Bull Soc Pathol Exot* 1990, **83**: 473-478.
6. Minta DK, Dembélé M, Dolo A, et al: **Les parasitoses digestives chez les patients infectés par le VIH/SIDA dans les services de médecine interne et maladies infectieuses de Bamako-Mali**. *Mali Médical* 2007, 33-36.
7. Oumar A.A., S.Dao, S.Diallo: **Prévalence des infections opportunistes au cours du SIDA en milieu hospitalier de Bamako, Mali**. *Louvain Médical* 2008, **127**: 12-17.
8. Reese NC, W.L.Current, J.V Ernst, and W.S.Bailey: **Cryptosporidiosis of man and calf: a case report and results of experimental infections in mice and rats**. *Am J Trop Med Hyg* 1982, **31**: 226-229.
9. Triffit MJ: **Observation on two species of coccidia parasites in snakes**. *J Protozool* 1925, **1**: 19-26.
10. Tyzzer EE: ***Cryptosporidium parvum* (sp. nov.), a coccidium found in the small intestine of the common mouse**. *Arch Protistenkd* 1912, **26**: 394-412.
11. Tyzzer EE: **An extracellular coccidium *Cryptosporidium muris* (gen. et sp. nov) of the gastric glands of the common mouse**. *J Med Res* 1910, **23**: 487-516.
12. O'Donoghue PJ: ***Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals**. *Int J Parasitol* 1995, **25**: 139-195.
13. Pohlenz J, H.W.Cheville, and W.J.Bemrick: **Cryptosporidiosis as a probable factor in neonatal diarrhea of calves**. *J Am Vet Med Assoc* 1978, **172**: 452-457.
14. Nime FA, J.D Burek, D.L.Page, M.A.Holscher, and J.H.Yardley: **Acute enterocolitis in a human being infected with the protozoan *Cryptosporidium***. *Gastroenterology* 1976, **70**: 592-598.

15. Fayer R, and B.L.P.Unger: ***Cryptosporidium* spp. and cryptosporidiosis.** *Microbiol Rev* 1986, **50**: 458-483.
16. Uni S, M.Iseki, T.Maekawa, K.Moriya, and S.Takada: **Ultrastructure of *Cryptosporidium muris* (strain RN 66) parasitizing the murine stomach.** *Parasitol Res* 1987, **74**: 123-132.
17. Tzipori S: **Cryptosporidiosis in perspective.** *Adv Parasitol* 1988, **27**: 63-129.
18. Sterling CR, Arrowood MJ: **Cryptosporidia.** *Parasitic Protozoa* 1993, **6**: 159-225.
19. E.Divoux, S.Szainer, G.Le Moal, N.Venisse, et al: **Mise au point sur le traitement de la cryptosporidiose: Intérêt de la Nitazoxanide.** *J Pharm Clin* 2006, **25**: 197-205.
20. Hart CA, D.Baxby, and N.Blundell: **Gastroenteritis due to *Cryptosporidium*: a prospective survey in a children's hospital.** *J Infect* 1984, **9**: 264-270.
21. Klesius PH, T.B.Haynes, and L.K.Malo: **Infectivity of *Cryptosporidium* sp isolated from wild mice for calves and mice.** *J Am Vet Med Assoc* 1986, **189**: 192-193.
22. Loureiro, E.C.B., A.C.Linhares, and L.Mata: **Acute diarrhea associated with *Cryptosporidium* in Belem, Brazil (Preliminary report).** *Rev Inst Med Trop* 1986, **28**: 138-140.
23. Baxby D, C.A.Hart, and C.Taylor: **Human cryptosporidiosis: a possible case of hospital cross infection.** *Br Med* 1983, **287**: 1760-1761.
24. Koch KL, D.J.Phillips, R.C.Aber, and W.L.Current: **Cryptosporidiosis in hospital personnel: evidence for person-to-person transmission.** *Ann Intern Med* 1985, **102**: 593-596.
25. Holten-Anderson W: **Human cryptosporidiosis.** *N Engl J Med* 1983, **309**: 1326.
26. Jokipii L, S.Pohjola, and A.Jokipii: ***Cryptosporidium* : a frequent finding in patient with gastrointestinal symptoms.** *Lancet ii* 1983, 358-362.
27. Current WL: ***Cryptosporidium* and cryptosporidiosis. In Acquired Immune Deficiency Syndrome (M.S. Gottlib and J.E. Groopman, Eds).** *U C L A Symposia on molecular and cellular biology, new serie* 1984, **16**: 355-373.
28. Anderson BC: **Cryptosporidiosis in Idaho lambs: natural and experimental infections.** *J Am Vet Med Assoc* 1982, **181**: 151-153.
29. Alpert G, L.M.Bell, C.E.Kirkpatrick, et al: **Outbreak of cryptosporidiosis in a day-care center.** *Pediatrics* 1986, **77**: 152-157.
30. Nwanyanwu OC, J.N.Baird, and G.R.Reeve: **Cryptosporidiosis in a day-care center.** *Tex Med* 1989, **85**: 40-43.
31. D'Antonio RG, R.E.Winn, J.Taylor, et al: **A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts.** *Ann Intern Med* 1985, **103**: 886-888.

32. Gallaher MM, J.L.Herndon, L.J Nim, et al: **Cryptosporidiosis and surface water.** *Am J Public Health* 1989, **79**: 39-42.
33. Tzipori S, M.Smith, C.Birch, et al: **Cryptosporidiosis in hospital patient with gastroenteritis.** *Am J Trop Med Hyg* 1983, **32**: 931-934.
34. Weber J, and S.Philipp: **Human cryptosporidiosis.** *N Engl J Med* 1983, **309**: 1326.
35. Campbell I, S.Tzipori, G.Hutchinson, et al: **Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts.** *Vet Rec* 1982, **111**: 414-415.
36. Matheron S, et P.M.Girard: **La cryptosporidiose.** *Concours Med* 1987, 1829-1835.
37. Fayer, Graczyk TK, et al: **Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay.** *Appl Environ Microbiol* 1998, **64**: 1070-1074.
38. Graczyk TK, Cranfield MR, et al: **Viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts are retained upon intestinal passage through a refractory avian host.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**: 3234-3237.
39. Clavel A, Doiz, et al: **House fly (*Musca domestica*) as a transport vector of *Cryptosporidium parvum*.** *Folia Parasitol* 2002, **49**: 163-164.
40. Mathison BA, Ditrich O: **The fate of *Cryptosporidium* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis.** *J Parasitol* 1999, **85**: 678-681.
41. Casemore DP: **Epidemiological aspects of human cryptosporidiosis.** *Epidemiol Infect* 1990, **104**: 1-28.
42. Cohen JD, L.Ruhlig, S.A.Jayich, M.J.Toyo, et al: ***Cryptosporidium* in acquired immunodeficiency syndrome.** *Dig Dis Sci* 1984, **29**: 773-777.
43. Clark DP, Sears CL: **The pathogenesis of Cryptosporidiosis.** *Parasitol Today* 1996, **12**: 221-225.
44. Andreani T, R.Modigliani, Y.Le Charpentier, et al: **Acquired immunodeficiency with intestinal cryptosporidiosis: possible transmission by Haitian whole blood.** *Lancet i* 1983, 1187-1191.
45. Jokipii L, and A.Jokipii: **Timing of symptoms and oocyst excretion in human cryptosporidiosis.** *N Engl J Med* 1986, **315**: 1643-1647.
46. Goldfarb J, and H.Tanowitz: **Cryptosporidiosis assesment of chemotherapy of male with AIDS.** *Morbid Mortal Week Rep* 1982, **31**: 589-592.
47. Kibbler CC, A.Smith, et al: **Pulmonary cryptosporidiosis occuring in a bone marrow transplantation patient.** *Scand J Infect* 1987, **19**: 581-584.
48. Travis WD, K.Schmidt, J.Maclowry, et al: **Respiratory cryptosporidiosis in a patient with malignant lymphoma.** *Arch Pathol Lab Med* 1990, **114**: 519-522.

49. Guarda LA, S.A.Stein, K.A.Cleary, et al: **Human cryptosporidiosis in the acquired immune deficiency syndrome.** *Arch Pathol Lab Med* 1983, **107**: 652-666.
50. Margulis SJ, C.Honig, R.Soave, et al: **Biliary tract obstruction in the acquired immunodeficiency syndrome.** *Ann Intern Med* 1986, **105**: 207-210.
51. N.Kourda, A.Blel, S.Baltagi Ben Jilani, et al: **Cryptosporidiose gastrique révélant un carcinome à petites cellules bronchiques.** *Bull Soc Pathol Exot* 2008, **101**: 22-23.
52. Vetterling JM, H.R.Jervis, T.G.Meril, et al: ***Cryptosporidium wrairi* sp.n. from the guinea pig *Cavia porcellus* with an emendation of the genus.** *J Protozool* 1971, **18**: 243-247.
53. Berg IE, A.C.Peterson, and T.P.Freeman: **Ovine cryptosporidiosis.** *J Am Vet Med Assoc* 1978, **173**: 1586-1587.
54. Moon HW, F.L.Joachim, et al: **Intestinal cryptosporidiosis : pathogenesis and immunity.** *Microecol and Therapy* 1985, **15**: 103-120.
55. Dhillon AS, H.L.Thacker, A.V.Dietzel, et al: **Respiratory cryptosporidiosis in broiler chickens.** *Av Dis* 1981, **25**: 747-751.
56. Randall CJ: **Cryptosporidiosis of the bursa of Fabricius and trachea in broilers.** *Av Pathol* 1982, **11**: 95-102.
57. Smith HV, Corcoran GD: **New drugs and treatment for cryptosporidiosis.** *Curr Opin Infect Dis* 2004, **176**: 557-564.
58. Vera H, Jutta E, and Franz P: **Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum*.** *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003, **52**: 359-364.
59. Amadi B, Mwiya M, Musuku J, et al: **Effect of nitazoxanide on morbidity and mortality in Zambian children with cryptosporidiosis: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2002, **360**: 1375-1380.
60. Chen XM, Keithly JS, Paya CV, et LaRusso NF: **Cryptosporidiosis.** *N Engl J Med* 2002, **346**: 1723-1731.
61. Guerrant RL: **Cryptosporidiosis: an emerging highly infectious threat.** *Emerg Infect Dis* 1997, **3**: 51-57.
62. Fayer R, et Neard T: **Effects of low temperature on viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts.** *Appl Environ Microbiol* 1996, **62**: 1431-1433.
63. Robertson LK, Campbell AT, Smith HV: **Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures.** *Appl Environ Microbiol* 1992, **58**: 3494-3500.
64. Deng MQ, et Cliver DO: **Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts in cider by flash pasteurization.** *J Food Prot* 2001, **64**: 523-527.

65. Korich DG, Mead JR, Modore MS, et al: **Effect of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability** . *Appl Environ Microbiol* 1990, **56**: 1423-1428.
66. Belosevic M, Craik SA, Stafford JL, et al: **Studies on the resistance / reactivation of *Giardia muris* cyst and *Cryptosporidium parvum* oocysts exposed to medium-pressure ultraviolet radiation**. *FEMS Microbiol Lett* 2001, **204**: 197-203.
67. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Bamako>. Bamako. 2010. 10-2-2010.
Ref Type: Internet Communication
68. Weller I: **Delivry of antiretroviral therapy in sub-saharan Africa**. *Clin Infect Dis* 2006, **43**: 777-778.
69. Lawn SD, Myer L, Harling G, et al: **Of mortality and non-death losses from an antiretroviral treatment service in South Africa: implications for program evaluation**. *Clin Infect Dis* 2006, **43**: 770-776.
70. Van Der Loeff MS, Awasana AA, Sarge-Njie R, et al: **Sixteen years of HIV surveillance in a West African research clinic reveals divergent trends of HIV-1 and HIV-2**. *Int J Epidemiol* 2006, **35**: 1322-1328.
71. F.Loko et al : **Prévalence de la cryptosporidiose chez les sujets séropositifs au VIH au Bénin**. *Journal des sciences* 2008, **8**: 17-20.
72. Hommer V, Eichholz J, Petry F: **Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum***. *J Antimicrob Chemother* 2003, **52**: 359-364.
73. Zavvar M SJEHPM: **RNA, to characterise *Cryptosporidium* isolates from HIV/AIDS patients**. *Ann Trop Med Parasitol* 2008, **102**: 597-601.

IX. FICHE SIGNALÉTIQUE

Nom : TRAORE

Prénom : Sory Ibrahima

Nationalité : Malienne

Date de soutenance : xx yy 2010

Ville de soutenance : Bamako

Titre : Diagnostic de la cryptosporidiose chez les patients VIH diarrhéiques à Bamako

Lieu de dépôt : Bibliothèque de la Faculté de Médecine de Pharmacie et d'Odontostomatologie.

Résumé

Nous avons réalisé une étude transversale de juillet 2007 à Janvier 2010, portant sur 335 patients VIH repartis dans les trois principaux sites de prise en charge de Bamako (CHU du point G, CHU du Gabriel Touré et le CESAC).

L'ensemble des échantillons de selles a été examiné par la technique de Ziehl Neelsen modifiée.

La PCR des cryptosporidies a été réalisée pour poser le diagnostic d'espèce.

Les résultats de ce travail montrent que la cryptosporidiose demeure la première cause de diarrhée d'origine parasitaire chez les patients VIH-SIDA au Mali avec une fréquence de 10,75%.

Le CHU du point G était le site qui avait enregistré la plus forte prévalence 13,04% devant le CESAC 9,52% et le CHU Gabriel Touré 7,78%.

Parmi les échantillons positifs à *Cryptosporidium sp.*, nous avons identifié 10 cas de *Cryptosporidium hominis* et 8 cas de *Cryptosporidium parvum* par PCR.

La cryptosporidiose est un marqueur clinique de mauvais pronostic de l'infection par le VIH car 96,3% de nos patients positifs avaient un taux de $CD4 < 200$ cellules/mm³ avec une moyenne de 56,59.

L'avènement de la gratuité de la trithérapie et sa diffusion ont permis la réduction de cette parasitose digestive opportuniste au Mali.

Mots Clés : Bamako, cryptosporidiose, diarrhées, VIH positif, PCR.

IDENTIFICATION SHEET

Name: TRAORE

First Name: Sory Ibrahima

Nationality: Malian

Date of defense: xx yy 2010

City of Defense: Bamako

Title: Diagnosis of cryptosporidiosis among HIV diarrheal patients in Bamako

Location of Repository: Library of the Faculty of Medicine Pharmacy and Dentistry.

Abstract

We carried out a cross-sectional study from July 2007 to January 2010, concerning 335 HIV patients divided into the three main sites of Bamako which take in charge the HIV positive patients (The CHU (Universal Hospital Center) of the Point G, the CHU of Gabriel Touré and the CESAC (Center of Listening , Care, Animation and Counselling)).

The whole samples of the saddles have been examined by the modified technique of Ziehl Neelsen.

The PCR of the *Cryptosporidium* sp was carried out in order to find species diagnosis.

The results of this work show that cryptosporidiosis remains the first cause of parasitic origin diarrhoea among HIV/AIDS patients in Mali with a frequency of 10,75%.

The CHU of the Point G was the site which had recorded the highest prevalence 13,04% before CESAC 9,52% and the CHU of Gabriel Touré 7,78%.

Among the samples positive to *Cryptosporidium* sp, we have identified 10 cases of *Cryptosporidium hominis* and 8 cases of *Cryptosporidium parvum* by PCR. Cryptosporidiosis is a clinical marker of bad forecast of the infection by HIV because 96,3% of our positive patients had a rate of CD4 < 200 cells / mm³ with a mean 56,59.

The advent of the exemption from payment of the tri-therapy and its popularization allowed the reduction of this digestive opportunist parasitic disease in Mali.

Keywords: Bamako, cryptosporidiosis, diarrheal, HIV positive, PCR.

En collaboration avec le CESAC, les USAC, le CHU Gabriel Touré et le CHU du Point G

Etiquette Patient n : nom : (e) le : Sexe : M <input type="checkbox"/> F	Service demandeur	X . PRESCRIPTEUR Nom : N° de poste : Signature:	XI . PRELEVEUR Nom : Date : Heure :
---	--------------------------	---	---

<p>Première demande pour cet épisode Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Fièvre récente: Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/></p> <p><u>DONNEES CLINIQUES ET BIOLOGIQUES</u></p> <p>Traitement ARV : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/></p> <p>Dernier chiffre de CD4 : _____/mm³</p> <p>date/...../200_</p> <p>=====</p> <p>Signes cliniques actuels :</p> <p>date début...../...../200_</p> <p>Traitement de l'épisode actuel : Oui <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/></p> <p><u>Si oui, lequel</u></p> <p>date dernière prise...../...../200_</p>	<p>Temp. actuelle : °C Poids.....kg</p> <p>Algie(s) <input type="checkbox"/> : Céphalées <input type="checkbox"/> , Abdomen <input type="checkbox"/> , Poumon <input type="checkbox"/> , Courbatures <input type="checkbox"/></p> <p><u>Autre loc (précisez) :</u></p> <p>Asthénie <input type="checkbox"/> , Vomiss. <input type="checkbox"/> , Diarrhée <input type="checkbox"/> , Anorexie <input type="checkbox"/> ,</p> <p>Trbles neuro <input type="checkbox"/> , Signes cutanés <input type="checkbox"/> , Signes pulmonaires <input type="checkbox"/> ,</p> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-top: 10px;"> Autres, remarques, précisions : </div>
---	---

<p>PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE</p> <p><input type="checkbox"/> Examen parasitologique des selles <i>Examen direct, Concentration, Kato, Baermann (Anguillule)</i> Recherche de cryptosporidies, Recherche de microsporidies</p> <p><input type="checkbox"/> Histoplasmosse <input type="checkbox"/> peau <input type="checkbox"/> autre localisation, préciser</p> <p><input type="checkbox"/> Leishmanies <input type="checkbox"/> peau <input type="checkbox"/> sang <input type="checkbox"/> moelle</p> <p><input type="checkbox"/> Liquide de Lavage Bronchiolo-Alvéolaire (LBA)</p> <p><input type="checkbox"/> Expectations induites</p> <p><input type="checkbox"/> Biopsies diverses (tube sec acheminé sans délai) préciser</p> <p>SPECIFIQUE MYCOLOGIE</p> <p><input type="checkbox"/> Selles <input type="checkbox"/> Urines <input type="checkbox"/> Peau <input type="checkbox"/> Phanères</p> <p><input type="checkbox"/> Muqueuse</p> <p><input type="checkbox"/> Liquide céphalo-rachidien (cryptococcose)</p>	<p>Prélèvements <input type="checkbox"/> au laboratoire <input type="checkbox"/> structure de soin</p> <table border="1" style="width:100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width:80%;"><u>Nature du prélèvement (peau, phanères, muqueuses...) et localisation précise :</u></td> <td style="width:20%; text-align: center;">Réservé au labo</td> </tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> <tr><td>.....</td><td></td></tr> </table>	<u>Nature du prélèvement (peau, phanères, muqueuses...) et localisation précise :</u>	Réservé au labo	
<u>Nature du prélèvement (peau, phanères, muqueuses...) et localisation précise :</u>	Réservé au labo																				
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					
.....																					

Partie réservée au laboratoire

Date & heure arrivée :

Date & heure validation biologique :

Tél : oui non

ESTHER/IO/BAMAKO/v4/12/09/2007

Modalités de prélèvement, contacter le laboratoire : 20 22 81 09/ 76 12 33 03



**LABORATOIRE CLINIQUE
FMPOS/DEAP/MRTC/
PREMA-UNIT**



**MODE OPERATOIRE NORMALISE (MON) POUR LA TECHNIQUE DE
CONCENTRATION PAR LA METHODE DE RITCHIE**

Objet

Cette procédure décrit les différentes étapes de la technique de concentration selon RITCHIE

Domaine d'Application

Cette procédure s'adresse à tout médecin, pharmacien ou Interne en médecine ou en pharmacie, stagiaires travaillant dans le laboratoire clinique de l'unité PREMA

Historique

Version	objet de la Création	Date D'application
1.0	création du document	Janvier 2008

Approbation

Rédacteur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date

Sommaire

I- Principe

- II- Matériels et Réactifs
- III- Mesures de sécurité et de Protections
- IV- Techniques : Etapes par étapes
- V- Résultats et Interprétation
- VI- Inconvénients
- VII- Annexes
- VIII- Formation

I- Principe

Il repose sur l'examen d'une plus grande quantité de selles sous un petit volume, ce qui facilite la mise en évidence des parasites même s'ils sont peu nombreux.

Cette méthode de concentration dite diphasique résulte de 3 phénomènes.

- La mise en présence de 2 phases non miscibles dont l'une aqueuse et l'autre lipophile, qui crée pour chacune des particules fécales (parasites, débris alimentaires, et microbes) un coefficient de partage leur permettant de s'orienter en fonction de leur équilibre hydrophile-lipophile.
- La résultante de ce coefficient qui est une élimination des éléments à prédominance lipophile et par conséquent, une concentration des particules à tendance hydrophile (éléments parasitaires)
- A ce mécanisme fondamental, vont s'ajouter :
 - L'action dissolvante des réactifs qui supprime certains constituants fécaux (éléments protéiques coagulés par le formol, les graisses et les lipides solubilisés par l'éther)
 - La densité des parasites est supérieure à celle de la phase aqueuse, ce qui permet de former le culot

II- Matériels et Réactifs

- Lames porte-objet
- Lamelles
- Spatule
- Marqueur
- Verre à pied
- Baguette
- Pipette Pasteur ou Pastette
- Tubes Eppendorf
- Solution physiologique de NaCl 0,9%, ou de PBS, ou d'Eau distillée
- Formol
- Ether
- Tubes coniques de 15ml ou 50ml
- Gants
- Blouse
- Microscope optique
- Centrifugeuse

III- Mesures de sécurité et de Protections

Les précautions universelles de bonne pratique de laboratoire devraient être observées tout au long des différentes expériences. Tous les échantillons biologiques seront considérés comme potentiellement infectieux. Aussi, le port des gants et des blouses est obligatoire. Après chaque

expérience au laboratoire, on doit enlever les gants et se laver les mains avant de quitter le laboratoire.

IV- Techniques : Etapes par étapes

- Mettre une portion de selles dans un verre à pied
- Faire une dilution au 1/3 si selles liquides, ¼ si selles semi-liquides, 1/6 si selles pâteuses ou moulées avec du formol.
- User d'une baguette pour rendre le mélange homogène ;
- Filtrer à l'aide d'une passoire (puis d'un tamis de 100mm si culot prévu pour IFI, weber, ziehl)
- Recueillir le filtrat dans un tube conique.
- Ajouter de l'éther au 1/3
- Secouer le tube refermer pour homogénéiser.
- Ouvrir le tube pour laisser échapper le gaz, puis réfermer.
- Centrifuger la suspension a 2500trs/mn pendant 5 minutes
- Après centrifugation nous obtenons 4 couches (1^{ère} couche contient l'éther, 2^{ème} les débris, 3^{ème} le formol, 4^{ème} le culot d'œufs et de kystes.
- Récolter le culot avec pipette ou une pastette dans un tube Eppendorf.
- Déposer quelques gouttes du culot sur une lame porte objet et couvrir avec une lamelle
- Lire à l'objectif 10 ou 40.

V- Résultats et interprétation

L'examen du culot permet l'observation des œufs, larves et les kystes de protozoaires.

VI- Inconvénients

La technique de concentration n'est pas recommandée pour les formes végétatives des protozoaires

VII- Annexes

Cahier de paillasse
Fiches ESTHER



LABORATOIRE CLINIQUE FMPOS/DEAP/MRTC/ PREMA-UNIT



MODE OPERATOIRE NORMALISE (MON) POUR LA TECHNIQUE DE ZEHL NEELSEN MODIFIEE A LA RECHERCHE DE CRYPTOSPORIDIES

Objet

Cette procédure décrit les différentes étapes de la technique de Ziehl Neelsen modifiée.

Domaine d'Application

Cette procédure s'adresse à tout médecin, pharmacien ou Interne en médecine ou en pharmacie, stagiaires travaillant dans le laboratoire clinique de l'unité PREMA

Historique

Version	objet de la Création	Date D'application
1.0	création du document	Janvier 2008

Approbation

Rédacteur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date

Sommaire

I- Principe

II- Matériels et Réactifs

III- Mesures de sécurité et de Protections

IV- Techniques : Etapes par étapes

V- Résultats et Interprétation

VI- Inconvénients

VII- Annexes

VIII- Formation

I- Principe

II- Matériels et Réactifs

- Lames porte-objet super Frost
- Crayon à papier
- Pipette Pasteur ou Pastette
- Gants
- Blouse
- Microscope optique
- Huile à immersion
- Fuchsine phéniquée :
50 ml de fuchsine de Ziehl (fournisseur : RAL)
+
150 ml d'eau phéniquée 5% { 100ml d'eau distillée pour 5g de phénol cristallisé réf :
20598294 fournisseur : VWR)
- Vert de malachite à 3%.
- Méthanol
- Acide sulfurique à 2%

III- Mesures de sécurité et de Protections

Les précautions universelles de bonne pratique de laboratoire devraient être observées tout au long des différentes expériences. Tous les échantillons biologiques seront considérés comme potentiellement infectieux. Aussi, le port des gants et des blouses est obligatoire. Après chaque expérience au laboratoire, on doit enlever les gants et se laver les mains avant de quitter le laboratoire.

IV- Techniques : Etapes par étapes

- Déposer une goutte ou 10µl du culot obtenu par la technique de Ritchie (cf. SOP)
- Laisser sécher à la température du labo
- Fixer au méthanol jusqu'à l'évaporation de celui-ci
- Colorer la ou les lames pendant 1 heure dans la fuchsine phéniquée
- Rincer à l'eau du robinet
- Différencier dans une solution d'acide sulfurique à 2% pendant 20 secondes
- Rincer à l'eau du robinet
- Faire une contre coloration avec une solution verte de malachite à 3% pendant 5 à 10mn
- Rincer à l'eau de robinet
- Laisser sécher
- Lire au microscope à l'objectif 50 ou 100 à immersion

V- Résultats et interprétation

Cryptosporidium sp. Peut être recherché essentiellement dans des biopsies intestinales ou dans les fèces.

Les biopsies permettent de repérer tous les stades du parasite, mais il est plus simple de rechercher des oocystes dans les matières fécales. Des techniques spécifiques doivent être utilisées pour leur diagnostic et la technique de référence est la coloration de Ziehl- Neelsen, modifiée par Henricksenz, après concentration formol éther.

Les oocystes de cryptosporidies apparaissent colorés en rose fuchsia, et mesurent entre 5 à 8 µm selon l'espèce causale.

Les levures sont colorées en rouges.

Les bactéries acido résistantes peuvent se colorées en rose, mais leur forme et leur taille différentes évitent de les confondre.

Les oocystes peuvent être recherchés parfois dans le LBA ou dans la bile (les mêmes colorations sont utilisées).

VI- Inconvénients

VII- Annexes

Cahier de paillasse
Fiches ESTHER



**LABORATOIRE CLINIQUE
FMPOS/DEAP/MRTC/
PREMA-UNIT**



**MODE OPERATOIRE NORMALISE (MON) POUR LA TECHNIQUE DE LA PCR
(polymerase chain reaction)
A LA RECHERCHE DE CRYPTOSPORIDIES**

Objet

Cette procédure décrit les différentes étapes de la technique de la PCR.

Domaine d'Application

Cette procédure s'adresse à tout médecin, pharmacien ou Interne en médecine ou en pharmacie, stagiaires travaillant dans le laboratoire clinique de l'unité PREMA

Historique

Version	objet de la Création	Date D'application
1.0	création du document	Janvier 2008

Approbation

Rédacteur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date
Approbateur		Signature	Date

I - Réactifs

- PBS réf 75511	Biomerieux
- Tubes Eppendorf 1,7 ml	Marché AP
- Passoire métallique	BHV
- Tamis 400µm réf 05015072	VWR
- Tamis 50 µm réf 8009000	VWR
- Verre à pieds	
- Tubes TPP coniques 15 ml réf T915015	ATGC
- Tubes NUNC	NUNC Brand products cryotube
- Tubes à hémolyse réf MTH55	Magasin médical
- Qiamp DNA Stool mini kit réf 51504	Qiagen
- Tubes Eppendorf 2 ml	Marché AP
- Ethanol 96-100% réf 20821.296	Prolabo
- Tubes Eppendorf 0.2 ml	Marché AP
- Eau stérile en ampoule	Marché AP
- Amorces 50nmol	Invitrogen
- DNTP réf NTPMX255	Q-Biogène
- Ampli Taq Gold réf 4311806	Applied Biosystems
- Eau distillée	Marché AP
- Agarose réf 18054	Eurobio
- Ethidium bromide réf E1510	Sigma
- DNA molecular weight marker XIII réf 1721925	Roche diagnostic
- Tampon T AE 50X réf 33807	D. Dutscher
- Parafilm	Marché AP

II - Matériel

Hotte à flux laminaire, bain marie, centrifugeuse, portoir à cinq rangées, pipettes 1000, 200 et 50µl et cône stérile adaptés, vortex, boîtes pour stockage, portoirs, eppendorf, cuve à migration, générateur, thermocycleur, appareil photo, table de révélation à UV.

III - Diagnostic d'espèces *Cryptosporidium* spp

La technique de PCR permet de différencier les deux espèces les plus fréquemment isolées chez l'homme : *C. parvum* et *C. Hominis*. En effet, la discrimination de ces deux espèces permet des études épidémiologiques.

Pour chaque prélèvement présentant des oocystes de *Cryptosporidium* sp en microscopie optique, une PCR nichée suivie d'une digestion enzymatique (PCR /RFLP) sera systématiquement réalisée pour le diagnostic d'espèce.

Pour chaque échantillon il faut :

- Immédiatement :** - préparer les selles pour l'extraction
Dans la semaine suivante : -extraire l'ADN parasitaire des selles
-réaliser la technique de PCR/RFLP

1 - Techniques

Conservation des selles :

Seule la numérotation pour l'enregistrement change :

N° Molis BM : année/mois/n° d'incrémentation (**retour à 1 à chaque début de mois, en commençant par 3 pour les Cryptosporidies**)

Ex : BM 04033003 (n°3 du mois de mars 2004)

Préparation des selles pour l'extraction :

-Enregistrer dans Molis la demande de PCR pour le diagnostic d'espèce de *Cryptosporidium* sp (PCRC).

-Faire 2 aliquots dans des tubes NUNC, à conserver dans l'azote liquide (tiroir A6)

-Noter le numéro du PCR dans le cahier « azote liquide » (pièce de réception)

Extraction

Utiliser le kit Quiagen DNA stool R

! A chaque ouverture d'un nouveau kit, il faut **régénérer** les tampons dans l'éthanol absolu.

Préparation du matériel :

Attention : pour cette technique il est nécessaire de réaliser un témoin d'extraction= extraire 200µl de PBS seul.

! Utiliser les eppendorf et les tubes collecteurs préalablement stérilisés

! Aliquoter pour chaque réactif du kit, le volume nécessaire pour la manipulation (évite les contaminations)

Réalisation de la PCR *Cryptosporidium* \rightleftharpoons PCR nichée

La PCR nichée est une technique de biologie moléculaire qui consiste en une double amplification. Une première amplification sur un échantillon d'ADN extrait des selles est réalisée en utilisant des amorces spécifiques qui encadrent une région hyper variable de l'ordre de 1000 pb. Une seconde amplification est réalisée à partir des produits obtenus après la première amplification en utilisant des amorces encadrant la région d'intérêt. Le produit amplifié attendu présente alors un poids moléculaire de 214 pb. Dans notre technique l'ADN cible est une région codant pour la sous-unité 18S de l'ARN ribosomal. Ce gène est caractérisé par la co-existence de régions très conservées parmi les différentes espèces et de séquences spécifiques de chacune des espèces (Figure 1).

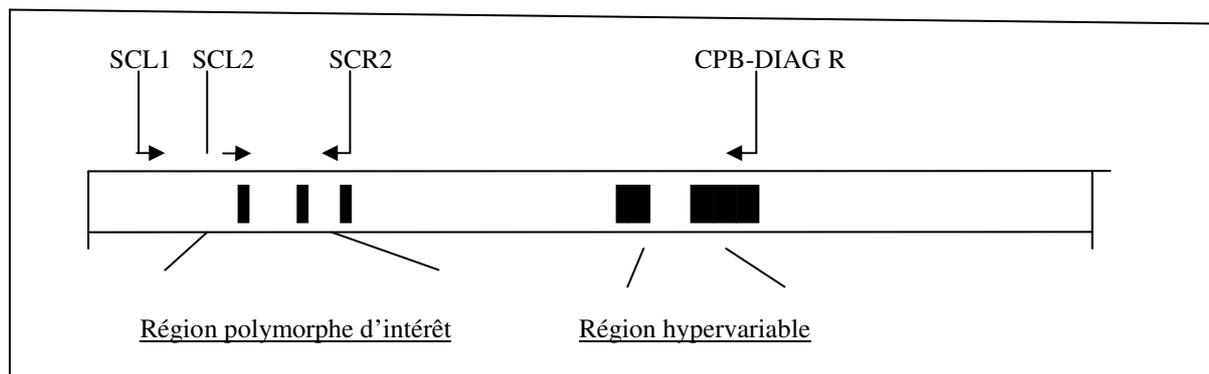


Figure 1 : Représentation de la position des zones polymorphes et des amorces d'amplification utilisées

Cibles utilisées pour la 1^{ère} amplification génique :

SCL1 (5'-CTGGTTGATCCTGCCAGTAG-3') code couleur noire

CPB-DIAGR (5' -TAAGGTGCTGAAGGAGTAAGG-3') code couleur bleue

Cibles utilisées pour la 2nde amplification génique :

SCL2 (5'-CAGTTATAGTTTACTTGATAATC-3') code couleur rouge

SCR2 (5'-CAATACCCTACCGTCTAAAG-3') code couleur vert

Pour chaque technique de PCR, il faut :

- Prévoir 2 tubes par patient
- Un tube pour la recherche de Cryptosporidies
- Un tube pour la recherche d'inhibiteurs (5µL d'une dilution limite d'un témoin positif *Cryptosporidium spp*) [actuellement échantillon 05496003]
- Prévoir 3 témoins par série
- Un témoin négatif d'extraction : extraction de 200µL de PBS seul (même condition d'extraction de selles)
- Un témoin négatif d'amplification : amplification de 5µL d'eau PPI utilisée pour la préparation du mix
- Un témoin positif : amplification de 5µL de l'échantillon d'AND de *Cryptosporidium sp* [actuellement échantillon F]
- Tous les réactifs sont rangés dans la boîte Cryptosporidies (5^{ème} étage, tiroir 7)
- NB : les amorces sont aliquotées et conservées à 100 µM dans des tubes 0,2mL.
- Pour obtenir la concentration de travail (20µM), réaliser une dilution au 1/5^{ème} dans de l'eau ppi et les transférer dans un tube de 0,5ML. **Bien respecter et noter le code couleur sur le bouchon des tubes.**

✓ 1^{ère} amplification

Les concentrations utilisées sont les suivantes :

Réactifs	C°initiale	Conservation	Mix (vol/léch)	C°finale
Eau stérile		TA	14,55µL	
Mg C12	25mM	-20°C	2µL	2mM
Tampon	10X	-20°C	2,5µL	1X
dNTP	25mM chacun	-20°C	0,2µL	0,2mM chacun
SCL1	20µM	-20°C	0,25µL	0,2µM
CPB-DIAGR	20µM	-20°C	0,25µL	0,2µM
Ampli taq gold5	5U/µL	-20°C	0,25µL	1,25U/réaction
Volume total			20µL	

Préparation du matériel

Sortie les ADN à tester (congélateur pièce Bactec)

La réalisation des Mix a lieu dans la pièce PCR (pièce Bactec)

1- Allumer la hotte

2- Préparer sous la hotte : pipettes 1000, 200, 50, cônes stériles adaptés , poubelle, Eppendorf 0,2 ml, eau stérile (ampoule), portoir eppendorf 0,2 ml

3- Sortir du congélateur

- Le tampon 10X, Mgc12, témoin ADN *Cryptosporidinum sp*, dNTP, les jeux d'amorces

! Ne pas sortir l'AmpliTaq Gold à ce moment

Préparation de la technique

1- Sortir la liste de travail

2-Préparer le schéma du gel de dépôt (feuille annexe)

3- Calculer le volume de chaque mix à préparer selon la feuille de calcul jointe

4-Réaliser les mix sous la hotte et ajoute en dernier l'AmpliTaq Gold (**sortie au dernier moment et rangée immédiatement**), bien vortexer

5- Répartir 20µl du mix dans chaque tube préalablement identifié

! Pour les témoins inhibiteurs (15µl de mix + 5 µl d'ADN de cryptosporidies)

6-Vortexer et déposer 5µl d'ADN parasite extrait de chaque patient

7- Réaliser les témoins comme indiqués sur la feuille de calcul

8-Bien fermer les tubes

9- Ranger tous le matériel

10- Nettoyer la hotte

11- Mettre les UV 30 min et ne pas oublier de les éteindre

Amplification

Réalisation dans la pièce PCR (4^{ème} étage, pièce 4- 13)

1-Allumer le thermocycleur [Mastercycler Eppendorf ou PTC 100]

2- Centrifuger 15 sec en adaptant les tubes Eppendorf 0,2ml dans des Eppendorf 2ml

3-Déposer les tubes et fermer le capot

4- Démarrer le programme "Crypto1"

Programme d'amplificateur (durée = 2h 30) :

5' à 94°C *dénaturation initiale*

30'' à 94°C *dénaturation*

45'' à 60°C *hybridation*

90'' à 72°C *élongation*

10' à 72°C *élongation finale*

} 40 cycles

4°C conservation

✓ 2^{ème} amplification

! Risque de contamination +++ , ouvrir /fermer les tubes au fur et à mesure des dépôts

Réaliser la seconde amplification à partir des produits issus de la première.

Réaliser le mix comme précédemment citer selon les données du tableau 2 et répartir 45µl de mix dans chaque tube préalablement identifié.

Déposer 5µl de produits issus de la première amplification

Tableau 2 : composition du mix pour la 2^{ème} amplification

	Conservation	Mix	Concentration finale
Réactifs		Volume pour 1 échantion	
Eau stérile	TA	32,35µl	
Mg Cl ₂ 25 mM	-20°C	5µl	2,5mM
Tampon 10X	-20°C	5µl	1X
dNTP 25 ml chacun	-20°C	0,4µl	0,2 mM chacun
SCL2 20 µM	-20°C	1µl	0,4 µM
SCR2 20 µM	-20°C	1µl	0,4 µM
Ampli Taq Gold 5U/µL	-20°C	0,25µl	1,25 U/réaction
Volume total		45µl	

On teste également des témoins pour valider cette 2^{ème} PCR :

- Un témoin négatif d'amplification : 5µl d' eau PPI
- Reprendre le témoin négatif d'extraction de la 1^{ère} amplification (5µl)
- Reprendre le témoin négatif d'amplification de la 1^{ère} amplification (5µl)
- Reprendre le témoin positif de la 1^{ère} amplification (5µL)

Programme "crysto 2S" sur le thermocycler [Mastercycler Eppendorf ou PTC 100]

Programme d'amplificateur (durée ≈ 2h 30) :

5' à 94°C dénaturation initiale

30'' à 94°C dénaturation

45'' à 58°C hybridation

60'' à 72°C élongation

10' à 72°C élongation finale

4°C conservation

40 cycles

Si les échantillons ne sont pas révélées tout de suite, conserver à 4°C

NB : les 2 programmes d'amplification sont enregistrés dans les 2 thermocycleurs (crypto1 et crypto2S)

Révélation : (cf. supra, coulage du gel) :

Révéler les produits issus des 2 PCR successives afin de s'assurer que les PCR ont fonctionné (avant la réalisation de la digestion)

! Commencer les dépôts par le témoin H₂O et les témoins négatifs

-1^{ère} PCR

Déposer 10µl d'amplicons +2µl de tampon de charge

-2^{ème} PCR

Déposer 5µl d'amplicons+ 2µl de tampon de charge

Ajouter les molecular weight marker XIII et XIV (2µl +2µl de tampon de charge)

Enregistrer la photo, l'annoter et la sauvegarder dans « mes documents », « photos PCR cryptosporidies ».

✓ Digestion enzymatique

Au vu de l'épidémiologie, nous utilisons uniquement 2 enzymes (AseI et TaqI) qui permettent le diagnostic d'espèce de *C. parvum* et *C. hominis* (cf figure 8).

- Préparation des mélanges contenant les enzymes de restriction
Pour cette manipulation :
- Digérer le témoin positif (objectiver la digestion enzymatique)
- Digérer le témoin H₂O (objectiver le non contamination)

Préparer les mélanges réactionnels pour le nombre de tube.

Tableau1 : Préparation du mélange pour la digestion enzymatique avec Taq1 (10U/µl)

	Conservation	Volume pour l'échantillon
TaqI	-20°C	0,2µl
Buffer B	-20°C	3µl
Eau PPI	+4°C	21,8µl
Volume total		30µL

Tableau2 : Préparation du mélange pour la digestion enzymatique avec Ase1 (10U/µl)

	Conservation	Volume pour l'échantillon
Ase1	-20°C	0,2µl
NE Buffer 3	-20°C	3µl
Eau PPI	+4°C	21,8µl
Volume total		30µL

Distribuer 25 µL de mix dans chaque tube PCR.

Fermer tous les tubes car il y a un risque de contamination (amplicons +++)

Distribuer 5 µL du produit de PCR issu de la 2^{ème} amplification.

L'incubation des échantillons a lieu à 65°C pour l'enzyme Taq I, à 37°C pour l'enzyme Ase I pendant 2 heures.

Utiliser le programme Ase 2 sur le thermocycleur PTC 100 et le programme Taq 1 sur le thermocycleur " Mastercycler Eppendorf"

Révélation

! Le BET est un produit cancérigène, toute cette manipulation doit être réalisée avec des gants

1- Préparation du gel 2%

Installer la cuve de migration taille moyenne sans oublier de mettre les peignes

Preparer des tampons TAE 1X (980 ml eau distillé + 20 ml tampon TAE 50X)

Peser 2g d'agarose dans un Erlenmeyer et ajouter 100ml de tampon TAE 1X

Chauffer au micro onde jusqu'à ce que le mélange devienne transparent (! c'est chaud)

Sortir avec 2 paires de gants le BET de la chambre froide (**! produit cancérigène à manipuler avec précaution**)

Ajouter 1µl de BET dans l'Erlenmeyer, homogénéiser délicatement

Couler le gel en évitant les bulles (polymérisation \approx 30min)

Ranger immédiatement le BET

Rincer l'Erlenmeyer à l'eau chaude, jeter l'eau de rinçage dans la poubelle jaune

2- Dépôt des échantillons

- Sortir le molecular weight marker XIII et le tampon de charge (congélateur pièce 4-18)
- Enlever les peignes du gel
- Ajouter le TAE 1X dans la cuve jusqu'aux bornes blanches
- Couper une bande de para film

Pour chaque patient, déposer le produit d'amplification non digéré, le produit d'amplification digéré par Taq1 et le produit d'amplification digéré AseI

- Pour les produits d'amplification non digéré : prélever 5 μ l de produit d'amplification et les mélanger avec 3 μ l de tampon de charge.
- Pour les produits d'amplification digérés : prélever 20 μ l de produit d'amplification et les mélanger avec 3 μ l de tampon en charge
- Pour le marqueur de poids moléculaires : prélever 2 μ l de marqueur XIII et les mélanger avec 3 μ l de tampon de charge
- La migration est faite durant 1 heure à 120V. Une fois terminée, on relève sous lampe UV et on prend une photo pour archivage.
- Fermer la cuve et brancher les électrodes sur le générateur
- Allumer le générateur et le régler sur W 250 ; mA 200 ; V130
- Appuyer sur start et laisser migrer = 1 H v(contrôle la migration par le tampon de charge)
- Arrêter le générateur et sortir le gel avec des gants
- Le poser délicatement sur la table UV
- Faire la photo à l'aide de la camera (cf GBEA diagnostic d'espèce des amibes)
- Ranger tout le matériel et nettoyer la cuve et la paillasse
- Allumer les UV 30min et ne pas oublier de les éteindre
- Sur l'ordinateur « Didier » ou « Sophie » extraire et annoter la photo dans le logiciel Ecapt
- Sauvegarder la photo dans « mes documents », . « photo PCR cryptosporidies » en intitulant la photo avec la date de réalisation de la technique.

2 - Validation technique et biologique

Validation technique

Mettre la photo avec la feuille du schéma du gel de dépôt. Noter la date du jour et le N° de lot de l'AmpliTaq Gold.

Validation des contrôles

- Aucune anomalie relevée dans le déroulement du mode opératoire
- Présence des bandes attendues pour le témoin cryptosporidie (1000 pb pour la 1^{ère} amplification et 214 pb pour la seconde amplification)
- Absence de bande dans le témoin négatif

Si ces 3 conditions sont remplies, la technique est validée. Dans le cas contraire, il faut recommencer la technique.

Validation des échantillons

Vérifier la présence de la bande à 214pb pour tous les témoins inhibiteurs

- Si celle-ci est présente, elle affirme l'absence de inhibiteur, lire le résultat de l'amplification de l'extrait correspondant

- Si celle-ci est absente, il y a présence d'un inhibiteur dans le prélèvement, il faudra donc diluer l'extrait (1 µl d'extrait + 9 µl d'eau stérile)

Noter les résultats sur la feuille du schéma du gel ainsi que sur la liste de travail

Ranger le tout dans un classeur PCR cryptosporidies

Enregistrer les résultats dans l'ordinateur

Validation biologique

Effectuée par un biologiste, elle vérifie la cohérence des résultats avec les autres données clinico-biologiques ainsi que la cohérence des résultats des 2 amplifications

Validation biologique secteur DI période BM

Pour chaque patient il faut faire un duplicata de l'examen parasitologique des selles et l'agrafer au résultat de PCR

Noter manuellement sur la feuille de travail que le résultat a été validé et rendu.

Feuille de calcul pour la préparation des mélanges réactionnels PCR "cryptosporidies"

1. 1ère PCR

Nombre de tubes à préparer :

. **Mix** : = nombre de prélèvements P x2 (témoin inhibiteur) + 1 témoin négatif d'extraction(PBS) + 1 témoin négatif d'amplification +1 témoin positif=N

On prépare toujours un mix pour N+1 (volume mort) dans un tube Eppendorf stérile, adapté au volume.

	Mix	
Réactifs	Pour N+1tubes =	
Eau stérile	14,55 µl x (N+1)=	µl
MgC12 25 mM	2 µl x (N+1)=	µl
Tampon 10X	2,5 µl x (N+1)	µl
dNTP 25mM each	0,2 µl x (N+1)	µl
SCL1 20 µM	0,25 µl x (N+1)=	µl
CPB-DIAGR 20 µM	0,25 µl x (N+1)=	µl
AmpliTaq Gold 5 U/µl	0.25 µl x (N+1)=	µl

Répartir dans chacun des **tubes PCR témoin inhibiteur 15 µl de mix +5 µl de TI + 5µl d'ADN**

Répartir dans chacun des **tubes PCR 20 µl de mix +5 µl d'ADN**

Volume réactionnel=25 µl

2. 2ème PCR

Nombre de tubes à préparer=**N+ 1** témoin négatif d'amplification=**N'**

On prépare toujours un mix pour N'+1 (volume mort) dans un tube Eppendorf stérile, adapté au volume

Réactifs	Pour N'+1 tubes=	
Eau stérile	32,35 µl x (N'+1)=	µl
MgC 12 25 mM	5 µl x (N'+1)=	µl
Tampon 10X	5 µl x (N'+1)=	µl
dNTP 25 mM each	0,4 µl x (N'+1)=	µl
SCL2 20 µm	1 µl x (N'+1)=	µl
SCR2 20 µm	1 µl x (N'+1)=	µl
AmpliTaq Gold 5 U/µl	0.25 µl x (N'+1)=	µl

Répartir 45µl de mix dans chacun des tubes PCR préalablement identifiés puis 5 µl d'ADN issu de la première amplification
Volume réactionnel = 50µl

Serment d' Hippocrate

En présence des Maîtres de cette faculté, de mes chers condisciples, devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure, au nom de l'Être Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail, je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine dès la conception.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçu de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses !

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure !

