



**UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES – FES  
DEPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE**



**PROJET DE FIN D'ETUDES**

**Licence en Sciences & Techniques :  
Sciences Biologiques Appliquées et Santé**

**La Qualification Sérologique des Dons  
du Sang et sa Contribution à la Sécurité  
Transfusionnelle**

**Présenté par :      ZAHY Youssef-Saif**

**Encadré par :**

**✚ Dr. ZIZI Soumia** : responsable d'assurance Qualité, de Formation et de Métrologie du CRTS de Fès.

**✚ Pr. GUISSI Sanae** : Professeur à La FST de Fès.

**Soutenu le : 17/06/2015**

**Devant le jury composé de :**

**✚ Dr. ZIZI Soumia**

**✚ Pr. GUISSI Sanae**

**✚ Pr. Benchikh Rachid**

**Année Universitaire : 2014-2015**

# DEDICACE

*Je dédie ce mémoire à ...*

*A mes chers parents*

*Pour leur soutien, leur patience, leur sacrifice*

*et leur amour. Vous méritez tout éloge,*

*vous, qui avez fait de moi ce que je suis maintenant.*

*J'espère être l'image que vous vous êtes faits de*

*moi, que dieu vous garde et vous bénisse.*

*Je dédie aussi ce travail à mes chers frères,*

*pour leur affection et leurs encouragements qui ont*

*toujours*

*été pour moi des plus précieux.*

*Que ce travail soit pour vous le gage de notre profond*

*amour.*

*A tous mes amis*

*A tous ceux qui m'ont aidés.*

*A tous ceux que j'aime, je dédie ce travail ...*

# REMERCIEMENTS

**Premièrement nous remercions Dieu source de toute connaissance...**

Au terme de ce travail, j'exprime ma reconnaissance et mes remerciements à toute personne qui m'a été utile pour son accomplissement.

Je remercie principalement **Dr. ZIZI Soumia**, responsable d'assurance Qualité, de Formation et de Métrologie du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Fès, d'avoir accepté d'encadrer ce travail. Son choix du sujet, les connaissances qu'elle m'a transmises et le suivi continu des conditions du déroulement de mon stage, m'ont créé l'environnement adéquat pour aboutir à ce résultat.

Ce mémoire n'aurait pas pu avoir lieu sans un encadrement de très grande qualité, celui de **Pr. GUISSI Sanae**, Professeur de biologie moléculaire à la Faculté des Sciences et Techniques de Fès. Je la remercie vivement d'avoir encadré ce sujet, pour son appui et savoir scientifique et sa disponibilité durant la préparation de mon projet de fin d'études. Toute mon estime pour ses aptitudes pédagogiques dont elle a fait preuve, ses remarques constructives et la qualité des discussions qui ont ponctué ce travail. Je la remercie également pour son aide précieuse et continuelle pendant la rédaction de ce mémoire.

Je ne manquerai pas l'occasion de remercier chaleureusement :

**Dr Benyasrhi Abderrahim**, directeur du Centre Régional de Transfusion Sanguine de Fès, pour l'opportunité qu'il m'a offert en acceptant mon stage de fin d'étude dans cet intéressant établissement. Qu'il trouve ici l'expression de ma vive gratitude.

**Mr Lachkar Hassan**, Ingénieur d'Etat principal Responsable du laboratoire de Sérologie du CRTS pour son incontestable contribution à l'accomplissement de mon projet, son caractère accueillant qui nous a offert une ambiance très motivante et encourageante au travail, ainsi que pour sa disponibilité extraordinaire qui m'a permis de surmonter les difficultés et autres problèmes rencontrés. Que dieu préserve votre optimisme et votre enthousiasme.

Je remercie également **Mr BENCHEIKH Rachid**, professeur à La Faculté des Sciences et Techniques de Fès de m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Qu'il trouve ici l'expression de ma vive gratitude.

Je tiens à remercier l'ensemble des enseignants de la Faculté des Sciences et Techniques pour leur encadrement tout au long de mes trois années de formation de la licence.

## Table des matières

<b>ABREVIATIONS :</b> .....	<b>5</b>
<b>LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX</b> .....	<b>6</b>
<b>OBJECTIF DE STAGE :</b> .....	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE :</b> .....	<b>8</b>
<b>PRESENTATION DE LIEU DE STAGE</b> .....	<b>9</b>
<b>ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	<b>12</b>
I.    Transfusion sanguine .....	12
1.    Définition .....	12
2.    Notion de sang .....	12
•    La formation et le renouvellement du sang : .....	12
•    Les propriétés physiques du sang : .....	13
•    Les composants du sang : .....	13
II.   La Qualification biologique des dons (QBD) .....	14
1.    Définition et Principe .....	14
2.    Test de Dépistage .....	14
3.    Examens Immuno-hématologiques .....	14
III.  L'hépatite B.....	15
1.    Agent étiologique .....	15
2.    Transmission .....	15
3.    Diagnostic .....	15
IV.  L'hépatite C.....	15
1.    Agent étiologique .....	15
2.    Transmission .....	16
3.    Diagnostic .....	16
V.   Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) .....	17
1.    Agent étiologique .....	17
2.    Transmissibilité .....	18
3.    Diagnostic .....	18
VI.  La Syphilis .....	18
1.    Agent étiologique .....	18
2.    Modes de transmission .....	19
3.    Diagnostic .....	19
<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>20</b>

I.	Matériel .....	20
1-	Matériel biologique .....	20
2-	Le matériel technique .....	21
II.	Méthodes .....	21
1-	ELISA « Enzyme Linked Immunosorbent Assay » .....	22
1. 1	Procédure expérimentale de diagnostic de l'hépatite B .....	23
1. 2	Procédure expérimentale de diagnostic de l'hépatite C .....	26
1. 3	Procédure expérimentale de diagnostic de HIV : .....	29
2-	TPHA « Treponema Pallidum Hemagglutination Assay » .....	33
1. 1	Procédure expérimentale de diagnostic de la Syphilis .....	33
	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>37</b>
I.	<b>Résultats .....</b>	<b>37</b>
	<b>DISCUSSION .....</b>	<b>40</b>
	<b>CONCLUSION .....</b>	<b>41</b>
	<b>REFERENCES .....</b>	<b>46</b>

## ABREVIATIONS :

- Ac : Anticorps
- Ag : Antigène
- BS : Banque de Sang
- CNTS : Centre National de Transfusion Sanguine
- CRTS : Centre Régional de Transfusion Sanguine
- CTS : Centre de Transfusion Sanguine
- CGR : Culot Globulaire Rouge
- CPS : Concentré Plaquettaire Standard
- ELISA : Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- TPHA : Treponema Pallidum Hemagglutination Assay
- HBs : Hépatite B dans le Sang
- IHD : Immuno-Hématologie Donneur
- K : Kell
- PFC : Plasma Frais Congelé
- PSL : Produits Sanguins Labiles
- PRP : Plasma Riche en Plaquettes
- QBD : Qualification Biologique du Don
- RAI : Recherche d'Agglutinines Irrégulières
- Rh : Rhésus
- SIDA : Syndrome d'Immunodéficience Acquise
- SN : Séronégative
- SP : Séropositive
- SSM : Solution de sag-mannitol
- TPHA : Treponema Pallidum Hemagglutination Assay
- VHC : Virus de l'hépatite C
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine (SIDA)
- VS : Valeur seuil
- TN : Témoin négatif
- TP : Témoin positif

## LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

<i>Figure 1 : Les étapes de parcours de la poche de sang</i> .....	11
<i>Figure 2 : Structure du virus de l'hépatite B</i> .....	15
<i>Figure 3 : Structure du virus de l'hépatite C</i> .....	16
<i>Figure 4 : Structure du VIH responsable du SIDA</i> .....	17
<i>Figure 5 : Schéma de la bactérie Treponema Pallidum</i> .....	19
<i>Figure 6 : Préparation du sérum sanguin</i> .....	20
<i>Figure 7 : Appareil d'analyse sérologique (BEP 2000)</i> .....	21
<i>Figure 8 : Principe des différentes variantes du test ELISA</i> .....	22
<i>Figure 9 : Principe de l'ELISA direct</i> .....	22
<i>Figure 10 : Comparaison des principes de l'ELISA direct et indirect</i> .....	23
<i>Figure 11 : Cupules d'une microplaque</i> .....	25
<i>Figure 12 : Plaque représentant les résultats du test HBs-Ag</i> .....	33
<i>Figure 13 : Les réactifs de TPHA</i> .....	34
<i>Figure 14 : Résultats du test TPHA en fonction de l'intensité de la réaction</i> .....	34
<i>Figure 15 : Taux global de positivité de différents marqueurs de la population étudiée</i>	38
<i>Figure 16 : Taux global de positivité de différents marqueurs selon les régions</i> .....	39
<i>Figure 17 : Taux de séropositivité par région</i> .....	39
<i>Tableau 1 : COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa™ HBs Ag ULTRA</i> .....	24
<i>Tableau 2 : COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA</i> .....	27
<i>Tableau 3 : Composition de la trousse Geenscreene HIV Ag-Ab ULTRA</i> .....	30
<i>Tableau 4 : Résultats des tests sérologiques de la population étudiée entre janvier et Mai 2015</i> .....	37
<i>Tableau 5 : Séropositivité exprimée en nombre et en pourcentage de la population par région</i> .....	39

## OBJECTIF DE STAGE :

**Le contexte de ce travail s'inscrit dans un cadre pratique qui consiste à assurer la sécurité transfusionnelle. Il a pour objectifs :**

- ✚ Le dépistage viral de l'hépatite B, l'hépatite C et le HIV par l'utilisation de la technique «ELISA» 3<sup>ème</sup> génération (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).
  
- ✚ Le dépistage bactérien de la syphilis par l'utilisation de « TPHA » (*Treponema Pallidum* Haemagglutination Assay).



## INTRODUCTION GENERALE :

La transfusion sanguine est une thérapie vitale se basant sur l'injection intraveineuse de sang ou ses dérivés (globules rouges, plaquettes, plasma) provenant d'un donneur à un receveur. Le nom de transfusion sanguine englobe la collecte, la préparation et l'utilisation du sang ou ses dérivés (6).

Les indications médicales de la transfusion consistent essentiellement dans le traitement des anémies, qui proviennent soit d'un défaut de production des globules rouges (aplasies médullaires, anémies des leucémies aiguës), soit d'un excès de destruction des globules rouges (anémies par hémolyse), soit encore d'une tendance hémorragique constitutionnelle ou acquise (hémophilie, purpura thrombopénique, choc traumatique, hémorragie au cours d'interventions chirurgicales ou accouchements difficiles).

Dans un passé proche, les efforts se sont principalement focalisés sur la réduction des risques infectieux liés à la transfusion sanguine. L'existence d'un passage sanguin asymptomatique de certains virus, bactéries ou parasites, pose un risque de transmission de ces agents lors d'une transfusion sanguine. Avec les progrès considérables réalisés ces dernières années en matière de sécurité virale, ce risque est bien maîtrisé pour certains agents infectieux comme le VIH, le VHB, le VHC et le tréponème, et ceci grâce à la recherche de leurs anticorps et/ou antigènes par une qualification biologique systématique de tous les dons de sang.

Néanmoins, il persiste un risque de transmission virale lié aux dons prélevés pendant la «fenêtre silencieuse», définie comme la phase précoce de l'infection qui précède l'apparition des marqueurs biologiques «phase de séroconversion». Ce risque, bien documenté et régulièrement réévalué, est réduit au minimum grâce à la sélection des donneurs en amont du don, en vue d'exclure tout cas suspect. Actuellement, c'est en fait le risque bactérien qui reste le plus redoutable en transfusion.

Etant donné que l'option étudiée à la FST est «Sciences Biologiques appliquées et Santé», le CRTS reste un domaine très convenable pour ajouter à mes connaissances théoriques acquises durant mon parcours, une autre formation d'ordre pratique via l'apprentissage des techniques utilisées pour la qualification biologique des dons.

Il s'agit en fait, d'un terrain riche par ses différents axes d'investigations sur le plan sérologique.

## PRESENTATION DE LIEU DE STAGE

Le centre régional de transfusion sanguine de Fès fait partie du réseau National de Transfusion Sanguine composé de 16 CRTS, de 13 Banques de Sang (BS) et de 24 Antennes de Transfusion, tous sous la dépendance du Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS), placé sous la tutelle du Ministère de la santé et relevant hiérarchiquement de la direction des hôpitaux et des soins ambulatoires.

Les activités du CRTS se résument comme suit :

- ✚ **Le service d'accueil** : c'est la phase d'enregistrement et d'identification du donneur et sa préparation à l'entretien pré-don.
- ✚ **Le service de consultation médicale** : l'entretien avant chaque don, est réalisé par un médecin selon une procédure bien établie dont l'objectif est de sélectionner le donneur qui ne présente aucune contre-indication au don susceptible de porter préjudice à sa sécurité ou à celle du receveur.

En effet, comme le montre le guide d'entretien médical du CRTS (Cf ANNEXE), la sécurité du donneur repose sur :

- La prévention d'un malaise par la mesure de sa tension artérielle qui doit être normale, et son poids qui doit être supérieur à 50kg.
- La prévention de l'aggravation d'une pathologie chronique quand elle existe, en l'interrogeant sur ses antécédents médicaux.

La sécurité du receveur est visée par l'interrogation du donneur sur :

Ses antécédents chirurgicaux ou des soins dentaires proches.

Des pratiques à risque de transmissions microbiennes (MST) : Rapports sexuels non protégés, piercing, tatouage, toxicomanie...

- ✚ **Le service de prélèvement** : il est effectué par des infirmiers sur une poche spéciale de 400 ml. Deux tubes échantillons sont prélevés pour effectuer les analyses de la qualification biologique selon deux axes : L'immuno-hématologie et la sérologie (1).

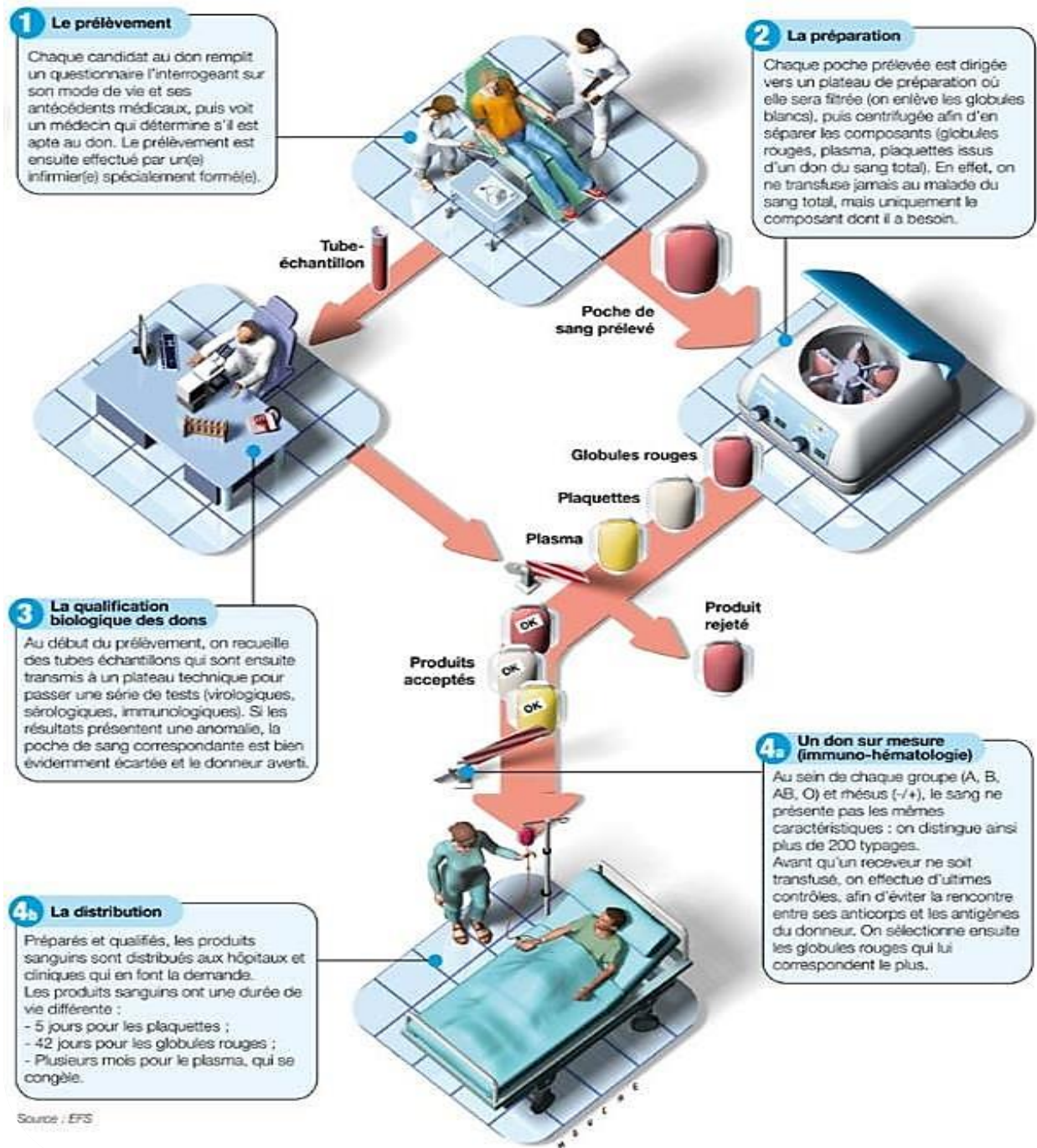
- ✚ **Le laboratoire d'immunohématologie Donneurs :** Les échantillons prélevés y sont analysés afin de déterminer le groupe sanguin, le phénotypage et à rechercher les anticorps anti-érythrocytaires susceptibles de causer des conflits immunitaires chez le receveur.
- ✚ **Le laboratoire de sérologie :** (Objet de ce mémoire) qui cherche à dépister les agents transmissibles par le sang (VIH-SIDA, hépatite B, syphilis, hépatite C...).
- ✚ **Le laboratoire de préparation de PSL :** Comme la thérapeutique transfusionnelle repose sur l'utilisation des produits sanguins labiles (PSL) et non de sang total. Les poches de sang prélevées subiront une centrifugation différentielle pour être fractionnées en concentré de globule rouge (CGR), plasma frais congelé PFC et concentré de plaquettes standard CPS), sans rupture du système clos (6).

En effet, l'utilisation du sang total comme produit à usage transfusionnel est presque abandonnée, sauf dans quelques pays en voie de développement, car son efficacité est très limitée.

Les PSL préparés seront finalement soumis à un triage qui cherche à identifier les poches conformes pour leur apposer les étiquettes adéquates avec les mentions nécessaires pour leur usage (Groupage, Résultats de sérologie négative, date de péremption et conditions de conservations). Les poches non conformes seront destinées au rejet selon une procédure bien déterminée.

- ✚ **Laboratoire de contrôle de qualité :** Pour donner la preuve sur la non altération des PSL par les différents procédés de production, un échantillon bien représentatif du lot produit est soumis à une batterie de tests pour contrôler leur qualité. Leur principe est de chercher si les PSL préservent toujours une teneur optimale en leurs principes actifs et minimale en facteurs contaminants.
- ✚ **La distribution :** Le produit sanguin, préparé et qualifié, est distribué ensuite aux hôpitaux et cliniques qui en font la demande. Avant toute transfusion, un dernier test de contrôle de compatibilité immunohématologique au chevet du malade est exigé pour lui éviter tout incident transfusionnel.
- ✚ **La conservation :** Une fois les contrôles effectués, les produits sanguins conformes sont conservés dans des conditions optimales :
  - les globules rouges : 42 jours au réfrigérateur entre +2 et +8°C en présence de CPD + SAG Mannitol.

- Les plaquettes : 5 jours dans un incubateur-agitateur entre 18 et 24°C sous agitation continue.
- Le plasma : Après une congélation rapide ou une surgélation à -80°C, il peut être conservé une année à -25°C (5).



**Figure 1 : Les étapes de parcours de la poche de sang**

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. Transfusion sanguine

#### 1. Définition

La transfusion sanguine est une discipline aux confins de l'hématologie et de l'immunologie. Elle implique la médecine, la biologie, la bio-industrie et la sociologie. Elle repose sur l'éthique. La transfusion sanguine consiste à administrer le sang ou l'un de ses composants (globules rouges, plaquettes, granulocytes, plasma, protéines) provenant d'un ou plusieurs sujets appelés « donneurs », à un ou plusieurs sujets malades appelés « receveurs ».

L'élaboration de produits cellulaires dits labiles, nécessaires au traitement des malades, n'est possible que par la mise en œuvre d'une chaîne de solidarité dont le premier maillon est constitué par les donneurs de sang bénévoles.

La mise à disposition des produits doit obligatoirement répondre à des règles de bonnes pratiques transfusionnelles dans tous les secteurs : prélèvement, préparation, qualification biologique, distribution et indications cliniques. Le respect de ces règles est une nécessité absolue(7).

#### 2. Notion de sang

Le sang est une suspension cellulaire dont la couleur rouge est due à la présence très majoritaire de globules rouges, ou hématies, riches en hémoglobine. Les cellules sont en suspension dans le plasma, un liquide complexe constitué d'eau, de sels minéraux et de molécules organiques. Après coagulation, le plasma dépourvu de fibrinogène constitue le sérum.

Chez un adulte, le volume sanguin est d'environ 5 litres mais cela peut varier en fonction du poids, de la taille et du sexe de l'individu (8).

#### La formation et le renouvellement du sang :

La moelle osseuse ou moelle rouge est une substance contenue dans les épiphyses des os longs, elle se trouve aussi dans les os plats (le crâne, les côtes, le sternum et la crête iliaque). La moelle osseuse est l'organe principal responsable de l'hématopoïèse (= fabrication des constituants du sang). Egalement, la formation des éléments figurés du sang à partir d'une cellule souche, va donner naissance à différentes lignées : érythrocytaire, granulocytaire, plaquettaire et lymphocytaire.

### ✚ Les propriétés physiques du sang :

Le sang est un liquide visqueux, faiblement alcalin et de saveur salée. Il est opaque et sa couleur varie en fonction de son oxygénation. Son volume représente 8 % du poids du corps, le volume sanguin est de 5-6 L chez un homme et de 4-5 L chez une femme.

### ✚ Les composants du sang :

#### ➤ Les globules rouges :

Les globules rouges contiennent de l'hémoglobine qui donne à notre sang sa couleur rouge. Ils ont pour rôle de transporter l'oxygène de nos poumons vers les autres organes du corps.

Dans le sang, ces cellules sont les plus nombreuses. En effet, il y a environ 5 millions de globules rouges par millimètre cube de sang. Un manque de globules rouges se caractérise par un affaiblissement continu et une forte fatigue. Il s'agit de l'anémie.

La transfusion de globules rouges est indiquée lors d'une grave anémie sévère ou d'une forte hémorragie (ex : un accidenté de la route voie publique).

#### ➤ Les globules blancs

Les globules blancs (ou leucocytes) sont des cellules du système immunitaire qui nous protègent des agressions extérieures telles que les bactéries, les virus, les cellules étrangères, etc. Il existe trois cinq types de globules blancs groupés en deux lignées : les granulocytes (Neutrophiles, Eosinophiles et basophiles), et les Agranulocytes (lymphocytes et monocytes) qui assurent chacun, par leur spécificité propre, les fonctions de défense (on en dénombre entre 4000 et 10.000 par mm<sup>3</sup>).

Comme les globules blancs peuvent être responsables de certaines complications dues à une incompatibilité des composants sanguins du donneur et du receveur lors d'une transfusion, ils sont extraits du sang grâce à un filtre. On dit que les poches de sang sont déleucocytées. Actuellement, cette déleucocytation n'est pas systématique au Maroc, elle n'est faite que pour certaines indications : la Thalassémie et la drépanocytose.

#### ➤ Les plaquettes

Les plaquettes « thrombocytes » ont un rôle primordial dans la prévention ou l'arrêt des saignements internes et externes de notre corps. Devant une lésion vasculaire quel que soit son ampleur, l'hémostase primaire est immédiatement déclenchée et grâce à l'action des plaquettes, il y a formation d'un caillot (thrombus) ou d'une croûte qui va obturer la lésion et arrêter le saignement.

L'indication de la transfusion de plaquettes étant les syndromes hémorragiques dues à une numération plaquettaire inférieure au seuil (Thrombopénie) dont la cause est soit hématopoiétique (défaut de synthèse), soit pathologique (leucémie, cancers...).

➤ Le plasma

Le plasma est la partie liquide du sang qui est composée à 90% d'eau et qui transporte tous les éléments du sang. Les 10% restants contiennent des lipoprotéines (assurent le transport des lipides), de l'albumine (maintient le volume des fluides corporels et l'hydratation de l'organisme), les protéines de coagulation (renforcent l'action des plaquettes), et les immunoglobulines (défendent l'organisme contre les agents infectieux) (4).

## II. La Qualification biologique des dons (QBD)

### 1. Définition et Principe

La QBD désigne un ensemble d'analyses biologiques effectuées sur un échantillon de sang prélevé chez un donneur. Tant pour la caractérisation des produits que pour le dépistage des infections transmissibles par la transfusion sanguine.

Leur principe commun est la mise en jeu des interactions Ag-Ac, pour la recherche éventuelle d'un Ag ou d'un Ac, qu'il soit soluble ou particulaire.

### 2. Test de Dépistage

En matière de sécurité microbiologique, les infections qui sont systématiquement dépistées en qualification biologique du don sont :

- Le TPHA pour le dépistage de la syphilis.
- La détection de l'Ag HBs pour le dépistage de l'hépatite B.
- La détection des anticorps et antigènes HCV pour le dépistage de l'hépatite C.
- La détection des anticorps et antigènes VIH1/VIH2 pour le dépistage du SIDA.
- Le dosage des Alanines Amino-Transférases (ALAT) pour le dépistage d'éventuelles formes disséminées d'hépatites autre que B et C.

### 3. Examens Immuno-hématologiques

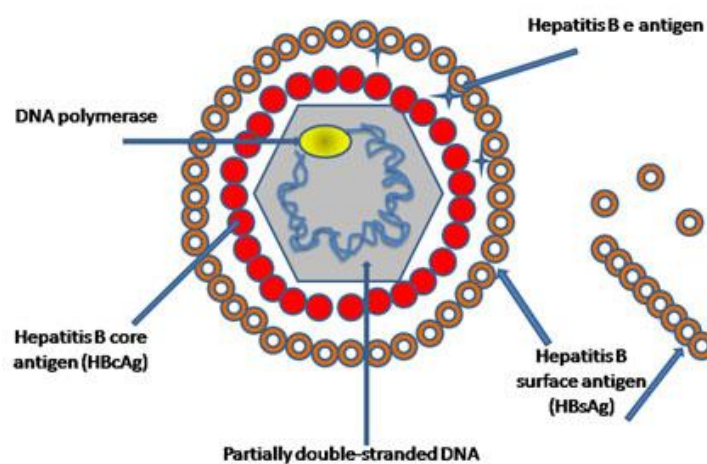
Consiste en la détermination du groupe sanguin, du phénotypage rhésus Kell, du dépistage des hémolysines Anti-A et Anti-B, et du dépistage simplifié des agglutinines irrégulières.

### III. L'hépatite B

#### 1. Agent étiologique

L'hépatite B est due à un virus VHB, appartenant à la famille des hépadnavirus, et qui possède un patrimoine génétique sous forme d'ADN circulaire double brin. Cet ADN est entouré d'une capsidie formée d'une protéine, portant l'antigène de surface désigné par Ag HBs.

Au cours de l'infection, le sang des patients infectés par le virus regorge de particules virales (3).



**Figure 2** : structure du virus de l'hépatite B

#### 2. Transmission

La transmission est principalement parentérale, sexuelle et materno-fœtale. Elle est donc, peut être liée aux transfusions sanguines et aux injections ne respectant pas les exigences de sécurité, aux relations sexuelles non protégées avec une personne infectée par le virus, au passage transplacentaire ou lors de la délivrance pour la transmission mère enfant (2).

#### 3. Diagnostic

Le tableau clinique de l'hépatite B est affirmée par la biologie, la présence d'AgHBs et/ou de l'Ac Anti-HBc de type IgM permet d'établir le diagnostic (9).

### IV. L'hépatite C

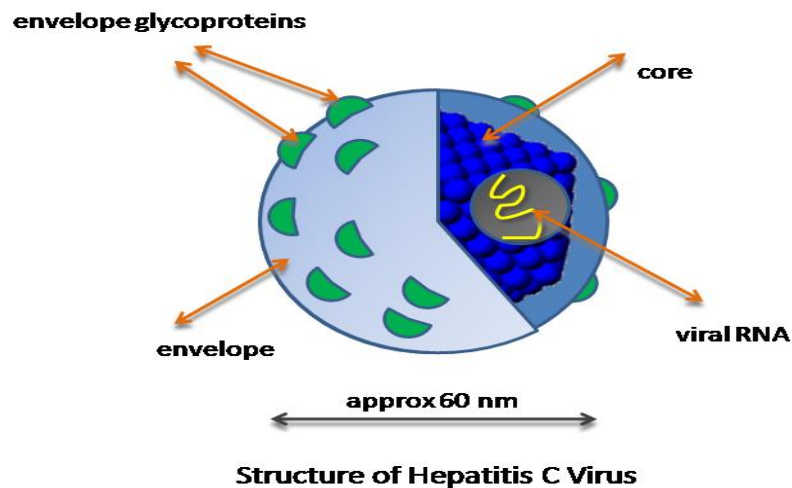
#### 1. Agent étiologique

En 1989, Choo et al., avaient mis en évidence par des techniques de biologie moléculaire, de clonage et de séquençage, un nouvel agent viral responsable de la majorité des hépatites post-



transfusionnelles et sporadiques, non liées aux virus connus des hépatites . Ce virus fut nommé virus de l'hépatite C.

C'est un virus de petite taille (55 à 65 nm de diamètre), dont l'enveloppe, dérivée de la membrane de la cellule infectée, contient deux glycoprotéines virales E1 et E2 qui se présentent sous la forme d'un hétérodimère non covalent. A l'intérieur de l'enveloppe se trouve une capsidie icosaédrique renfermant le génome composé d'une molécule d'ARN simple brin. (14).



**Figure 3:** structure du virus de l'hépatite C

## 2. Transmission

Il existe de nombreux modes de transmission pour le VHC :

- Transmission parentérale ; par injection de produits sanguins labiles ou stables.
- Toxicomanie par voie intraveineuse.
- Transmission nosocomiale, en particulier chez l'hémodialysé.
- Transmission mère- enfant ou verticale (14).

## 3. Diagnostic

Généralement, les médecins ont recours à des analyses de sang pour déterminer si une personne est atteinte ou non d'hépatite C. Ces analyses consistent en :

- des tests de dépistage direct des particules virales via la recherche soit de l'ARN virale par RT-PCR soit des protéines virales par la RIBA ou simplement de l'antigène HCV par ELISA.
- des tests de dépistage indirect via la recherche des anticorps produits par l'organisme qui combat le virus.

- des tests pour mettre en évidence une altération de la fonction hépatique (dosage des transaminases, phosphatases, Gamma GT) (15).

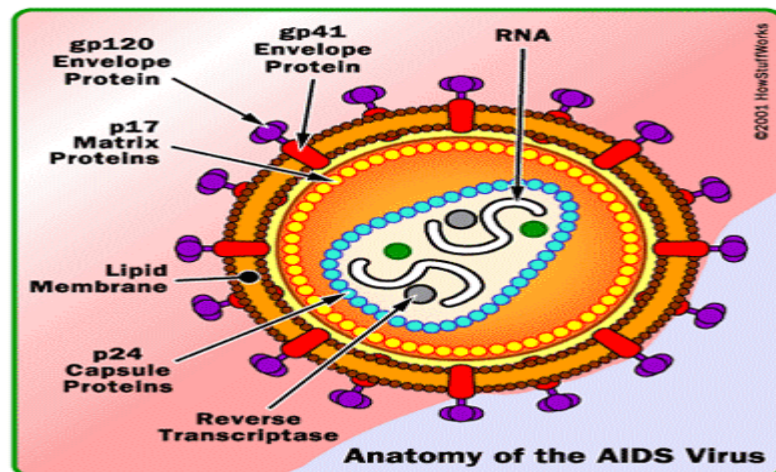
Compte-tenu de leur coût, les tests de dépistage direct RIBA et PCR ne sont prescrit en routine, que pour une confirmation des résultats d'une séropositivité mise en évidence initialement par les tests ELISA. La PCR quant à elle est demandée aussi pour le suivi thérapeutique afin de déterminer la Charge virale en amont et au cours du traitement.

## V. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

### 1. Agent étiologique

Le VIH est l'agent étiologique responsable du syndrome d'immunodéficience acquise ou « SIDA ». C'est le plus complexe des rétrovirus répertoriés jusqu'à présent. Il fait partie des lentivirus, dont le développement est lent, de l'ordre de 5 à 15 ans (10).

Les particules virales ont une taille d'environ 120 nm. Le noyau central est composé de deux protéines ; la protéine de la matrice qui soutient une bicouche lipidique et la p24 qui a la propriété de s'auto-agréger. Le core contient deux molécules d'ARN et un certain nombre de protéines. (14).



**Figure 4 : structure du VIH responsable du SIDA**

Les cellules cibles du VIH sont celles présentant des récepteurs CD4 à leur surface, il s'agit des lymphocytes T CD4+. La réplication du virus se déroule en plusieurs étapes :

La fixation ou attachement à une cellule, la pénétration et la décapsidation, la transcription inverse, l'intégration, la formation d'un ARN messager, l'épissage, la traduction de l'ARN, l'assemblage et le bourgeonnement (14).

## 2. Transmissibilité

Une personne infectée peut transmettre le virus par la grossesse, le contact avec le sang infecté, ou des rapports sexuels non protégés. Ce virus ne peut pas traverser une peau saine. Enfin, le VIH a été retrouvé dans d'autres fluides biologiques tels que les larmes, l'urine ou encore la salive sans pour autant que des cas de transmission aient pu clairement être mis en évidence du fait des faibles concentrations retrouvées (15).

## 3. Diagnostic

Le dépistage d'une infection HIV comprend des tests de diagnostic initial par la recherche dans le sang des AC anti HIV ou des Ag. La confirmation est faite par le western-blot et la charge virale par PCR (15).

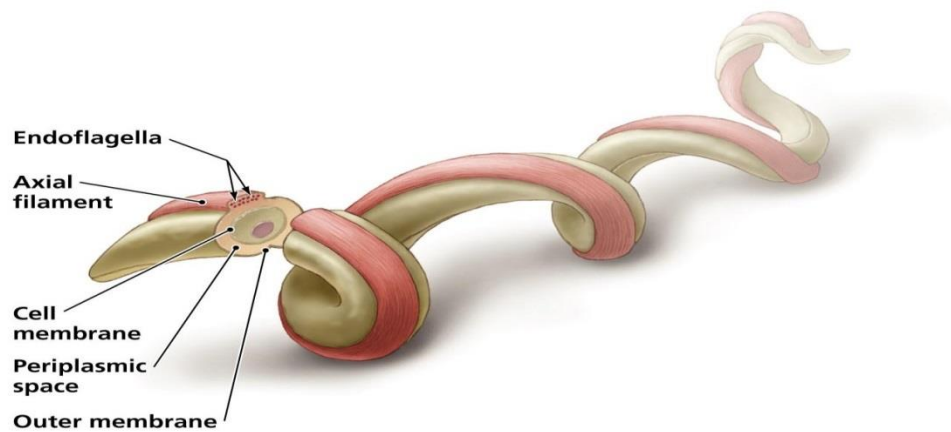
En effet, l'infection à HIV peut être détectée dans les deux semaines qui suivent la contamination, mais la plupart des personnes ont des anticorps anti-HIV détectables entre 3 semaines et 6 mois après l'infection initiale. C'est la fenêtre sérologique pendant laquelle une personne infectée peut ne pas avoir de test positif pour l'AC HIV.

# VI. La Syphilis

## 1. Agent étiologique

La Syphilis est une maladie bactérienne chronique dont le mode de contamination est habituellement vénérien (contact sexuel). Elle est due à la bactérie *Treponema Pallidum qui, une fois parvenue dans la circulation sanguine se propage dans tout le corps. Une lésion primaire appelée chancre peut apparaître habituellement environ trois semaines après l'exposition. Cette durée peut être réduite en cas de transmission transfusionnelle, puisque la bactérie pénètre directement dans le sang circulant. La syphilis est endémique dans de nombreuses parties du monde.*

*Treponema pallidum est une bactérie mobile de forme hélicoïdale, mesurant 15 micromètres de long sur 0,3 de large. Sa structure est celle des spirochètes. Elle comprend une enveloppe externe en trois feuilletts recouvrant une couche de peptidoglycanes qui donne la forme à la bactérie et qui est intimement liée à la membrane cytoplasmique sous-jacente. Entre la membrane externe et les peptidoglycanes, se trouvent trois flagelles enroulés autour du corps bactérien et qui constituent l'organe moteur (14).*



**Figure 5:** schéma de la bactérie *Treponema Pallidum*

## 2. Modes de transmission

La transmission bactérienne peut se faire :

- Par contact direct avec les exsudats des lésions de la peau ou des muqueuses.
- Par transfusion sanguine lorsque les mesures de sécurité transfusionnelles ne sont pas appliquées.
- Lors du partage du matériel d'injection.
- La transmission materno-fœtale (14).

## 3. Diagnostic

Le diagnostic de la syphilis peut se faire directement par la mise en évidence de *treponema* par microscopie à fond noir, ou indirectement par la mise en évidence de la réponse spécifique aux anticorps.

✚ L'examen au microscope à fond noir :

L'examen au microscope à fond noir du frottis obtenu par raclage du fond du chancre d'inoculation, est la seule possibilité de confirmation du diagnostic, la première semaine après la constitution du chancre.

✚ La sérologie :

Le sérodiagnostic de la syphilis est aujourd'hui bien standardisé, peu coûteux et fiable : l'association d'un test spécifique « *Treponema Pallidum* hemagglutination » (TPHA) et d'un test non spécifique « Venereal Disease Research Laboratory test » (VDRL) est suffisante pour affirmer ou infirmer un diagnostic de syphilis (14).

## MATERIEL ET METHODES

### I. Matériel

#### 1- Matériel biologique

##### ✚ Prélèvement

Cette étude est effectuée sur les donneurs de sang qui se sont présentés au CRTS de Fès pendant la période de 2 mois. Ces donneurs sont de deux types :

- Les donneurs volontaires qui viennent pour donner volontairement, dans un cadre de bénévolat et d'altruisme.
- Les donneurs familiaux ou de compensation qui viennent donner au profit de leur malade en cas de pénurie.

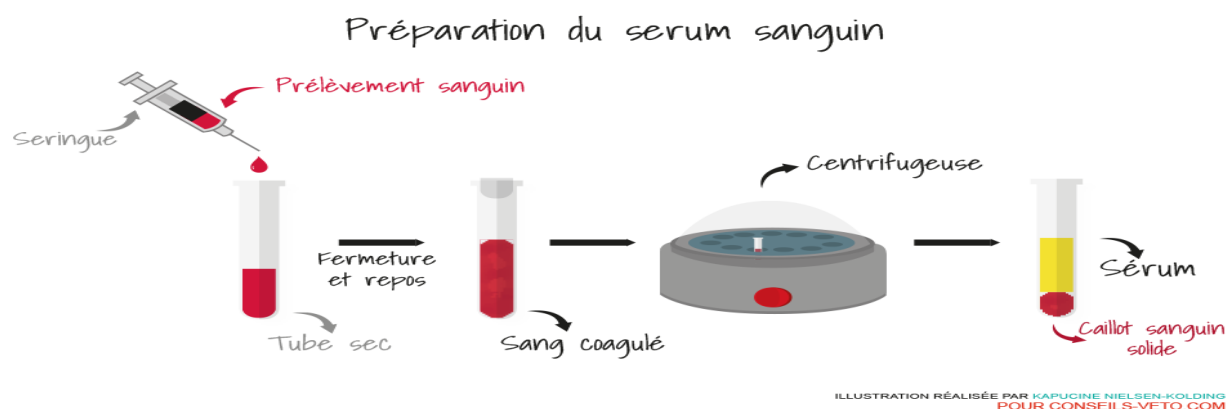
Pour chaque donneur, on prélève une poche de 400 et deux tubes : un tube sec pour les tests sérologiques et l'autre sur EDTA pour les tests immuno-hématologiques.

Les prélèvements sont ensuite acheminés aux laboratoires correspondants, munis d'une fiche de liaison où figurent les numéros code à barre de chaque don effectué. Cette fiche est établie pour permettre la vérification s'il l'on n'a pas omis de prélever les tubes pour certaines poches. Sinon, ces poches ne pourront pas être qualifiées et par conséquent, seront destinées au rejet.

##### ✚ La centrifugation

Après vérification de la qualité et de la quantité des tubes prélevés, ceux-ci sont centrifugés « bouchés » à 4000 RPM pendant 4min, pour obtenir le sérum qui fera la matrice des différents tests sérologiques.

La centrifugeuse de tube dont on a fait usage est de marque « Rotofix 32A ». sa capacité est de 68 tubes à la fois.



**Figure 6 : Préparation du sérum sanguin**

### ✚ Conditions de conservation

Si les échantillons ne sont pas à traiter immédiatement ou dans l'heure qui suit, ils doivent être conservés bouchés à une température entre +2 et +8°C.

Au moment du traitement, les tubes sont débouchés soigneusement en évitant les éclaboussures qui risquent de causer des contaminations croisées. Les bouchons sont jetés dans un container selon les bonnes règles d'hygiène et de sécurité et ne doivent plus être réutilisés.

### ✚ Gestion des déchets

Les échantillons seront éliminés dans le sac destiné à l'incinération.

## 2- Le matériel technique

Le matériel dont dispose le CRTS pour les analyses sérologiques est l'automate « BEP 2000 Advance ». C'est un analyseur pour plaques de microtitration intégralement automatisé et parfaitement adapté aux besoins des laboratoires réalisant des volumes d'échantillons faibles à moyens.



**Figure 7 : Appareil d'analyse sérologique (BEP 2000)**

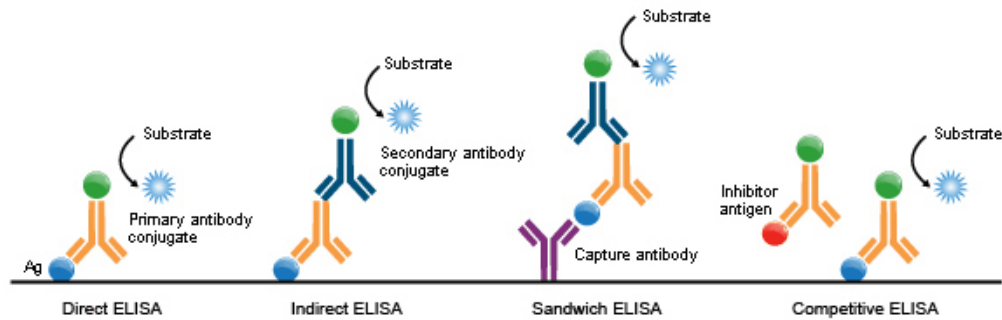
## II. Méthodes

Il existe de nombreuses techniques de dépistage sérologique dont le principe est la détection d'anticorps ou d'antigènes de différentes entités microbiennes. Les plus couramment utilisées sont l'ELISA « Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay » pour l'HBs, HCV et HIV et l'hémagglutination pour le TPHA. Et vu que ce sont les tests adoptés par le CRTS pour la qualification sérologique des dons, ils feront donc l'objet de notre étude.

## 1- ELISA « Enzyme Linked Immunosorbent Assay »

C'est une technique immuno-enzymatique qui permet de visualiser une réaction antigène-anticorps grâce à une réaction colorée produite par l'action sur un substrat d'une enzyme préalablement fixée à l'anticorps de détection.

On distingue plusieurs variantes d'ELISA (Figure 8).



**Figure 8:** principe des différentes variantes du test ELISA

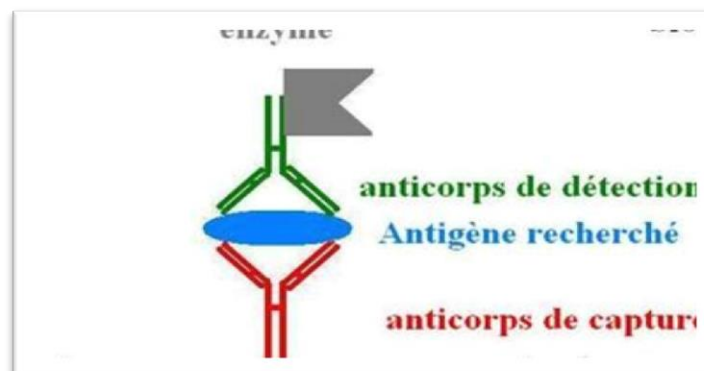
Les variantes qui seront détaillées sont celles utilisées pour les tests objet de ce travail :

- l'ELISA direct pour le dépistage de l'Ag HBs.
- L'ELISA indirect pour le dépistage de l'HCV et l'HIV.

Leurs principes sont les suivants :

### ✚ L'ELISA direct :

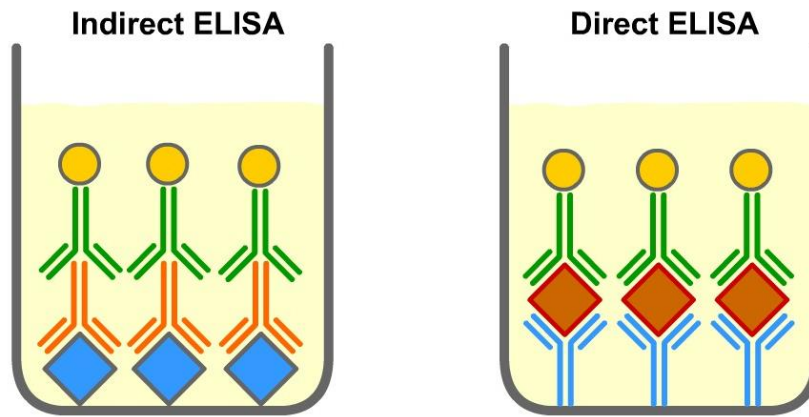
Cherche à détecter directement l'agent infectieux en recherchant ses antigènes par la mise en jeu d'un anticorps « de capture ». On l'appelle aussi ELISA Sandwich car l'antigène à détecter est pris en sandwich entre deux anticorps : « l'anticorps de capture » qui est fixé sur le support solide de la plaque de microtitration et « l'anticorps de détection » qui est couplé à l'enzyme conjugué. (Figure 10).



**Figure 9:** principe de l'ELISA direct

### ✚ L'ELISA indirect :

Permet de dépister indirectement l'agent infectieux en recherchant les anticorps dont il a induit la synthèse. Dans ce cas, c'est l'anticorps de l'échantillon qui est pris en sandwich entre l'antigène déposé sur la plaque de microtitration et l'anticorps couplé à l'enzyme.



**Figure 10:** comparaison des principes de l'ELISA direct et indirect

Le procédé de ces deux variantes est le même :

Le sérum contenant l'antigène (ELISA direct) ou l'anticorps à détecter (ELISA indirect) est ajouté au support solide (puits de plaque de micro-titration) où est préalablement fixé respectivement l'anticorps ou l'antigène de capture. Après incubation puis lavage le ligand est ajouté, en l'occurrence, l'anticorps de détection couplé à une enzyme (peroxydase). Après incubation, ce ligand se lie au complexe anticorps-antigène éventuellement formé. Après lavage, la présence éventuelle du complexe anticorps-antigène-ligand est révélée par l'adjonction d'un chromogène : une substance initialement incolore, qui devient colorée par l'effet de la portion enzymatique du ligand. Cette révélation est donc par une réaction colorimétrique.

## 1.1 Procédure expérimentale de diagnostic de l'hépatite B

a- Préparation des réactifs :



**Tableau 1 : COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa™ HBs Ag ULTRA**

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS
R1	<b>MICROPLAQUE</b> : 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux anti-HBs (souris)
R2	<b>SOLUTION DE LAVAGE concentrée (20X)</b> Tampon tris, NaCl, pH = 7,4 Conservateur : ProClin™ 300 (0,04 %)
R3	<b>CONTRÔLE NÉGATIF</b> Tampon Tris HCl, contenant de la SAB. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1 %)
R4	<b>CONTRÔLE POSITIF (Humain)</b> Tampon Tris HCl, contenant de la SAB, additionné d'un mélange d'Ag HBs purifiés des sous-types ad et ay, (humains) Conservateur : ProClin™ 300 (0,1 %)
R6	<b>DILUANT CONJUGUÉ</b> : Tampon Tris HCl pH 7.4 additionné de BSA, de Tween® 20, d'immunoglobulines de boeuf et de souris et d'un indicateur coloré témoin de dépôt Conservateurs : Ciprofloxacine (10 µg/ml), ProClin™ 300 (0,1 %)
R7	<b>CONJUGUÉ</b> Anticorps monoclonaux anti-HBs de souris et anticorps polyclonaux anti-HBs de chèvre couplés à la peroxydase. Lyophilisé.
R8	<b>TAMPON SUBSTRAT DE LA PEROXYDASE</b> Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)
R9	<b>CHROMOGÈNE</b> coloré en rose : solution contenant du tétraméthyl benzidine (TMB)
R10	<b>SOLUTION D'ARRÊT</b> Solution d'acide sulfurique 1 N

Avant utilisation des réactifs de la trousse Monolisa™ HBs Ag ULTRA, les laisser s'équilibrer à température ambiante (18-30°C).

 Les Réactifs prêts à l'emploi sont :

- Réactif 1 (R1) : la Microplaque ou le support cadre contenant 12.
- Réactif 3 (R3) : Contrôle Négatif.
- Réactif 4 (R4) : Contrôle Positif.
- Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt.

 Réactifs à reconstituer

- Solution de lavage : Réactif 2 (R2) à diluer au 1/20<sup>e</sup> dans de l'eau distillée. Préparer 800 ml pour une microplaque de 12 barrettes.
- Conjugué : Taper doucement le flacon de conjugué lyophilisé (R7) sur la pailleuse pour détacher toute substance pouvant adhérer au bouchon de caoutchouc, déboucher délicatement et y transvaser le contenu d'un flacon de

diluant pour conjugué (R6). Reboucher et laisser reposer 10 minutes en homogénéisant de temps en temps pour faciliter la dissolution.

- Solution de révélation enzymatique : diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/11ème (1 volume de R9 dans 10 volumes de R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Cette solution reste stable 6 heures à l'obscurité. Homogénéiser.
- Le témoin interne.

#### b- Protocole expérimental

Le protocole expérimental exécuté par l'automate repose sur la réalisation des mêmes étapes faites en mode manuel :

- ✚ 100 µl de contrôle négatif sont déposés dans les puits A1, B1 et C1 (Cf. fig 10) ;
- ✚ 100 µl de contrôle positif sont déposés dans les puits D1 et E1 ;
- ✚ 100 µl de contrôle interne sont déposés dans les puits F1 ;
- ✚ 100 µl de chaque échantillon à tester sont déposés dans les cupules à partir de G1 ;
- ✚ 50 µl de la solution reconstituée de l'enzyme conjuguée aux Ac monoclonaux Anti-HBs sont déposés dans toutes les cupules ;
- ✚ La microplaque est homogénéisée par une série de vibrations légères sur une surface plane, puis incubée pendant 1h30 min à 37°C ;
- ✚ Les cupules sont lavées avec la solution de lavage préparée selon les recommandations du kit désignée dans le tableau ci-dessus ;
- ✚ 100 µl de substrat, dont le rôle est la révélation de l'activité enzymatique, sont répartis dans toutes les cupules ;
- ✚ Une deuxième incubation de 30 min à 37°C à lieu ;
- ✚ Enfin, 100 µl de la solution d'arrêt sont additionnés pour stopper la réaction enzymatique ;
- ✚ La densité optique est lue à 450/620 nm à l'aide d'un lecteur de microplaques dans un délai de 4 à 30 min alors que la coloration est toujours stable.



**Figure 11** : cupules d'une microplaque

c- Calcul des seuils d'interprétation :

la densité optique moyenne du témoin négatif TN distribué dans les puits A1, B1 et C1 est :

$$\text{Moyenne TN} = (\text{DO A1} + \text{DO B1} + \text{DO C1})/3$$

la densité optique moyenne du témoin positif TP distribué dans les puits D1 et E1 est :

$$\text{Moyenne TP} = (\text{DO D1} + \text{DO E1})/2$$

la valeur seuil VS = Moyenne TN + 0,050

d- Critères de validation de la réaction:

- La moyenne des TN < 0,080
- La moyenne des TP  $\geq$  1

## 1.2 Procédure expérimentale de diagnostic de l'hépatite C

C'est un dosage immuno-enzymatique qualitatif pour la détection simultanée de l'antigène Core du virus de l'hépatite C et des anticorps anti-VHC dans le sérum ou le plasma humain au cours d'un même dosage.

Ce test est destiné à améliorer la détection précoce d'une infection par le VHC lors du dépistage chez les donneurs de sang, ou lors d'examens cliniques.

a- Préparation des réactifs :

**Tableau 2 : COMPOSITION DE LA TROUSSE Monolisa HCV Ag-Ab ULTRA**

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS
<b>R1</b>	<b>MICROPLAQUE</b> 12 barrettes sensibilisées avec un anticorps monoclonal anti-capside du VHC et des antigènes recombinants purifiés (NS3, NS4) et un peptide muté de la région capsidique du VHC
<b>R2</b>	<b>SOLUTION DE LAVAGE CONCENTRÉE (20X)</b> Tampon Tris NaCl pH 7,4 Conservateur : Proclin™ 300 (0,04%)
<b>R3</b>	<b>CONTRÔLE NEGATIF</b> Tampon Tris HCl, contenant de la SAB; Conservateur : Proclin™ 300 (0,1%)
<b>R4</b>	<b>CONTRÔLE POSITIF</b> Sérum humain contenant des anticorps anti-VHC et négatif pour l'antigène HBs et pour les anticorps anti-HIV1 et anti-HIV2 dilué dans un tampon Tris HCl contenant de la S.A.B., inactivé photochimiquement Conservateur : Proclin™ 300 (0,1%)
<b>R5a</b>	<b>CONTRÔLE ANTIGÈNE POSITIF</b> Antigène positif synthétique de contrôle contenant un peptide de capsidique lyophilisé
<b>R5b</b>	<b>DILUANT DU CONTRÔLE ANTIGÈNE</b> Diluant du R5a. Eau contenant un conservateur : Proclin™ 300 (0,5 %)
<b>R6</b>	<b>CONJUGUE 1</b> Anticorps monoclonal murin dirigé contre la capsidique du VHC marqué à la biotine. Coloré en violet. Conservateur : Azide de sodium (<0,1%), Cosmocil 0,025%
<b>R7</b>	<b>CONJUGUE 2</b> Anticorps murins anti-IgG humaines marqués à la peroxydase et streptavidine marquée à la peroxydase Coloré en vert. Conservateur : Proclin™ 300 ( 0,5 %)
<b>R8</b>	<b>TAMPON SUBSTRAT DE LA PEROXYDASE</b> Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium pH 4,0 contenant 0,015% d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)
<b>R9</b>	<b>CHROMOGÈNE</b> Solution contenant du tétraméthyl benzidine (TMB)
<b>R10</b>	<b>SOLUTION D'ARRÊT</b> Solution d'acide sulfurique 1 N

✚ Les réactifs prêts à l'emploi sont :

- Réactif 1 (R1) : la Microplaque ou le support cadre contenant 12 .
- Conjugué 1 (R6) .
- Conjugué 2 (R7).
- Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt.
- Avant l'utilisation des réactifs, les laisser équilibrer à température ambiante pendant 30 minutes. Homogénéiser par retournement avant utilisation.

✚ Réactifs à reconstituer :

- Solution de lavage : Réactif 2 (R2) à diluer au 1/20<sup>e</sup> dans de l'eau distillée. Préparer 800 ml pour une microplaque de 12 barrettes.

- Solution de révélation enzymatique : diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/11ème (1 volume de R9 dans 10 volumes de R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Cette solution reste stable 6 heures à l'obscurité. Homogénéiser.
- Contrôle Antigène positif: Remplir le flacon de R5a avec la totalité de la solution du flacon R5b. Reboucher et attendre 10 minutes à température du laboratoire en agitant de temps en temps par inversion du flacon.

b- Protocole:

Déposer directement et successivement :

- + 100 µl de conjugué 1 (R6) dans chaque cupule ;
- + 50 µl de contrôle négatif (R3) en A1;
- + 50 µl de contrôle positif (R4) en B1,C1 et D1 ;
- + 50 µl de contrôle antigène positif de R5 en E 1 ;
- + 50 µl du chaque échantillon à partir de F1 ;
- + Homogénéisez le mélange avec un agitateur de microplaque durant 5 secondes
- + Couvrir la microplaque pour assurer l'étanchéité et l'incuber dans un incubateur sec pendant :  $90 \pm 5$  minutes à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ;
- + Les cupules sont lavées avec la solution de lavage préalablement préparée (5cycles de lavage) ;
- + Distribuer rapidement 100 µl de la solution de conjugué 2 (R7) dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi. Recouvrir, et incuber pendant  $30 \pm 5$  minutes à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ ;
- + Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant  $30 \pm 5$  minutes à température ambiante ( $18$  à  $30^{\circ}\text{C}$ ) ;
- + Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10), attendre au moins 4 minutes après la distribution de la solution d'arrêt, et, dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620-700 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ;
- + S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

### c- CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS :

La présence ou l'absence des anticorps anti-HCV et/ou de l'antigène de capsid du VHC est déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil calculée.

#### d- Calcul des seuils d'interprétation :

la densité optique moyenne du témoin positif TP (R4) distribué dans les puits B1, C1, D1 est :

$$\text{Moyenne TN} = (\text{DO B1} + \text{DO C1} + \text{DO D1})/3$$

$$\text{la valeur seuil VS} = \text{Moyenne DO R4} / 5$$

#### e- Critères de validation

- + DO TN (R3) < 0,6 fois la valeur seuil.
- +  $0,8 < \text{La moyenne des TP (R4)} < 2,4$
- + DO du contrôle antigène positif (R5) > 0.500.

Le test est invalidé si le contrôle négatif R3, le contrôle antigène positif R5, et/ou plus d'une valeur du contrôle positif R4 sont hors de l'intervalle des valeurs ci-dessus.

### 1.3 Procédure expérimentale de diagnostic de HIV :

C'est un dosage immunoenzymatique qualitatif pour la détection simultanée de l'antigène VIH p24 et des anticorps anti-VIH1 (groupes M et O) et anti-VIH2 Dans le sérum ou le plasma humain au cours d'un même dosage.

#### a- Préparation des réactifs

**Tableau 3 :** Composition de la trousse Geenscreene HIV Ag-Ab ULTRA

ETIQUETAGE	NATURE DES RÉACTIFS
<b>R1</b>	<b>Microplaque</b> 12 barrettes de 8 cupules sensibilisées avec des anticorps monoclonaux (souris) anti-p24 du VIH1 et des antigènes VIH1 et VIH2 purifiés
<b>R2</b>	<b>Solution de lavage concentrée 10 fois</b> Tampon Tris NaCl pH 7,4 Conservateur : Merthiolate de Sodium 0,01%
<b>R3</b>	<b>Contrôle négatif</b> Plasma humain inactivé par chauffage, négatif en antigène HBs et VIH et en anticorps anti-VIH1, anti-VIH2 et anti-VHC Conservateur : Azide de Sodium < 0,1%
<b>R4</b>	<b>Contrôle positif anticorps VIH</b> Diluant synthétique contenant du plasma humain inactivé par chauffage, positif en anticorps anti-VIH, négatif en antigène HBs et en anticorps anti-VHC. Conservateur : ProClin™ 300 < 0,1%
<b>R5</b>	<b>Contrôle positif Ag VIH</b> Diluant synthétique contenant de l'antigène VIH1 purifié inactivé par la chaleur en présence d'un agent dissociant. Conservateur : ProClin™ 300 < 0,1%
<b>R6</b>	<b>Conjugué 1</b> Anticorps polyclonaux (mouton) biotinylés anti-p24 VIH1 coloré en jaune-vert Conservateur : ProClin™ 300 0,5%
<b>R7a</b>	<b>Conjugué 2</b> Streptavidine et antigènes VIH1 et VIH2 purifiés marqués à la peroxydase, lyophilisé
<b>R7b</b>	<b>Diluant du conjugué 2</b> Solution de lait écrémé coloré en rouge Conservateur: ProClin™ 300 0,5%
<b>R8</b>	<b>Tampon substrat</b> Solution d'acide citrique et d'acétate de Sodium pH 4,0, contenant 0,015% d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et 4% de DMSO
<b>R9</b>	<b>Chromogène</b> Solution contenant de la tetramethyl-benzidine (TMB)
<b>R10</b>	<b>Solution d'arrêt</b> Solution d'acide sulfurique

 Réactifs prêts à l'emploi

- Réactif 3 (R3) : Contrôle négatif.
- Réactif 4 (R4) : Contrôle positif anticorps VIH.
- Réactif 5 (R5) : Contrôle positif Ag VIH.
- Réactif 6 (R6) : Conjugué 1.
- Réactif 10 (R10) : Solution d'arrêt.

 Réactifs à reconstituer

- Solution de lavage : Réactif 2 (R2) à diluer au 1/10<sup>e</sup> dans de l'eau distillée.  
Préparer 800 ml pour une microplaque de 12 barrettes.
- Solution de travail du conjugué 2 : Taper doucement le flacon de conjugué lyophilisé (R7a) sur la paillasse pour détacher toute substance pouvant adhérer

au bouchon de caoutchouc. Enlever le bouchon avec soin et verser le contenu d'un flacon de diluant (R7b). Reboucher et laisser reposer pendant 10 minutes en remuant et en retournant de temps en temps pour faciliter la dissolution.

- Solution de révélation enzymatique : diluer le réactif R9 dans le réactif R8 au 1/11ème (1 volume de R9 dans 10 volumes de R8) sachant que 10 ml sont nécessaires et suffisants pour traiter 12 barrettes. Cette solution reste stable 6 heures à l'obscurité. Homogénéiser.

b- Protocole:

Déposer directement et successivement dans la plaque :

- + 25 µl de conjugué 1 (R6) dans chaque cupule ;
- + 75 µl de contrôle positif Ag VIH (R5) en A1 ;
- + 75 µl de contrôle positif anticorps VIH (R4) en B1 ;
- + 75 µl de contrôle négatif (R3) en C1, D1 et E1 ;
- + 75 µl de l'échantillon à partir de F1 ;
- + Homogénéiser le mélange en agitant la microplaque après l'étape de pipetage.
- + Couvrir la microplaque pour assurer l'étanchéité et l'incuber dans un incubateur sec pendant :  $60 \pm 5$  minutes à  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ;
- + Les cupules sont lavées avec la solution de lavage préalablement préparée (5cycles de lavage) ;
- + Distribuer rapidement 100 µl de la solution de conjugué 2 (R7) dans toutes les cupules. Le conjugué doit être agité avant emploi. Recouvrir, et incuber pendant  $30 \pm 5$  minutes à température ambiante ( $18-30^{\circ}\text{C}$ ) ;
- + Distribuer rapidement dans toutes les cupules 80 µl de la solution de révélation de l'activité enzymatique (R8 + R9) préalablement préparée. Laisser la réaction se développer à l'obscurité pendant  $30 \pm 5$  minutes à température ambiante ( $18$  à  $30^{\circ}\text{C}$ ) ;
- + Ajouter 100 µl de la solution d'arrêt (R10), attendre au moins 2 minutes après la distribution de la solution d'arrêt, et, dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction, lire la densité optique à 450/620-700 nm à l'aide d'un lecteur de plaques ;
- + S'assurer avant la transcription des résultats de la concordance entre la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons.

e- Calcul des seuils d'interprétation

La moyenne des absorbances du contrôle négatif (DO R3)



$$DO R3 = DO (C1) + DO (D1) + DO (E1)/3$$

La valeur seuil VS = DO R3 + 0.200

f- Critères de validation de l'essai

La moyenne des absorbances du contrôle négatif DO (R3) < 0,170

L'absorbance du contrôle positif anticorps VIH (R4) DO (R4) > 0,9

L'absorbance du contrôle positif Ag VIH DO (R5) > 0,9

g- Interprétation des résultats

La procédure d'interprétation des résultats est la même pour les trois tests HBs, HCV et HIV.

Elle se fait comme suit :

- Echantillon initialement positif (+) si sa D.O  $\geq$  VS
- Echantillon négatif (-) si sa D.O < VS

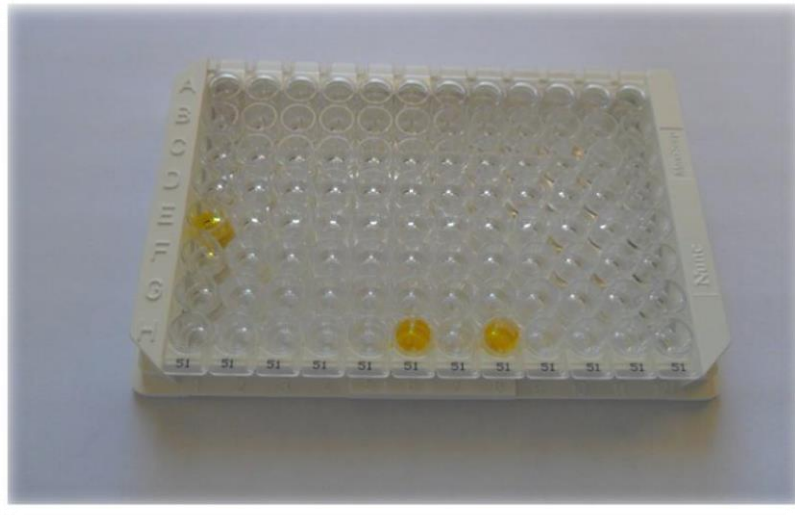
Toutefois, les résultats situés juste au-dessous de la valeur seuil (VS-20 % <DO<VS) sont considérés douteux et doivent être interprétés avec prudence.

h- Validation analytique :

Elle repose sur :

- La validité des critères calculés (TN, TP) qui doivent être dans les intervalles recommandés.
- La reproductibilité des résultats du contrôle quotidien interne par rapport à la valeur initiale.
- La concordance entre le compte rendu des résultats de l'automate et l'observation de la microplaque à l'œil nu. En effet, toutes les étapes de calcul et d'interprétation des résultats citées préalablement sont effectuées automatiquement par le logiciel intégré à l'automate. Néanmoins, le compte rendu des résultats traités par l'automate est insuffisant. Une lecture à l'œil nu de la plaque est obligatoire, En se basant sur la simple coloration des puits, on peut facilement identifier les échantillons positifs.

Les (E6), (H8) et (H6) dans l'image suivante sont positifs. Tous les autres puits sont incolores, donc négatifs. Les puits douteux sont d'un jaune très pale à peine détectable à l'œil nu (ne figurent pas dans cette microplaque).



**Figure 12** : Plaque représentant les résultats du test HBs-Ag

- La vérification de la lecture et de la transcription des résultats par une tierce personne pour détecter les éventuelles erreurs qui peuvent être commises à ce niveau.

## 2- TPHA « *Treponema Pallidum* Hemagglutination Assay »

Le coffret TPHA détecte les anticorps sériques humains anti-*T.pallidum* par une méthode d'hémagglutination indirecte (HAI). Des érythrocytes aviaires sont sensibilisés avec des composants antigéniques de *T. pallidum*. En présence d'anticorps spécifiques anti-*T.pallidum*, les érythrocytes sensibilisés (cellules test) s'agglutinent et présentent un aspect caractéristique (présence d'un voile) dans le fond des puits de la plaque de microtitration. En cas d'absence d'anticorps, ils sédimentent et forment un anneau très serré ou bouton compact dans le fond du puits.

Les éventuelles réactions non spécifiques sont détectées par l'utilisation de cellules de contrôle, qui sont des érythrocytes aviaires non sensibilisés.

### 1.1 Procédure expérimentale de diagnostic de la Syphilis

#### a- Réactifs

- **Cellules Test** : Erythrocytes aviaires sensibilisés avec de l'antigène de *T. pallidum*.
- **Cellules Contrôle** : Erythrocytes aviaires non sensibilisés.
- **Diluant** : Tampon phosphate + extrait de *T.pallidum* pH=7.2
- **Contrôle positif** : Sérum prédilué au 1/20 contenant des anticorps anti-*T. pallidum*.
- **Contrôle négatif** : Sérum prédilué au 1/20 sans anticorps anti-*T. pallidum*.



**Figure 13 : Les réactifs de TPHA**

b- Mode opératoire :

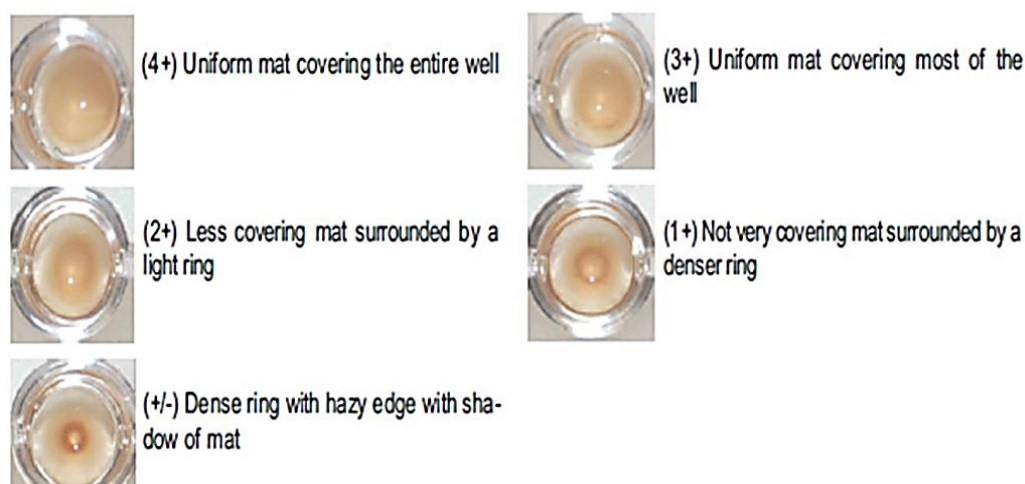
- ✚ Déposer 190  $\mu$ l du diluant dans les puits des colonnes 1, 4, 7, 10. Le nombre de puits utilisé est fonction du nombre d'échantillons à traiter. le principe c'est que pour chaque puits rempli, on laisse ceux des deux colonnes adjacentes vides ;
- ✚ Ajouter, dans l'ordre du plan de travail, 10  $\mu$ l de sérum pour chaque échantillon dans le puits correspondant ;
- ✚ Prélever de chaque puits, deux fois, 25  $\mu$ l de la dilution après l'avoir bien mélangé et les verser respectivement dans les deux puits adjacents ;
- ✚ 25  $\mu$ l de témoin négatif (TN) déjà prédilué, sont déposés dans deux puits distincts à la suite de la série d'échantillons ;
- ✚ 25  $\mu$ l de témoin positif (TP) déjà prédilué, sont déposés dans deux puits distincts après le TN ;
- ✚ 75  $\mu$ l des hématies/cellules tests sont ajoutés dans les premiers puits adjacents ;
- ✚ 75  $\mu$ l des hématies/cellules contrôles sont ajoutés dans les deuxièmes puits adjacents ;
- ✚ Une agitation est réalisée en appliquant à la plaque, un mouvement de rotation sur une surface stable. L'incubation se fait ensuite pendant 45 min et à T° ambiant;
- ✚ La lecture se fait à l'œil nu.

a- Interprétation :

Un sérum est TPHA négatif s'il y a présence d'un point au centre.

Un sérum est TPHA positif s'il y a présence d'une auréole (absence du point au centre).

L'intensité de la réactivité vis-à-vis de l'antigène tréponémique est proportionnelle au diamètre de l'auréole. Selon cette intensité, le résultat qualitatif est exprimé de (+) à (++++)



**Figure 14** : Résultats du test TPHA en fonction de l'intensité de la réaction

## CONDUITE A TENIR DEVANT UN RESULTAT REACTIF INITIAL (POSITIF OU DOUTEUX)

### **(Applicable quel que soit le marqueur biologique)**

Les tubes initialement positifs et les douteux sont systématiquement retestés en double avant l'interprétation finale des résultats.

Un contrôle sur un échantillon de la poche correspondante et fait en parallèle.

Si après répétition de l'essai, les résultats des 2 doublets sont négatifs, l'échantillon est déclaré négatif.

Si le résultat d'au moins l'un des doublets est reproductible, l'échantillon est considéré positif ou réactif répétable.

Si le contrôle poche est concordant avec le contrôle du tube, c'est bon, sinon tout le lot de poche qualifié est mis en quarantaine jusqu'à ce que l'anomalie soit diagnostiquée selon la procédure de gestion des écarts établit par le service d'assurance de qualité.

Par mesure de sécurité, si le résultat d'un échantillon est initialement réactif (soit douteux ou positif), la poche correspondante est destinée au rejet même si les résultats des contrôles ce sont avérés négatifs.

Les résultats des échantillons initialement réactifs (positifs ou douteux) sont systématiquement confirmés par un contrôle du marqueur en question un deuxième

échantillon prélevé sur le donneur lui-même après sa convocation s'il ne s'est pas présenté spontanément pour récupérer ses résultats.

Lorsque les résultats sont confirmés sur le deuxième prélèvement, le donneur est orienté vers une consultation médicale spécialisée.

## RESULTATS ET DISCUSSION

### I. Résultats

#### 1.2 Nombre d'échantillons traités

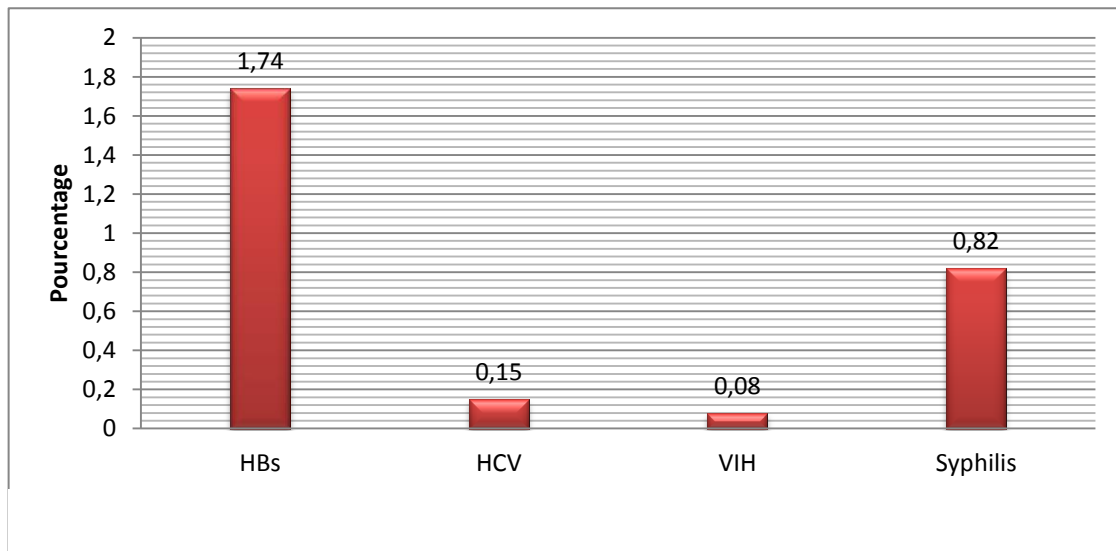
Durant les cinq premiers mois de l'année 2015, 7303 échantillons ont été examinés au niveau du laboratoire de sérologie du CRTS de Fès pour la détection des marqueurs virologiques HBs, HCV, VIH et de la syphilis. 5077 proviennent de la ville de Fès soit 69,5% et 2226 des environs, soit 29,5 % (tableau 4).

Après confirmation des tests sérologiques par le contrôle des tubes et des poches correspondantes, les statistiques des échantillons positifs répétables ont été réalisées. Les résultats sont représentés dans le tableau suivant, par mois, par région et par marqueur.

**Tableau 4:** Résultats des tests sérologiques de la population étudiée entre janvier et Mai 2015

		Nombre de prélèvements examinés	Nombre des résultats positif pour :			
			HBs	HCV	VIH	Syphilis
Janvier	<b>FES</b>	749	17	1	2	10
	<b>Régions</b>	605	4	0	0	5
Février	<b>FES</b>	982	21	3	2	11
	<b>Régions</b>	577	5	1	0	5
Mars	<b>FES</b>	1145	23	2	0	4
	<b>Régions</b>	366	4	0	0	4
Avril	<b>FES</b>	1114	24	3	1	5
	<b>Régions</b>	457	7	0	0	3
Mai	<b>FES</b>	1087	20	1	1	7
	<b>Régions</b>	221	2	0	0	6
TOTAL		7303	127	11	6	60
POURCENTAGE			1.74%	0.15%	0.08%	0.82%

Les résultats, s'ils sont illustrés par un histogramme, il sera plus facile de mettre en évidence l'ampleur de chaque marqueur au sein de la population étudiée.



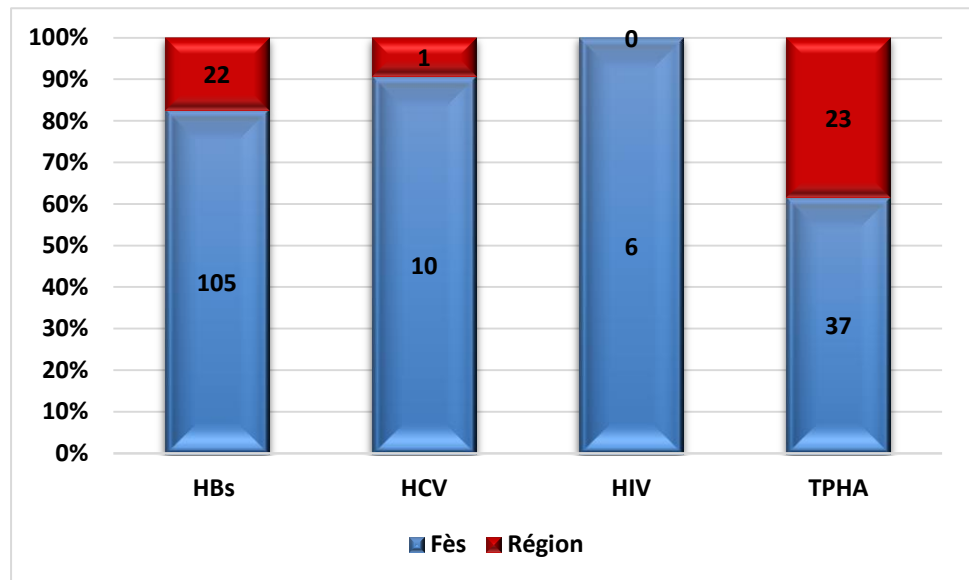
**Figure 15:** Taux global de positivité de différents marqueurs de la population étudiée

#### Analyse et Interprétation

- 127 échantillons se sont révélés positifs pour l'hépatite B dont 105 de Fès et 22 des régions. Donc le taux de positivité globale au sein de la population étudiée est de 1.74%.
- 11 échantillons sont positifs pour l'hépatite C dont 10 de Fès et 1 des régions. Ce qui représente un taux de positivité globale de 0.15%.
- Quant au VIH, les 6 échantillons positifs sont tous de Fès. Donc le taux global de positivité est de 0.08%.
- Pour la Syphilis 60 échantillons sont positifs dont 37 de Fès et 23 des régions. Le taux global de positivité est de 0.82%.

Donc, les marqueurs les plus fréquents chez la population étudiée sont l'HBs (1.74%) et le TPHA (0.82%) suivi de l'HCV (0.15%) et l'HIV (0.08%) avec une ampleur significativement inférieure.

Si les résultats sont présentés sous forme de nombre de cas séropositifs en fonction des régions (Cf. Figure suivante), les nombres les plus élevés d'échantillons séropositifs pour les quatre marqueurs sont ceux de Fès : l'HBs (80% vs 20%) et le TPHA (62% vs 28%) suivi de l'HCV (91% vs 9%) et l'HIV (100% vs 0).

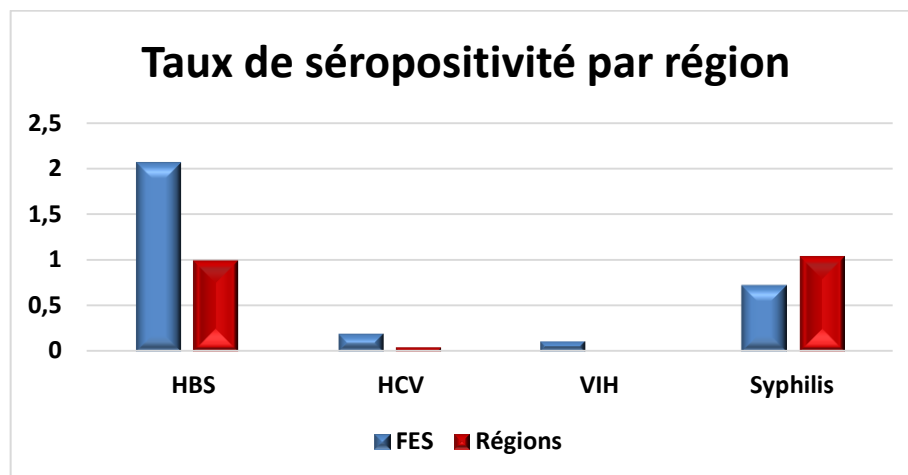


**Figure 16 : Taux global de positivité de différents marqueurs selon les régions**

Cette comparaison ne signifie pas que le taux de séropositifs au sein de l'échantillon provenant de Fès est plus élevée que celui des environ, car pour pouvoir faire une telle déduction, il faut tout d'abord exprimer les résultats en pourcentage de la population étudiée. Rappelons les données de chaque région dans le tableau suivant et calculons le taux de séropositivité de chaque marqueur.

**Tableau 5 : Séropositivité exprimée en nombre et en pourcentage de la population par région**

		HBs	HCV	HIV	TPHA	Effectif de l'échantillon
FES	Nombre	105	10	6	37	5077
	Taux (%)	2,07	0,19	0,12	0,73	
Régions	Nombre	22	1	0	23	2226
	Taux (%)	0,99	0,04	0	1,03	



**Figure 17 : Taux de séropositivité par région**



Après avoir exprimé les résultats en pourcentage de séropositifs par rapport à l'effectif de chaque région, il en sort qu'au contraire, le taux de TPHA s'est révélé plus élevé dans la région de Fès qu'en ville.

## **DISCUSSION**

Ces chiffres nous donnent une image approximative sur le taux de séropositivité des différents marqueurs recherchés au sein d'une population de donneurs de sang du CRTS de Fès. Néanmoins, nous ne pouvons pas nous prononcer pour faire l'extrapolation sur la population générale pour deux raisons principales :

1° Il faut que l'échantillon soit représentatif de la population globale. Malheureusement, nous ne disposons pas de données sur le dénombrement démographique de chaque région.

2° Notre échantillon étudié n'est pas randomisé ou choisi aléatoirement parmi la population globale. Il s'agit de donneurs de sang sélectionnés sur des critères rigoureux où l'exclusion à cause du risque de séropositivité est la condition N° 1.

Bien qu'il nous paraisse un écart significatif des taux de séropositivité des marqueurs recherchés entre les deux groupes (Fès et régions), nous ne pouvons pas tirer des conclusions strictes sur « laquelle des régions est la plus touchée ? » pour les mêmes raisons suscitées. Seulement, il convient de signaler que le mode de vie dans les grandes villes où il y a plus de recours aux comportements à risques à savoir les activités sexuelles non protégées et à plus de recours aux soins dentaires et aux explorations fonctionnelles invasives (endoscopies...) faisant usage ; parfois ; de matériel insuffisamment stérilisé.

Si ces résultats sont comparés avec ceux d'une étude réalisée au sein du même CRTS, sur une période de 42 mois et sur une population de 47766, les résultats donnent à conclure que les variations les plus significatives sont celles du TPHA (0.129% vs 0.82%), puis de l'HBS (0.075% vs 1.74%), l'HCV (0.127% vs 0.15%) et l'HIV (0.006% vs 0.08%).

## CONCLUSION

La sécurisation des produits sanguins destinés à la transfusion du sang est de plus en plus renforcée avec les découvertes et les progrès actuels. Un entretien médical bien fait avec les donateurs de sang sous réserve de la sincérité de leurs réponses permet d'écartier tous les donateurs potentiellement à risque. La Qualification Biologique du Don (QBD) permet de vérifier qu'aucun agent infectieux ne sera transmis lors de la transfusion sanguine, dans la limite du seuil de détection et de la sensibilité des tests utilisés qui est de plus de 99,9%). L'acte transfusionnel sera encore plus sûr si l'on introduit le dépistage génomique dans la routine des tests de dépistage viral

La transfusion sanguine est un geste noble, sûr et efficace. C'est un acte de solidarité qui permet aux médecins de soigner et de sauver des vies humaines. Cependant, la demande reste toujours très loin de l'offre. Nous sommes loin d'atteindre un taux de satisfaction des demandes à 100%.

**C'est en changeant les regards que les choses avanceront. Alors devenons bénévoles.**

## QUESTIONNAIRE GUIDE (ANNEXE 1)

### **1. Les dons antérieurs**

Date du dernier don

Récupération des résultats

### **2. Les antécédents chirurgicaux**

Date d'intervention

Type d'intervention

### **3. Les antécédents médicaux**

Date de survenue

Type d'affection

Traitement / Exploration invasive

### **4. L'état actuel**

Existence d'un problème de santé même minime lequel ?

La prise médicamenteuse

### **5. Le risque de transmission**

Ictère / la date de survenue

MST / Le type et La date de survenue

### **6. Appartenance à une population à risque majoré**

Multi partenariat

Toxicomanie par voie intra-veineuse ou nasale

Transfusion

### **7. Conduite à risque**

Relation sexuelle occasionnelle

Nouveau partenaire sexuel

Relation sexuelle avec un partenaire appartenant à une population à risque majoré

Tatouage / piercing

### **8. Accident d'exposition au sang**

Date

### **9. Voyage hors pays**

Le nom du pays

La date \ la durée du séjour

### **10. Particulier aux femmes**

Grossesse, Accouchement (même prématuré), Avortement, Allaitement (Date)

## **Contre-indications définitives du don**

(ANNEXE 2)

Les contre-indications au don de sang total ne sont pas toutes répertoriées dans cette liste, la décision finale de prélever ou non un donneur appartient au médecin de prélèvement.

<b>CODE</b>	<b>CONTRE-INDICATION</b>
D1	Pathologie cardio-vasculaires (ATCD de coronaropathie, d'angine de poitrine, d'arythmie cardiaque sévère, d'AVC, de thrombose artérielle ou veineuse récurrente)
D2	Diabète insulino-dépendant
D3	Néphropathies chroniques
D4	Hémopathies chroniques
D5	Pancréatites chroniques
D6	Antécédents de résection de l'estomac
D7	ATCD d'Hépatite virale ou d'ictère non étiqueté
D8	Partenaire sexuels réguliers porteur du virus d'une hépatite
D9	Neuropathies chroniques
D10	Maladie de système
D11	Affections malignes/ Cancers même guéris
D12	Asthme, Manifestations allergiques majeures (choc anaphylactique, œdème de Quincke...)
D13	Paludisme ou séjour en zone impaludée
D14	Infection au VIH ou partenaires sexuels réguliers porteur du VIH
D15	ATCD de Transfusion sanguine
D16	Maladie de Creutzfeldt-Jakob ou autre encéphalopathie spongiforme transmissible, ou sujet appartenant à une famille à risque au regard de la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou d'une autre encéphalopathie spongiforme transmissible
D17	Séjour en Angleterre plus d'un an entre 1980 et 1996
D18	Traitement par hormone de croissance (extraits de glandes hypophysaires d'origine humaine) avant 1986
D19	Allogreffes de tissus ou d'organe
D20	Utilisation de drogues par voie intraveineuse même ancienne ou une seule fois dans la vie
D21	Homosexualité
D22	Vitiligo

## Contre-indications provisoires du don

(ANNEXE 3)

CODE	CI	DELAI MAX.
P1	TA<10 max.      TA<6min	jusqu' à normalisation
P2	Age : Minimum = 18 ans Maximum = 65 ans	La poursuite des prélèvements au-delà de 65 ans de même que le recrutement d'un nouveau donneur de plus de 60 ans sont laissés à l'appréciation du médecin
P3	Poids < 50 Kg ou mauvais état général	
P4	Conduites à risques (Acupuncture, Piercing, tatouage...)	4 mois
P5	Relations sexuelles non protégées avec partenaire occasionnel ou partenaires multiples	4 mois
P6	Accident d'exposition au sang	4 mois
P7	Saignée traditionnelle (Hijama)	4 mois
P8	Exploration endoscopique (digestive, urinaire...)	4 mois
P9	Grossesse (Accouchement prématuré)	6 mois après accouchement
P10	Allaitement	Fin allaitement
P11	Avortement	3 mois
P12	Vaccination	21 jours
P13	Sérothérapie d'origine animale (sérum antitétanique, anti-scorpionique)	15 jours
P14	Sérothérapie d'origine humaine (sérum antitétanique, anti-D)	3 mois
P15	Anesthésie locale	8 jours
P16	Soins dentaires	4 mois
P17	Etat d'ébriété ou vertige	
P18	Maladies infectieuses (angine, bronchite, infection urinaire...)	15 jours après guérison
P19	Gastroentérite fébrile (diarrhée avec fièvre)	1 mois après guérison
P20	Intervention chirurgicale	6 mois après
P21	Tuberculose	2 ans après guérison
P22	Épilepsie	3 ans sans crise après l'arrêt du traitement
P23	RAA	2 ans après arrêt de la crise en l'absence de cardiopathie chronique
P24	sujets manifestement sous l'emprise de l'alcool	ajournés jusqu'au moment où ils seront sobres
P25	Sujet sous traitement	(Voir document)

## **NE CONTRE-INDIQUENT PAS LE DON (sauf cas particulier)**

- ❖ Aspirine et anti-inflammatoires (sauf plaquettes)
- ❖ Rhinite simple
- ❖ Traitements vasodilatateurs (toniques veineux)
- ❖ Traitements hormonaux (pilule, ménopause)
- ❖ Traitement de l'HTA (si elle est équilibrée)
- ❖ Traitement anxiolytique (somnifères...)
- ❖ Traitement par des aérosols (traitement de l'asthme)
- ❖ Traitement du diabète non insulino-dépendant (si la glycémie est équilibrée)
- ❖ Traitements locaux (pommades, crèmes, lotions...)
- ❖ Allergie ou désensibilisation (sauf plaquettes)

## REFERENCES

1. [infirmiers.com/etud/courslibre/courslibre.php](http://infirmiers.com/etud/courslibre/courslibre.php)
2. STANISLAS POL . DOIN. GROUPE LIAISONS. AS, Les HEPATITES VIRALES.
3. Aurent Karila , Module 7 :Santé et Environnement-Maladie Transmissible. DCEM Collection
4. <http://www.transfusion.be/>
5. Loi n°93-5 du 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament journal officiel français. Gastroenterology 1993 ; 85 : 439-462.
6. J.J . Le frère. P. Rouge , Transfusion sanguine .P231-233-234-2 35
7. Docteur Mahdi TAZEROUT – Madame Yolande GALINIER Manuel d’aide a la formation en transfusion sanguine, décembre 2005.
8. [infirmiers.com/etud/courslibre/courslibre.php](http://infirmiers.com/etud/courslibre/courslibre.php).
9. APP Mme BENDJEBLA, le sang.PDF
10. I.PRESCOTT, J.Harley, D.Klein, Maladies sexuellement transmissibles : Syphilis primaire et secondaire 2010-2011. P212, P213 et P214
11. Lefrère J-J., Lunel F., Marecellin P., Pawlotski J-M. and zakaski J-P., 1998. Guide pratique des hépatites virales. 82-155, 211-222.
12. A. Mammette, Transmission sexuelle Virologie médicale.Infection par le VIH et SIDA, ARCAT-SIDA, édition 1999, P12, P13 et P14.
13. [http://www.infectiologie.com/site/medias/\\_documents/officiels/vhc/2007-hvc-medecins-inpes.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/officiels/vhc/2007-hvc-medecins-inpes.pdf)
14. François Denis, édition 2006. Les virus transmissibles sous la direction scientifique , P112, P113 et P114.