



Développement d'approches PCR et implémentation pour l'amélioration de l'accès au diagnostic moléculaire des maladies infectieuses dans les pays à ressources limitées

Sylvie Zida

► To cite this version:

Sylvie Zida. Développement d'approches PCR et implémentation pour l'amélioration de l'accès au diagnostic moléculaire des maladies infectieuses dans les pays à ressources limitées. Médecine humaine et pathologie. Université Montpellier, 2018. Français. NNT : 2018MONTT005 . tel-01809529

HAL Id: tel-01809529

<https://theses.hal.science/tel-01809529>

Submitted on 6 Jun 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En BIOLOGIE SANTE « BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE »

École doctorale SCIENCES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES POUR LA SANTE

Unité de recherche INSERM / UMR 1058

Développement d'approches PCR et implémentation pour l'amélioration de l'accès au diagnostic moléculaire des maladies infectieuses dans les pays à ressources limitées

Présentée par Sylvie ZIDA
Le 09 Février 2018

Sous la direction de M. Edouard TUAILLON
et M. Albert SOTTO

Devant le jury composé de

Mme Rasmata OUEDRAOGO/TRAORE, Professeur, Université de Ouagadougou, UFR SDS
Mme Florence ABRAVANEL, MCU-PH, Université de Toulouse, INSERM UMR1043
Mme Hélène MARCHANDIN, Professeur, Université de Montpellier, UMR 5569 HSM
Mme Zorée DJELOUADJI, MC, Université de Lyon-VetAgro Sup, INRA/VAS
M. Gauthier DOBIGNY, CR1, Université d'Abomey-Calavi de Cotonou, IRD
M. Philippe Van de PERRE, Professeur, Université de Montpellier, INSERM UMR 1058
M. Edouard TUAILLON, MCU-PH, Université de Montpellier, INSERM UMR 1058
M. Albert SOTTO, Professeur, Université de Montpellier, INSERM ERI 26

Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Examinateur
Président
Directeur
Codirecteur



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

DEDICACES

Je dédie ce travail:

A mon tendre et cher époux Jean Fidèle BATIONO, merci pour ton amour et ton soutien inconditionnel.

A mes chers enfants : Joyce Ingrid et Donald Mathis

A mes parents : Jacques ZIDA et Honorine VALEA

A mon frère et mes sœurs : Serge Apollinaire, Nicole Adeline, Carolle Amélie et Benjamine Astrid

A mes neveux : Franck Janice Anicet et Schadrac Raphael

A ma belle-sœur Flora et sa famille

A Chantal ILBOUDO

REMERCIEMENTS

J'adresse mes sincères remerciements :

Au Pr Edouard TUAILLON, merci pour ton encadrement, ta disponibilité et ton soutien

Aux : Pr Albert SOTTO, Pr Vincent FOULOGNE, Pr Hélène MARCHANDIN et Pr Nicolas MEDA

Aux : Dr Michel BRUN, Dr Mathieu PICARDEAU, Dr Gauthier DAUBIGNY et Mme SERVENT

A toute l'équipe de l'UMR U1058 INSERM, Montpellier et particulièrement, Pr Philippe VAN De PERRE, Pr Jean-Pierre MOLES, Pr Pierre DUJOLS, Karine BOLLORE, Amandine PISONI et Vanessa DAOUDI.

A tout le personnel du laboratoire de virologie de l'hôpital LAPEYRONIE, particulièrement, Jacques DUCOS, Anne Marie MONDAIN, Patrick PASTOR, Sylvie CHAMBERT et Laure OTTOMANIE

A : Pratt DIAFOUKA-KOLIA, Séverine KREMER, Joany CASTERA, Armen SANOYAN, Cara Chan MANVILLE et Aleksandra MALESKA

A mes collègues du Centre MURAZ : Dramane KANIA, Thérèse KAGONE, Bachirou TINTO, Amadou DICKO, Ousséni BANDAOGO, Saidou OUEDRAOGO, Alidou ZANGO, Issé ROUAMBA, Viviane NIKIEMA et Jacques TRAORE.

A toutes les personnes qui ont contribué d'une manière ou d'une autre à la réalisation de ce travail, merci.

SOMMAIRE

DEDICACES.....	2
REMERCIEMENTS	3
LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX	8
ABSTRACT	9
RESUME	10
INTRODUCTION	11
1. Enjeu et difficultés de l'accès au diagnostic moléculaire dans les pays à ressources limitées	13
1.1. Les besoins et les difficultés :	13
1.2. Les techniques de biologie moléculaire aujourd'hui	20
2. Données sur la situation au Burkina Faso	34
2.1. Le Burkina Faso	34
2.2. Le Centre Muraz	36
3. Des pistes de recherche pour améliorer l'accès au diagnostic moléculaire dans les pays à ressources limitées	38
3.1. Améliorer l'accès et l'implémentation : Le DBS dans le VIH, une technique prometteuse pour centraliser les examens dans les laboratoires de références mais dont les possibilités et limites demeurent à bien établir, par exemple vis à vis de la LOD, la spécificité (ADN) etc....Nécessité de l'implication des fabricants pour disposer de notes techniques et d'approbation (CE, FDA) sur ce support	38
3.2. Utiliser les plateformes polyvalentes ouvertes pour élargir le panel des pathogènes explorés afin de documenter les infections négligées qui pourraient être traitées par des stratégies ciblées sur un pathogène et d'initier des approches de diagnostic syndromique	42
OBJECTIFS.....	44
1. Objectif général.....	44
2. Objectifs spécifiques.....	44

RESULTATS ET ARTICLES	45
1. Estimation du niveau d'ADN du VIH-1 qui interfère sur la fiabilité de la quantification de l'ARN du VIH-1. Quantification effectuée sur dried blood spots recueillis auprès de patients traités avec succès.....	45
2. Exploration de La leptospirose comme une cause possible et négligée d'ictère fébrile au Burkina Faso.....	51
3. Détection de virus de l'herpès et de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> dans le liquide céphalo-rachidien chez les patients suspects de méningite aseptique au Burkina Faso, en Afrique de l'Ouest	72
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	94
ANNEXE.....	96
REFFERENCES.....	104

LISTE DES SIGLES ET ABREVIATIONS

µl :	microlitre
Ac :	anticorps
ADN :	acide désoxyribonucléique
ANRS :	Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les hépatites virales autrement dénommée France Recherche Nord & Sud Sida-HIV Hépatites
ARN :	acide ribonucléique
ARV :	antirétroviral
ASSURED :	affordable, sensitive, specific, user friendly, rapid and robust, equipment free and deliverable to end users
CD4 :	cluster de différenciation 4
CE :	certification européenne
CHN :	centre hospitalier national
CHR :	centre hospitalier régional
CHU :	centre hospitalier universitaire
CM :	centre médical
CMA :	centre médical avec antenne chirurgicale
CSPS :	centre de santé et de promotion sociale
CSF :	cerebrospinal fluid
CV :	charge virale
CDC :	Center for disease control
DALY :	disability-adjusted life year
DNA :	deoxyribonucleic acid
DSF :	direction de la santé et de la famille
ELISA :	enzyme-linked immunosorbent assay
FDA :	food and drug administration
FRET :	fluorescence resonance energy transfer
GLEAN :	global leptospirosis environmental action network
HAART :	highly active antiretroviral therapy

HIV :	human immunodeficiency virus
HCV :	hepatitis C virus
HBV :	hepatitis B virus
HSV :	herpes simplex virus
IgM :	immunoglobuline de type M
INSD :	institut national de la statistique et de la démographie
INSERM :	institut national de la santé et de la recherche médicale
NASBA :	nucleic acid sequence based amplification
LCR :	liquide céphalorachidien
LOD :	limit of detection
MERS-CoV :	Middle East Respiratory Syndrome-Coronavirus
MTB :	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS :	organisation mondiale de la sante
ONUSIDA :	programme commun des Nations Unies sur le VIH/sida
OPP :	open polyvalent platform
PBMC :	peripheral blood mononuclear cell
RUO :	research use only
PCR :	polymerase chain reaction
PNUD :	programme des nations unies pour le développement
POC :	point of care
PTME :	prévention de la transmission mère enfant
qPCR :	quantitative polymerase chain reaction
RNA :	ribonucleic acid
SIDA :	syndrome d'immunodéficience acquise
TDR :	test de diagnostic rapide
UMR :	unité mixte de recherche
UNITAID :	organisation internationale d'achats de médicaments
VIH :	virus de l'immunodéficience humaine
WHO :	world health organization

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Vies sauvées par l'introduction de nouveaux diagnostics recommandés	12
Figure 2 : Comparaison des vies sauvées par un nouveau diagnostic pour la pneumonie bactérienne	13
Figure 3 : Répartition des diagnostics étiologiques chez des enfants fébriles en Tanzanie	16
Figure 4 : Pourcentage de populations africaines et asiatiques qui ont accès à des infrastructures de soins de santé avancées contre les minimums	18
Figure 5 : Principe de l'essai 5'-nucléase avec sonde Taqman	24
Figure 6 : Principe de la chimie des sondes FRET en tandem	25
Figure 7 : La chimie des sondes Beacon	26
Figure 8 : les dix principales causes de décès au Burkina Faso	36
Figure 9 : Sensibilité par gamme de charge virale de DBS par rapport aux échantillons de plasma correspondants	42

Tableaux

Tableau 1 : Défis techniques pour les tests POC dans différents niveaux de laboratoire dans les pays à ressources limitées	32
Tableau 2 : Sensibilité et spécificité du DBS pour la charge virale par rapport au plasma	42

ABSTRACT

Development and implementation of nucleic acid tests for diagnosis of infectious diseases in resource-limited countries

Molecular assays are frequently requested for the diagnosis and monitoring of infectious diseases. While nucleic acid testing is the standard of care in developed countries, its availability remains limited and constrained by cost, technologies, and human resources in many settings, including West Africa. In remote areas, limited access to laboratory facilities is also a main issue. The development of PCR methods on open polyvalent platform in reference laboratories such as the Centre Muraz in Burkina-Faso and the use of capillary whole blood collected on DBS specimens can facilitate access to nucleic acid testing.

According to WHO guideline HIV-RNA quantification using DBS can be considered in settings where there is a lack of access to sites or nearby laboratory facilities for nucleic acid test. A major concern is the suboptimal lower specificity of DBS due to the interference of HIV-DNA copies archived in infected cells with HIV-RNA copies. In the first study we determined the HIV-1 DNA level that interfered with the reliability of HIV-1 RNA quantification on DBS specimens used for therapeutic monitoring (1). False-positive HIV RNA detection (22/62, 35%) was associated with high HIV-1 DNA levels. Our results indicate that the specificity of HIV-1 RNA assays on DBS should be evaluated following manufacturer protocols on samples with HIV-1 DNA levels of $\geq 1,000$ copies/106 peripheral blood mononuclear cells.

Beside infections frequently tested by nucleic acid tests there is an urgent need to scale up assay for neglected infection such leptospirosis. In the second study we explored leptospirosis by serological and molecular testing as a neglected cause of disease among patients with febrile icteric illness in Burkina Faso. The results showed for the first time that leptospirosis is an unsuspected cause of acute febrile illness in this semi-arid country.

In the last part of the PhD, we developed a multiplex PCR assay for the diagnosis of tuberculosis and Herpes Simplex (HSV) meningitis among patients with suspected aseptic meningitis. This qPCR which allowed to test in a single run HSV 1/2 and M. tuberculosis was highly specific, sensitive and reproducible. The lowest DNA concentration giving 100% detection signal was estimated at 2.45 copies/ μ l for HSV1, 1.72 for HSV2 and 2.54 copies/ μ l for M. tuberculosis. Of the 202 CSF specimens included in this study, 5 (2.46%) were tested positive: 2 (0.99%) for HSV and 3 (1.47%) for M. tuberculosis. This assay may be especially useful in cases of meningitis/encephalitis with a low number of white blood cells count in the CSF.

Our project stresses the importance of the implementation of new molecular methods to provide preliminary data about the burden of infectious diseases including leptospirosis, tuberculosis and HSV meningitis in Burkina Faso. DBS is an alternative specimen that facilitates access to nucleic acid tests but requires validation studies. Syndromic approach need to be tested and implemented in West Africa and should be based on local expertise and implementation of molecular methods in reference laboratories.

Key words: PCR, Diagnosis, Infectious diseases, Resource-limited countries

RESUME

Les tests moléculaires sont fréquemment demandés pour le diagnostic et le suivi des maladies infectieuses dans les pays développés. Cependant, leur disponibilité reste limitée dans les pays à ressources limitées en raison des contraintes de coûts, des technologies et des ressources humaines. Dans les régions éloignées, un accès limité aux installations de laboratoire constitue également un problème majeur. Le développement de méthodes de PCR sur plateformes ouvertes dans des laboratoires de référence tels que le Centre MURAZ au Burkina-Faso et l'utilisation d'échantillons de sang total capillaire sur DBS peuvent faciliter l'accès aux tests moléculaires.

Selon la directive de l'OMS, la quantification de l'ARN du VIH à l'aide de DBS peut être une alternative dans les contextes d'accès difficile au laboratoire. Une préoccupation majeure est la spécificité sous-optimale de l'utilisation des DBS en raison de l'interférence de l'ADN du VIH archivé dans des cellules infectées sur la charge virale ARN du VIH. Dans une première étude, nous avons déterminé le niveau d'ADN du VIH-1 qui entravait la fiabilité de la quantification de l'ARN du VIH-1 sur des DBS. Une détection d'ARN du VIH-1 faussement positif (22/62, 35%) a été associée à des niveaux élevés d'ADN de VIH-1. Nos résultats indiquent que la spécificité des tests d'ARN du VIH-1 sur les DBS devrait être évaluée selon les protocoles du fabricant sur des échantillons avec des niveaux d'ADN de VIH-1 de $\geq 1\ 000$ copies / 10^6 cellules mononuclées du sang périphérique.

Outre les infections fréquemment diagnostiquées, il est urgent d'intensifier la recherche d'infections négligées comme la leptospirose. Dans une seconde étude, nous avons exploré la leptospirose par des tests sérologiques et moléculaires comme cause négligée de maladie chez les patients atteints d'ictère fébrile au Burkina Faso. Les résultats ont montré pour la première fois que la leptospirose est une cause insoupçonnée de maladie fébrile aiguë dans ce pays semi-aride.

Dans la dernière partie du doctorat, nous avons développé un test de PCR multiplex pour le diagnostic de la méningite à herpès simplex virus (HSV) et à *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) chez des patients suspects de méningite aseptique. Cette qPCR qui a permis de tester dans un seul essai HSV 1/2 et MTB était très spécifique, sensible et reproductible. La concentration d'ADN la plus faible donnant 100% de signal de détection a été estimée à 2,45 copies / μ l pour HSV1, 1,72 pour HSV2 et 2,54 copies / μ l pour MTB. Parmi les 202 échantillons de LCR inclus dans cette étude, 5 (2,46%) étaient positifs: 2 (0,99%) pour HSV et 3 (1,47%) pour MTB. Ce test peut être particulièrement utile dans les cas de méningite / encéphalite avec un faible nombre de globules blancs dans le CSF.

Notre projet a montré l'importance de la mise en œuvre de nouvelles méthodes moléculaires pour fournir des données préliminaires sur le fardeau des maladies infectieuses, y compris la leptospirose, la tuberculose et la méningite à HSV au Burkina Faso. Le DBS est un spécimen alternatif qui facilite l'accès aux tests moléculaires mais nécessite des études de validation. Les approches syndromiques doivent être testées et mises en œuvre dans les pays à ressources limitées en se basant sur l'expertise locale et la mise en œuvre de méthodes moléculaires dans les laboratoires de référence.

Mots clés : PCR, Diagnostic, Maladies infectieuses, Pays à ressources limitées

INTRODUCTION

L'impact potentiel des nouvelles technologies diagnostiques dans la lutte contre le fardeau des maladies infectieuses n'est pas toujours mesuré à sa juste valeur. Au contraire d'autres interventions indispensables, thérapeutiques (médicaments) ou préventives (vaccins), l'étape de diagnostic dans le contrôle des maladies infectieuses peut nécessiter la mise en œuvre d'outils technologiques complexes [1]. L'accès aux outils de diagnostic appropriés est une composante essentielle pour identifier la présence et la cause de la maladie et pour déterminer un traitement approprié. Au contraire du diagnostic probabiliste qui prévaut largement dans les pays à faible revenu, un diagnostic précis avec une preuve biologique peut aider à économiser les traitements, limiter leur coût et permettre une thérapie ciblée. Les outils de diagnostic actuellement disponibles sont souvent inadaptés aux contraintes des pays à ressources limitées (PARL), notamment parce qu'ils sont complexes et trop coûteux. La recherche montre que les nouveaux outils diagnostiques et leur utilisation pertinente ont le potentiel de sauver des millions de vies par an à condition qu'ils soient accessibles dans les pays à ressources limitées. Quelques exemples des avancées potentielles pour la santé que l'implémentation de nouveaux moyens diagnostiques permettrait sont illustrés par la figure 1. Une évaluation des gains en termes de vies sauvées par l'amélioration de l'accès au diagnostic des pneumopathies suivant quatre scénarios différents est illustrée par la figure 2 [2]. Le recours aux tests moléculaires est devenu fréquent pour le diagnostic et la surveillance des maladies infectieuses dans les pays développés, alors que leur disponibilité reste limitée dans les pays à ressources limitées. Certaines régions ont un accès limité aux laboratoires en raison de leur éloignement. Le développement de méthodes de PCR dans des laboratoires de référence tels que le Centre Muraz au Burkina-Faso et l'utilisation d'échantillons prélevés, transportés et conservés sur DBS peuvent faciliter l'accès aux tests moléculaires pour les pays du Sud y compris dans les zones périphériques et les populations d'accès difficile. Des experts en santé mondiale ont classé les technologies moléculaires modifiées pour un diagnostic simple et abordable des maladies infectieuses en tant que principale biotechnologie pour améliorer la santé dans les pays en développement. Ce constat a déjà été reconnu par l'OMS dans un rapport intitulé « Genomics and World Health », qui a souligné le potentiel de la

génomique dans l'amélioration de la santé mondiale [3] et il a été évalué que l'utilisation du DBS pour le suivi du traitement VIH était l'une des interventions possible les plus efficaces en Afrique sur le plan médico-économique [4].

Ce travail de thèse a été réalisé grâce à une fructueuse collaboration entre l'UMR 1058 INSERM, Pathogenèse et contrôle des infections chroniques, Etablissement Français du Sang, Université de Montpellier, France et le Centre MURAZ, Bobo Dioulasso, Burkina Faso. L'objectif global était de développer et évaluer de nouveaux outils de diagnostic moléculaire.

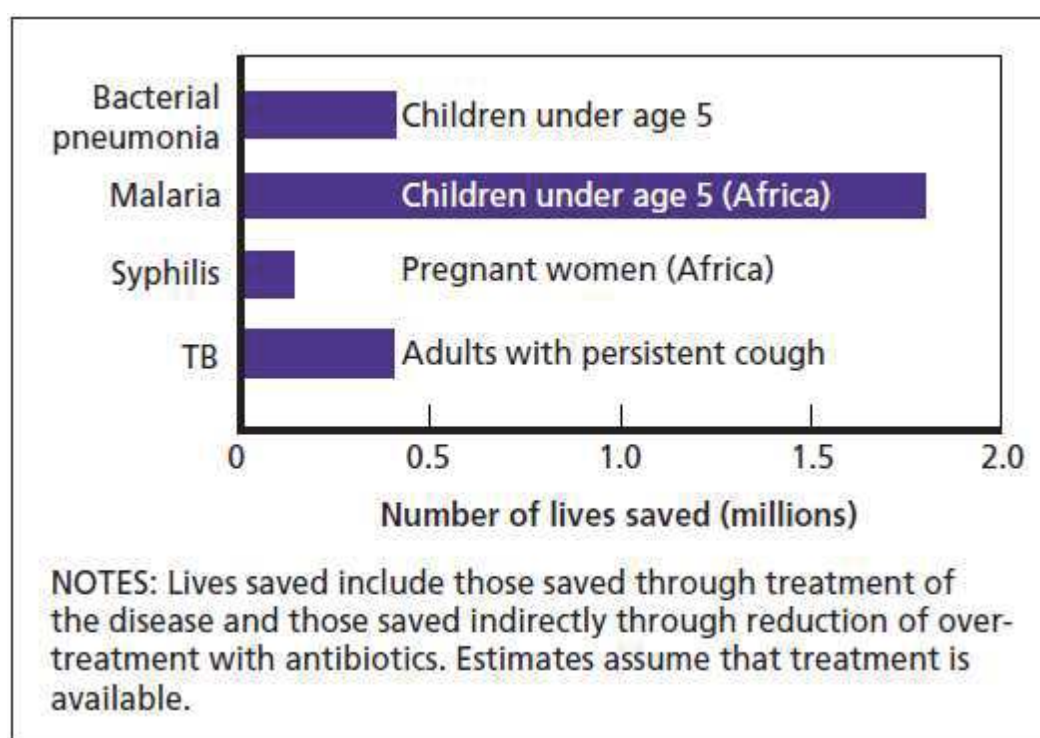


Figure 1: Vies sauvées par l'introduction de nouveaux diagnostics recommandés [2]

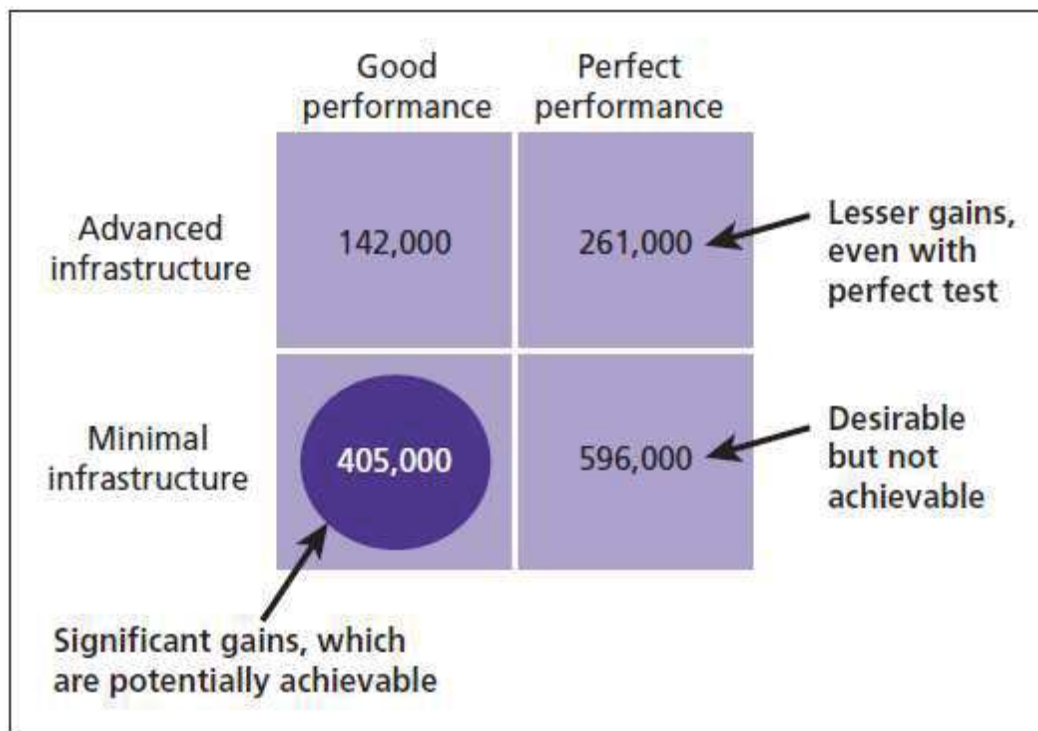


Figure 2: Comparaison des vies sauvées par un nouveau diagnostic pour la pneumonie bactérienne [2]

1. Enjeu et difficultés de l'accès au diagnostic moléculaire dans les pays à ressources limitées

1.1. Les besoins et les difficultés

1.1.1. Impact des maladies infectieuses sur la mortalité globale dans les pays à ressources limitées

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a récemment estimé les charges imposées par des maladies dans la population mondiale et il en résulte que de nombreuses maladies infectieuses dont les traitements sont disponibles continuent à lourdement peser sur la santé des populations des pays à ressources limitées. Ainsi, en 2011, environ 1,7 millions de personnes sont mortes du sida dans le monde; 34 millions de personnes (dont 3,4 millions d'enfants) vivaient avec le VIH, dont 70% (dont près de 3 millions d'enfants) étaient en Afrique subsaharienne [5, 6, 7]. Malgré les progrès des connaissances sur le paludisme et le développement des antipaludéens, environ 3,3

milliards de personnes demeurent exposées au paludisme (50% de la population mondiale) et 660 000 personnes sont décédées du paludisme en 2010, principalement dans les pays à ressources limitées [8]. Dans ces mêmes pays, les maladies diarrhéiques représentent 20% des décès chez les enfants de moins de 5 ans par rapport à 1% dans les pays économiquement plus développés [9]. En ce qui concerne la tuberculose, elle a causé 1,4 millions de décès en 2011, avec un impact particulièrement élevé enregistré dans les pays en développement même si le problème de la résistance du bacille se pose partout dans le monde [9]. Il est à noter particulièrement pour la tuberculose et les hépatites virales que les modélisations récentes suggèrent que les objectifs fixés en 2015 ne seraient probablement pas atteints en 2030 [11]. En plus d'une mortalité élevée, les maladies infectieuses ont un impact important sur la société, en affectent largement les adultes jeunes qui sont économiquement actifs et souvent parents d'enfants en bas âge. Pour mesurer les fardeaux de mortalité et de morbidité, l'OMS a proposé l'utilisation de l'année de vie ajustée par l'incapacité (DALY) [12], qui est un indice composite tenant compte des années perdues mais aussi de la réduction de la qualité de vie due à un handicap chronique. On estime que les principales maladies infectieuses représentent près de 325 millions de DALY par an [13], équivalent à près de 17 jours perdus annuellement pour chaque personne dans la population mondiale actuelle. Les principaux facteurs évitables contribuant à la mortalité induite par les maladies infectieuses dans les pays à ressources limitées sont le défaut de vaccination, le manque de médicaments essentiels [14], l'insuffisance d'assainissement et de traitement de l'eau et le défaut d'outils de diagnostic in vitro abordables, précis et largement disponibles [15, 16].

1.1.2. Un besoin urgent d'accès aux tests de diagnostic in vitro

Les tests de diagnostic in vitro sont essentiels pour identifier la présence de l'infection, définir l'agent causal, déterminer sa sensibilité au traitement, planifier et surveiller les effets des interventions préventives ou thérapeutiques.

Les taux élevés de mortalité et de morbidité des maladies dans les pays à ressources limitées sont en grande partie dus à un manque de moyens diagnostiques [17].

À ce jour, la grande majorité des ressources financières des organismes de financement ont été axées sur la prévention des maladies et la fourniture de soins. Le

manque de financement alloué aux laboratoires de diagnostic est reconnu par les spécialistes de la santé publique, [18, 19, 20]. Le manque d'accès aux tests diagnostiques induit une fréquence accrue de diagnostics probabilistes inexacts, des traitements inadéquats, une mortalité accrue et finalement une incapacité à déterminer la prévalence exacte de certaines infections. Ainsi, une étude réalisée dans un hôpital rural au Kenya a révélé grâce à la pratique d'hémoculture que les infections bactériennes invasives non diagnostiquées étaient responsables de 26% des décès chez les enfants [21]. Dans une autre étude réalisée au Burkina Faso en 2002-2003, les auteurs ont mis en évidence l'insuffisance du diagnostic des méningites bactériennes à méningocoque, pneumocoque et *Haemophilus Influenza* grâce à l'implémentation de PCR, de test antigénique et de techniques de culture conventionnelles [22, 23]. Ces travaux soulignent le besoin de tests de diagnostic in vitro et démontrent la nécessité pour les médecins d'envisager des diagnostics alternatifs dans leur pratique clinique. La fièvre aiguë est l'un des symptômes les plus fréquents dans les établissements de santé dans les pays à ressources limitées. [24, 25, 26]. Jusqu'à très récemment, le paludisme était considéré comme la cause prédominante de la fièvre dans de nombreuses régions endémiques du monde. Cependant, avec l'utilisation accrue des tests de diagnostic rapide du paludisme (TDR), il est devenu évident qu'une proportion beaucoup plus faible de fièvres sont en fait causées par le paludisme [27] et d'autres étiologies devraient être recherchées. Derrière les syndromes fébriles évocateurs ou compatibles avec le paludisme se cachent des infections très variées [28] dont beaucoup nécessitent une prise en charge thérapeutique spécifique (voir figure 3). Cependant la capacité des laboratoires à diagnostiquer les infections reste faible et il semble que les décideurs négligent souvent l'importance des tests de diagnostic et ne considèrent pas avec sérieux la nécessité d'un développement de tests de laboratoire maison dans les laboratoires centraux et de référence [29].

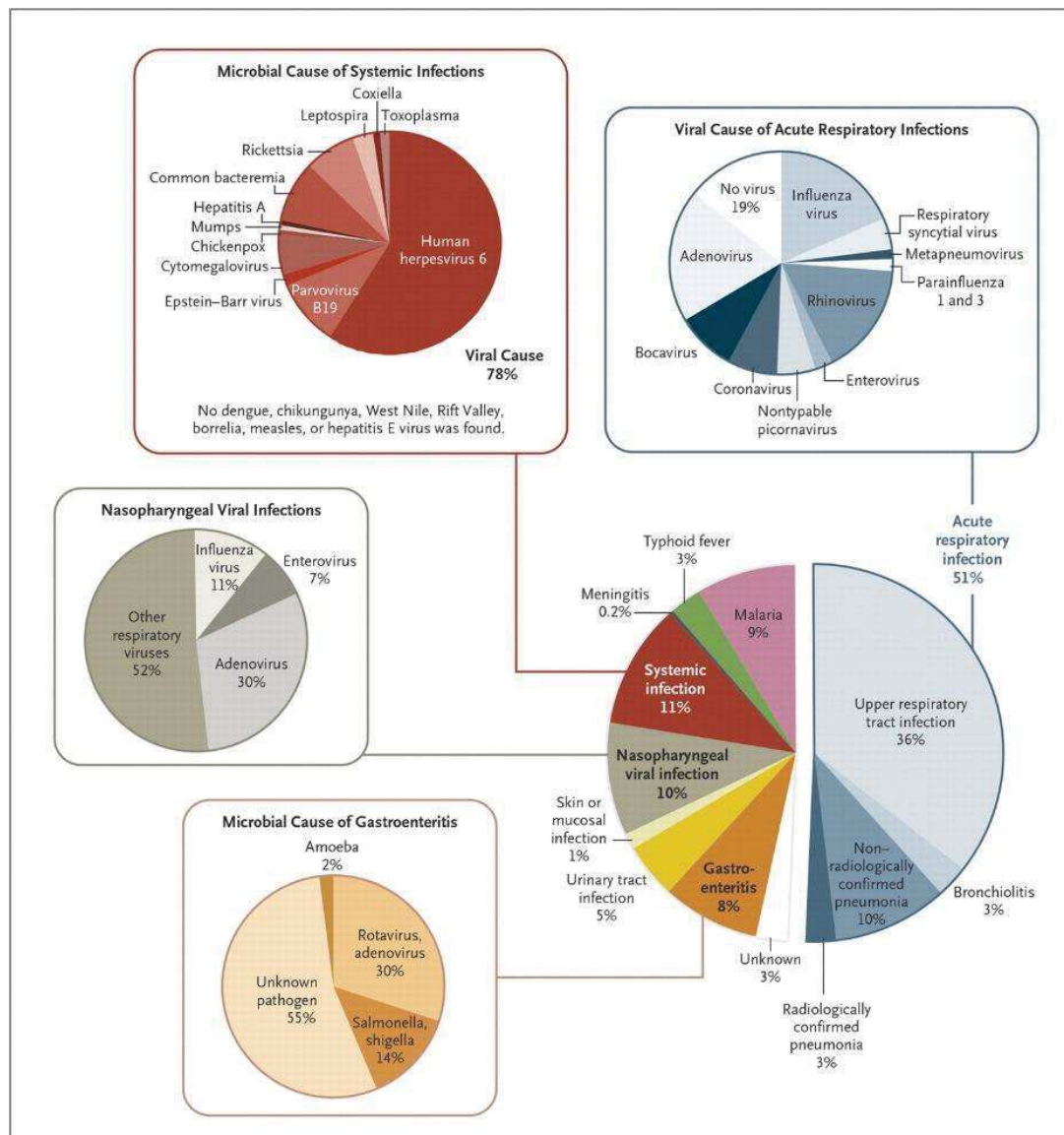


Figure 3 : Répartition des diagnostics étiologiques chez des enfants fébriles en Tanzanie [28]

L'accès à des technologies moléculaires adaptées pour un diagnostic simple et abordable des maladies infectieuses dans les pays à ressources limitées est considéré comme étant l'un des principaux progrès biotechnologiques pour améliorer la santé globale [30, 31]. C'est aussi une condition nécessaire à la génération de données solides afin de guider les politiques de santé publique. La mesure des incidences et prévalences des maladies infectieuses pose en effet un défi majeur pour la santé publique, car les approches hospitalières ne captent qu'une fraction des patients, le diagnostic clinique n'est généralement pas fiable et les tests diagnostiques ne sont pas souvent disponibles [32]. Par conséquent, l'importance relative des agents étiologiques reste très mal connue dans de nombreuses régions du monde. Le

personnel de la santé publique ne dispose pas de données suffisantes pour calculer les besoins en charge de la maladie (incidence, maladie et décès) pour guider les politiques pour une utilisation optimale des ressources de santé limitées [33].

Le défi consiste donc à la mise en place d'infrastructures de laboratoire abordables et durables et au développement de tests de diagnostic simples, précis et stables pour lutter contre les maladies infectieuses. L'accent devrait être mis sur les outils de diagnostic moléculaire qui sont considérés comme la biotechnologie de pointe pour améliorer la santé dans les pays à ressources limitées.

1.1.3. Le diagnostic in vitro pour les populations difficiles d'accès, populations éloignées ou marginalisées

En Afrique, la majorité des cas de maladies infectieuses aiguës n'est pas retrouvée dans les établissements de santé. Ainsi près de la moitié des crises de paludisme chez l'enfant au Kenya ne sont pas traitées dans le secteur public formel [34]. Le taux d'incidence de ces fièvres aiguës non explorées par des tests in vitro est élevé dans les populations africaines, une étude récente au Kenya rapporte 10 épisodes annuels chez les enfants de moins de 5 ans et plus de 3 épisodes chez les adultes [35]. Par ailleurs beaucoup des décès surviennent à domicile sans qu'un diagnostic précis soit établi ce qui nécessite la mise en place de système de surveillance en dehors des structures de soins [36]. La surveillance communautaire des ménages peut compléter la surveillance fondée sur les statistiques des formations sanitaires afin de collecter des données robustes sur le fardeau réel des maladies infectieuses et de mesurer l'impact des interventions de santé publique [35].

Parmi les facteurs qui influent sur l'utilisation des structures de soins et le recours potentiel à des tests in vitro de laboratoire, le coût, la distance, la qualité des soins, et la sévérité du tableau clinique semblent primordiaux [37, 38, 39, 40]. Même lorsqu'une offre de soins gratuits et de bonne qualité existe à l'échelle du pays dans les centres urbains comme pour le paludisme, le VIH ou la tuberculose, l'accès aux formations sanitaires dans les régions rurales demeure faible [35].

1.1.4. Les difficultés : faibles infrastructures, faible disponibilité des personnes compétentes en biologie clinique, problèmes de maintenance et de coût des tests

Le déficit en ressources de laboratoires est considérable en Afrique subsaharienne. L'Organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'il existe moins d'une structure de laboratoire pour 10 000 habitants en Afrique. Depuis moins d'une dizaine d'années, les initiatives nationales et internationales, publiques et privées, existent néanmoins pour élargir l'offre comme la qualité dans le domaine du laboratoire en Afrique [41]. En 2008, la Déclaration de Maputo, Mozambique (Maputo Declaration on Strengthening of Laboratory Systems) appelait à l'appui intégré des laboratoires pour les principales maladies ainsi qu'à la formulation et à la mise en œuvre par les pouvoirs publics de politiques et de plans stratégiques nationaux en matière de laboratoires [42]. Peu après, la résolution AFR/RC58/R2 du comité régional de l'OMS pour l'Afrique, réuni à Yaoundé en 2008, appelait au renforcement des laboratoires de santé publique en Afrique comme centres d'excellence [43]. Pour aider et encourager les laboratoires à entrer dans la démarche qualité selon la norme ISO 15189 [44], le bureau régional pour l'Afrique de l'OMS mettait en place en 2009, pour la région africaine, un système d'évaluation par étapes dénommé Slipta (pour stepwise laboratory improvement process towards accreditation) [45]. Enfin, l'African Society for Laboratory Medicine fut créé en 2010 à Kampala, avec pour principaux objectifs, d'ici 2020, de former 30 000 personnels de laboratoire, d'engager plus de 2 500 structures de laboratoire dans le programme Slipta, d'aboutir à plus de 250 laboratoires effectivement accrédités selon la norme ISO15189, d'harmoniser la production des intrants de laboratoires en Afrique et de créer un réseau Sud-Sud d'au moins trente laboratoires nationaux de référence en Afrique [46].

Les tests moléculaires sont très efficaces pour diagnostiquer les maladies infectieuses qui affectent la santé mondiale. Cependant, leur utilisation dans les pays à faible revenu est limitée en partie en raison des exigences d'instrumentation complexe et des contraintes économiques.

La plupart des tests moléculaires disponibles dans le commerce nécessitent un environnement avec une température maîtrisée, un équipement coûteux (thermocycleur), la maîtrise de la chaîne du froid et du stockage à température contrôlée pour les réactifs et un personnel technique et d'encadrement hautement

qualifié. L'alimentation électrique, lorsqu'elle est disponible, n'est souvent pas fiable [2]. De ce fait la plupart des laboratoires capables de réaliser les tests moléculaires dans les pays à ressources limitées sont situés dans les zones urbaines. Les expéditions d'échantillons dans ces laboratoires centralisés peuvent retarder le retour en temps opportun des résultats des tests et augmenter les pertes de suivi [47, 48, 49]. En revanche, les établissements de santé ruraux peuvent permettre un rendu des résultats plus rapide, mais ne possèdent généralement que des équipements de base [50]. Les travailleurs de la santé dans ces contextes ont une formation limitée et sont incapables de maintenir l'équipement et de gérer efficacement les réactifs.

1.1.5. Approche décentralisée en point of care versus approche combinant le prélèvement décentralisé et l'analyse en laboratoire central.

L'amélioration de l'accès aux moyens diagnostiques nécessite de prendre en compte la faiblesse des infrastructures de soins périphériques. Par exemple, 75% de la population en Afrique ont accès à des structures minimales de soins, alors que seulement 28% ont accès à des établissements de soins de santé avancés (Figure 4). Cela signifie qu'un test nécessitant une infrastructure minimale pourrait éventuellement étendre l'accès à 47% supplémentaires de la population africaine. Dans ce cas on parlera de technologie point of care (POC) pour des tests réalisables sans infrastructure. Pour la biologie moléculaire et beaucoup d'analyses il est plus exact de parler de test « near point of care » car les appareillages les plus simples nécessitent tout de même un minimum d'infrastructure et ne sont pas immédiatement accessibles en dehors des structures de soins [51]. Pour autant des tests spécialisés nécessitant l'accès à des technologies relativement avancées ne doivent pas être considérés comme définitivement hors de portée des populations. Une organisation basée sur la décentralisation du prélèvement combiné à la centralisation de l'analyse grâce à un système de transport performant peut contribuer à apporter une réponse aux insuffisances d'infrastructures et aux limites des technologies décentralisées. Parmi les solutions envisagées le transport par drone est expérimenté avec des résultats prometteurs [52, 53]. La collection, le transport et la conservation de sang capillaire sur DBS plus classique s'imposent progressivement comme une solution

retenue dans les guidelines de l'OMS [54, 55]. L'usage de la téléphonie mobile (sms) est un moyen complémentaire envisagé dans ce contexte pour permettre de renforcer le suivi thérapeutique comme cela a été démontré pour le VIH [56]. Les tests diagnostiques POC/near POC, les tests utilisant des approches décentralisées peuvent avoir des performances cliniques très satisfaisantes malgré des caractéristiques de performance (spécificité et sensibilité) légèrement inférieures aux tests de laboratoire sur sérum/plasma comme dans le cas pour les tests rapides VIH VHB ou VHC et des tests sur DBS [57].

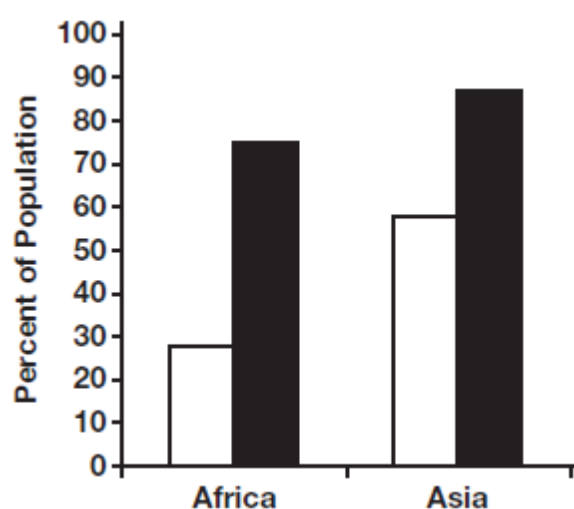


Figure 4: Pourcentage de populations africaines et asiatiques qui ont accès à des infrastructures de soins de santé avancées (barres blanches) contre infrastructures minimales (barres noires) [31].

1.2. Les techniques de biologie moléculaire aujourd'hui

Les techniques de biologie moléculaire occupent une place importante dans le diagnostic direct des pathogènes [58]. Globalement la tendance pour le diagnostic direct depuis les vingt dernières années est que les approches basées sur la détection des acides nucléiques supplantent progressivement la détection d'antigène et l'analyse microscopique moins sensibles et la culture plus longue. Les méthodes de biologie moléculaire permettent de mettre en évidence et parfois de quantifier les acides nucléiques (AN) des microorganismes. Parmi les techniques diagnostiques,

l'amplification génique et singulièrement la technique dite PCR (polymerase chain reaction) est la plus largement utilisée. La PCR découverte par Kary Mullis en 1983 [59, 60] et qui lui a valu le prix Nobel de chimie en 1993, est aujourd'hui devenu un outil quasiment universel dans le domaine de la biologie, bouleversant profondément les capacités diagnostiques des tests in vitro. Le principe et la spécificité de la détection reposent fondamentalement sur la capacité d'une séquence monocaténaire d'ADN ou d'ARN à se lier spécifiquement avec la séquence complémentaire des amorces et éventuellement de la sonde ou d'un support solide d'hybridation. La détection repose toujours sur le principe d'une amplification de la cible grâce à élongation par une polymérase et/ou du signal. La réaction de PCR, prototype des techniques d'amplification génique, a révolutionné les capacités de détection grâce à l'apport de polymérases thermostables permettant un cycle continu alternant dénaturation, hybridation et élongation sans intervention extérieure. Dans la PCR dite "conventionnelle", l'amplification et la détection des amplicons se font de manière successive au contraire de la PCR en temps réel. Par ailleurs l'analyse des amplicons par migration sur gel est associée à un risque de contamination car elle nécessite la manipulation manuelle de produits d'amplification. L'analyse des produits amplifiés par électrophorèse sur gel d'agarose, par chromatographie ou par hybridation sur support solide est réalisée en point final, c'est à dire à la fin de la réaction de PCR ce qui ne permet qu'une détection qualitative ou semi-quantitative. Les techniques de PCR en temps réel (qPCR) apparues à la fin des années 90 ont permis le développement rapide de la biologie moléculaire dans le diagnostic de routine [61] en évitant l'étape de migration sur gel. Dans la qPCR, l'amplification est évaluée grâce à l'émission d'un signal fluorescent dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'amplicons générés au fur et à mesure des cycles de PCR. Dans la qPCR, l'amplification et la détection des amplicons se font simultanément en système fermé. L'analyse des produits amplifiés se fait en temps réel. Le diagnostic par qPCR est au final plus rapide et plus sûr que celui par PCR conventionnelle (réduction de la durée des cycles et de la taille des amplicons, absence de procédures techniques post-PCR et possibilité d'avoir une lecture en continue de l'amplification grâce aux marqueurs fluorescents), mais l'avantage déterminant repose sur la détection en "système fermé", c'est à dire sans ouverture des tubes réactionnels, ce qui limite considérablement les risques de contamination à partir des produits d'amplification générés au cours de la réaction enzymatique. La sensibilité des techniques de qPCR est bonne, généralement

supérieure à celle des PCR conventionnelles. Les tests moléculaires quantitatifs sont fondés sur deux grands principes à savoir d'une part les tests de type NASBA (Nucleic Acid Sequence Based Amplification) qui est basé sur l'amplification du signal et d'autre part les tests de type PCR (Polymerase Chain Reaction) basé sur l'amplification de l'acide nucléique. Il existe deux méthodologies principales pour la détection des amplicons : l'utilisation d'agents et se liant à l'ADN double brin (SYBR Green, Bromure d'éthidium) et les sondes fluorescentes spécifiques de la cible amplifiée. Les technologies utilisant des sondes sont: Taqman ou hydrolyse de sondes ; HybProbes Fluorescence Resonance Energy Transfert (FRET) ou hybridation de 2 sondes ; Molecular Beacons ou balises moléculaires [59].

a. Le système de détection SYBR Green repose sur l'inclusion d'un agent intercalant qui se lie préférentiellement à l'ADN double brin nouvellement synthétisé. À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle PCR, le SYBR Green s'intercale entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin et peut émettre un signal de fluorescence lorsqu'excité par des rayonnements ultraviolets. La mesure de l'intensité du signal émis à la fin de chaque étape d'élongation permet le suivi cycle par cycle de la réaction PCR [59].

b. Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman sont constituées par un fragment d'oligonucléotides marqué par deux groupements fluorophores en ses extrémités 5' et 3'. L'extrémité 5' porte le fluorophore donneur qui est un dérivé de la fluorescéine (FAM, TET, JOE, HEX ou VIC). À l'extrémité 3', se trouve le fluorophore quencher qui est habituellement un dérivé de la rhodamine (TAMRA). Du fait de la proximité des deux groupements fluorophores, liée à la petite taille de la sonde (25 à 30 nucléotides entre les deux fluorophores), l'énergie absorbée par le fluorophore donneur excité est transférée par FRET (fluorescence resonance energy transfer) au fluorophore accepteur. Le spectre d'excitation du TAMRA ne chevauchant pas le spectre d'émission du fluorophore donneur, le quencher absorbe l'énergie qui lui est transmise mais n'émet aucune fluorescence. La particularité du système TaqMan est d'exploiter l'activité 5'-3' nucléase de l'ADN polymérase qui permet d'hydrolyser la sonde hybridée à sa cible spécifique lors de l'étape d'élongation des amorces. Le clivage de la sonde au cours de cette étape a pour conséquence d'éloigner les deux fluorophores, de libérer le fluorophore donneur de l'effet quenching exercé par le TAMRA et ainsi de rétablir son émission de fluorescence (figure 5). L'intensité de la fluorescence émise

par le fluorophore donneur, couramment dénommé fluorophore reporter dans une sonde TaqMan, est mesurée en fin de chaque cycle d'amplification [59].

c. Les sondes FRET en tandem (sondes LightCycler) repose sur l'utilisation d'un couple de sondes d'hybridation très courtes portant chacune un fluorophore. La particularité de ce système réside dans le fait que le processus de transfert d'énergie par FRET s'effectue entre deux fluorophores séparés par moins de cinq nucléotides, le fluorophore donneur ayant un spectre d'émission se chevauchant avec le spectre d'excitation du fluorophore accepteur. Le transfert d'énergie est alors direct et hautement efficace ; une fois les deux sondes appariées à leur séquence cible tout en restant adjacentes l'une envers l'autre, l'énergie libérée par le fluorophore donneur de haute énergie est directement captée par le fluorophore accepteur de moindre énergie qui ainsi excité émet à son tour un signal fluorescent mesurable (figure 6) [59].

d. La sonde Beacon est une sonde d'hybridation en épingle à cheveux qui porte à son extrémité 5' un groupement fluorophore reporter et à celle 3' un groupement fluorophore non fluorescent quencher. Elle possède une structure particulière de type tige boucle dans laquelle les bras de la tige résultent de l'appariement de ses extrémités complémentaires ; la boucle est spécifique et complémentaire de la séquence cible à détecter. Dans ce type de sonde, la proximité des deux groupements fluorophores est imposée par la structure secondaire en épingle à cheveux de la sonde, ainsi dénommée sonde phare. En présence de la séquence cible complémentaire, la sonde s'apparie de façon spontanée à cette cible et subit un changement de conformation au cours duquel le quencher s'éloigne du reporter alors capable d'émettre une fluorescence mesurable (figure 7) [59].

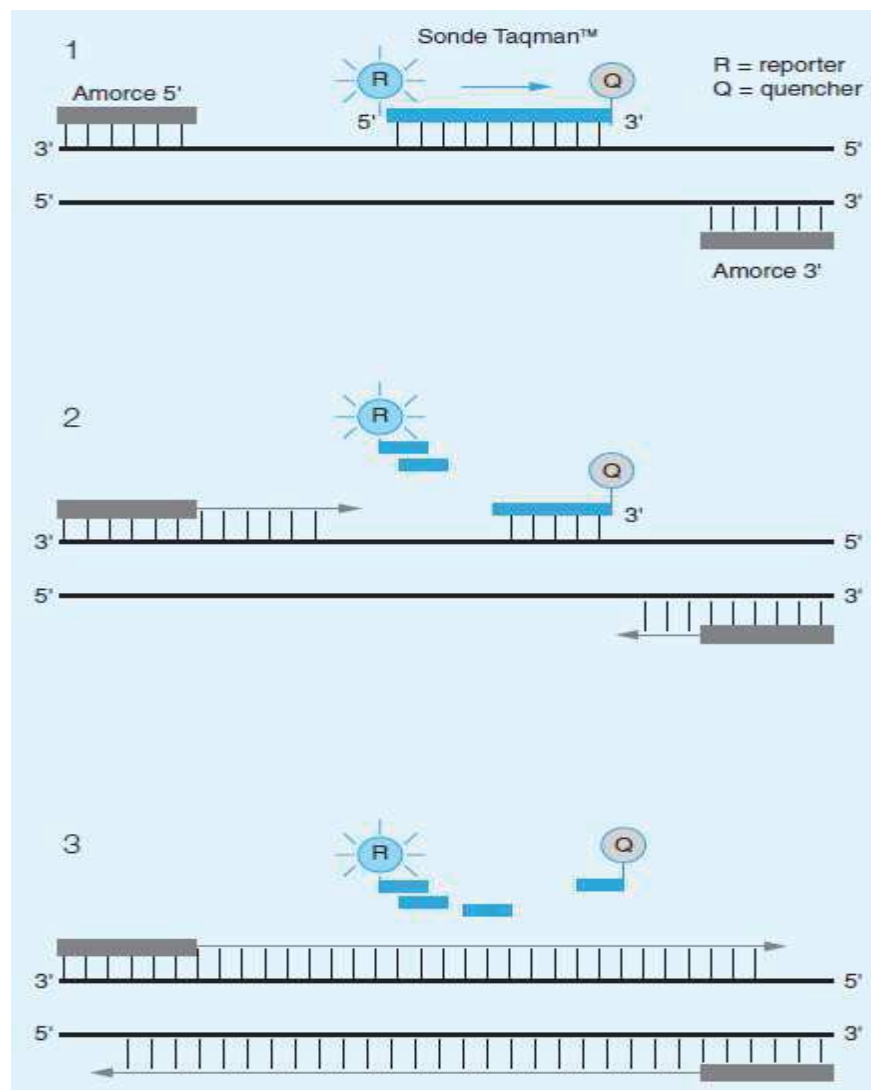


Figure 5 : Principe de l'essai 5'-nucléase avec sonde Taqman [59].

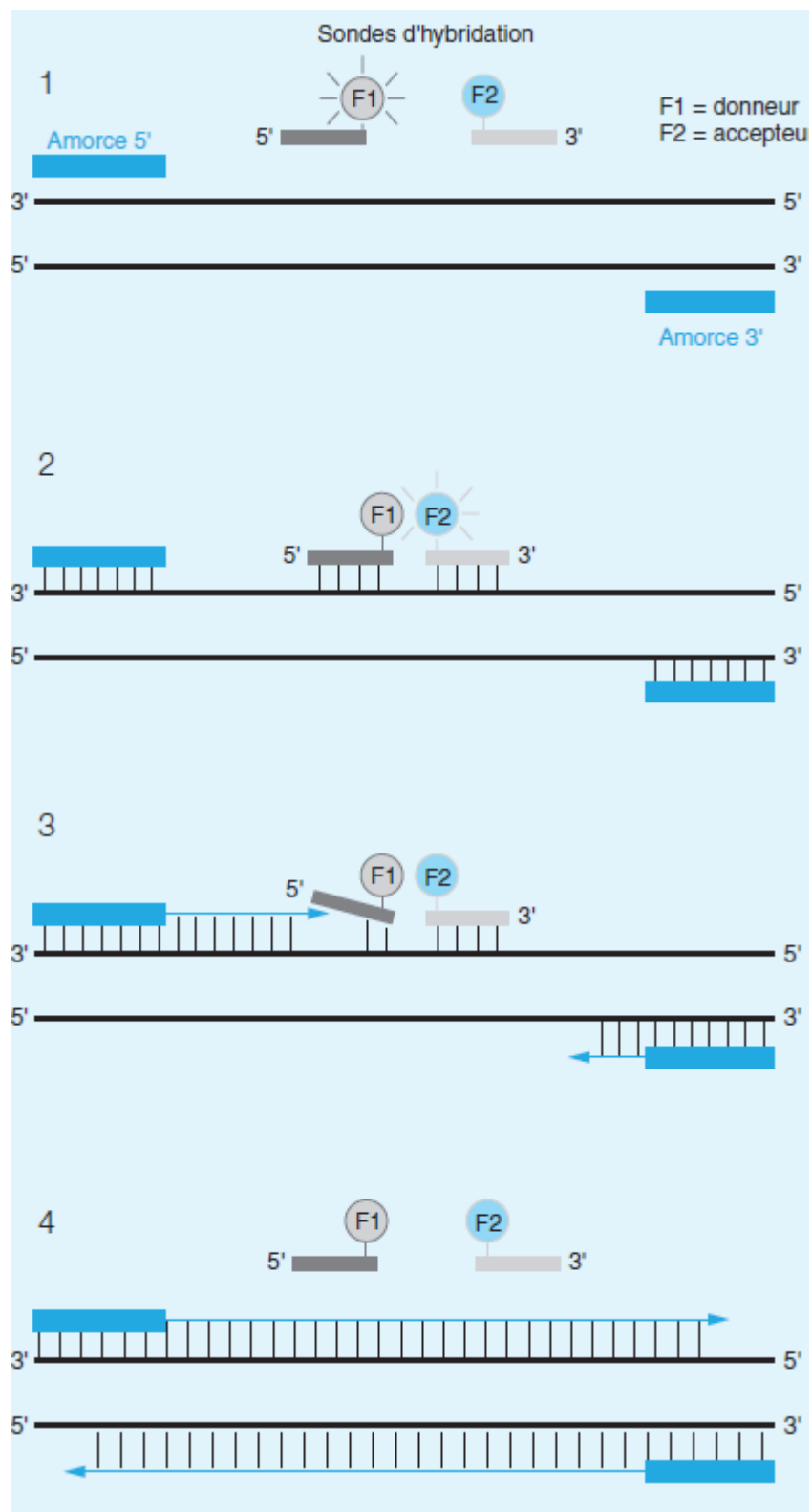


Figure 6 : Principe de la chimie des sondes FRET en tandem [59].

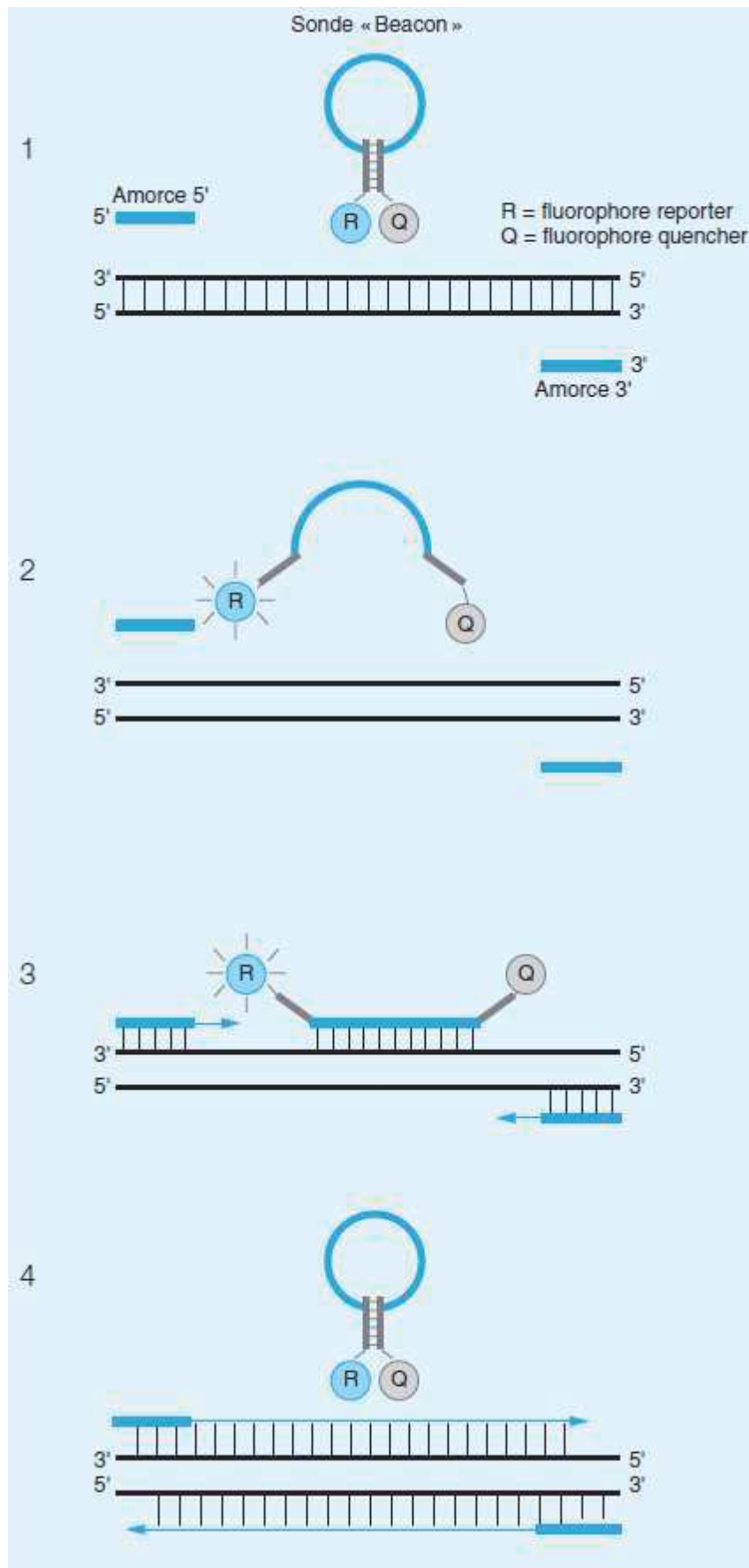


Figure 7. La chimie des sondes Beacon [59].

Le marché actuel des tests de biologie moléculaire est caractérisé par la coexistence de plateformes de biologie moléculaire « fermées » et « ouvertes ».

1.2.1. Les systèmes fermés

Des sociétés comme Roche, Abbott, Hologic, Cepheid, Alere proposent des systèmes intégrés nécessitant d'utiliser des réactifs spécifiques sur équipements spécifiques (systèmes dits « fermés »). Ce modèle contribue au prix élevé du test moléculaire car l'utilisateur est dépendant du réactif fourni par le fournisseur, sans pouvoir en changer sans avoir à renouveler la plateforme extraction-amplification. Ces systèmes fermés intègrent tous les équipements dans une seule machine. Les principales plates-formes commerciales existantes sont restrictives et nécessitent l'utilisation exclusive des trousse commerciale correspondantes. Autrement dit en l'absence de trousse disponible pour un pathogène donné l'analyse n'est pas possible. Le nombre de pathogènes analysables est donc restreint à ceux qui représentent un marché significatif : VIH, VHB, VHC, *Chlamydia trachomatis* et *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Mycobacterium tuberculosis*. Ces tests répondent presque toujours à des normes de certification (Certification Européenne (CE), FDA). Les prix unitaires de ces tests disponibles dans le commerce sont élevés pour les pays à ressources limitées en raison de l'absence de marché négocié, des coûts de transport, douane et distribution, du coût de la maintenance des appareils. Ainsi il est estimé par l'OMS que le coût de la détection des ARN VHC ou ADN VHB est de 50 à 150 dollars par test dans les pays à ressources limitées, ce qui représente un coût généralement supérieure à celui constaté en France qui est de B180 soit 48.6 euros pour la détection de l'ARN VHC et B 150 pour la détection de l'ADN VHB soit 40.5 euros.

1.2.2. Les systèmes ouverts de PCR (plateformes extraction + amplification en qPCR) exemple du projet OPP-ERA

Pour effectuer le test de charge virale, trois composants sont nécessaires : un système d'extraction (extracteur et réactifs), un thermocycleur PCR en temps réel et des kits d'amplification et quantification. En parallèle des automates fermés et de leurs réactifs dédiés, de nombreux automates d'extractions, des thermocycleurs en temps réels et

des trousse PCR sont disponibles sur le marché pour la réalisation d'analyse de biologie moléculaire à visée clinique. Ces appareillages bénéficient de progrès constants et la concurrence internationale permet de réduire les coûts d'achat. Ces plateformes de PCR ouvertes sont par définition polyvalentes puisque pouvant accueillir de nombreuses trousse commerciales et des tests maisons. On parlera donc de plateformes polyvalentes ouvertes (OPP : Open Polyvalent Platforms). Il n'y pas de limite théorique à leur utilisation vis-à-vis de la détection des pathogènes impliqués en santé humaine. En outre ces appareillages offrent la possibilité à l'utilisateur de développer ses propres applications diagnostiques et donc de répondre à des priorités spécifiques du lieu où il exerce. Même si l'offre industrielle marquée CE s'étoffe de jour en jour, dans le domaine de la microbiologie, il est évident que certains micro-organismes ou des agents pathogènes émergents ne feront pas l'objet de tels développements qui entraînent un surcoût important. Néanmoins il est possible dans ce cas de répondre aux exigences de la norme internationale de qualité des laboratoires (ISO15189) en suivant les règles adaptées de l'accréditation des tests RUO. En utilisant des appareils d'extraction/amplification dits « ouverts », il est donc possible de choisir son test, de faire baisser les prix en faisant jouer la concurrence, de gagner en polyvalence afin de tester d'autres pathogènes que ceux prévus pour les appareils fermés. Cette approche nécessite de s'appuyer sur les compétences de biologistes qui maîtrisent les principes de la biologie moléculaire. Mais c'est une contrainte qu'il est possible de surmonter parce que des personnes formées existent ou peuvent être formées dans les pays à faibles ressources ou parfois l'expertise locale est sous-utilisée.

Le projet OPP-ERA vise à élargir l'accès à des tests de charge virale performants à un coût abordable en Afrique (<http://opp-era.org/>). Le projet est basé sur un consortium composé d'Expertise France, de Sidaction, de Solthis et de l'ANRS et est financé par UNITAID. La mesure de la charge virale est le seul moyen de vérifier le succès du traitement contre le VIH et chez le nourrisson, d'apporter un diagnostic précoce de l'infection. Les difficultés d'accès à la charge virale pourraient compromettre les efforts mondiaux pour diagnostiquer et traiter les personnes vivant avec le VIH. Le projet OPP-ERA favorise l'accès à des plateformes ouvertes et polyvalentes (OPP) un système ouvert innovant de techniques de biologie moléculaire pour les laboratoires qui permet de mesurer la charge virale du VIH, ainsi que de diagnostiquer d'autres

pathologies infectieuses comme la tuberculose et les hépatites virales. Le projet OPP-ERA vise aussi à ouvrir le marché des technologies de charge virale et à y faire entrer de nouveaux acteurs – fabricants et fournisseurs. De 2013 à 2016, OPP-ERA a mis en œuvre sa première phase en soutenant 7 laboratoires dans quatre pays (Burundi, Cameroun, Côte d'Ivoire, Guinée). D'août 2014 à novembre 2016, 76 000 tests de charge virale ont été fournis grâce au projet OPP-ERA dans les 4 pays du projet. Depuis septembre 2016, la deuxième phase du projet d'une durée de trois ans a démarré afin de développer à plus large échelle l'accès à ces tests et développer la polyvalence des plateformes pour les autres pathogènes ciblés [62].

1.2.3. Les techniques sur DBS, avantages et limites

L'utilisation des papiers filtre pour la collection et l'analyse du sang humain date du début des années 1960 avec le Dr Robert Guthrie qui a utilisé des échantillons de sang séchés pour mesurer la phénylalanine chez les nouveaux nés dans le but de détecter la phénylcétonurie [63, 64]. Après la mise en évidence des désordres métaboliques, l'utilisation des DBS a émergé pour d'autres applications cliniques. En principe, tout analyte pouvant être mesuré à partir du sang total ou du plasma peut être aussi mesuré par les DBS. La seule mise en garde est que les analytes à mesurer à partir des DBS doivent être stables au séchage et doivent être sélectivement libérés après élution. Aussi des études de stabilité des analytes en fonction des conditions de conservation est un prérequis pour une large utilisation dans les études épidémiologiques parce que la stabilité varie en fonction des analytes [65].

La matrice des DBS stabilise de nombreux analytes, y compris l'ADN, permettant sa détection, la quantification et l'analyse de séquence à partir d'un petit volume de sang. Les Centers for Disease Control and Prévention (CDC) maintiennent un programme indépendant de contrôle de la qualité des DBS et, selon les rapports CDC, le dispositif de collecte de sang sur papier filtre a atteint le même niveau de précision et de reproductibilité que celui des méthodes standard pour collecter du sang, tels que les tubes à vide et les pipettes capillaires [64]. Les procédures pour la collecte des échantillons de sang sur papier filtre, le traitement et le stockage ont été assez standardisées et sont facilement adaptables. Cependant l'analyse des DBS pose quelques défis, principalement celle de l'élution des globules rouges avec l'analyte

d'intérêt. Les composants cellulaires se rompent lorsque les échantillons de sang total sont séchés sur un filtre, qui se libère ensuite dans la solution de reconstitution. Des procédures d'extraction supplémentaires peuvent être nécessaires pour certains analytes. L'efficacité de l'élution de l'analyte d'intérêt et le volume d'échantillon relatif de l'échantillon recueilli sont deux autres sujets de préoccupation dans l'utilisation des DBS. Une autre limite majeure est le manque de certification des tests commerciaux pour leur utilisation sur DBS. Il existe quelques avancées pour le VIH : le test NucliSENS de bioMérieux est approuvé CE pour les DBS, Cepheid est doté d'une pré-qualification OMS pour la détection ARN/ADN HIV, et Abbott et Biocentric disposent d'une procédure fabricant validée pour l'utilisation des DBS pour l'ARN VIH, mais cela est modeste et insuffisant et aucun test moléculaire n'est approuvé par un organisme certificateur ou par un fabricant pour les hépatites virales [55]. La matrice DBS présente plusieurs avantages. La collecte du sang capillaire au talon ou la piqûre du doigt est relativement indolore et non invasive, contrairement à la ponction veineuse qui peut être difficile chez les nourrissons et les personnes âgées. Il n'y a pas besoin de centrifugation et de séparation des échantillons, rendant le sang séché adapté aux applications sur le terrain avec une participation minimale du personnel de laboratoire formé. La plupart des analytes sont stables à température ambiante après séchage pendant au moins une semaine, ce qui contourne le besoin de maintenir une chaîne de froid pour le transport de l'échantillon. Les taches de sang représentent en outre un faible risque infectieux, car la plupart des virus connus pour être présents dans le sérum ou le plasma perdent leur pouvoir infectieux en raison de la rupture de leur enveloppe lors du séchage [65]. Les DBS sont particulièrement adaptés aux enquêtes basées sur la population dans les pays en développement où la réduction des coûts est importante compte tenu des budgets de santé limités [66]. Une option moins coûteuse pour la collecte et le transport, comme les DBS, a une application énorme dans de telles enquêtes comme nous l'avons montré dans l'étude ANRS 12270 d'évaluation de la prévalence des hépatites B, C et Delta en population générale au Burkina Faso (voir article en annexe de la thèse). En France les DBS sont utilisés de manière systématique pour la surveillance de l'incidence du VIH. Pour le cas particulier du VIH, dans les zones périphériques, les échantillons DBS, qui peuvent être transportés en toute sécurité, restent stables à température ambiante, même au-dessus de 30 ° C. Une fois séchés, les DBS peuvent être stockés avec du dessiccateur et expédiés vers des laboratoires centraux [67, 68].

Les algorithmes standards actuels de diagnostic précoce du VIH chez les nourrissons intègrent le DBS pour la détection de l'ADN par PCR [69] et l'OMS préconise l'utilisation des DBS pour améliorer l'accès à la charge virale [53] même si les limites de la technique sont soulignées. La disponibilité des tests moléculaires sur DBS reste cependant insuffisante se limitant à des laboratoires centralisés en raison du coût et à la complexité de l'équipement et des protocoles de test exigeants [70]. La charge de travail des laboratoires centralisés entraîne souvent d'importants retards dans le rendu des résultats [6, 7]. Même dans le meilleur des cas, il peut prendre 4 semaines pour que les résultats soient retournés sur des sites distants et, dans certaines conditions, ils peuvent prendre 2 mois ou plus [71]. Compte tenu des longs délais, il y a des pertes de vue [72, 73, 74] et l'opportunité de diagnostiquer et de traiter est alors soit manquée soit retardée.

1.2.4. Les techniques décentralisées « near » point of care (GeneXpert, Samba)

Des diagnostics simples et peu coûteux qui peuvent être utilisés au lieu où les soins sont dispensés « point of care » en anglais (POC) représentent une solution à court et à moyen terme. Selon l'OMS le test idéal POC doit répondre aux critères "ASSURED (affordable, sensitive, specific, user-friendly, rapid and robust, equipment-free and deliverable to end users)" : abordable, sensible, spécifique, convivial, rapide et robuste, sans équipement et livrable aux utilisateurs finaux) [75]. La disponibilité rapide des résultats réduit le besoin de visites multiples de patients, permet un traitement rapide et facilite le confinement des épidémies de maladies infectieuses. Les diagnostics POC réduisent également la dépendance à un traitement présomptif. Ces techniques nécessitent en théorie moins d'infrastructure réduisant la complexité des équipements et les besoins énergétiques. Ces méthodes peuvent être utilisées sur place dans les établissements de soins de santé primaire ruraux, avec une préparation ou une conservation minimale de l'échantillon et des réactifs résistant aux températures extrêmes et exécutées avec peu d'expertise technique. Cependant, les défis techniques doivent être associés à différents niveaux de scénarios POC (tableau 1) parce que dans les pays à ressources limitées, il existe des variations considérables en termes de capacités diagnostiques pour les soins aux patients [76].

Tableau 1: Défis techniques pour les tests POC dans différents niveaux de laboratoire dans les pays à ressources limitées [76]

Lab settings	Instrument/device	Operator	Logistics
First tier	Bulky, expensive instruments; appropriate quality control	Sufficient staff training and quality assurance measures	Clean water, stable power supply, dedicated lab space, cold storage, appropriate waste disposal
Second tier	Relative small and affordable instruments; basic quality control	Basic staff training; basic quality assurance measures	Varying conditions for water/power supply, may have limited laboratory space and cold storage facility, basic waste disposal
Third tier	Lightweight, portable instruments; or stand-alone devices, basic or no quality control	Less-trained technicians; basic or no quality assurance	No dedicated space for specific testing; basic or no contamination control; no reliable water and power supply, varying humid and temperature conditions, no appropriate waste disposal
Rural areas	Battery-operated instruments; stand-alone devices, basic or no quality control	Physicians who have less technical training	No laboratory space; no reliable water and power supply, varying humid and temperature conditions, no appropriate waste disposal

Néanmoins les contraintes ne sont pas effacées ; l'acheminement des réactifs, la maintenance des appareils, la gestion des réactifs, la participation à un programme de contrôle qualité demeurent nécessaire pour la bonne conduite des analyses. La décentralisation des analyses rend plus complexe ces impératifs et expose à des dysfonctionnements. Récemment, les outils diagnostiques moléculaires émergents ont l'ambition de mieux répondre aux exigences de vitesse, de faible coût et de facilité d'utilisation pour les applications near-POC. L'utilisation potentielle à la fois dans les pays développés et les pays à ressources limitées a alimenté un effort intense pour développer les technologies existantes et générer de nouvelles technologies pour le diagnostic d'un large éventail de maladies infectieuses.

L'amplification isotherme à médiation en boucle (LAMP) est l'une des méthodes les plus publiées [77, 78]. Les étapes complexes de préparation d'échantillon requises pour la PCR peuvent être simplifiées ou éliminées avec la technique LAMP [79]. Des essais LAMP ont été développés notamment pour la tuberculose, le paludisme et le VIH [79, 80, 81, 82].

Le test GeneXpert est un procédé entièrement automatisé d'amplification d'acide nucléique développé par la société Cepheid et approuvé par la FDA et CE, utilisé dans les pays à revenus élevés et les pays à ressources limitées notamment pour le

diagnostic de la tuberculose et de la tuberculose résistant aux médicaments. Cependant, son déploiement est entravé par le coût relativement élevé de la machine aux environs de 20 000 dollars auxquels il faut ajouter des frais d'installation complémentaires estimés dans une étude au Nigéria entre 2500 et 7000 dollars par site [83] et la nécessité d'une maintenance pour un montant entre 3000 et 5000 dollars annuels. A cela il faut ajouter les contraintes liées à l'importation des cartouches de diagnostic mais aussi leur traitement après utilisation et la nécessité d'un réseau électrique constant et stable [84, 85, 86].

Le système SAMBA II est un système automatisé de mesure semi quantitative de l'ARN VIH utilisable sur plasma et sang total développé par la société Diagnostics for the Real World en partenariat avec l'Université de Cambridge et le Wellcome Trust. La chimie (y compris les amorces) est identique à celle du SAMBA I, mais les cartouches sont traitées automatiquement et la lecture du signal est automatique. Les séquences d'amplification SAMBA ont une longueur de 22 bases et visent la région LTR très conservée du génome du VIH [87]. Étant donné que les réactifs sont stables pendant 1 mois à 55 ° C et pendant 9 mois à 2 ° à 37 ° C, le transport et le stockage réfrigéré des réactifs ne sont pas nécessaires. Le principal avantage de la plate-forme SAMBA par rapport au DBS est que les échantillons peuvent être testés dans les 2h, avec un rendu du résultat dans la journée pour les patients qui peuvent attendre sur place leurs résultats et recevoir un traitement approprié ou des conseils au cours de la même visite [51].

L'élaboration de tests POC pour les pays à ressources limitées pourrait sembler être une tâche simple basée sur l'utilisation de matériaux peu coûteux et de technologies basiques. Mais le développement de test POC nécessite non seulement une expertise multidisciplinaire de la science des matériaux, du matériel et de l'ingénierie logicielle, de l'immunologie, de la biologie moléculaire et de la médecine, mais aussi de l'appréciation de la réglementation, de la culture et de la politique dans les pays à ressources limitées ce qui engendre un coût de développement élevé et donc des contraintes de rentabilité importantes. La nécessité d'élaborer des tests diagnostiques cliniques haut de gamme avec un budget limité et une rentabilité faible, avec des exigences opérationnelles strictes est particulièrement difficile et freine le développement des tests POC.

2. Données sur la situation au Burkina Faso

2.1. Le Burkina Faso

Le Burkina Faso est un pays sahélien enclavé, sans littoral ; il couvre une superficie de 272 967 km² (IGB 2002), et partage ses frontières avec six (6) pays de la sous-région Ouest africaine: le Mali, le Niger, le Bénin, le Togo, le Ghana et la Côte-d'Ivoire. Selon le Recensement général de la population et de l'habitation (RGPH 2006), le Burkina Faso comptait 14 017 262 habitants en 2006 dont 51,7% de femmes. La population est à majorité jeune (46,6% des habitants ont moins de 15 ans) et croît à un taux de 3,1% par an. Les projections démographiques faites par l'INSD en 2007 sur la période 2007-2020 montrent que la population burkinabè serait de 19 034 397 habitants en 2016 dont 52,1% sont âgés de 15 ans et plus (soit 9 916 921). Cette population réside essentiellement en milieu rural, (77,3% contre 22,7%, en milieu urbain).

L'économie du Burkina Faso repose essentiellement sur le secteur primaire (l'agriculture et l'élevage) qui occupe plus de 80% de la population active mais avec une contribution au Produit intérieur brut (PIB) de seulement 30%. De plus le pays est situé en zone de climat sahélien-soudanien et soumis aux aléas climatiques, plongeant de nombreuses populations dans une situation d'insécurité alimentaire récurrente et de pauvreté. Le revenu par habitant est équivalent à 300 \$US par an, plaçant le Burkina Faso parmi les pays à ressources limitées les plus pauvres. Selon le rapport 2015 du PNUD sur le développement humain, le pays occupe le 183ème rang sur 188 pays avec un IDH de 0,402 en 2014 contre 0,388 en 2013. Le pays entretient depuis près d'une décennie une croissance économique moyenne de l'ordre de 5% par an au prix d'importantes réformes politiques et socio-économiques. On note cependant que depuis 2013, le taux de croissance économique est en baisse. En 2014, on a enregistré une croissance de 4% contre 6,8% en 2013 et 9,8% en 2012. Les résultats de l'enquête multisectorielle continue (EMC) de 2014 montrent que, 40,1% de la population vit en dessous du seuil de la pauvreté contre 46,7% en 2009 (soit une baisse d'environ 7 points de pourcentage).

En matière de santé, la couverture nationale en prestation de services de soins a connu une amélioration ces dernières années, mais des disparités régionales

importantes subsistent. En 2015, le Burkina Faso totalisait 129 dispensaires isolés, 13 maternités isolées, 1 694 CSPS, 39 CM, 47 CMA, 9 CHR, 1 CHN, 4 CHU et 450 formations sanitaires privées tous types confondus. Malgré les efforts de couverture nationale en prestation de services de soins, certains indicateurs démographiques et sanitaires, demeurent encore à un seuil non satisfaisant. Le recours aux formations sanitaires et l'utilisation des moyens préventifs et curatifs, sont encore faibles (0,87 contact par habitant/an en 2014 (Annuaire statistique 2015 du Ministère de la santé). Les principales maladies rencontrées sont le paludisme, les infections respiratoires aiguës, la malnutrition, les maladies diarrhéiques, l'infection à VIH et les IST, la Tuberculose, la lèpre et les maladies tropicales négligées [88].

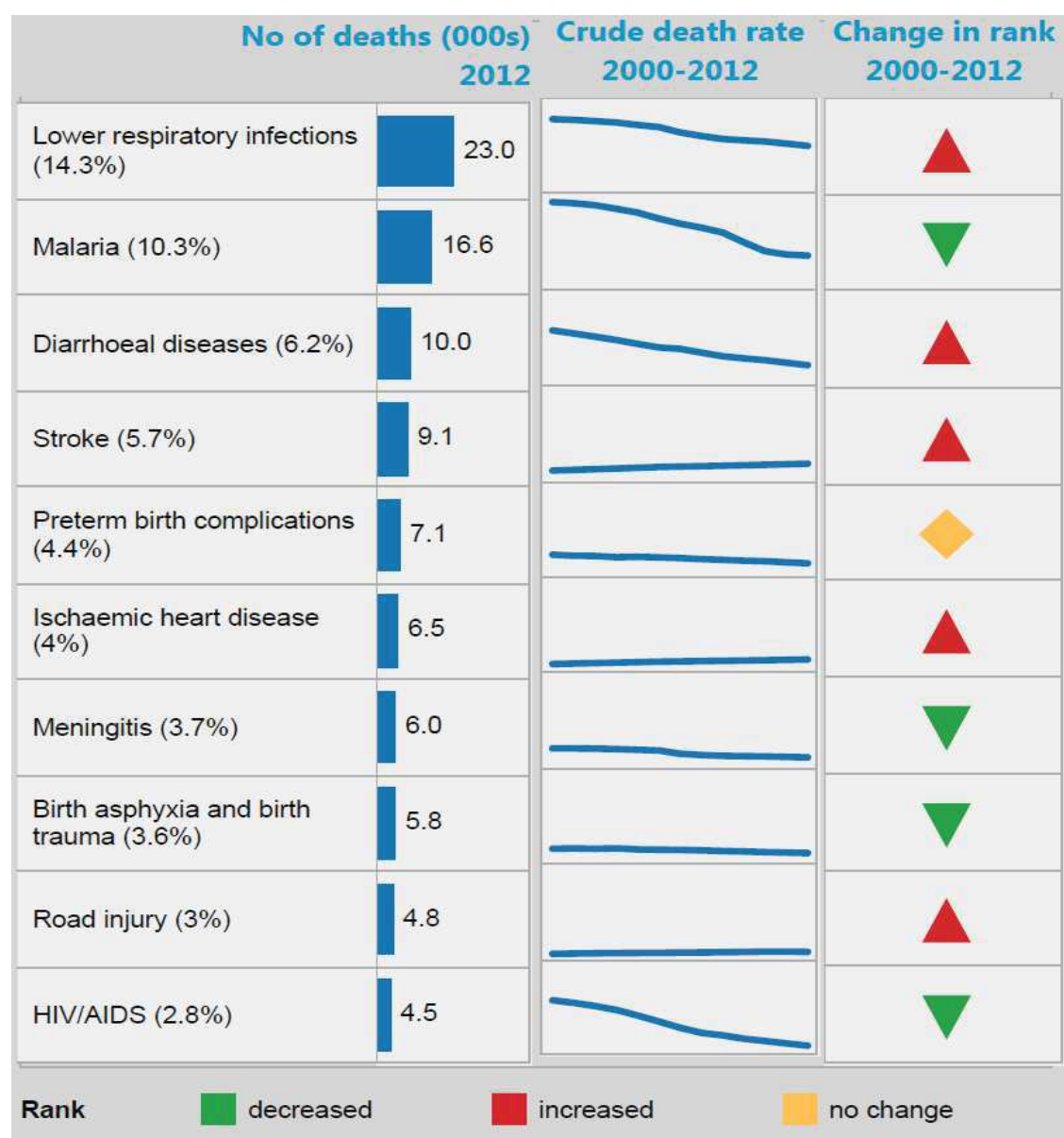


Figure 8: les dix principales causes de décès au Burkina Faso [89]

2.2. Le Centre MURAZ

Le Centre MURAZ est une structure de recherche du ministère de la Santé situé dans la ville de Bobo Dioulasso, la deuxième grande ville du Burkina. Le Centre MURAZ constitue un centre de référence dans la région des Haut Bassins, à environ 360 km de Ouagadougou la capitale. Ses missions sont en autres la recherche, la formation, la surveillance et l'expertise.

2.2.1. Implication dans le diagnostic et suivi thérapeutique

Le Centre MURAZ offre depuis plusieurs années son expertise à la population de la région des Hauts-Bassins et du Burkina Faso en général à travers son laboratoire d'analyses biomédicales pour des soins de qualité. Il dispose de laboratoires d'hématologie, biochimie, immunologie, parasitologie, bactériologie, Mycobactériologie et de virologie. Ces laboratoires font des analyses de routine au profit de la population (en moyenne 50 patients par jour) en plus de leurs activités de recherche.

2.2.2. Rôle dans la surveillance épidémiologique

Le Centre MURAZ participe à la surveillance épidémiologique de certaines pathologies : le paludisme, la méningite, la fièvre jaune, Ebola et autres fièvres hémorragiques, la tuberculose et le VIH. Le laboratoire de bactériologie est l'un des laboratoires de référence de niveau national pour les méningites dans la région des hauts bassins. Par ailleurs, le Centre MURAZ abrite le laboratoire national de référence des fièvres hémorragiques virales et le laboratoire de référence OMS pour la fièvre jaune au Burkina. Aussi, son laboratoire de parasitologie s'occupe du diagnostic du paludisme et des autres parasitoses. Des chercheurs de ce laboratoire ont expérimenté le vaccin « RTS, S » prometteur contre le paludisme dans une commune rurale du nom de Nanoro à environ 100 km de Ouagadougou. Quant à son laboratoire de Mycobactériologie, il fait de la bacilloscopie et a une expertise avérée dans la culture de Mycobactéries et des tests de sensibilité aux antituberculeux de première ligne.

2.2.3. La plateforme de biologie moléculaire de Centre MURAZ et le diagnostic pédiatrique du VIH

Le Centre MURAZ dispose d'un personnel compétent et qualifié dans le domaine de la biologie moléculaire et est l'un des pionniers à rendre accessible la mesure de charge virale VIH-1 plasmatique et les tests de génotypage à Bobo-Dioulasso et au Burkina Faso. Sur le plan des infrastructures, son laboratoire possède de l'espace dédié avec de pièces appropriées pour les différentes étapes de la biologie moléculaire répondant aux normes et standards internationaux.

La plateforme de biologie moléculaire est commune à tous les laboratoires qui font des analyses de biologie moléculaire à savoir la virologie, la bactériologie, la mycobactériologie et la parasitologie. Il y a une salle d'extraction avec PSM II, un extracteur automatique, une centrifugeuse et des micro centrifugeuses, un congélateur et un réfrigérateur et tout le matériel nécessaire pour l'extraction d'acides nucléiques ; une salle de mix avec deux stations de PCR, un congélateur -20 degrés et tout le matériel nécessaire pour la préparation d'un mix réactionnel ; une salle d'amplification pour la PCR en temps réel avec deux thermocycleurs de PCR en temps réel et leurs systèmes informatiques, deux thermocycleurs simples pour la PCR conventionnelle, un PSM II, un réfrigérateur ; une salle de migration sur gel avec deux cuves de migration, un lecteur et une salle pour le séquençage avec un séquenceur à 4 capillaires couplé à son système informatique.

Pour le cas spécifique du laboratoire de virologie et du laboratoire national des fièvres hémorragiques virales dont le personnel est mutualisé, il y a 5 technologistes biomédicales, 4 biologistes chercheurs et un médecin vétérinaire.

Le rapport ONUSIDA sur l'épidémie mondiale du Sida 2015 indique que la prévalence de l'infection à VIH dans la population adulte du Burkina Faso est estimée à 0,90% en fin 2014, dans un intervalle de [0.8-1.1], contre 9,2% en fin 2013. Toutes les femmes enceintes bénéficient d'un test de dépistage du VIH POC lors de leur première visite de soins prénatals et sont inscrites au programme de prévention de la transmission mère enfant (PTME) si elles sont séropositives. Les nourrissons exposés au VIH bénéficient de la prévention et du diagnostic précoce du VIH à la naissance. Le diagnostic précoce est financé par la direction de la santé et de la famille (DSF). La

technique des DBS est utilisée pour collecter des échantillons pour PCR ADN chez les enfants. Depuis 2009, le laboratoire de virologie est sollicité par la Direction de la Santé de la Famille (DSF) à travers un contrat de prestation soutenu par le Fonds Mondial pour aider à faire le diagnostic pédiatrique précoce VIH par PCR dans toutes les régions de l'Ouest (Boucle du Mouhoun, Cascade, Hauts Bassin et Sud-Ouest) avec en moyenne 600 tests par an. Les cartes DBS sont séchées pendant au moins 3 h et emballées avec des sachets déshydratants avant d'être transférées au laboratoire. Une fois que la collecte DBS a eu lieu, les nourrissons exposés au VIH sont suivis par des visites mensuelles programmées pour le suivi mère-enfant. Les résultats des tests de PCR ADN sont communiqués par le même système de transport des DBS. Le laboratoire reçoit régulièrement des demandes de mesure de charge virale de l'ARN VIH-1 plasmatique de patients suivis dans les cliniques, les centres d'association et les files actives de CMA de district de la ville de Bobo-Dioulasso et d'ailleurs.

3. Des pistes de recherche pour améliorer l'accès au diagnostic moléculaire dans les pays à ressources limitées

- 3.1. Améliorer l'accès et l'implémentation : Le DBS dans le VIH, une technique prometteuse pour centraliser les examens dans les laboratoires de références mais dont les possibilités et limites demeurent à bien établir, par exemple vis à vis de la LOD, la spécificité (ADN) etc....Nécessité de l'implication des fabricants pour disposer de note techniques et d'approbation (CE, FDA) sur ce support

L'analyse sur DBS pour le diagnostic et suivi du VIH est l'un des usages les mieux établi pour ce support. Les publications sur le dépistage et suivi du VIH sur DBS ont fait l'objet de nombreuses publications y compris dans l'unité INSERM U1058 et le Centre MURAZ [90, 91, 92, 93, 94].

Selon l'organisation mondiale de la santé en 2011, 34 millions de personnes vivent avec le VIH à travers le monde [95]. Au cours de l'année 2012, plus de 8 millions de personnes infectées devraient être placées sous traitement antirétroviral et auront besoin de suivi biologique [96]. L'augmentation de l'accès au traitement antirétroviral

va de pair avec le besoin de suivi biologique. Des efforts visant à rendre plus accessible et moins coûteux le diagnostic et le suivi des patients sont devenus une priorité. Bien que l'énumération des CD4 soit traditionnellement utilisée pour le suivi des patients sous traitement dans les pays à ressources limitées, la mesure de la charge virale est plus performante pour suivre l'efficacité du traitement [97]. Les pays à ressources limitées peinent à suivre malgré les recommandations de l'OMS qui demande aux pays de rendre accessible la mesure de la charge virale. Les plateformes de mesures de charge virale sont coûteuses et nécessitent une main d'œuvre qualifiée [98].

Parallèlement, le diagnostic précoce du VIH chez les enfants reste un challenge. En dépit des investissements significatifs, des données portant sur 108 pays montrent que seulement 35% des enfants exposés au VIH ont accès à un diagnostic moléculaire entre le premier et le deuxième mois de vie. Malgré les progrès réalisés pour le dépistage du VIH au cours de la grossesse et la prophylaxie de la transmission mère-enfant près de 170 000 enfants sont infectés annuellement à la naissance ou au cours de l'allaitement en Afrique subsaharienne [99]. En l'absence de traitement, la moitié des enfants infectés par le VIH meurt avant l'âge de 2 ans [100] et la majorité des décès survient entre l'âge de 2 et 3 mois [101]. L'initiation précoce du traitement antirétroviral réduit la mortalité et la morbidité à long terme [102] d'où l'importance du diagnostic précoce. Les tests de dépistage sérologique du VIH ne peuvent pas être utilisés chez les enfants de moins de 18 mois à cause des réactions croisées avec les anticorps maternels. Le diagnostic moléculaire s'impose alors que la disponibilité au test moléculaire est faible et le coût élevé [98, 103]. L'utilisation des DBS constitue une alternative très prometteuse, peu coûteuse et pratique par rapport au plasma pour le diagnostic et la surveillance du traitement antirétroviral dans les pays à ressources limitées. Ces DBS peuvent être collectés en périphérie et transportés dans les laboratoires au niveau central pour les tests moléculaires. Utilisables sur sang capillaire, stables à température ambiante, sans risque de dissémination, transportables et stockables aisément, les DBS présentent de nombreux avantages par rapport à la collecte traditionnelle d'échantillons et améliorent l'accessibilité à la mesure de la charge virale et au diagnostic précoce du VIH chez les enfants dans les zones reculées et difficiles d'accès où les conditions de réfrigération ne sont pas réunies.

Bien que l'on procède à l'amélioration continue des technologies existantes et développement de nouvelles technologies, certaines plates-formes de test de charge virale ont toujours des limites dans la mesure de la charge virale en utilisant des échantillons de DBS. Les sensibilités de DBS par rapport au plasma dans la mesure de la CV et le diagnostic précoce du VIH chez les enfants sont présentées dans le tableau 2 et la figure 9 [95]. Actuellement, deux essais ont un marquage CE et une préqualification de l'OMS pour l'utilisation de DBS. Il s'agit de BioMérieux (BM) NucliSENS easyQ et Abbott VL. Abbott VL fournit depuis plusieurs années une procédure officielle pour l'utilisation des DBS et de nombreuses études de la littérature ont confirmées la validité de cette méthode, un marquage CE a récemment été obtenu en 2016 par le fabricant [92, 104, 105, 106, 107]. Roche développe une nouvelle technique pour la mesure de la charge virale à partir d'échantillons DBS mais une évaluation récente réalisée au Vietnam montre que la technique n'offre pas les performances attendues malgré le suivi strict des recommandations du fabricant [108]. La nouvelle technique DBS pour la plate-forme Roche attend sa certification [109] mais devra améliorer son protocole. Enfin, la société Biocentric qui produit un test de charge virale VIH marqué CE/préqualifié OMS utilisable sur plateforme ouverte fournit depuis 2016 une notice pour l'utilisation du DBS actuellement en cours d'évaluation au sein de l'UMR 1058 dans le cadre du projet OPP-ERA.

La limite inférieure de détection diminue sur DBS en raison du volume de sang disponible (50-70 µl de sang total au maximum), alors que 1 ml de plasma est la norme sur les techniques ultra-sensibles ayant un seuil inférieur à 50 copies/ml. La spécificité est également diminuée en raison de l'ADN pro-viral et l'ARN associé aux cellules. Cette contamination par l'ADN VIH biaise la quantification d'ARN en particulier à des charges virales basses (affectant la fiabilité du seuil défini par l'OMS à 1000 copies / ml pour le diagnostic de l'échec virologique).

Malgré les questions qui demeurent concernant la bonne utilisation des DBS pour le diagnostic et le suivi VIH, l'OMS recommande le DBS comme une possibilité intéressante d'améliorer l'accès aux tests moléculaires. Il faut souligner que tous les fabricants de kit de quantification ARN VIH devraient fournir un protocole incluant le DBS et s'engager dans la certification sur cet échantillon biologique. Les politiques nationales sont encouragées à utiliser des preuves scientifiques et à évaluer leurs besoins afin de sélectionner les plateformes et tests appropriées [54].

Tableau 2: Sensibilité et spécificité du DBS pour la charge virale par rapport au plasma [95]

Author	Assay	VL Threshold (copies/mL)	Sample size	Sensitivity (%)*	Specificity (%)*
Lofgren <i>et al.</i> [19]	RealTime	1000	176**	100	99
	RealTime	10000	176**	100	100
	RealTime	400	137 [‡]	99	87
	RealTime	5000	137 [‡]	100	97
Pirillo <i>et al.</i> [22]	kPCR	37	98	88.2	69.2
	kPCR	5000	98	85.1	96.1
Rottinghaus <i>et al.</i> [23]	NucliSens v.1.1	1000	173	77.8	98.1

*sensitivity and specificity given against plasma.

** infants (median 6 months, none on ART).

[‡]adults (median 34 years, all on ART).

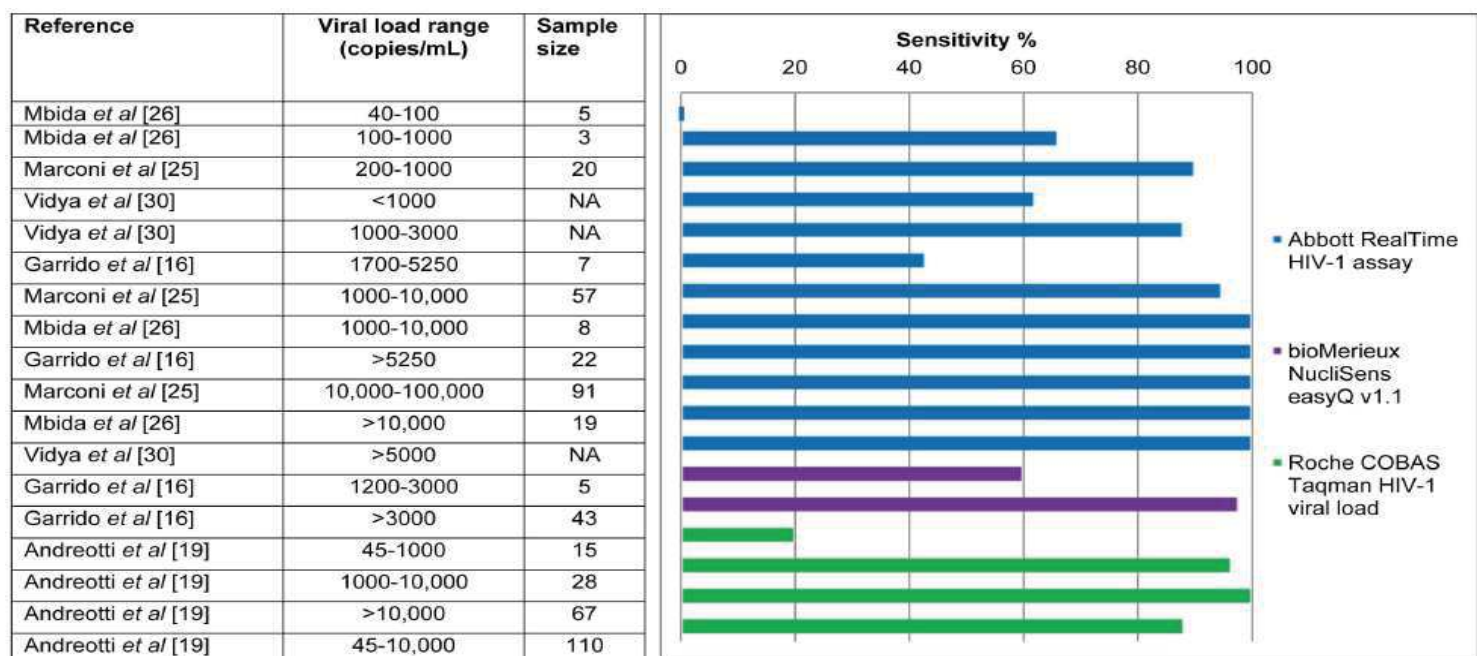


Figure 9: Sensibilité par gamme de charge virale de DBS par rapport aux échantillons de plasma correspondants [95]

3.2. Utiliser les plateformes polyvalentes ouvertes pour élargir le panel des pathogènes explorés afin de documenter les infections négligées qui pourraient être traitées par des stratégies ciblées sur un pathogène et d'initier des approches de diagnostic syndromique

Alors que certaines infections spécifiques causant de la fièvre, comme le paludisme et la septicémie bactérienne sont identifiés de manière relativement satisfaisantes [76,110], d'autres infections dont différentes zoonoses (brucellose, leptospirose, fièvre Q, borréliose tropicale), les infections virales (dengue chikungunya, Zika) et les maladies infectieuses pandémiques ou émergentes (la grippe A : H7N9, Ebola, le syndrome respiratoire du Moyen-Orient dû au coronavirus : MERS-CoV) sont rarement diagnostiquées malgré une incidence parfois élevée [111, 112, 113]. Diverses étiologies de maladies fébriles sont difficiles à distinguer les unes les autres cliniquement [114, 115]. Comme les services de laboratoire clinique sont souvent limités dans les zones où les maladies fébriles sont particulièrement fréquentes [116, 117], les cliniciens peuvent avoir peu d'outils de diagnostic pour établir un diagnostic étiologique. Par conséquent, la gestion clinique est souvent motivée par des directives basées sur le syndrome utilisant un traitement empirique [118, 119, 120]. Des études sur l'étiologie de la fièvre ont souligné une grande diversité de pathogènes en cause qui varie en fonction de la population étudiée, avec une variabilité considérable de la prévalence et de la diversité à l'intérieur et entre les pays [121, 122]. En l'absence de données systématiquement recueillies sur l'étiologie de la fièvre, un décalage considérable entre le diagnostic clinique, la gestion clinique et l'étiologie réelle peut se produire, ce qui entraîne des résultats médiocres chez les patients [123]. L'importance des tests diagnostiques pour le traitement fondé sur des preuves a été reconnue par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et d'autres acteurs de la santé mondiale.

La combinaison de l'approche syndromique et le développement de nouveaux tests de diagnostic moléculaire sur des plateformes ouvertes pourraient être une solution pour une meilleure gestion des patients et le contrôle des maladies. Chaque pays devrait chercher à décrire de manière exhaustive les étiologies des maladies et proposer des solutions diagnostiques qui aideront à estimer la prévalence réelle de chaque maladie.

Cette caractérisation du fardeau des syndromes de maladies infectieuses est importante pour cibler et prioriser l'utilisation de ressources limitées pour des services curatifs et préventifs optimaux et pour la recherche et le développement de nouvelles stratégies et interventions.

OBJECTIFS

1. Objectif général

Documenter les possibilités et limites de l'approche centralisée basée sur les plateformes polyvalentes ouvertes de PCR pour améliorer l'accès au diagnostic moléculaire via d'une part l'utilisation du DBS pour la charge virale VIH et d'autre part l'élargissement à l'analyse d'autres pathogènes.

2. Objectifs spécifiques

- Evaluer l'impact de l'ADN VIH sur la détection de l'échec virologique afin de documenter précisément l'interférence de l'ADN sur la quantification ARN sur DBS.
- Mettre en place une approche de diagnostic sérologique et moléculaire de la leptospirose pour le diagnostic des cas au cours des syndromes d'ictère fébrile.
- Mettre au point une PCR duplex pour le diagnostic HSV et *Mycobacterium tuberculosis* dans les syndromes méningés ou neuro-méningés à liquide clair.

RESULTATS ET ARTICLES

1. Estimation du niveau d'ADN du VIH-1 qui interfère sur la fiabilité de la quantification de l'ARN du VIH-1. Quantification effectuée sur dried blood spots recueillies auprès de patients traités avec succès.

Article 1

Zida S, Tuailon E, Barro M, Kwimatouo Lekpa Franchard A, Kagoné T, Nacro B, Ouedraogo AS, Bolloré K, Sanosyan A, Plantier JC, Meda N, Sangaré L, Rouzioux C, Rouet F, Kania D. Estimation of HIV-1 DNA Level Interfering with Reliability of HIV-1 RNA. Quantification Performed on Dried Blood Spots Collected from Successfully Treated Patients. J Clin Microbiol. 2016; 54(6): 1641-3.

La charge virale (CV) est recommandée pour détecter l'échec du traitement chez les patients infectés par le VIH-1 par un traitement antirétroviral (ART) [124]. Néanmoins, le suivi de la CV reste difficile dans les pays à ressources limitées et les zones éloignées en raison du coût de l'équipement et des infrastructures de laboratoire insuffisantes [94]. Les spots de sang séché (DBS) peuvent être utilisés pour surmonter certaines de ces limitations. L'échantillon DBS offre les avantages d'une matrice stable, la facilité de collecte des échantillons et l'expédition avec des risques minimaux pour les tests dans les laboratoires centraux. Des études ont montré que le DBS peut être utile dans les pays à ressources limitées pour le dépistage précoce du VIH-1, le suivi et le test de résistance [54, 92, 94]. Cependant, des performances sous-optimales ont été rapportées pour les tests de CV effectués sur DBS [92, 95, 125] par rapport au plasma, les inconvénients de l'évaluation de l'ARN du VIH-1 sur DBS incluaient une interférence possible de l'ADN intracellulaire. Ce point a fait l'objet d'un débat scientifique sur les performances réelles et les limites des tests utilisés dans cette approche telle que pratiquée notamment dans les travaux de l'unité 1058, du Centre MURAZ et des membres du réseau de l'Agence Nationale de Recherche sur le Sida et les Hépatites (ANRS). Alors que des études avaient rapporté de très bonnes performances de la quantification ARN VIH sur DBS, y compris sur plateforme ouverte

polyvalente de PCR [94], le document technique de l'OMS et un article publié par Monleau et al dans le cadre de l'étude ANRS 12235 rapportaient des résultats bien moins satisfaisants [92,126]. Le document OMS rapporte des résultats non publiés pour lesquels la procédure du test n'est pas détaillée, mais l'étude ANRS 12235 montre l'absence d'étape destinée à éliminer l'ADN par traitement à la DNase ou extraction ARN spécifique. Ce point a fait l'objet d'un commentaire publié par les membres du groupe de travail ANRS AC12 et AC12 à la suite de l'article insistant sur l'importance de l'étape pré-analytique et le suivi du protocole fabricant [91].

L'objectif de cette étude était de mettre en évidence l'impact du niveau d'ADN du VIH-1 dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) sur la détection d'ARN du VIH-1 sur DBS.

Des échantillons de plasma et de sang total ont été recueillis auprès de 69 sujets infectés par le VIH-1 après consentement éclairé et approbation du comité local d'éthique (004-2012 / CE-CM et ID RCB n ° 2011-A01566-35). Cinquante microlitres de sang veineux EDTA ont été recueillis sur cinq spots de 12 mm sur papier filtre Whatman 903 (Watman GmbH, Dassel, Allemagne) et séchés à l'air pendant 7 à 15 jours avant d'être stockés à -20 ° C. L'ARN du VIH-1 a été extrait de 200 µl de plasma avec le kit QIAMP® Viral RNA Mini (Qiagen, Courtaboeuf, France). L'ARN du VIH-1 provenant de deux spots entiers de DBS de 12 mm a été élué directement dans 2 ml de tampon de lyse sous agitation constante pendant 1 heure. L'ARN du VIH-1 de DBS a été extrait par le système d'extraction NucliSENS miniMag (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) ou par le kit NA Extraction-Large Volume utilisant le système d'extraction Arrow (Biocentric, Bandol, France). L'ADN du VIH-1 a été extrait des PBMC avec le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen). L'ARN du VIH-1 plasmatique et l'ARN du VIH-1 de DBS ont été quantifiés en utilisant le test Generic HIV Charge Virale avec une limite de détection inférieure de 300 copies / ml (Biocentric). La quantification de l'ADN du VIH a été effectuée avec l'essai générique d'ADN du VIH cellulaire (Biocentric). Les sujets ont été regroupés selon les détections d'ARN du VIH-1 dans des échantillons de plasma et DBS : indétectables pour l'ARN du VIH-1 dans le plasma et le DBS (groupe 1); indétectable pour l'ARN du VIH-1 dans le plasma mais a détecté des points positifs sur le DBS (groupe 2); et détectable pour l'ARN du VIH-1 dans le plasma, quel que soit le résultat de l'ARN du VIH-1 sur le DBS (groupe 3). Sur un total de 69 patients, les échantillons de plasma de 62 patients (90%) étaient négatifs pour

l'ARN du VIH-1. Comme le montre la figure 1A, parmi les 62 patients avirémiques, 40 étaient négatifs pour l'ARN du VIH-1 sur les échantillons de DBS (groupe 1), alors que 22 (35%) avaient des résultats faussement positifs avec des tests sur le DBS (groupe 2). Les taux d'ADN du VIH-1 étaient plus élevés chez les patients du groupe 2 que chez les patients du groupe 1 (test de Mann-Whitney, $P = 0,0003$) (figure 1B). L'ARN du VIH-1 a été détecté dans le plasma de sept patients (médiane, 2156 copies / ml, intervalle interquartile, 1198 à 23709 copies / ml) (groupe 3). Cinq d'entre eux (71%) ont été jugés positifs pour l'ARN du VIH-1 sur le DBS, alors que les deux patients restant avec des DBS négatifs ont montré une faible virémie plasmatique (2156 et 115 copies / ml) (figure 1A). Comme le montre la figure 1C, une corrélation significative a été observée entre les niveaux d'ADN du VIH-1 et la charge d'ARN du VIH-1 sur le DBS (test de Spearman, $r = 0.50$; $P < 0,0001$). Sur la base d'une analyse de courbe (ROC), nous avons estimé que la contamination de la charge d'ARN du VIH-1 sur DBS par l'ADN du VIH-1 était perceptible de 800 à 1200 copies d'ADN / 10^6 PBMC (figure 1D). Nos résultats ont confirmé que l'ADN de VIH-1 associé aux cellules était libéré dans le liquide d'élution des DBS d'une manière quantitative et par conséquent a été amplifié lorsque les taux d'ADN du VIH-1 étaient élevés, entraînant souvent des tests détectables d'ARN du VIH-1 chez des patients traités avec succès. Le seuil au-delà duquel l'ADN du VIH-1 a souvent contaminé la quantification de l'ARN était estimé à 800 à 1000 copies d'ADN du VIH-1/ 10^6 PBMC. Les protocoles DBS actuels pour les tests VL disponibles dans le commerce devraient être remis en cause pour leur capacité à identifier avec précision les patients traités avec succès malgré les niveaux d'ADN du VIH-1 de 1 000 copies / 10^6 PBMC et l'échec du traitement à un seuil de 1 000 copies d'ARN du VIH-1 / ml. Atteindre cet équilibre est la clé pour une utilisation accrue de DBS pendant la surveillance du traitement ARV.

Estimation of HIV-1 DNA Level Interfering with Reliability of HIV-1 RNA Quantification Performed on Dried Blood Spots Collected from Successfully Treated Patients

Sylvie Zida,^{a,b} Edouard Tuaillon,^b Makoura Barro,^c Arnaud Kwimatouo Lekpa Franchard,^a Thérèse Kagoné,^a Boubacar Nacro,^c Abdoul Salam Ouedraogo,^d Karine Bolloré,^b Armen Sanosyan,^b  Jean-Christophe Plantier,^e Nicolas Meda,^a Lassana Sangaré,^d Christine Rouzioux,^f François Rouet,^g Dramane Kania^a

Laboratoire de Virologie, Département des Sciences Biomédicales, Centre MURAZ, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso^a; INSERM Unité 1058, Université de Montpellier et CHRU de Montpellier, Montpellier, France^b; Département de Pédiatrie, CHU Sanou Souro, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso^c; Laboratoire de Bactériologie-Virologie, CHU Yalgado Ouédraogo, Ouagadougou, Burkina Faso^d; Laboratoire de Virologie, CHRU Charles Nicole, Rouen, France^e; Equipe d'accueil 7327, Université Paris-Descartes, Paris, France^f; Unité VIH/Hépatites, Institut Pasteur du Cambodge, Phnom Penh, Cambodia^g

The impact of HIV-1 DNA coamplification during HIV-1 RNA quantification on dried blood spots (DBS) was explored. False-positive HIV RNA detection (22/62, 35%) was associated with high HIV-1 DNA levels. Specificity of HIV-1 RNA assays on DBS should be evaluated following manufacturer protocols on samples with HIV-1 DNA levels of $\geq 1,000$ copies/ 10^6 peripheral blood mononuclear cells.

Using plasma specimens for viral load (VL) testing is the preferred approach to detect treatment failure in HIV-1-infected people on antiretroviral therapy (ART) (1). However, widespread implementation of VL monitoring remains challenging in resource-limited settings, especially in remote areas, because of insufficient laboratory infrastructures and a lack of human resources. VL testing on dried blood spot (DBS) specimens can be an alternative to testing in plasma to overcome logistical, infrastructural, or operational barriers.

The use of DBS offers the advantages of a stable and easy-to-collect specimen and improved shipment with minimal infectious risk for testing with most available platforms in central laboratories. Studies have shown that DBS specimens may be useful for early diagnosis of pediatric HIV-1 infection, treatment monitoring, external quality assessment programs, and resistance testing (2–4). HIV-1 RNA testing on whole blood collected on DBS is highly effective in determining viral failure at the clinical threshold of 5,000 copies/ml and may be used effectively at a threshold of 1,000 copies/ml, although a suboptimal sensitivity was reported for this level (5).

Standardized protocols, including a step for blood elution from filter paper, are needed for successful implementation of HIV-1 load testing using DBS. Advancements were made in the last 5 years with DBS protocols for HIV load provided by bioMérieux, Roche, Abbott, Biocentric, and Siemens (6). The bioMérieux NucliSENS assay is currently Conformité Européenne In Vitro Diagnostics (CE-IVD) approved for DBS specimens. Other manufacturers of HIV RNA nucleic acid tests need to pursue regulatory approval for *in vitro* diagnostics on DBS (6, 7).

One of the current limitations of measuring HIV-1 load with DBS is interference of HIV-1 DNA coamplified during HIV-1 RNA quantification by reverse transcription-PCR, notably, among samples collected from patients who were successfully treated with ART (7–11). Here, we determined the HIV-1 DNA level that interfered with the reliability of HIV-1 RNA quantification on DBS without using a DNase pretreatment step or a specific RNA extraction method. It enabled the establishment of an HIV-1

DNA threshold with a high risk of false-positive HIV-1 RNA results on DBS specimens.

We randomly collected venous blood samples from 69 HIV-1-infected outpatients after receiving informed consent and obtaining the approval of local ethics committees from Burkina Faso and France (004-2012/CE-CM and ID RCB 2011-A01566-35, respectively). All patients were treated with ART for at least 6 months. Fifty microliters of blood collected on EDTA tubes was spotted onto five 12-mm circles on a Whatman 903 filter paper card (Whatman GmbH, Dassel, Germany) and air dried for 1 day prior to storage at -20°C . For elution, two entire 12-mm spots were placed in 2.0 ml of lysis buffer under constant shaking for 1 h as previously described (2). DBS HIV-1 RNA was then extracted by the NucliSENS miniMag extraction system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France) or by the large-volume nucleic acid extraction kit using the Arrow extraction system (Biocentric, Bandol, France). Plasma HIV-1 RNA was extracted from 200 μl of matched plasma with the QIAamp viral RNA minikit (Qiagen, Courtaboeuf, France). HIV-1 DNA was extracted from matched whole blood with the QIAamp DNA minikit (Qiagen). Plasma and DBS HIV-1 RNA levels were quantified using the Generic HIV load assay (Biocentric) with a lower detection limit of 300 copies/ml in plasma and an estimated $\sim 2,000$ copies/ml on DBS specimens (2, 3). HIV-1 DNA quantitation was performed with the Generic cell

Received 26 December 2015 Returned for modification 24 January 2016

Accepted 16 March 2016

Accepted manuscript posted online 23 March 2016

Citation Zida S, Tuaillon E, Barro M, Kwimatouo Lekpa Franchard A, Kagoné T, Nacro B, Ouedraogo AS, Bolloré K, Sanosyan A, Plantier J-C, Meda N, Sangaré L, Rouzioux C, Rouet F, Kania D. 2016. Estimation of HIV-1 DNA level interfering with reliability of HIV-1 RNA quantification performed on dried blood spots collected from successfully treated patients. *J Clin Microbiol* 54:1641–1643. doi:10.1128/JCM.03372-15.

Editor: A. M. Caliendo, Rhode Island Hospital

Address correspondence to Edouard Tuaillon, e-tuaillon@chu-montpellier.fr.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

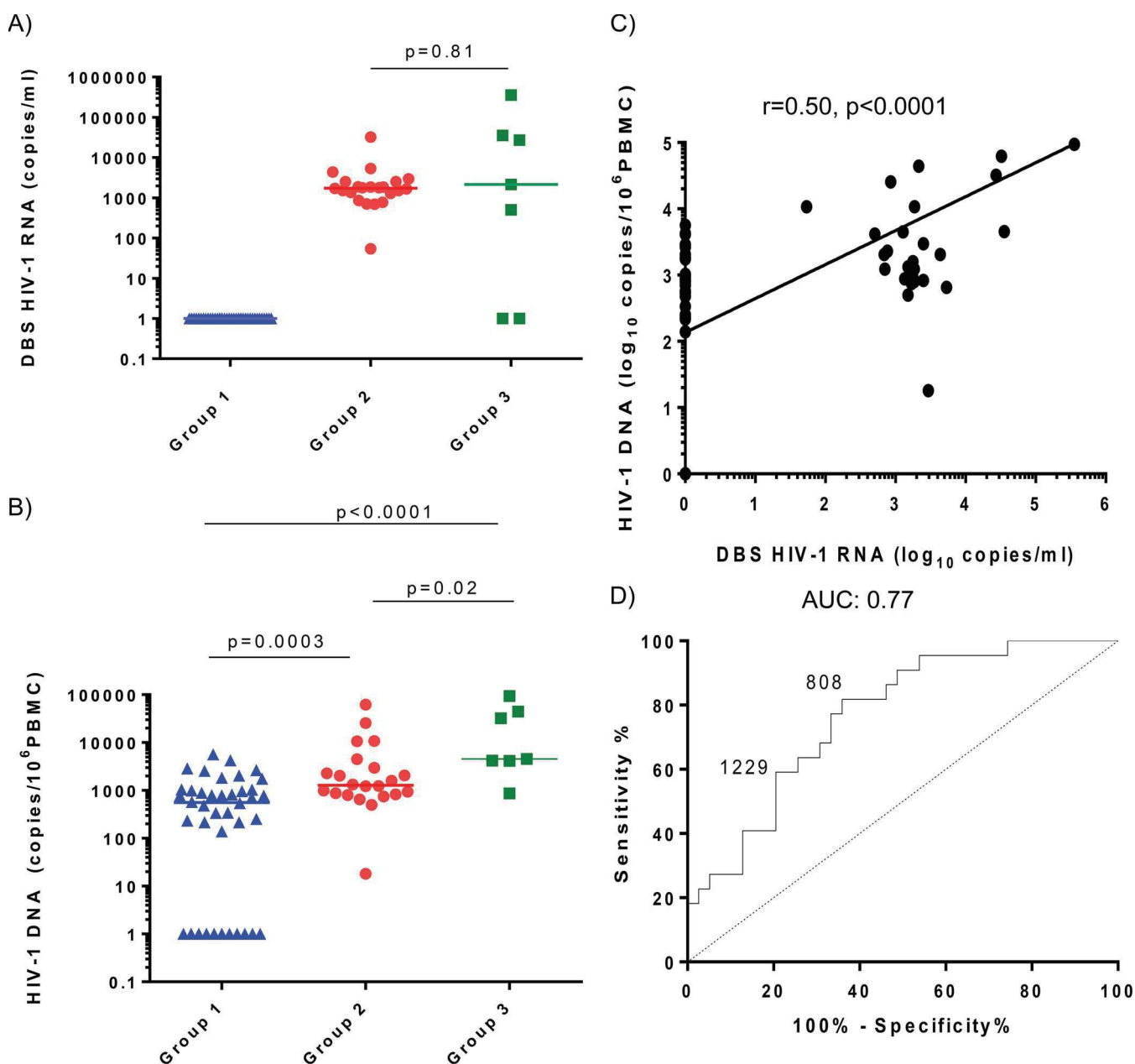


FIG 1 HIV-1 RNA quantification on DBS according to HIV-1 DNA levels. Subjects were classified in the three following categories: group 1 ($n = 40$), HIV-1 RNA plasma⁻/DBS⁻; group 2 ($n = 22$), HIV-1 RNA plasma⁻/DBS⁺; group 3 ($n = 7$), HIV-1 RNA plasma⁺/DBS⁺ or DBS⁻. (A) HIV-1 RNA levels on DBS according to HIV-1 RNA results in plasma. (B) HIV-1 DNA levels in whole blood according to HIV-1 RNA results in plasma and DBS. (C) Correlation between HIV-1 RNA load results on DBS and HIV-1 DNA levels in whole blood. (D) ROC curve displaying sensitivity versus specificity of HIV-1 RNA quantification on DBS for the prediction of the risk of false-positive VL results with DBS specimens. Thresholds at 1,229 and 880 HIV-1 DNA copies/10⁶ PBMC and area under the curve (AUC) are indicated. r , Spearman correlation coefficient; p , Mann-Whitney test.

HIV DNA assay (Biocentric), with a detection limit of 5 copies per PCR. HIV-1 DNA results were expressed as copies per million peripheral blood mononuclear cells (PBMC) using the results of the blood formula.

Subjects were assigned to one of three groups: group 1, undetectable for HIV-1 RNA in plasma and DBS specimens; group 2, undetectable for HIV-1 RNA in plasma but positive for HIV-1 RNA on DBS; and group 3, detectable for HIV-1 RNA in plasma regardless of HIV-1 RNA results on DBS.

From a total of 69 patients, the plasma samples of 62 patients (90%) were negative for HIV-1 RNA. As shown in Fig. 1A, among the 62 aviremic patients, 40 were negative for HIV-1 RNA on DBS specimens (group 1), whereas 22 (35%) had false-positive results with testing on DBS (group 2). HIV-1 DNA levels were higher in group 2 patients than in group 1 patients (Mann-Whitney test, $P = 0.0003$) (Fig. 1B).

HIV-1 RNA was detected in the plasma of seven patients (median, 2,156 copies/ml; interquartile range, 1,198 to 23,709 copies/

ml) (group 3). Five of them (71%) were found to be positive for HIV-1 RNA on DBS, whereas the two remaining patients with negative DBS results showed low plasma viremia (2,156 and 115 copies/ml) (Fig. 1A).

As shown in Fig. 1C, a significant correlation was observed between HIV-1 DNA levels and HIV-1 RNA load on DBS (Spearman test, $r = 0.50$; $P < 0.0001$). Based on a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis, we estimated that the contamination of HIV-1 RNA load on DBS by HIV-1 DNA was noticeable from 800 to 1,200 DNA copies/ 10^6 PBMC (Fig. 1D).

Our results confirmed that cell-associated HIV-1 DNA was released in DBS elution liquid in a quantitative manner and consequently was amplified when levels of HIV-1 DNA were high, often leading to detectable HIV-1 RNA testing in patients treated successfully with AIDS-associated retrovirus. The threshold beyond which HIV-1 DNA frequently contaminates RNA quantification was estimated to be ~ 800 to 1,000 HIV-1 DNA copies/ 10^6 PBMC.

Current DBS protocols for commercially available VL tests should be challenged for their capacity to accurately identify successfully treated patients despite HIV-1 DNA levels of $\geq 1,000$ copies/ 10^6 PBMC and treatment failure at a threshold of 1,000 HIV-1 RNA copies/ml. Reaching this balance is key for expanded DBS use during ART monitoring.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Albert Sotto for codirection of the doctoral study of S.Z.

Financing for the doctoral training of S.Z. was provided by Infec-tiopôle Sud.

REFERENCES

- World Health Organization. 2013. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf?ua=1.
- Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, Touré-Kane C, Truong LXT, Chaix M-L, Delaporte E, Ayoub A, Peeters M, ANRS 12235 Study Group. 2014. Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. *J Clin Microbiol* 52:578–586. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02860-13>.
- Viljoen J, Gampini S, Danaviah S, Valéa D, Pillay S, Kania D, Méda N, Newell ML, Van de Perre P, Rouet F, World Health Organization/ANRS 1289 Kesho Bora Study Group. 2010. Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 55:290–298. <http://dx.doi.org/10.1097/QAI.0b013e3181edaaf5>.
- Prach LM, Puren A, Lippman SA, Carmona S, Stephenson S, Cutler E, Barnhart S, Liegler T. 2015. Design and implementation of an external quality assessment program for HIV viral load measurements using dried blood spots. *J Clin Microbiol* 53:964–966. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02698-14>.
- Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, Barnett D, Cheng B, Crowe SM, Denny T, Landay A, Stevens W, Habiambere V, Perriens JH, Peeling RW. 2014. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS One* 9:e86461. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086461>.
- World Health Organization. 2014. Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/viral-load-testing-technical-update/en/>.
- Fajardo E, Metcalf CA, Chaillat P, Aleixo L, Pannus P, Panunzi I, Triviño L, Ellman T, Likaka A, Mwenda R. 2014. Prospective evaluation of diagnostic accuracy of dried blood spots from finger prick samples for determination of HIV-1 load with the NucliSENS Easy-Q HIV-1 version 2.0 assay in Malawi. *J Clin Microbiol* 52:1343–1351. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.03519-13>.
- Yapo V, d'Aquin Toni T, Desmonde S, Amani-Bosse C, Oga M, Lenaud S, Menana H, Timité-Konon M, Leroy V, Rouzioux C. 2013. Evaluation of dried blood spot diagnosis using HIV1-DNA and HIV1-RNA Biocentric assays in infants in Abidjan, Côte d'Ivoire. The Pedi-Test DBS ANRS 12183 Study. *J Virol Methods* 193:439–445. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.07.011>.
- Rouet F, Kania D, Tuaillon E, Maiga A, Nouhin J, Rouzioux C, Descamps D, Plantier J-C. 2014. Use of reverse transcription-PCR-based assays for quantification of HIV-1 in dried blood spots requires specific HIV-1 RNA isolation for monitoring of antiretroviral treatment efficiency. *J Clin Microbiol* 52:2740–2741. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00962-14>.
- Costenaro P, Lundin R, Petrara MR, Penazzato M, Massavon W, Kizito S, Nabachwa SM, Nannyonga Musoke M, Namisi C, Morelli E, Bilardi D, Mazza A, Zanchetta M, Giaquinto C, De Rossi A. 2014. Viral load detection using dried blood spots in a cohort of HIV-1-infected children in Uganda: correlations with clinical and immunological criteria for treatment failure. *J Clin Microbiol* 52:2665–2667. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00961-14>.
- Sawadogo S, Shiningavamwe A, Chang J, Maher AD, Zhang G, Yang C, Gaeb E, Kaura H, Ellenberger D, Lowrance DW. 2014. Limited utility of dried-blood- and plasma spot-based screening for antiretroviral treatment failure with Cobas Ampliprep/TaqMan HIV-1 version 2.0. *J Clin Microbiol* 52:3878–3883. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02063-14>.

2. Exploration de la leptospirose comme une cause possible et négligée d'ictère fébrile au Burkina Faso.

Article 2

Zida S, Kania D, Sotto A, Brun M, Picardeau M, Castéra J, Bolloré K, Kagoné T, Traoré J, Ouoba A, Van de Perre P, Méda N, Tuailon E. Acute leptospirosis, a neglected cause of disease among patients with febrile icteric illness in Burkina Faso, West Africa. Emerging Infectious Diseases EID-17-0436.R1 [Soumis In Peer Review].

La leptospirose est une zoonose bactérienne transmise à l'homme à partir d'un réservoir constitué principalement par les rongeurs sauvages et les animaux domestiques. La leptospirose a un impact sur la santé publique à l'échelle mondiale et est soupçonnée d'être endémique en Afrique de l'Ouest. La leptospirose a été signalée dans diverses parties de l'Afrique de l'Ouest chez les humains [127,128,129,130]. Des études au Sénégal et au Mali ont montré que les bovins, les porcs et les moutons sont fréquemment infectés [131,132]. La détection de la leptospirose a également été signalée récemment chez les rongeurs à Niamey, au Niger, en particulier dans les milieux agricoles urbains [133]. Cependant, les données épidémiologiques sont rares en Afrique subsaharienne et particulièrement en zone semi-arides. Dans certains pays comme le Burkina Faso, les données sur la leptospirose humaine sont inexistantes.

Pour prouver l'existence de la leptospirose au Burkina Faso, nous avons rétrospectivement testé des échantillons prélevés sur des sujets consultants pour ictère fébrile et qui ont été inscrits dans le réseau national pour la surveillance de la fièvre jaune.

L'étude a été réalisée au Centre Muraz au Burkina Faso. Les cas confirmés de leptospirose ont été identifiés selon les critères de l'OMS [134], par la présence de symptômes compatibles avec la leptospirose et la positivité pour le test de référence qui est le test de microagglutination (agglutination-lyse de Martin et Pettit) avec un titre d'anticorps supérieur $\geq 1:400$ ou / et par détection de l'ADN de *Leptospire*s par PCR. Les cas présomptifs ont été identifiés par des symptômes cohérents avec la

leptospirose et la présence d'anticorps IgM. Les échantillons testés négatifs pour le test sérologique et la PCR ont été considérés comme négatifs. Les échantillons collectés chez des adultes et des enfants atteints d'ictère et de fièvre $\geq 38,5^{\circ}\text{C}$, de janvier 2014 à juillet 2015, ont été testés rétrospectivement pour la recherche d'anticorps IgM dirigés contre *Leptospira* spp. en utilisant un ELISA maison. Les sérums trouvés positifs par ELISA ont été testés au laboratoire de bactériologie du CHU de Montpellier en utilisant le test MAT pour confirmer la sérologie avec un panel de sept sérogroupes avec sept souches de référence. Des échantillons pour lesquels un volume suffisant de sérum était disponible ont également été testés par MAT par le Centre national de référence pour la leptospirose à Paris, en utilisant un panel élargi de 24 sérogroupes. La PCR en temps réel pour la leptospirose a été effectuée au Centre Muraz en utilisant un test PCR ciblant le gène *lipL32*. Cette cible génomique qui est exclusivement présente dans les leptospires pathogènes [135] a été utilisée dans de nombreuses études précédentes, une PCR maison de ce type est utilisé au CNR de la leptospirose à l'Institut Pasteur de Paris. La version de la PCR *LipL32* (Puma, Leptospire, Omunis, Clapiers) que nous utilisons a été validée, optimisée et produite en partenariat entre l'UMR Inserm U1058 et la société Omunis qui est une start-up hébergée par le laboratoire Inserm. Parmi les 781 échantillons collectés entre Janvier 2014 et Juillet 2015 ; 45 (5,57%) ont été testés positifs pour l'IgM anti-*Leptospira* par ELISA. La sérologie a été confirmée par le test d'agglutination microscopique (MAT) chez 23 sujets (2,94%). Quatre échantillons qui étaient testés négatifs en ELISA ont été trouvé positifs par PCR. Par conséquent, un total de 27 (3,45%) cas confirmés de leptospirose aiguë ont été identifiés. Les résultats de MAT ont suggéré l'existence de sérogroupes multiples, y compris la réaction des sérogroupes Australis, Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona et Sejroë. Nos données étaient conformes à une publication récente estimant que certains des pays de l'Afrique de l'Ouest, y compris ceux des régions semi-arides, peuvent avoir l'un des taux les plus élevés d'années de vie ajustées par incapacité (DALY) en raison de la leptospirose. Par conséquent, au Burkina Faso, on a estimé que les DALY dues à la leptospirose peuvent être de 60 à 70/100 000 personnes par an [136]. Au Burkina Faso, les secteurs de l'agriculture et de l'élevage représentent 30% du produit intérieur brut (PIB) et constituent l'épine dorsale de l'économie, avec environ 80% de la population active occupée dans ces activités. Par conséquent, l'exposition humaine aux leptospires est probablement fréquente. Des études menées

au Ghana sur des patients atteints de maladie fébrile sans cause évidente de la maladie ont trouvé une fréquence de 3,2% des cas confirmés de leptospirose chez les patients avec ictère. Dans cette étude rétrospective basée sur des tests d'échantillons uniques, certains cas de leptospirose ont probablement été négligés. Le manque de détails sur la présentation clinique et l'évolution était également une limitation de cette étude. En plus de la fièvre, les participants ont été recrutés en fonction de la présence d'un ictère, donc il est probable que parmi les cas de leptospirose confirmée, les formes sévères étaient surreprésentées. Le test MAT a fourni un aperçu général des sérogroupes existants au Burkina Faso, ce qui suggère de multiples réservoirs.

La leptospirose semble être une cause importante d'ictère fébrile, suggérant que la leptospirose est probablement endémique au Burkina Faso. D'autres études sont nécessaires pour explorer les réservoirs d'animaux et les facteurs de risque professionnels associés à la leptospirose humaine. La prise de conscience de la leptospirose chez les cliniciens, le financement et la possibilité d'effectuer des tests de laboratoire sont nécessaires pour clarifier l'ampleur du problème en Afrique subsaharienne.



Leptospirosis as a neglected cause of febrile icteric illness in Burkina Faso, West Africa.

Journal:	<i>Emerging Infectious Diseases</i>
Manuscript ID	EID-17-0436.R1
Manuscript Type:	Dispatch
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Zida, Sylvie; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang.; Centre MURAZ, Département des sciences Biomédicales. Kania, Dramane; Centre MURAZ, Département des sciences Biomédicales Sotto, Albert; INSERM ERI26, Université de Montpellier, , Nîmes, France. Department of Infectious and Tropical Diseases, Centre Hospitalier Universitaire de Nîmes. Brun, Michel; Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier. Picardeau, Mathieu; Pasteur Institute, Biology of Spirochetes Unit Castéra, Joany; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang. Bolloré, Karine; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang. Kagoné, Thérèse; Centre MURAZ, Département des sciences Biomédicales. Traoré, Jacques; Centre MURAZ, Département des sciences Biomédicales. Ouoba, Aline; Centre MURAZ, Département des sciences Biomédicales. Dujols, Pierre; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang. Van De Perre, Philippe; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang Méda, Nicolas; Centre MURAZ Tuillon, Edouard; UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang.
Keywords:	Leptospirosis, febrile illness, jaundice, icteric, ELISA, MAT, PCR

EMERGING INFECTIOUS DISEASES®

Centers for Disease Control and Prevention
1600 Clifton Rd, NE
Mail stop D61
Atlanta, GA 30333
Phone: 404 639-1960
Fax: 404 639-1954

Checklist for Authors: Note that *EID* follows the policies and recommendations of the [ICMJE](#)

First Author and Manuscript Title:

Proprietary Considerations	
☒	Authors agree that if their manuscript is accepted for publication in Emerging Infectious Diseases , it will upon publication be in the public domain and can be used without liability for copyright infringement.
☒	This manuscript (or one with substantially similar content written by the authors) has not been published and is not being considered for publication elsewhere.
☒	Corresponding author is the primary contact for reviewing the edited manuscript and galleys.
☒	Financial support for this content is clearly disclosed in the manuscript.
☒	Any organization or person with a financial interest in the subject matter is disclosed in the manuscript.
☒	Authors have disclosed any conflicts of interest related to this article. EID accepts the ICMJE Conflict of Interest form .
☒	This research has been approved by appropriate human or animal subjects research review boards, which are named in the manuscript.
☒	DNA and amino acid sequences have been submitted to an open access sequence database such as GenBank® and accession numbers are used to refer to the sequences.
☒	Authors have obtained written permission from the publishers of any figures or tables previously published or adapted from published figures or tables.
☒	Authors have obtained written permission from persons identifiable in photographs, case descriptions, or pedigrees.
☒	Authors have obtained written permission from persons named in personal communications (oral or written) stating that they agree to be named and that the information cited is accurate.
Authorship and Acknowledgments	
☒	All authors and contributors meet the ICMJE criteria for those roles , and all persons who made substantial contributions to this work but who did not fulfill the authorship criteria are named in the Acknowledgments.
☒	Written permission has been obtained from all persons listed in the Acknowledgments.
☒	Written permission has been obtained from all persons listed as authors of this manuscript.
☒	A two-sentence biography is provided for the first author or for both authors if there are only two.
Formatting, References, Figures, Word Count, Units of Measure	
☒	Authors have accessed and used guidance provided in the Author Resource Center .
☒	All pages are double-spaced, numbered, and left justified (ragged right margin).
☒	All references are cited in the text in sequential order, comply with Uniform Requirements , and have been checked for accuracy and completeness.
☒	Legends for figures are at the end of the text, following the reference list and any tables.
☒	Each figure or panel of a figure is in a separate file, and each file is at least 300 DPI.
☒	The abstract and manuscript meet specified word counts, which are strictly enforced.
☒	Continuous line numbering is turned on and applied throughout the document.
☒	All units of measure are expressed in SI units.

Additional notes or statements: [Click here to enter text.](#)

Dr. Sylvie ZIDA
UMR 1058, INSERM,
Centre Muraz, BP 390
Bobo Dioulasso, Burkina Faso

June 14, 2017

To: Dr. D. Peter Drotman
Editor-in-Chief
Emerging Infectious Diseases

Manuscript number: EID-17-0436

Title: Acute leptospirosis as a neglected cause of febrile icteric illness in Burkina Faso, West Africa.

Emerging Infectious Diseases

Dear Dr. D. Peter Drotman,

On behalf of my co-authors, I would like to express my thanks and appreciation for the fruitful comments regarding our manuscript, and for the invitation to submit a revised version of the paper to Emerging Infectious Diseases.

We have responded to all queries in a point-by-point fashion, to the best of our ability. Please do not hesitate to inform us of any additional comments that may further improve our paper. We hope that the manuscript in its revised form will be suitable for publication in Emerging Infectious diseases

Thank you in advance for your final consideration.

Looking forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Sylvie ZIDA PharmD, Msc

1 **Title page:**

- 2 - Sylvie Zida: PharmD, PhD student, UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier,
- 3 Etablissement Français du Sang, Montpellier, France; Centre Muraz, BP 390 Bobo
- 4 Dioulasso, Burkina Faso
- 5 - Dramane Kania : PharmD, PhD, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso
- 6 - Albert Sotto: Professor, INSERM ERI26, Université de Montpellier, Nimes, France.
- 7 Department of Infectious and Tropical Diseases, Centre Hospitalier Universitaire de
- 8 Nimes, Nimes, France
- 9 - Michel Brun: MD, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier,
- 10 France
- 11 - Mathieu Picardeau: PhD, Pasteur Institute, Biology of Spirochetes Unit, National
- 12 Reference Center for Leptospirosis, Paris, France
- 13 - Joany Castéra: PhD, Omunis SAS, Clapiers, France
- 14 - Karine Bolloré: Mcs, Engineer, UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier,
- 15 Etablissement Français du Sang, Montpellier, France
- 16 - Thérèse Kagoné: PhD, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso
- 17 - Jacques Traoré: Msc, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso
- 18 - Aline Ouoba: Pharm D, Mcs, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso
- 19 - Pierre Dujols: Professor, UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier,
- 20 Etablissement Français du Sang, Montpellier, France; Centre Hospitalier Universitaire
- 21 de Montpellier, Montpellier, France
- 22 - Philippe Van de Perre: Professor, UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier,
- 23 Etablissement Français du Sang; Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier,
- 24 Montpellier, France
- 25 - Nicolas Méda: Professor, Centre Muraz, Bobo Dioulasso, Burkina Faso

- Edouard Tuaillon: Corresponding author: UMR 1058, INSERM, Université de Montpellier, Etablissement Français du Sang, Inserm, Montpellier, France; Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Montpellier, France

Article Summary Line:

Leptospirosis is a neglected cause of febrile icteric illness in Burkina Faso, West Africa.

Running Title:

Leptospirosis a cause of febrile icteric illness in Burkina Faso

Keywords:

Leptospirosis, febrile illness, jaundice, icteric, ELISA, MAT, PCR, Burkina Faso, West Africa

Title:

Leptospirosis as a neglected cause of febrile icteric illness in Burkina Faso, West Africa

Authors:

Sylvie Zida, Dramane Kania, Albert Sotto, Michel Brun, Mathieu Picardeau, Joany Castéra, Karine Bolloré, Thérèse Kagoné, Jacques Traoré, Aline Ouoba, Pierre Dujols, Philippe Van de Perre, Nicolas Méda, Edouard Tuaillon

Affiliations:

Pathogenesis and control of chronic infections, UMR 1058 University of Montpellier, France (S. Zida, J. Castéra, K. Bolloré, P. Van de Perre, E. Tuaillon); Centre Muraz, Bobo Dioulasso,

Burkina Faso (S. Zida, D. Kania, T. Kagoné, J. Traoré, A. Ouoba, N. Méda); INSERM
ERI26, University of Nîmes Hospital, France (A. Sotto); University of Montpellier Hospital,
Montpellier, France (M. Brun, P. Van de Perre, E. Tuaillon); Pasteur Institute, National
Reference Center for Leptospirosis, Paris, France (M. Picardeau).

52

Abstract:

Text – word count: 50

Subjects who sought medical attention for febrile jaundice were tested for leptospirosis.
Confirmed leptospirosis were identified in 27/781 (3.46%) specimens: 23 (2.94%) tested
positive using serological assays (IgM and Microscopic Agglutination Test (MAT) $\geq 1:400$)
and 4 (0.51%) using LipL32 PCR; presumptive leptospirosis in 16/781 (2.82%) subjects (IgM
positive, MAT $\geq 1:100$).

60

Text – word count: 1200

Worldwide, approximately one million cases of human leptospirosis occur each year resulting
in about 60,000 deaths (1). Scarce epidemiological data exists in Africa, although some
observations suggest that *Leptospira spp.* may be more prevalent than previously thought
(2,3). Investigations in semi-arid and arid regions in Africa are particularly needed. To our
knowledge, there are no published data on leptospirosis in Burkina Faso. In this study, the
hypothesis that leptospirosis is a cause of febrile jaundice in Burkina Faso was tested.

68

The study

The study was conducted in the Muraz Centre in Burkina Faso, a central reference laboratory responsible for the national surveillance of yellow fever. Confirmed leptospirosis cases were identified according to WHO criteria (4), by symptoms consistent with leptospirosis and a single Microscopic Agglutination Test (MAT) titre $\geq 1:400$ or/and by detection of *Leptospira* DNA by PCR, presumptive case were identified by symptoms consistent with leptospirosis and presence of IgM antibodies. Specimens tested negative for serological and PCR were considered as negative. Samples received from both adults and children with jaundice and fever $\geq 38.5^{\circ}\text{C}$, from January 2014 to July 2015 were retrospectively tested for the presence of IgM antibodies directed against *Leptospira spp.* using an in-house ELISA (Technical Appendix 1). Serum tested positive by ELISA were assessed for anti-*Leptospira* antibodies in the CHU Montpellier Bacteriology laboratory using MAT to confirm the serology with a panel of seven reference serogroups. Specimens for which a sufficient volume of serum was available were also tested by MAT in the French National Reference Center for leptospirosis, using an enlarged panel of 24 serogroups (Technical Appendix 2). Real-time PCR for leptospirosis was performed at the Muraz Centre using a PCR assay targeting the lipL32 gene (Puma, Leptospire, Omunis, Clapiers), which is exclusively present in pathogenic *Leptospira spp.* (5). The median subject age was 20 years (interquartile range [IQR] 12-30 years), and sixty-one percent of subjects were male ($p = 0.65$, Chi^2 test). Among 781 samples, 45 (5.57%) tested positive for anti-leptospira IgM by ELISA (Figure 1). Among those samples, 23 were found positive by MAT $\geq 1:400$ (2.94%) and consequently were considered to be confirmed leptospirosis cases. Sixteen samples having MAT titer ranging from 1:100 to 1:200 and six samples tested negative using MAT were considered as presumptive cases (2.82%). MAT results suggested the existence of multiple serogroups (Table 1) including reacting serogroups Australis, Ballum, Canicola, Grippotyphosa, Icterohaemorrhagiae, Pomona, and Sejroe. In addition, MAT was performed in the Leptospirosis National Reference Laboratory using a

larger panel of serogroups applied to 33 ELISA positive samples. Ten samples were tested positive and the presence of all previously detected serogroups except the Ballum serogroup was confirmed (data not shown). In one sample, this allowed for the identification of Mini as an additional serogroup with a 1:400 titer. Besides the serological test, leptospirosis cases were confirmed by lipL32 PCR in 4/781 (0.51%) samples. All were negative for IgM, but three had optical density of just above the positive threshold with signal to mean value of the negative controls between 2 and 3 (data not shown). Hence, screening by serological assay plus PCR identified a total of 27 (3.46%) specimens of confirmed leptospirosis. The highest number of confirmed cases was observed in the group of 10-19 years of age (data not shown), but the frequencies were not significantly different when cases were analyzed by age group ($p = 0.41$, χ^2 test). This observation was not unexpected as the population of Burkina Faso is young with almost two-thirds of the population aged under 25. There was no particular gender distribution (13 women and 14 men, $p = 0.33$, χ^2 test). The repartition of confirmed, unconfirmed and negative cases according to rainy season (between May and mid-October) versus dry season from mid-October to April, were unequal ($p = 0.0035$, χ^2 test), with a trend for a higher proportion of confirmed cases among samples received during the rainy season when compared to negative case ($p = 0.065$, χ^2 test, Figure 2).

Our data were in line with a recent publication estimating that some of the West African countries, including those in semi-arid regions, may have one of the highest rates of Disability Adjusted Life Years (DALYs) due to leptospirosis. Hence, in Burkina Faso, it has been estimated that DALYs due to leptospirosis may be 60 - 70 /100, 000 people per year (6). Leptospirosis have been reported in various parts of West Africa in humans (7-11). Studies in Senegal and Mali have shown that cattle, pigs and sheep are frequently infected (12,13). Detection of leptospirosis was also recently reported in rodents in Niamey, Niger especially in urban agricultural settings (14). In Burkina Faso, agricultural and livestock sectors represent

30% of the Gross Domestic Product (GDP) and are the backbone of the economy with about 80% of the working aged population involved in these activities. Hence, human exposure to *Leptospira spp.* is probably frequent. Studies conducted in Ghana on patients with febrile illness without an obvious cause of disease found a frequency of 3.2% of confirmed leptospirosis cases among icteric patients and 7.8% of probable cases (3). In our study, half of the probable leptospirosis cases characterized by clinical signs consistent with leptospirosis and screened positive for anti-*Leptospira* IgM were confirmed by MAT with a titer $\geq 1:400$, and two third had a titer $\geq 1:100$ that may be also leptospirosis cases. Those presumptive leptospirosis cases would have been confirmed if a convalescent serum sample had been collected and tested. In addition, the MAT has been shown to be less sensitive than IgM detection using ELISA, especially in acute-phase specimens (15). The low rate of molecular test positivity may be explained by the rapid disappearance of *Leptospira spp.* in the blood at the time the antibody response becomes detectable. Furthermore, the transportation from the field to the centralized laboratory and the storage at -20°C for at least one year before testing had a potentially adverse impact on the detection of low levels of leptospira DNA. In this retrospective study based on single sample testing, some cases of leptospirosis were probably overlooked. The lack of details about clinical presentation and evolution was also a limitation of this study. Besides fever, participants were recruited based on the presence of jaundice, hence, it is probable that among those cases of confirmed leptospirosis, severe forms were overrepresented.

MAT provided a general insight into existing serogroups within Burkina Faso, suggesting multiple reservoirs. However, cautious interpretation is invited because of the high degree of cross-reactions between different serogroup especially in acute-phase serum samples. In addition, two seroreactivity against Ballum serogroup observed in the first MAT performed in the Montpellier University Hospital were not confirmed by using an enlarged panel in the

National Center for Leptospirosis. This may be related to prolonged sample storage and multiple freeze / thaw cycles before testing in the national reference laboratory.

Conclusions

Leptospirosis appears to be a significant cause of febrile jaundice, suggesting that leptospirosis is probably endemic in Burkina Faso. Further studies are required to explore animal reservoirs and occupational risk factors associated with human leptospirosis. Awareness of leptospirosis among clinicians, funding, and possibility in carrying out laboratory tests in the field are request to clarify the extent of the problem in Sub-Saharan Africa.

Biographical Sketch

Sylvie Zida holds a Doctorate in pharmacy and a Master's degree in biology and works at the Muraz Center as a pharmacist. She is currently preparing a PhD at the University of Montpellier as a member of the U1058 INSERM team.

References

1. Costa F, Hagan JE, Calcagno J, Kane M, Torgerson P, Martinez-Silveira MS, et al. Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep 17;9(9):e0003898.
2. Allan KJ, Biggs HM, Halliday JE, Kazwala RR, Maro VP, Cleaveland S, et al. Epidemiology of Leptospirosis in Africa: A Systematic Review of a Neglected Zoonosis and a Paradigm for 'One Health' in Africa. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Sep

- 167 14;9(9):e0003899. Review. Erratum in: PLoS Negl Trop Dis. 2016
168 Mar;10(3):e0004552.
- 169 3. De Vries SG, Visser BJ, Nagel IM, Goris MG, Hartskeerl RA, Grobusch MP.
170 Leptospirosis in Sub-Saharan Africa: a systematic review. Int J Infect Dis. 2014
171 Nov;28:47–64.
- 172 4. World Health Organization. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis
173 Burden Epidemiology Reference Group. Geneva: WHO; 2011.
174 http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521_eng.pdf
- 175 5. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of Real-Time PCR
176 Assays for Detection of Pathogenic *Leptospira* spp. In Blood and Identification of
177 Variations in Target Sequences. J. Clin. Microbiol. 2011;49(6):2154.
- 178 6. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al.
179 Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life
180 Years. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 2;9(10):e0004122.
- 181 7. Awosanya EJ, Nguku P, Oyemakinde A, Omobowale O. Factors associated with
182 probable cluster of leptospirosis among kennel workers in Abuja. Nigeria Pan Afr
183 Med J 2013;16:144.
- 184 8. Onyemelukwe NF. A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern
185 Nigeria among people at occupational risk. J Trop Med Hyg 1993;96:301–4.
- 186 9. Ngbede EO, Raji MA, Kwanashie CN, Okolocha EC, Momoh AH, Adole EB, et al.
187 Risk practices and awareness of leptospirosis in an abattoir in northwestern Nigeria.
188 Sci J Vet Adv 2012;1:65–9.
- 189 10. Isa SE, Onyedibe KI, Okolo MO, Abiba AE, Mafuka JS, Simji GS, et al. A 21-year
190 old student with fever and profound jaundice. PLoS Negl Trop Dis 2014;8:e2534.

11. Houemenou G, Ahmed A, Libois R, Hartskeerl RA. *Leptospira spp.* prevalence in small mammal populations in Cotonou, Benin. ISRN Epidemiology 2013;2013:8.

12. Riel J, Baylet R, Rioche M. Seroepidemiological surveys on leptospirosis of livestock in Senegal [in French]. VIIes Journ Med Dakar February 1973. Reference in Int J Infect Dis. 2014 Nov; 28:47–64.

13. Niang M, Will LA, Kane M, Diallo AA, Hussain M. Seroprevalence of leptospiral antibodies among dairy-cattle kept in communal corrals in periurban areas of Bamako, Mali, West Africa. Prev Vet Med 1994;18:259-65.

14. Dobigny G, Garba M, Tatard C, Loiseau A, Galan M, Kadaouré I, et al. Urban Market Gardening and Rodent-Borne Pathogenic *Leptospira* in Arid Zones: A Case Study in Niamey, Niger. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 5;9(10):e0004097.

15. Cumberland P, Everard CO, Levett PN. Assessment of the efficacy of an IgM ELISA and microscopic agglutination test (MAT) in the diagnosis of acute leptospirosis. Am J Trop Med Hyg 1999;61:731–4.

Address for correspondence:

Sylvie Zida, UMR INSERM U1058, EFS, University of Montpellier, France; Centre MURAZ, Phone: (+226)70747906, Avenue Mamadou Konaté, BP 390, Bobo Dioulasso, Burkina Faso; email: zida_sylvie@yahoo.fr

214 Table 1. Confirmed leptospirosis cases by serogroup using MAT

Serogroup	Number of positives	Titer	215
	N= 23		
Ballum	11 (1*)	1:400-1:1600	
Grippotyphosa	4 (1 [†])	1:400-1:1600	
Australis	2	1:400 & 1:800	
Canicola	1 (1 [†])	1:400 & 1:800	
Sejroe	1*(1 [‡])	1:400	
Icterohaemorrhagiae	1	1:800	
Pomona	1	1:400	
Mini	1 [‡]	1:400	

216 * Equal titer serogroups Ballum and Sejroe.

217 [†] Equal titer serogroups Grippotyphosa and Canicola.218 [‡] Equal titer serogroups Mini and Sejroe.

219

220

221

222

223

224 Figure 1. Flow chart of the study

225 Figure 2. Percentage of confirmed cases of leptospirosis among samples received in the

226 Centre Muraz within the national network for yellow fever surveillance from January 2014 to

227 July 2015 in Burkina Faso. White bars indicate months of the dry season, grey bars months of

228 the rainy season. Number of confirmed leptospirosis relative to the number of specimens

229 tested per month is indicated. The months for which samples were collected during two

230 consecutive years were underlined (from January to June).

231

232

233

234

235

236

237

238

239

240

241

242

243

Peer Review

244 Technical Appendix 1: IgM ELISA:

245 Sera were tested for the presence of IgM antibodies directed against *Leptospira spp* by an in-
246 house ELISA performed in Centre Muraz. The assay used an antigenic preparation of
247 *Leptospira interrogans* serovar icterohaemorrhagiae provided by the French National
248 Reference Centre for Leptospirosis at Pasteur Institute. Briefly, cultures of bacteria were
249 inactivated at 56 ° C during 30 minutes, centrifuged and washed in NaN₃ alkaline buffer.
250 Bacteria were centrifuged at 30 minutes at 4000 rpm and washed with phosphate buffered
251 saline, and the pellets were resuspended in NaHCO₃ alkaline buffer. Polystyrene microtiter
252 plates (Falcon) were coated overnight at 4°C with 200 µl of *Leptospira spp* suspension. On
253 the second day, the plates were rinsed twice with NaHCO₃ alkaline buffer, and the coating
254 step was repeated one time in the same conditions. After washing, the plates were packaged
255 and stored at -20 ° C until use. The antigen covered plates were stable for three months. A
256 1:100 fold dilution of the sera was done in a PBS/Tween buffer containing milk. Two hundred
257 µl were dispensed per well, incubated for 1 hour at 37 ° C and washed 3 times in NaCl/Tween
258 buffer. Alkaline phosphatase conjugated goat anti-human IgM (Rockland TEBU BIO) at a
259 dilution of 1:1 600 in PBS/BSA, was added and incubated for 1 hour at 37 °C. After washing
260 three times, 200 µl of substrate (4 nitrophenyl phosphate, (Reference A12310.06 Alfa Aesar,
261 A Johnson Matthey Company) was added for 15 min at room temperature. The optical density
262 was measured at 405 and 630 nm. Five negative controls and two positive controls were used
263 for each microtiter plates. The positive threshold was calculated based on the value of
264 negative controls (mean value x 3). Hence samples with ratio of signal to mean value of the
265 negative controls over 3 were considered positive.

266

267

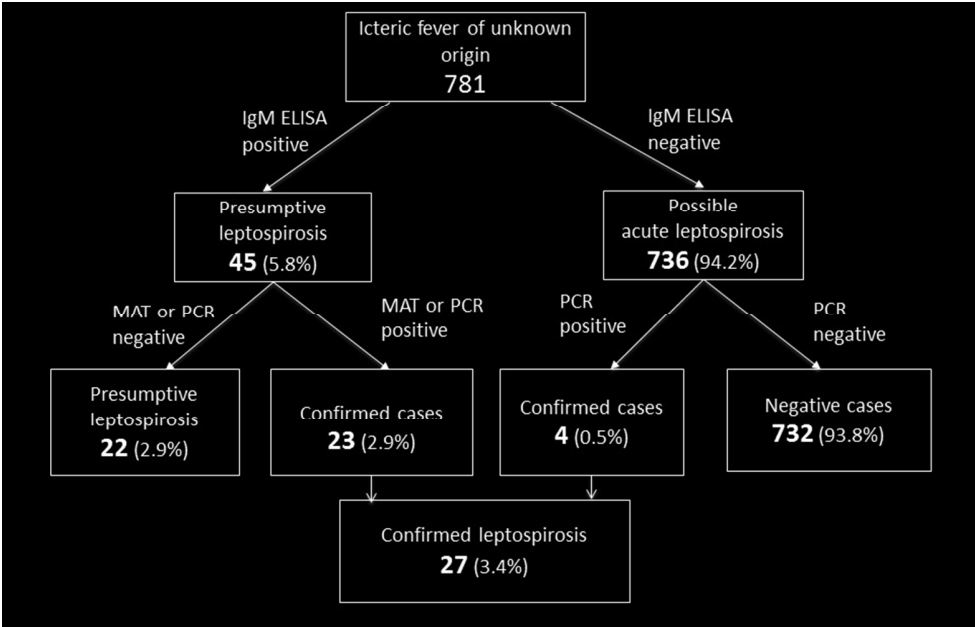
268 Technical Appendix 2. *Leptospira* serogroups used for MAT (online).

N°	Species	Serogroup	Serovar	Strain
1	<i>L. interrogans</i>	Australis*	Australis	Ballico
2	<i>L. interrogans</i>	Autumnalis	Autumnalis	Akiyami A
3	<i>L. interrogans</i>	Bataviae	Bataviae	Van Tienen
4	<i>L. interrogans</i>	Canicola*	Canicola	Hond Utrecht IV
5	<i>L. borgpetersenii</i>	Ballum*	Castellonis	Castellon 3
6	<i>L. kirschneri</i>	Cynopteri	Cynopteri	3522 C
7	<i>L. kirschneri</i>	Grippotyphosa*	Grippotyphosa	Moskva V
8	<i>L. interrogans</i>	Sejroe	Hardjobovis	Sponselee
9	<i>L. interrogans</i>	Hebdomadis	Hebdomadis	Hebdomadis
10	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae	Copenhageni	Wijnberg
11	<i>L. noguchii</i>	Panama	Panama	CZ 214 K
12	<i>L. biflexa</i>	Semarang	Patoc	Patoc 1
13	<i>L. interrogans</i>	Pomona*	Pomona	Pomona
14	<i>L. interrogans</i>	Pyrogenes	Pyrogenes	Salinem
15	<i>L. borgpetersenii</i>	Sejroë*	Sejroë	M 84
16	<i>L. borgpetersenii</i>	Tarassovi	Tarassovi	Mitis Johnson
17	<i>L. interrogans</i>	Icterohaemorrhagiae*	Icterohaemorrhagiae	Verdun
18	<i>L. weilii</i>	Celledoni	ND	2011/01963
19	<i>L. interrogans</i>	Djasiman	Djasiman	Djasiman
20	<i>L. borgpetersenii</i>	Mini	ND	2008/01925
21	<i>L. weilii</i>	Sarmin	Sarmin	Sarmin
22	<i>L. santarosai</i>	Shermani	Shermani	1342 K
23	<i>L. borgpetersenii</i>	Javanica	Javanica	Poi
24	<i>L. noguchii</i>	Louisiana	Louisiana	LUC1945

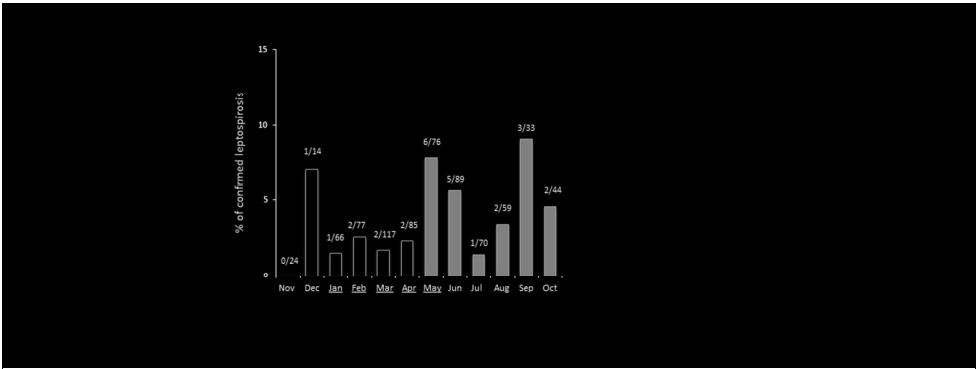
269 ND: Not determined

270 *Serogroups tested in the Montpellier CHU laboratory and National Reference Center at
 271 Pasteur Institute.

272



254x190mm (96 x 96 DPI)



338x190mm (96 x 96 DPI)

Review

3. Détection de virus de l'herpès et de *Mycobacterium tuberculosis* dans le liquide céphalo-rachidien chez les patients suspect de méningite aseptique au Burkina Faso, en Afrique de l'Ouest

Article 3

Sylvie ZIDA, Pratt Kolia-Diafouka, Dramane Kania, Albert Sotto, Vincent Foulongne, Karine Bolloré, Soumeiya Ouangraoua, Philippe Van De Perre, Edouard Tuailon. Mise au point d'une PCR duplex en temps réel et détection de herpès simplex virus (HSV) et *Mycobacterium tuberculosis* chez des patients suspects de méningite aseptique au Burkina Faso. [Non soumis]

La méningite aseptique est définie comme le syndrome clinique d'une inflammation méningée associé à des cultures négatives pour les pathogènes bactériens usuels chez un patient qui n'a pas reçu d'antibiotiques avant la ponction lombaire. De nombreux agent étiologiques peuvent être impliqués dans les méningites aseptiques, dont certains comme *Mycobacterium tuberculosis* ou l'herpès simplex virus (HSV) nécessitent un traitement spécifique.

En Afrique subsaharienne, on connaît très peu la prévalence de HSV et *Mycobacterium tuberculosis* comme causes de la méningite aseptique. Plus particulièrement au Burkina Faso, il n'y a pas de publications sur l'étiologie des méningites aseptiques par manque d'outils de diagnostic. Nous nous sommes intéressés à la méningite liée au virus HSV1 et 2 et à *M. tuberculosis* qui sont des causes sérieuses et curables de la méningite.

L'objectif donc de cette étude était de développer sur plateforme ouverte de PCR une qPCR duplex qui détecte à la fois HSV1 / HSV 2 et *M. tuberculosis* et d'évaluer la prévalence du HSV et de *M. tuberculosis* dans une collection d'échantillons de liquide céphalo-rachidien (CSF) au Burkina Faso. Pour HSV, les amorces et les sondes ont été conçues sur une séquence commune pour les virus de type 1 et 2 dans une zone hautement conservée du gène UL29. Pour *M. tuberculosis*, nous avons ciblé le gène IS6110 et avons conçu les amorces et la sonde propres au complexe tuberculosis. La limite de détection pour HSV1 / HSV2 et *M. tuberculosis* a été déterminée à l'aide de

dilutions sérielles d'échantillons reconstitués à partir d'ADN *M. tuberculosis* et HSV de concentrations connues. Dans un premier temps nous avons évalué les performances analytiques pour chacun des paramètres : spécificité, la variabilité intra et inter-test du test duplex qPCR. Les échantillons CSF testés dans l'étude ont été recueillis entre 2014 et 2015 chez des patients présentant des signes cliniques de méningite mais sans microorganisme sur la coloration Gram et sur la culture de routine et la PCR. L'extraction de l'ADN a été faite à partir de 200 µl de chaque échantillon avec 20% de Chelex (Bio-Rad, 100 Résine N ° 1432832). Les tests duplex qPCR ont été effectués en utilisant les instruments PCR en temps réel utilisant ABI 7500 au Burkina Faso et Light Cycler 480 en France.

La technique était très spécifique, sensible et reproductible. La concentration d'ADN la plus faible donnant un signal de détection de 100% a été estimée à 2,45 copies / µl pour HSV1, 1,72 / µl pour HSV2 et 2,54 copies / µl pour *M. tuberculosis* sur la base d'une analyse Probit de la LOD. Dans un deuxième temps nous avons conduit une étude exploratoire sur des échantillons adressés au Centre Muraz. Au total, 203 échantillons de patients suspects de méningite aseptique ont été testés. Parmi ceux-ci, 197/203 (97,52%) étaient négatifs pour HSV et *M. tuberculosis*, 2/203 (0,99%) étaient positifs pour HSV et 3/203 (1,47%) étaient positifs pour *M. tuberculosis*. Par conséquent, un total de 5 (2,46%) cas suspects de méningite aseptique confirmés ont été identifiés.

Le test de PCR duplex a été développé pour l'amplification simultanée des virus HSV1 / HSV2 et *M. tuberculosis* dans le LCR. Ce test, qui a été utilisé dans des conditions de routine pourrait être d'un grand intérêt en pratique car il permet la détection concomitante avec un seul couple d'amorce de HSV 1 et HSV 2. Nos résultats montrent que le virus de l'herpès simplex et *M. tuberculosis* sont impliqués dans des cas de méningites aseptiques au Burkina Faso. Il est crucial d'améliorer la disponibilité des anti-herpétiques par voie systémique. L'acyclovir en poudre injectable fait partie des médicaments considérés comme essentiels par l'OMS mais il n'est pas disponible en pratique au Burkina Faso. A la condition d'une meilleure disponibilité de certains médicaments essentiels, l'implémentation d'outils moléculaires capables de faire du diagnostic syndromique des infections curables permettrait sans aucun doute de sauver des vies.

TITLE PAGE

Combined testing for Herpes Simplex Virus and *Mycobacterium tuberculosis* DNA in cerebrospinal fluid of patients with aseptic meningitis in Burkina Faso, West Africa

Sylvie Zida^{1,2}, Pratt Kolia-Diafouka¹, Dramane Kania², Albert Sotto³, Vincent Foulongne¹,
Karine Bolloré¹, Soumeiya Ouangraoua², Nicolas Méda⁴, Séverine Carrère-Kremer¹, Philippe
Van de Perre¹, Edouard Tuaillon¹

1 UMR 1058 INSERM/EFS/Université de Montpellier, France;

2 Centre MURAZ, Bobo Dioulasso, Burkina Faso;

3 INSERM, ERI 26, Nîmes, France

4 Ministère de la santé, Burkina Faso

Corresponding author: Sylvie Zida

E-mail address: zida_sylvie@yahoo.fr

Phone number: +22670262708

Acknowledgments

S Z was recipient of a PhD fellowship funding from the Mediterranean Infection Foundation (IHU Méditerranée Infection).

The authors acknowledge Yalgado Ouédraogo University Hospital Center, Charles de Gaulle University Hospital Center, Sourou Sanou University Hospital Center, and National Public Health Laboratory for their contribution to the collection of cerebrospinal fluid samples.

Abstract

Background: Little is known about the involvement of Herpes Simplex (HSV) or *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) as potentially curable causes of central nervous system (CNS) infections in Sub-Saharan Africa.

Objective: In this study we developed a PCR assay dedicated to simultaneous testing of HSV1/2 and MTB in Burkina Faso, a country where HSV is neglected as a cause of CNS infection and where TB prevalence is high.

Methods: A consensus HSV-1 and 2 set of primers and probe were designed and combined to primers and probe targeting the IS6110 repetitive insertion sequence of MTB. Analytical performances of the assay were evaluated on reference materials. Cerebrospinal fluid (CSF) collected from subjects with aseptic meningitis were tested for HSV1/2 and MTB DNA.

Results: The U29 gene was chosen as a highly conserved region targeted by the HSV1/2 nucleic acid test. The lower limits of detection estimated to 2.45 copies/μl for HSV-1, 1.72 copies/μl for HSV-2, and 2.54 IS6110 copies per μl for MTB. The PCR was used in 202 CSF collected from subjects suspected of aseptic meningitis. Five samples (2.46%) tested positive, including two children positive for HSV-1 (0.99%) and three adults tested positive for MTB (1.47%).

Conclusion: Using an in-house real time PCR assay, we showed that both HSV and MTB are etiologic pathogens contributing to aseptic meningitis in Burkina Faso. This molecular test may have clinical utility for early diagnosis for those treatable CNS infections.

Keywords: PCR; Herpes simplex virus; *Mycobacterium tuberculosis*; Cerebrospinal fluid; Meningitis.

TEXT

Introduction

Infections of the central nervous system (CNS) are responsible for approximately 530,000 deaths throughout the world each year [1]. Patients with clinical and laboratory evidences for CNS infections but in whom common bacterial agents cannot be identified by conventional bacterial culture in the cerebrospinal fluid (CSF) can be considered as having aseptic meningitis and/or encephalitis. Clinical presentation of aseptic meningitis and of bacterial meningitis are

similar whereas encephalitis manifests with altered cognition, seizures and focal neurological dysfunction. The distinction between aseptic meningitis and encephalitis may be difficult since patients may have both signs of meningitis and altered mental status with sensory deficit. The clinical presentation of the different types of CNS infections may be nonspecific and can overlap, but viral meningitis is usually less severe, whereas viral encephalitis and bacterial meningitis are associated with a significant mortality. Viruses including those from the Herpesviridae family are the most common cause of acute aseptic inflammation of meninges and brain [2–6]. Among them, Herpes simplex virus (HSV) is regularly reported as a current and severe cause of encephalitis in high incomes countries. Other pathogens associated with meningitis and meningoencephalitis include *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) [7] which is responsible for a particularly deadly and disabling form of meningitis [8].

In African settings, aseptic meningitis is thought to be common, but the relative contribution of potential etiologic pathogens remain largely unexplored [9]. In countries located in the "meningitis belt" such as Burkina Faso, CSF samples are generally tested for the three main causative bacteria *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by culture, antigen detection and PCR [10,11]. However, only about a quarter of suspected cases are laboratory-confirmed these tests [12]. Little is known about the prevalence of HSV and MTB as agents responsible for severe but potentially curable aseptic meningoencephalitis in sub-Saharan Africa [13,14]. Identification of MTB and HSV in CSF is important since a specific chemotherapy is required for these pathogens.

The purpose of the present study was to improve the laboratory diagnosis of HSV-1/2 and MTB using an in-house duplex nucleic acid assay and to screen CSF samples collected from febrile patients clinically suspected of CNS infections in Burkina Faso.

Material and Methods

Standards, controls and clinical specimens

World Health Organization (WHO) international control for Human Herpes Simplex virus type 1 and 2 was obtained from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC; Hertfordshire, United Kingdom, product number 08/224-005 and 08/226-005, respectively). *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) strain were obtained from the Montpellier Infectiology Research Institute (IRIM, Montpellier, France). The target sequence of the MTB PCR assay is the IS6110, present in a single copy in BCG but in an average of 10 reiterations in MTB strains [15].

A total of 202 archived clinical CSF samples collected between 2014 and 2015 in the context of the nationwide meningitis surveillance in Burkina Faso (Centre Muraz, Bobo-Dioulasso) from patients with meningitis symptoms were tested for HSV and MTB DNA. Criteria for inclusion were a CSF white cell count >5 cells/ mm³, negative CSF Gram stain, negative routine culture using, negative meningococcal PCR, negative latex agglutination assays for *Neisseria meningitidis*, A, B/E coli K1, C, Y/W 135; *Haemophilus influenzae* Type b; *Streptococcus pneumoniae*; and group B streptococci (kit Pastorex Meningitis; Bio-Rad) [16]. All samples were anonymized and stored at -20 °C.

DNA extraction

DNA extraction was performed using Chelex-100® (Bio-Rad, 100 Resin #1432832), as previously reported [17,18]. This method chelates cations including Mg²⁺, which is an essential cofactor for DNases, preserving the DNA released after lysis of bacterial wall. This method was previously used for mycobacterial and HSV DNA extraction from CSF samples [18,19]. In this procedure, 200 µl of CSF samples was added with 100 µl of 20% of a Chelex-100 suspension prepared in molecular water and mix vigorously. The suspension was heated for 20 min at 95°C. The boiled mixture was centrifuged to pellet out the Chelex-100 resin and the supernatant was retained for PCR. Extracted DNA was kept at -20°C until PCR testing.

Real time PCR duplex

Primers and a probe were design using the PRIMER 3 PLUS software. HSV 1 and 2 published sequences were analyzed using BLAST software sequence alignment tool to identify a single set of primers and a probe for both HSV type 1 and 2. Primers and probe for MTB nucleic acid test were designed within the IS6110 insertion sequence. The IS6110 gene is a multiple repeated sequence frequently used for in-house and commercial MTB PCR methods [20–23]. The amplified DNA sequences were a 66 bp region of the IS6110 insertion elements which occur most of the time in multiple copies in the MTB genome [24]. For each PCR, 5µl of DNA extract was added to 15µl of master mixture incorporating: 1.6 µl of HSV forward and reverse primers at 10 µM, 0.4 µl of probe (FAM – TAMRA) at 10 µM, 1.2 µl of MTB IS6110 forward and reverse primers at 10 µM, 0.6 µl of ISP probe (Cy5 – BHQ2) at 10 µM, 4 µl of 5X TaqMan Master Mix (Omunis, Clapiers), 0.8 µl of DMSO and 6.4 µl of RNase/DNase-free water. Reaction consisted of 2 min at 50°C, 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 15 s at 95°C and 1 min at 60°C each. The duplex PCR assays were performed using a Light Cycler 480 II Real-

Time PCR Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and amplification data were analyzed using the Light Cycler 480 Software (Roche Diagnostics). All samples tested positive for HSV using the duplex PCR were tested by the RealStar® HSV PCR Kit 1.0 (Altona Diagnostics) to discriminate HSV type 1 versus 2 on the same apparatus.

Determination of the analytical performance of duplex PCR

The limits of detection (LOD) for HSV1/HSV2 and MTB were determined using serial concentrations of HSV 1 and 2 and BCG in at least 10 separate runs. The linearity of duplex quantitative polymerase chain reaction (PCR) technique was established by testing in 24 separate PCR-runs performed on serial dilution of the DNA samples ranging from 6.05×10^5 to 6.05×10^1 copies/ μ l for HSV1, 9.27×10^3 to 9.27 copies/ μ l for HSV2, and 3.42×10^5 to 3.42×10^1 genomic copies for MTB. Intra-assay variability of duplex PCR assay was assessed by analyzing a single PCR-run with nine replicates of the same serial concentrations of HSV1, HSV2, and BCG DNA. The inter-assay variability of duplex PCR technique was evaluated with two different operators measured five times on separate PCR-runs. Duplex PCR assay specificity was assessed by testing 24 negative CSF samples including 2 HBV-DNA positive samples, 2 HIV-RNA positive samples, 2 Enterovirus positive RNA samples, 2 Leptospire DNA positive samples, 2 *Neisseria meningitidis* DNA samples, 2 *Streptococcus pneumoniae* DNA samples, and 2 *Haemophilus influenzae* DNA samples.

Statistical analysis Data

HSV1/HSV2 and MTB DNA concentrations were converted to Log₁₀ values before performing statistical analysis. The LOD was defined as the lowest DNA load detected in 95% of the times. The probit regression analysis performed on SPSS was used to determine the LOD. Coefficient of variation $[(SD/Means) \times 100]$; SD, the standard deviation) was calculated to estimate intra-assay and inter-assay variabilities. Continuous variables were described as median and inter-quartile range (IQR).

Results

Design of HSV1/2 set of primers and probe

HSV UL47, UL40, UL35, UL29, and UL15 were identified as highly conserved HSV genes, and among them a target sequence nested in UL29 was selected. UL29 HSV-1 and HSV-2 percentage of homology is 52%, and 100% in the PCR target sequence. Primers allowed amplification of a 121 nucleic acid sequence (Table 1).

Analytical performance of the duplex PCR assays

Using serial concentrations on repeated runs, the lowest DNA concentration giving 95% detection signal was 2.45 HSV1 DNA copies/ μ l (95% confidence interval [CI]: 1.46 – 3.88) (Fig2A), 1.72 HSV2 DNA copies/ μ l (95%CI: 1.65 - 1.88) for HSV2. The LOD of MTB PCR was 2.54 IS6110 copies/ μ l (95%CI: 2.01 - 2.34) (Fig2B). Good linearity of the measures was observed with coefficients of determination $R^2=0.9999$ (60.5 to 650000 copies/ μ l) for HSV1 (Fig. 1A), $R^2=0.9989$ (9.27 to 9270 copies/ μ l) for HSV2 (Fig. 1B) and $R^2=1$ (34.2 to 342000 copies/ μ l) for MTB (Fig. 1C). The coefficients of intra-run and inter-run variation for each target with serial concentration are represented in Table 2. All 24 negative samples tested were found negative for HSV1/2 and MTB, conferring an analytical specificity of 100% (CI: 87.7-100) for the duplex PCR.

HSV1/2 and MTB testing in CSF from patients with suspected meningitis

A total of 202 CSF samples collected from patients with aseptic meningitis were tested for HSV and MTB DNA (table 3). Sixty five percent (65.8%) of the subjects were aged below 16 years old. CSF cellularity was most of the time moderately elevated with a median (IQR) of 17 (8 – 67.75) cells/mm³.

Five out of 202 CSF samples (2.46%) were tested positive using the HSV/MTB PCR. Two CSF (0.99%) were tested positive for HSV DNA, and three (1.47%) were tested positive for MTB DNA. The two HSV positive CSF were confirmed positive for HSV type 1. These samples were collected from two children aged of 2 years and presenting paucicellular CSF. The three samples positive for MTB had been collected from young adults and exhibited higher cellularity ranging from 54 to 551 cells per mm³ (Table 3).

Discussion

Meningitis is an important health problem in Sub-Saharan countries. In Burkina Faso meningitis accounts for 4% of all death representing the 7th most frequent cause of death [25]. Only a quarter of suspected meningitis cases with CSF were laboratory-confirmed as either *S. pneumoniae*, *N. meningitidis* or *H. influenza* [12]. Rapid and accurate diagnosis is mandatory to allowing prompt and appropriate care improving the clinical prognosis and minimizing debilitating sequelae. Furthermore, identification of the causative infectious agents yields valuable epidemiological information. Due to its speed, sensitivity and specificity, the PCR method is now being established as a diagnostic tool of growing potential for the diagnosis of aseptic meningitis and encephalitis [26,27].

In the first phase of this study, the analytical performance of the PCR was determined using HSV standards and BCG strain. UL29 (ICP8) chosen as a highly conserved HSV gene is a single-stranded linear DNA binding protein involved in the initiation of HSV replication [28,29]. The assay demonstrated a limit of detection around 2 copies/μl for HSV-1/2 and 2.5 IS6110 copies/μl for MTB. Taking into account a median number of ten IS6110 copies per bacteria, the analytical sensitivity of the PCR can be estimated around 250 copies of MTB/ml. The sensitivity of the assay for HSV DNA were comparable to others HSV nucleic acid tests [30,31] and probably sufficient to detect most of the HSV CNS infections regarding viral load generally observed in CSF [32]. However, a better sensitivity for HSV detection, able to detect less than 500 to 200 HSV DNA copies/ml, would be preferable to detect some of the specimens with low HSV DNA concentration [33]. The cation exchanger Chelex 100, requires less than an hour for DNA extraction and is especially inexpensive.

In the second phase of the evaluation, we explored HSV and MTB as pathogenic agents possibly involved in severe aseptic meningitis in a setting where HSV is neglected as a cause of CNS infection and TB prevalence is high.

Two children aged two years were tested positive for HSV in the CSF and confirmed HSV-1. HSV-1 and HSV-2 are important causes of CNS infections particularly among children and immunocompromised patients. HSV induce a large spectrum of presentation: meningitis, myelitis, radiculitis and encephalitis that is associated with a mortality estimated to 70% in absence of acyclovir/valacyclovir treatment [34]. HSV-1 was identified in CSF collected from 2 to 4% of adults and children with aseptic meningitis or encephalitis from Malawi [35] and Sudan [36]. In a prospective study conducted in Malawian children with suspected viral CNS infection, HSV-1 was detected in 8 out of 513 cases (1.5%) [37]. A similar study conducted in Bonn University Hospital, Bonn, Germany reported a prevalence of 0.3% for HSV [38]. Other

studies reported a prevalence of 1.5% for HSV-1 in Korea [39], 1.4% in Georgia [40]. HSV-1 were also reported in 3.4 and 6.5% in two studies conducted in adults living in Vietnam [41,42]. Children are probably affected by HSV CNS infection during primary infection whereas HSV reactivation are involved in adults. HSV-2 was not detected in our study but HSV-2 has been reported has a cause of recurrent aseptic meningitis in immunosuppressed individuals [43–45]. Regarding MTB, the proportion of aseptic meningitis attributable to this pathogen is thought to vary by location according to the overall frequencies of tuberculosis and HIV [8]. Tuberculous meningitis remains an important cause of death in young children and immunocompromised adults living in endemic areas. The highest rates were observed in South Africa with up to 30% of all adult meningitis [46–48].

In a recent study in Uganda, a diagnosis of tuberculous meningitis was confirmed in 4% of children suspected of meningitis [49]. Data are missing in West African countries where HIV prevalence is lower. The prevalence of MTB observed in our study (1.5%) is close to a report from Niger where 1.9% of confirmed cases of bacterial meningitis were caused by MTB [50]. Multiplex assays for diagnosis of meningitis are commercially available, e.g., BioFire [51,52], SeeGene [53] and Fast Track diagnostics [54], Clart Entherpex Genomica [30]. Panels used in these three assays include HSV1 and 2 but not MTB. BioFire and SeeGene panels include *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis* testing that is requested in Africa, whereas a separate bacterial panel is needed with the Fast – Track kits to test these pathogens. Furthermore, some assays cannot be performed on open and polyvalent PCR platform, hence a dedicated automated apparatus is needed for the BioFire assay and SeeGene used a specific microchip electrophoresis system. The implementation of these syndromic diagnostics tests has just started but cost of the tests remains one of the limitations for a large scale up in routine.

The results presented here show a highly specific, sensitive and reproducible duplex PCR assay using a fast, simple and reliable DNA extraction method for the detection of HSV 1/ 2 and MTB. This one-step assay can be easily implemented in the clinical laboratory equipped with open and polyvalent real time PCR apparatus. The assay can also be used as a screening tool when large numbers of samples need to be tested, such as for epidemiological studies.

Aseptic meningitis caused by HSV or MTB diagnosed by a molecular test constituted only a small proportion of the CSF samples in our setting. The high proportion of cases meeting the criteria for aseptic meningitis and without etiologies may be due to enteroviruses which represent the most common etiological agents of aseptic meningitis in high income countries [55–57] and arbovirus. Consensus enterovirus primers may be included in the stepwise

improved format of our multiplex assay. In addition, cases of TB infections have been possibly missed since the performances of MTB PCR assays are not optimal for the diagnosis of tuberculous meningitis [58].

Conclusion

In this study, we developed a dual PCR dedicated to HSV1/2 - MTB detection. Our results show that HSV and MTB are etiologic agents of aseptic meningitis in Burkina Faso and this molecular tool used under routine conditions have the potential to facilitate early detection and treatment.

Conflicts of interest:

On behalf of all authors, the corresponding author states that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. Wang H, Naghavi M, Allen C, Barber RM, Bhutta ZA, Carter A, et al. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*. 2016;388:1459–544.
2. Thwaites G, Chau TT, Mai NT, Drobniewski F, McAdam K, Farrar J. Tuberculous meningitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2000;68:289–99.
3. de Almeida SM, Nogueira MB, Raboni SM, Vidal LR. Laboratorial diagnosis of lymphocytic meningitis. *Braz J Infect Dis Off Publ Braz Soc Infect Dis*. 2007;11:489–95.
4. Mourvillier B, Wolff M. [Infectious meningitis and meningo-encephalitis in the adult]. *Rev Prat*. 2006;56:1927–32.
5. Alistair Lammie G, Hewlett R, Schoeman J, R Donald P. Tuberculous cerebrovascular disease: A review. 2009.
6. Khatami A, Pollard AJ. The epidemiology of meningococcal disease and the impact of vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9:285–98.
7. Irani DN. Aseptic meningitis and viral myelitis. *Neurol Clin*. 2008;26:635–55, vii–viii.

285 8. Wilkinson RJ, Rohlwink U, Misra UK, van Crevel R, Mai NTH, Dooley KE, et al.
286 Tuberculous meningitis. *Nat Rev Neurol*. 2017;13:581–98.

287 9. Rotbart HA. Enteroviral infections of the central nervous system. *Clin Infect Dis Off Publ*
288 *Infect Dis Soc Am*. 1995;20:971–81.

289 10. Parent du Châtelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Naccro B, Njanpop-Lafourcade
290 B-M, et al. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase
291 chain reaction testing. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2005;40:17–25.

292 11. Yaro S, Lourd M, Traoré Y, Njanpop-Lafourcade B-M, Sawadogo A, Sangare L, et al.
293 Epidemiological and molecular characteristics of a highly lethal pneumococcal meningitis
294 epidemic in Burkina Faso. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2006;43:693–700.

295 12. Diallo AO, Soeters HM, Yameogo I, Sawadogo G, Aké F, Lingani C, et al. Bacterial
296 meningitis epidemiology and return of *Neisseria meningitidis* serogroup A cases in Burkina
297 Faso in the five years following MenAfriVac mass vaccination campaign. *PloS One*.
298 2017;12:e0187466.

299 13. Kim S-H, Cho O-H, Park S-J, Lee EM, Kim M-N, Lee S-O, et al. Rapid diagnosis of
300 tuberculous meningitis by T cell-based assays on peripheral blood and cerebrospinal fluid
301 mononuclear cells. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2010;50:1349–58.

302 14. James SH, Kimberlin DW, Whitley RJ. Antiviral Therapy for Herpesvirus Central Nervous
303 System Infections: Neonatal Herpes Simplex Virus Infection, Herpes Simplex Encephalitis, and
304 Congenital Cytomegalovirus Infection. *Antiviral Res*. 2009;83:207–13.

305 15. Tanaka MM, Rosenberg NA, Small PM. The control of copy number of IS6110 in
306 *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Biol Evol*. 2004;21:2195–201.

307 16. Thwaites GE, van Toorn R, Schoeman J. Tuberculous meningitis: more questions, still too
308 few answers. *Lancet Neurol*. 2013;12:999–1010.

309 17. Tapiainen T, Prevots R, Izurieta HS, Abramson J, Bilynsky R, Bonhoeffer J, et al. Aseptic
310 meningitis: case definition and guidelines for collection, analysis and presentation of
311 immunization safety data. *Vaccine*. 2007;25:5793–802.

- 312 18. Nagdev KJ, Kashyap RS, Deshpande PS, Purohit HJ, Taori GM, Dagainawala HF.
313 Determination of polymerase chain reaction efficiency for diagnosis of tuberculous meningitis
314 in Chelex-100 extracted DNA samples. *Int J Tuberc Lung Dis Off J Int Union Tuberc Lung*
315 *Dis.* 2010;14:1032–8.
- 316 19. Kessler HH, Mühlbauer G, Rinner B, Stelzl E, Berger A, Dörr HW, et al. Detection of
317 Herpes simplex virus DNA by real-time PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38:2638–42.
- 318 20. Thierry D, Brisson-Noël A, Vincent-Lévy-Frébault V, Nguyen S, Guesdon JL, Gicquel B.
319 Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its
320 application in diagnosis. *J Clin Microbiol.* 1990;28:2668–73.
- 321 21. Deshpande PS, Kashyap RS, Ramteke SS, Nagdev KJ, Purohit HJ, Taori GM, et al.
322 Evaluation of the IS6110 PCR assay for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis.
323 *Cerebrospinal Fluid Res.* 2007;4:10.
- 324 22. Mazurek GH, Cave MD, Eisenach KD, Wallace RJ, Bates JH, Crawford JT. Chromosomal
325 DNA fingerprint patterns produced with IS6110 as strain-specific markers for epidemiologic
326 study of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 1991;29:2030–3.
- 327 23. Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, et al. A systematic review
328 of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess*
329 *Winch Engl.* 2007;11:1–196.
- 330 24. McEvoy CRE, Falmer AA, Gey van Pittius NC, Victor TC, van Helden PD, Warren RM.
331 The role of IS6110 in the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc Edinb Scotl.*
332 2007;87:393–404.
- 333 25. Country statistics and global health estimates by WHO and UN partner: Burkina Faso WHO
334 statistical profil [Internet]. 2015 Jan. Available from:
335 <http://www.who.int/gho/countries/bfa.pdf?ua=1>
- 336 26. Lee BW, Tan JA, Wong SC, Tan CB, Yap HK, Low PS, et al. DNA amplification by the
337 polymerase chain reaction for the rapid diagnosis of tuberculous meningitis. Comparison of
338 protocols involving three mycobacterial DNA sequences, IS6110, 65 kDa antigen, and MPB64.
339 *J Neurol Sci.* 1994;123:173–9.

- 340 27. Lakeman FD, Whitley RJ. Diagnosis of herpes simplex encephalitis: application of
341 polymerase chain reaction to cerebrospinal fluid from brain-biopsied patients and correlation
342 with disease. National Institute of Allergy and Infectious Diseases Collaborative Antiviral
343 Study Group. *J Infect Dis.* 1995;171:857–63.
- 344 28. Szpara ML, Gatherer D, Ochoa A, Greenbaum B, Dolan A, Bowden RJ, et al. Evolution
345 and Diversity in Human Herpes Simplex Virus Genomes. *J Virol.* 2014;88:1209–27.
- 346 29. Aguilar JS, Devi-Rao GV, Rice MK, Sunabe J, Ghazal P, Wagner EK. Quantitative
347 comparison of the HSV-1 and HSV-2 transcriptomes using DNA microarray analysis.
348 *Virology.* 2006;348:233–41.
- 349 30. Leveque N, Van Haecke A, Renois F, Boutolleau D, Talmud D, Andreoletti L. Rapid
350 virological diagnosis of central nervous system infections by use of a multiplex reverse
351 transcription-PCR DNA microarray. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3874–9.
- 352 31. Rodrigues D, de-Paris F, Paiva RM. Minimum detection limit of an in-house nested-PCR
353 assay for herpes simplex virus and varicella zoster virus. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2013;46:625–
354 8.
- 355 32. Schloss L, Falk KI, Skoog E, Brytting M, Linde A, Aurelius E. Monitoring of herpes
356 simplex virus DNA types 1 and 2 viral load in cerebrospinal fluid by real-time PCR in patients
357 with herpes simplex encephalitis. *J Med Virol.* 2009;81:1432–7.
- 358 33. Pillet S, Verhoeven PO, Epercieux A, Bourlet T, Pozzetto B. Development and Validation
359 of a Laboratory-Developed Multiplex Real-Time PCR Assay on the BD Max System for
360 Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus DNA in Various Clinical
361 Specimens. *J Clin Microbiol.* 2015;53:1921–6.
- 362 34. Alford CA, Dolin R, Hirsch MS, Karchmer AW, Whitley RJ. Herpes simplex encephalitis
363 and clinical trial design. *Lancet Lond Engl.* 1982;1:1013.
- 364 35. Benjamin LA, Kelly M, Cohen D, Neuhaan F, Galbraith S, Mallewa M, et al. Detection of
365 herpes viruses in the cerebrospinal fluid of adults with suspected viral meningitis in Malawi.
366 *Infection.* 2013;41:27–31.

- 367 36. El-Amin EO, Elbashir MIH, Elamin OE, Mukhtar Y, Abdo H, Abdul-Rahman I, et al. The
368 underlying aetiologies of coma in febrile Sudanese children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*
369 2013;107:307–12.
- 370 37. Mallewa M, Vallely P, Faragher B, Banda D, Klapper P, Mukaka M, et al. Viral CNS
371 infections in children from a malaria-endemic area of Malawi: a prospective cohort study.
372 *Lancet Glob Health.* 2013;1:e153–60.
- 373 38. Archimbaud C, Chambon M, Bailly JL, Petit I, Henquell C, Mirand A, et al. Impact of rapid
374 enterovirus molecular diagnosis on the management of infants, children, and adults with aseptic
375 meningitis. *J Med Virol.* 2009;81:42–8.
- 376 39. Vollbach S, Müller A, Drexler JF, Simon A, Drosten C, Eis-Hübinger AM, et al. Prevalence,
377 type and concentration of human enterovirus and parechovirus in cerebrospinal fluid samples
378 of pediatric patients over a 10-year period: a retrospective study. *Virol J* [Internet]. 2015 [cited
379 2018 Apr 4];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4660665/>
- 380 40. Akhvlediani T, Bautista CT, Shakarishvili R, Tsertsvadze T, Imnadze P, Tatishvili N, et al.
381 Etiologic Agents of Central Nervous System Infections among Febrile Hospitalized Patients in
382 the Country of Georgia. *PLoS ONE* [Internet]. 2014 [cited 2018 Apr 4];9. Available from:
383 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4219716/>
- 384 41. Taylor WR, Nguyen K, Nguyen D, Nguyen H, Horby P, Nguyen HL, et al. The Spectrum
385 of Central Nervous System Infections in an Adult Referral Hospital in Hanoi, Vietnam. *PLoS*
386 *ONE* [Internet]. 2012 [cited 2018 Apr 4];7. Available from:
387 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3431395/>
- 388 42. Tan LV, Thai LH, Phu NH, Nghia HDT, Chuong LV, Sinh DX, et al. Viral Aetiology of
389 Central Nervous System Infections in Adults Admitted to a Tertiary Referral Hospital in
390 Southern Vietnam over 12 Years. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:e3127.
- 391 43. Choi R, Kim G-M, Jo IJ, Sim MS, Song KJ, Kim BJ, et al. Incidence and clinical features
392 of herpes simplex viruses (1 and 2) and varicella-zoster virus infections in an adult Korean
393 population with aseptic meningitis or encephalitis. *J Med Virol.* 2014;86:957–62.

394 44. Franzen-Röhl E, Tiveljung-Lindell A, Grillner L, Aurelius E. Increased Detection Rate in
395 Diagnosis of Herpes Simplex Virus Type 2 Meningitis by Real-Time PCR Using Cerebrospinal
396 Fluid Samples. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2516–20.

397 45. Forsgren M, Sköldenberg B, Aurelius E, Gille E. Neurologic Morbidity after Herpes
398 Simplex Virus Type 2 Meningitis: A Retrospective Study of 40 Patients. *Scand J Infect Dis.*
399 2002;34:278–83.

400 46. Schutte CM, Van der Meyden CH, Magazi DS. The impact of HIV on meningitis as seen at
401 a South African Academic Hospital (1994 to 1998). *Infection.* 2000;28:3–7.

402 47. Jarvis JN, Meintjes G, Williams A, Brown Y, Crede T, Harrison TS. Adult meningitis in a
403 setting of high HIV and TB prevalence: findings from 4961 suspected cases. *BMC Infect Dis.*
404 2010;10:67.

405 48. Nanoo A, Izu A, Ismail NA, Ihekweazu C, Abubakar I, Mametja D, et al. Nationwide and
406 regional incidence of microbiologically confirmed pulmonary tuberculosis in South Africa,
407 2004-12: a time series analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15:1066–76.

408 49. Page A-L, Boum Ii Y, Kemigisha E, Salez N, Nanjebe D, Langendorf C, et al. Aetiology
409 and Outcomes of Suspected Infections of the Central Nervous System in Children in Mbarara,
410 Uganda. *Sci Rep.* 2017;7:2728.

411 50. Mindadou H, Sidikou F, Boisier P, Chanteau S. [Prevalence of tuberculous meningitis in
412 Niamey's Hospital, Niger]. *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 2006;99:39–40.

413 51. Leber AL, Everhart K, Balada-Llasat J-M, Cullison J, Daly J, Holt S, et al. Multicenter
414 Evaluation of BioFire FilmArray Meningitis/Encephalitis Panel for Detection of Bacteria,
415 Viruses, and Yeast in Cerebrospinal Fluid Specimens. *J Clin Microbiol.* 2016;54:2251–61.

416 52. Hanson KE, Slechts ES, Killpack JA, Heyrend C, Lunt T, Daly JA, et al. Preclinical
417 Assessment of a Fully Automated Multiplex PCR Panel for Detection of Central Nervous
418 System Pathogens. *J Clin Microbiol.* 2016;54:785–7.

419 53. Shin SY, Kwon KC, Park JW, Kim JM, Shin SY, Koo SH. Evaluation of the Seeplex®
420 Meningitis ACE Detection kit for the detection of 12 common bacterial and viral pathogens of
421 acute meningitis. *Ann Lab Med.* 2012;32:44–9.

422 54. Walls T, McSweeney A, Anderson T, Jennings LC. Multiplex-PCR for the detection of
423 viruses in the CSF of infants and young children. J Med Virol. 2017;89:559–61.

424 55. Read SJ, Jeffery KJ, Bangham CR. Aseptic meningitis and encephalitis: the role of PCR in
425 the diagnostic laboratory. J Clin Microbiol. 1997;35:691–6.

426 56. Jarrin I, Sellier P, Lopes A, Morgand M, Makovec T, Delcey V, et al. Etiologies and
427 Management of Aseptic Meningitis in Patients Admitted to an Internal Medicine Department.
428 Medicine (Baltimore). 2016;95:e2372.

429 57. Dewan M, Zorc JJ, Hodinka RL, Shah SS. Cerebrospinal fluid enterovirus testing in infants
430 56 days or younger. Arch Pediatr Adolesc Med. 2010;164:824–30.

431 58. Solomons RS, van Elsland SL, Visser DH, Hoek KGP, Marais BJ, Schoeman JF, et al.
432 Commercial nucleic acid amplification tests in tuberculous meningitis--a meta-analysis. Diagn
433 Microbiol Infect Dis. 2014;78:398–403.

434

435 **Table 1** Description of primers and probes

Microorganisms	Primers sequence (5' 3')	Genome region amplified	Amplicon, bp
HSV1 / HSV2		UL29	121
Forward	AAGAGCCGCGTGTGTTC		
Reverse	GTCCGAGGAGGATGTCCA		
Probe	CCTACCAGAAGCCCGACAAG		
<i>M. tuberculosis</i>		IS6110	66
Forward	CATGTCCGGAGACTCCAGTT		
Reverse	GGTACCTCCTCGATGAACCA		
Probe	AAAGGATGGGGTCATGTCAG		

436

437

438

439

440

441

Table 2 Intra- and inter-assay results of PCR

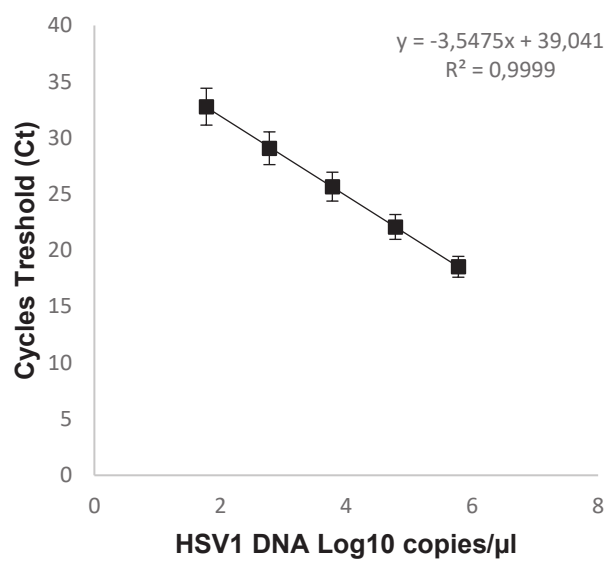
		%CV	
	DNA log ₁₀ copies/μl	Intra run	Inter run
HSV1			
Sample 1	4.78	0.42	2.03
Sample 3	3.78	0.24	1.66
Sample 3	2.78	0.29	1.40
Sample 4	1.78	0.79	0.76
HSV2			
Sample 1	2.96	0.38	1.08
Sample 2	1.96	0.86	0.5
Sample 3	0.96	0.77	1.41
<i>M. tuberculosis</i>			
Sample 1	4.53	1.49	2.01
Sample 2	3.53	1.86	1.52
Sample 3	2.53	0.59	2.29
Sample 4	1.53	0.86	1.14

Table 3 Demographics, CSF characteristics and detection of herpes viruses and MTB in 202 patients with suspected aseptic meningitis

Aetiology	Patient with diagnosis N ₀ (%) N=202	CSF WCC Cell/mm ³ (IQR)	Age Median (range)	Sex ratio H/F
HSV1	2	17 and 22	2 and 3	0/2
HSV2	0	-	-	-
<i>M.tuberculosis</i>	3	103 (54, 551)	26 (5 - 28)	3/0
Non-reactive	197	17 (8, 64)	7 (1 - 85)	1.13

IQR interquartile range, *WCC* white cell count, *CSF* cerebrospinal fluid.

449 a)

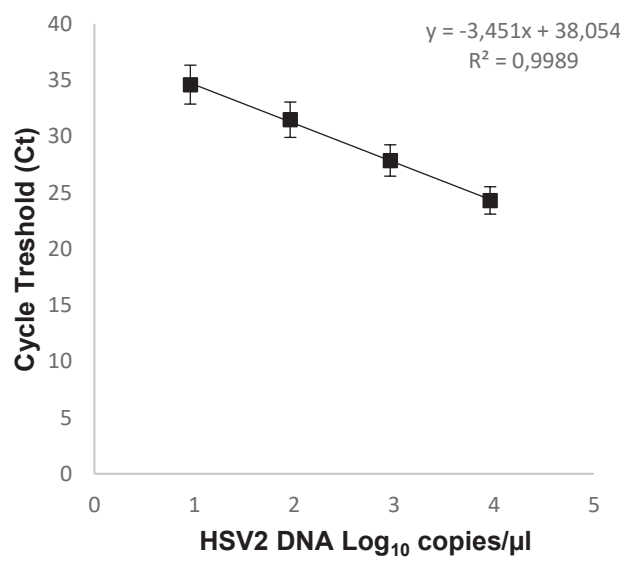


450

451

452 b)

453



454

455

456

457

458

459

460

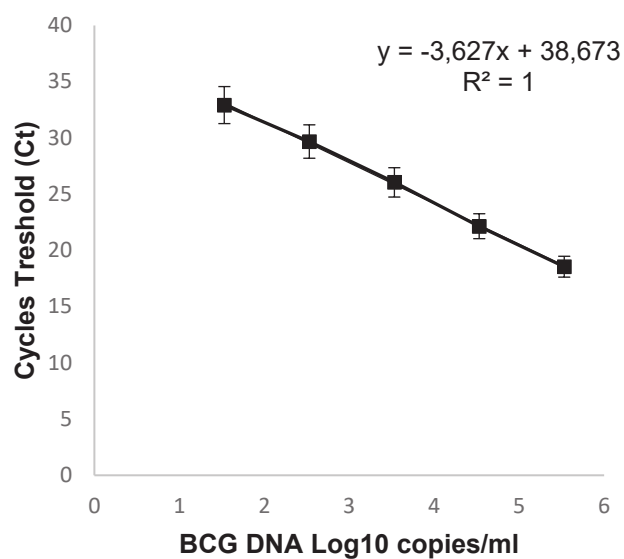
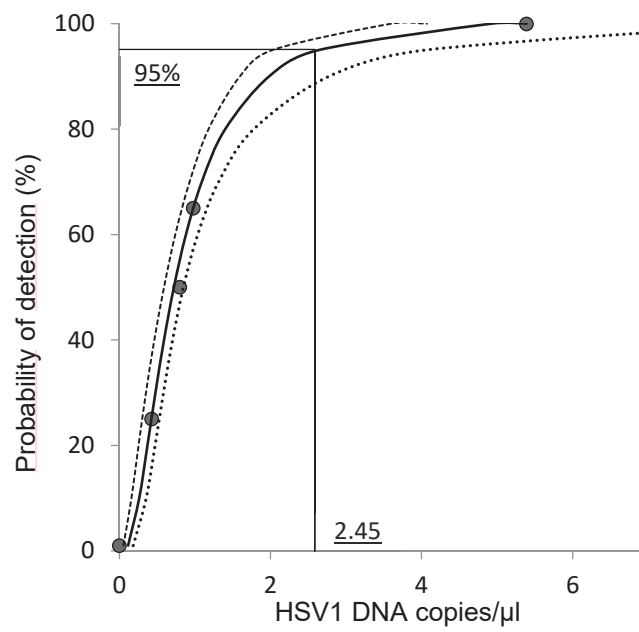
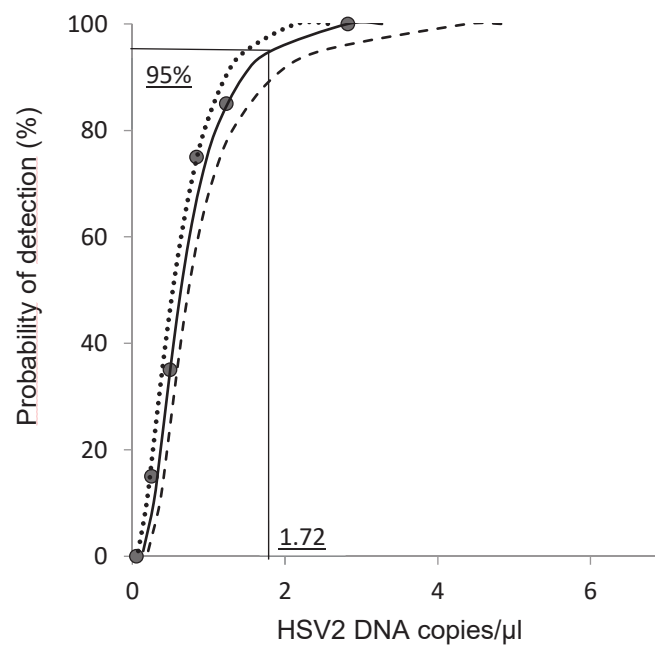


Fig. 1 Duplex HSV1/2 and *M. tuberculosis* PCR standard curves established by means of serial dilutions of DNA. The HSV1 standard curve is represented by (A), the HSV2 standard curve by (B) and the BCG DNA standard curve by (C).

a)



b)



c)

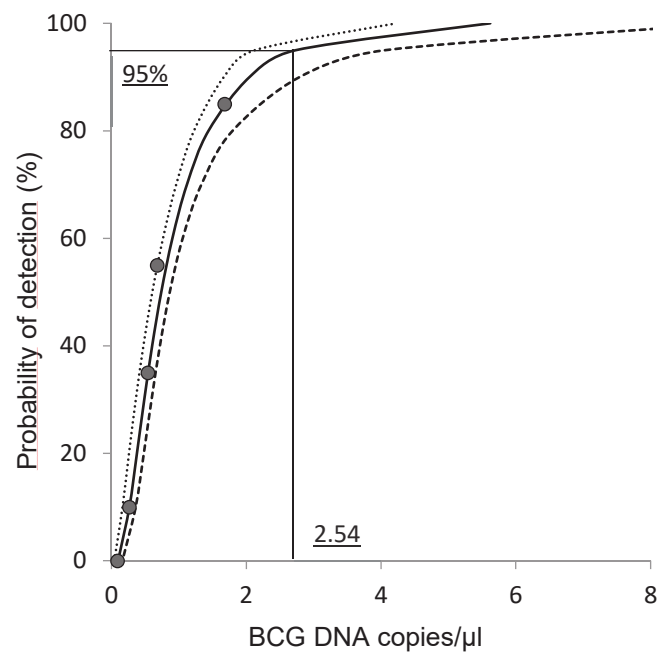


Fig. 2 Detection limits of the HSV1, HSV2 and IS61160 PCR assays. Curves were determined by probit analysis (95% probability detection). A) The LOD were estimated at 2.45 copies/μl for HSV1, B) 1.72 copies/μl for HSV2 , C) and 2.54 copies/μl for IS6110 using the BCG strain containing a single target copy of IS6110. Dashed lines show 95% confidence interval for the analysis.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre projet souligne les possibilités et l'importance de la mise en œuvre de nouvelles méthodes moléculaires pour fournir des données préliminaires sur le fardeau des maladies infectieuses, y compris la leptospirose, la tuberculose et la méningite à HSV au Burkina Faso. L'utilisation des DBS comme un spécimen alternatif facilite l'accès aux tests moléculaires mais nécessite des études de validation. Le coût modéré des tests sur plateformes ouvertes par rapport aux tests sur plateformes fermées (type Roche ou Abbott) et l'absence de restriction quant aux pathogènes recherchés permet d'augmenter l'accessibilité de la biologie moléculaire pour le diagnostic des maladies infectieuses en zone tropicale. Ces nouveaux tests sont une alternative aux trousseaux des leaders du marché et nous comptons poursuivre au Centre Muraz, le développement de tests pour d'autres pathogènes négligés et émergents qui ne sont pas pris en compte par les tests commerciaux usuels. En effet le Centre Muraz a une fonction de laboratoire spécialisé dans le diagnostic et la surveillance des maladies infectieuses y compris lorsqu'elles sont de diagnostic difficile (Ebola, diagnostic périnatal du VIH).

Concernant la leptospirose il est indispensable de poursuivre les efforts pour que les connaissances concernant cette infection négligée mais non reconnue comme telle par l'OMS progressent. Le travail nécessaire est considérable et consistera à identifier les réservoirs sauvages et domestiques, confirmer l'existence de cas sévères, identifier les activités à risque. Nous ne pouvons compter que sur des financements modestes pour ces travaux du fait de l'absence de prise de conscience du problème de santé publique que représente la leptospirose mais nous pouvons compter sur le dynamisme de la communauté des chercheurs qui travaillent sur cette pathologie. Nous avons pu constater la solidarité et la qualité de cette petite communauté scientifique notamment lors du meeting du GLEAN durant lequel nous avons présenté nos travaux, et aussi lors d'échanges avec Mathieu Picardeau responsable du CNR leptospirose à l'Institut Pasteur et enfin avec Gauthier Dobigny lors de mon 2^e comité de thèse. Nous avons rejoint un groupe de travail qui se met en place au sein du GLEAN pour les chercheurs impliqués dans les études sur la leptospirose en Afrique. Les travaux sur la leptospirose se poursuivent au sein du laboratoire UMR INSERM

1058 et du Centre MURAZ. Une étude prospective a été mise en place conjointement pour l'identification des cas dans les structures de soins primaires des districts sanitaires de Bobo Dioulasso. Près de 400 personnes présentant une fièvre $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ont été dépistées pour la leptospirose après exclusion du paludisme au mois de septembre 2017 correspondant à la fin de la saison humide. Les résultats sont en cours d'analyse mais semblent confirmer la présence de la leptospirose comme cause de fièvre non palustre dans cette population et à cette période de l'année.

L'approche syndromique serait intéressante à condition d'une sélection et d'un multiplexage adéquat des cibles dans l'environnement du Burkina Faso. L'utilisation optimale de la plateforme ouverte de biologie moléculaire du Centre MURAZ pour le diagnostic clinique se poursuivra grâce à l'élargissement de l'offre de diagnostic mais aussi grâce à l'amélioration continue des protocoles utilisant les DBS. La pérennité de ces actions passe par le développement de l'expertise locale à travers la formation de biologistes de qualité. Les fabricants d'instruments de laboratoire doivent accompagner les efforts en mettant au point des thermocycleurs, des automates et extracteurs relativement simples, robustes et bon marché. L'implantation et la promotion des approches sur plateformes ouvertes dans différents pays à ressources limitées contribuera à l'amélioration de l'accessibilité au diagnostic en particulier et de la santé en général du fait de la place importante du diagnostic étiologique dans la lutte contre les maladies infectieuses.

ANNEXE

Nicolas Meda^{1,2,3}, Edouard Tuaillon^{4,5}, Dramane Kania³, Adama Tiendrebeogo⁶, Amandine Pisoni^{4,5}, **Sylvie Zida**^{3,4}, Karine Bollore⁴, Isaïe Meda¹, Didier Laureillard⁷, Jean Pierre Moles⁴, Nicolas Nagot^{4,8}, Koumpingnin Yacouba Nebie^{2,9}, Philippe Van de Perre^{4,5}, Pierre Dujols^{4,8}

Epidemiology of hepatitis B and C infections in Burkina Faso: the ANRS 12270 nationwide cross-sectional study

Authors and affiliations

1. Ministère de la Santé, Ouagadougou, Burkina Faso
2. Univ. Ouagadougou, Ouagadougou, Burkina Faso
3. Centre MURAZ, 2054 Avenue Mamadou Konaté, 390, Ouagadougou, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso
4. Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Univ. Montpellier, INSERM, EFS, 60 avenue de Navacelles, 34394 Montpellier cedex 5, France
5. Département de virologie, CHU Montpellier, 191 avenue du Doyen G. Giraud, 34295 Montpellier cedex 5, France
6. Institut National de la Statistique et de la Démographie, Ministère de l'Economie, des Finances et du Développement, Avenue Pascal Zagré, Ouaga 2000, 01 BP 374 Ouagadougou 01, Burkina Faso
7. Service des maladies Infectieuses, CHU Nîmes, place du Pr R. Debré, 30029 Nîmes cedex 9, France
8. Département de l'Information Médicale, CHU Montpellier, 39 avenue Charles Flahaut, 34295 Montpellier cedex 5, France
9. Centre National de Transfusion Sanguine, 01 BP 5372, Avenue du Président Thomas Sankara, Ouagadougou, Burkina Faso

Corresponding author: Pierre Dujols, MD, PhD, professor of Public Health, Département de l'Information Médicale, Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Hôpital La Colombière, 39 avenue Charles Flahaut, Montpellier cedex 5, France, Phone: (33) 467338929, Fax: (33) 467335827, p-dujols@chu-montpellier.fr.

Abstract

Background--Viral hepatitis is a major health threat worldwide, and particularly in low- and middle-income countries. At a time when the control tools for hepatitis B (vaccination, antiviral drugs) and C (direct antiviral agents) are likely to become soon accessible in these regions, robust knowledge of the hepatitis epidemiology is essential to support local health policies and resource allocation. We present the results of a nationwide cross-sectional prevalence survey on hepatitis B and C in the adult population of Burkina Faso. **Methods--**Our data were based on the 2010 Demographic and Health Survey data augmented by serologic hepatitis markers on 14,886 dried blood spot (DBS) samples collected and stored during this survey. The prevalence of hepatitis markers was estimated according to demographic parameters and geographic origin.

Results--The estimated prevalence was 9.1% (95%CI 8.5-9.7) for the hepatitis B surface antigen (HBsAg) and 3.6% (95%CI 3.3-3.8) for hepatitis C virus antibodies (HCV-Ab). These prevalence levels classify Burkina Faso as highly endemic for hepatitis B and low-intermediate for hepatitis C. Strikingly high HCV-Ab prevalence (13.2%, 95%CI 10.6-15.7) was identified in the Sud-Ouest region, which deserves a comprehensive epidemiological investigation.

Conclusion--The high prevalence of hepatitis B and C in Burkina Faso calls for an urgent control plan of viral hepatitis that includes the new direct acting antiviral drugs. Our findings illustrate the added value of testing hepatitis marker on DBS samples from demographic health surveys for epidemic assessment, surveillance and evaluation of national health policies.

Keywords

Hepatitis prevalence, HBV, HCV, Dried Blood Spot, West-Africa

Viral hepatitis is a global health challenge worldwide, and particularly in low- and middle-income countries [1].

Hepatitis B virus (HBV) infection affects about 75 million people in Africa, including 1.9 million in Burkina Faso (BF) [2]. It is the most frequent cause of acute hepatitis, chronic liver disease and hepato-carcinoma [3, 4], with increasing incidence [2] despite the infant expanded programs on immunization (EPI) introduced in the early 2000s. Hepatitis C virus (HCV) infection is estimated to affect 10 to 33 million individuals in West Africa [5]. These hepatitis viral infections are the main contributors to the hepato-carcinoma burden in Africa [6].

Too few robust epidemiologic studies on viral hepatitis are available at a national level, in order to inform policy makers [7]. Most existing studies are local in scope, conducted at different periods on specific populations (pregnant women, blood donors) and do not report age-, sex- or demographic-specific prevalence estimations [8-11]. Included in systematic reviews and meta-analyses [2, 7, 12-17], these studies lead to biases and large estimation intervals, and overlook the demographic and geographic heterogeneity of the epidemics [7].

When new Direct Antiviral Agents, that cures most HCV-infected patients within 12 weeks of treatment, become available in low-income countries, a control of the epidemic can be envisaged. In order to estimate the number of subjects requiring treatment and the resource allocation, and to follow the efficiency of a treatment program, it is essential to have precise epidemic knowledge based on reliable nationwide representative surveys [7]. The same requirement applies for evaluation of the impact of the Expanded Program of Immunisation against HBV, as well as the estimation of the number of people living with chronic hepatitis B infection, and resources to be allocated to the treatment [18].

With assistance from the MEASURE DHS program [19], demographic and health surveys (DHS) are conducted in middle- or low-income countries on large multistage clustered population-based samples. The surveys collect and disseminate accurate and representative data on population and health, and include blood sample collection and storage on filter papers for HIV testing. These surveys are therefore an opportunity for affordable hepatitis testing and epidemiologic studies.

We report a nationwide hepatitis B and C epidemiologic study in BF based on a large survey representative of the adult population.

Methods

Recruitment and study design

Between May 2010 and January 2011, the Burkina Faso 4th Demographic and Health Survey (EDSBF) was conducted by the Institut National des Statistiques et de la Démographie (INSD) using a two stage, stratified clustered design [20]. At the first stage, 574 administrative demographic zones (DZs) were selected at random among the 13,989 DZs of the country, with additive stratification on geographic setting (rural/urban). Each DZ was assigned a probability to be selected proportional to its household count. At the second stage, households were selected at random in each selected DZ with a uniform probability. This stage led to a sample of 14,947 households. In each household, all 15 to 49 years old women living currently in the household or staying there the night preceding the survey were investigated by interviewers trained in administering structured questionnaires. In each DZ, one household out of two was also selected at random (7,475 households) for 15 to 59 years old male respondents.

Among these 7,475 households, after signed informed consent, 8,293 women and 7,084 men completed the questionnaires and provided a blood sample by finger prick on filter paper (Whatman® 903 protein saver, Dassel, Germany). The dried blood spots (DBS) were then sent to the Centre National de Transfusion Sanguine (CNTS) in individual dessicant bags and stored at -20°C. They were used in the CNTS for HIV diagnosis and confirmation (1.0%, prevalence in the EDSBF [20]) and returned immediately to storage at -20°C. At end a total of 14,886 DBS from HIV-uninfected participants were available for further research (Table 1).

Hepatitis serology assays

For hepatitis B surface antigen (HBsAg) assessment, a punched disc of 6-mm diameter was eluted overnight at ambient temperature into 1.5 ml PBS and tested using the Bio-Rad Monolisa™ HBs Ag ULTRA kit (Hercules, USA) according to the manufacturer's instructions. The sensitivity and specificity estimations of the test on DBS were 96.0% (95% confidence interval, CI, 77.7-99.8) and 100.0% (CI 97.6-100.0), respectively [21,22]. For HCV antibody (HCV-Ab) detection, a 6-mm punch was eluted overnight at ambient temperature in a 2 ml buffer composed of PBS (2/3) and manufacturer diluent (1/3) and tested using Monolisa™ HCV AgAb ULTRA, Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). The sensitivity and specificity estimations of the test on DBS were 95.0% (CI

83.1-99.4) and 100.0% (CI 98.9-100.0), respectively [21, 23, 24].

Study data

All survey database records were quality controlled by INSD according to international standards. Each record was weighted according to its survey representativeness. For the current study, we selected the following demographic and socioeconomic variables among the 818 items of the interview questionnaire: sex, age, ethnicity, educational achievement (none, primary, secondary or higher), household wealth index quintile (quintile of the nation-wide wealth index distribution constructed from household assets scoring), living with a partner (never, current, former), residency – region, setting (urban, rural), augmented by B and C hepatitis positive serology (yes, no). In addition, two participants were considered a tested-couple if they reported living as a couple in the same household, and had both been tested for viral hepatitis markers.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the dedicated procedures of SAS V9.2® for weighted survey samples. An adjusted F-test was used for comparisons of discrete variables. P-values ≤ 0.05 were considered significant. Results are presented with their 95% confidence interval (CI). As our study sample contained only HIV-negative subjects, a sensitivity analysis was carried out by allocating the maximum hepatitis prevalence values observed in the HIV-infected BF population [25] to HIV-infected subjects, i.e. 15% for HBsAg and 9% for HCV.

Results

Population

According to the methodology of the survey, the 14,186 interviewed and blood-sampled subjects (6,830 men aged 15 to 59 and 8,056 women aged 15 to 49) are representative of the HIV-uninfected BF population of these ages and sex. Of the sample-derived population, the mean age was 31.9 (95%CI 31.6-32.3) on men and 28.6 (95%CI 28.4-28.9) on women. 68.4% (67.5-69.2) participants had no educational achievement, 72.1% (71.2-73.0) were currently living with a partner and 72.5% (71.7-73.2) lived in rural settings. Table 1 shows the origin and distribution of the collected blood samples.

Hepatitis B

The HBsAg prevalence estimate was 9.1% (8.5-9.7) countrywide (Table 2), 10.5% (9.6-11.4) in men and 7.8% (7.1-8.6) in women ($p < 0.001$). It varied significantly with age class ($p = 0.0002$), education ($p = 0.03$), ethnicity ($p = 0.004$) and region of residency ($p = 0.0029$) (Table 2, Figure 1). The HBsAg prevalence is significantly higher in the Gourmantche (12.3%, CI 9.9-14.7, $p = 0.0029$) and Senoufo (12.5%, CI 9.8-15.1, $p = 0.0049$) ethnic groups than in the Mossi ethnic group, the most represented ethnic group in BF (8.2%, CI 7.4-9.0). In men, the prevalence decreased with age (p for trend = 0.003) (Figure 2). Among couples, the HBsAg prevalence significantly increased ($p = 0.02$) when one partner was infected (11.7%, CI 8.4-15.1) versus when neither partner was infected (8.1%, CI 7.4-8.9). The countrywide HBsAg prevalence estimate did not change after the sensitivity analysis.

Hepatitis C

HCV-Ab prevalence was 3.6% (CI 3.3-3.8) countrywide (Table 2), and was higher in men (3.9%, CI 3.4-4.5) than in women (3.2%, CI 2.8-3.7) ($p = 0.024$) (Table 2). The prevalence varied with age class ($p = 0.024$) (Figure 2), education level ($p < 0.0001$), wealth index quintile ($p < 0.0001$) and ethnicity ($p < 0.001$). It varied from 2.4% (1.9-2.8) in the Mossi ethnic group to 11.6% (8.2-15.0) in the Lobi and 13.2% (9.5-16.8) in the Dagara ethnic groups. HCV-Ab prevalence was higher in rural (4.2%, CI 3.4-4.4) than in urban (1.4%, CI 0.8-1.9) settings ($p < 0.0001$) and varied with regions ($p < 0.0001$); the Centre (1.0%, CI 0.3-1.7) or Centre-Sud (1.7%, CI 0.8-2.6) regions has the lowest prevalence rate, while Cascades (6.2%, CI 4.6-7.8) and Sud-Ouest (13.2%, CI 10.6-15.7) regions had the highest prevalence rate (Figure 1). Alike HBsAg, the HCV-Ab prevalence increased significantly ($p < 0.0001$) when one partner was infected (14.6%, CI 9.4-19.8), versus when neither partner was infected (3.7%, CI 3.2-4.0). In men, the prevalence increased with age (p for trend < 0.001) (Figure 2). The countrywide HCV-Ab prevalence estimate was not affected by the sensitivity analysis (3.6%, CI 3.3-4.0).

HCV-HBV co-infection

The prevalence of HBV-HCV co-infection was 0.3% (0.2-0.4) countrywide, lower in women (0.2%, CI 0.1-0.3)

than in men (0.4%, CI 0.2-0.6), ($p=0.0161$) and varied across regions (Figure 1). Among the HCV-Ab detectable population, the prevalence of HBsAg was 8.4% (6.4-10.4) countrywide, 6.1% (3.4-8.7) in women and significantly higher in men (10.7%, CI 7.6-13.7, $p=0.03$). Among the HBsAg-positive population, the prevalence of HCV-Ab was 3.4% (2.4-4.2) countrywide, 2.5% (1.4-3.6) in women and 4.1% (2.7-5.4) in men.

Discussion

We report the first national hepatitis seroprevalence survey conducted in the general adult population of an Africa country, Burkina Faso. National seroprevalence estimates were 9.1% for HBsAg and 3.6% for HCV-Ab. Recent systematic reviews [2, 7] have reported somehow different figures, with an estimated 12.0% (11.7-12.4) HBsAg seroprevalence in BF and a 6.1% HCV-Ab prevalence (1.3-14.2), ranking BF as one of the most affected sub-Saharan countries [7]. Even using meta-analytic specific designs, the estimations are biased by the heterogeneity and the absence of reliable country-representativeness of the selected studies. Our estimates are much lower and with narrower confidence intervals. BF can therefore be classified among high HBV (>8%) [4] and low-intermediate HCV (3–6%) [15] endemic countries.

If the HBsAg prevalence estimates have a roughly uniform regional distribution, a high degree of regional heterogeneity was observed for HCV-Ab. In the Sud-Ouest region populated mostly by the rural Lobi (45%) and Dagara (36%) ethnic groups, the HCV-Ab prevalence (13.2%) was similar to that in Egypt (14.7%), the most affected country in Africa [26]. These data demonstrate that the supposed “epidemiological homogeneity between neighbouring countries”, used in meta-analyses to extrapolate results from one country to another [7], does not apply at a national level.

In many countries, a decrease in HBsAg prevalence was noted between 1957–89 and 1990–2013 periods due to routine infant HBV immunization [6]. The potential effects of the introduction of the HBV vaccine in the BF national EPI in 2006 cannot be captured by our study. The HBsAg distribution strongly suggests that HBV is acquired at birth, during infancy or is horizontally transmitted in early childhood, and may represent a worrying cause of chronic liver dysfunction and hepato-carcinoma in the coming decades. These findings strengthen the importance of achieving efficient coverage of the HBV immunization program, and of planning for improved access to HBV therapy [6] for those already infected and for those who miss out on immunization under the EPI program.

In the Sud-Ouest region, the high level of HCV-Ab age-specific prevalence, not only in eldest groups but also in the 15-19 class, suggests that the epidemic is still ongoing in the young age-groups and that comprehensive epidemiological evaluation is required to identify the transmission routes [27, 28]. Whether some of these infections could be partly related to health procedures is unknown, but it should at least reinforce the awareness of HCV infection and control measures among healthcare workers.

Limitations of our study include the non-availability of DBS from HIV-infected individuals. Nevertheless, with a 1% HIV prevalence in BF, our sensitivity analyses suggest that this bias was fully negligible. Secondly, as EDSBF did not target hepatitis risks factors, even though some are shared with HIV [15, 27], at this stage our study did not address viral hepatitis risk factors.

This study highlights the opportunity offered by DHS surveys to estimate national prevalence of diseases. Such surveys, using a stratified clustered design close to a national census design, result in sample sizes of over 10,000 participants representative of the general population, which are required for consistent epidemiologic results, with good estimates at the regional levels [5]. The repetition of DHS surveys every 4–5 years provides the opportunity to monitor trends over time, including at regional levels, which is crucial for infection control programs.

Hepatitis serology testing using DBS is now recommended when collecting venous blood specimens is difficult (for example in epidemiological studies) and/or when the sample has to be tested away from where it was collected, as it is the case in many low- or middle-income countries [29, 30]. Combining the DHS survey with DBS testing in partnership with the CNTS and the INSD allowed reliable estimates of viral hepatitis in adults at national and regional levels. The budget to gain such information is dependent on serologic reagents (\$2, equivalent to a rapid diagnosis test) [30]; the extra-cost per subject for HBV and HCV testing during a DHS survey is therefore about \$8 including the basic laboratory fees [31]. DHS surveys are unique opportunities to generate affordable, accurate and pragmatic data and understanding of the hepatitis epidemiology in sub-Saharan Africa in order to guide health policies and interventions [32].

Our findings have several major implications for public health researchers, program managers and policy makers. BF can be classified at a high-endemic level for HBV [4] and low-intermediate for HCV [15]; both viruses are

major risk factors for hepato-carcinoma [6]. Implementing the HBV vaccine birth dose in the BF EPI (instead of a first dose at 8 weeks of age) [6] and improving vaccine coverage of children and teenagers [32, 33] should lead to a measurable decrease in the HBV epidemic.

The expected availability of new Direct Antiviral Agent for HCV treatment in low-income countries at affordable cost provides an opportunity for health managers to initiate a treatment access program without delay [1]. As 55% of the BF population is aged 15–59 years, and as resolution occurs spontaneously in about 25% of HCV-infected people [34], we estimate that about 220,000 HCV viraemic adults were in need of HCV therapy in 2010.

Additional studies are essential to identify and understand the current risk factors and transmission mechanisms of viral hepatitis in BF, mainly in its Sud-Ouest region. Such studies should include analysis of grey literature for the evolution of vaccine procedures and of traditional habits [15, 35].

Conclusion

This study provides, for the first time, reliable estimates of the hepatitis B and C prevalence in Burkina Faso. We identified an ongoing epidemic in the Sud-Ouest region which requires further investigation.

A national control program for viral hepatitis, including new DAA for hepatitis C, is urgently needed. It should be elaborated on the ground of accurate epidemiological data to precisely identify high-endemic areas and demographic characteristics of the affected populations. Our study highlights the value of using Demographic Health Surveys augmented by viral hepatitis serology-testing to achieve this goal.

Acknowledgments We thank the Ministry of Health of Burkina Faso, Ouagadougou, Burkina Faso, for its constant support. We also thank Angloscribe, Calvisson, France, an independent scientific language editing service, for their English revision of the manuscript.

Funding The study was funded by the INSERM/French National Agency for Research on AIDS & viral Hepatitis (ANRS), Paris, France (grant ANRS12270).

Compliance with ethical standards

Conflicts of interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical Approval: All procedures performed in the study involving human participants were in accordance with the ethical standards of the Comité d’Ethique pour la Recherche en Santé du Burkina Faso and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent: Informed consent was obtained for all individual participants included in EDSBF study, comprising use of their collected data and DBS for further research. All study file records were anonymous and therefore hepatitis test results could not be returned to participants.

References

1. WHO Global health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021. <http://www.who.int/hepatitis/strategy2016-2021/ghss-hep/en/> (accessed 18 January 2017)
2. Schweitzer A, Horn J, Mikolajczyk RT, Krause G, Ott JJ. Estimations of worldwide prevalence of chronic hepatitis B virus infection: a systematic review of data published between 1965 and 2013. *Lancet*. 2015;386:1546–1555. doi:10.1016/S0140-6736(15)61412-X
3. Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJ, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*. 2006;45(4):529–38. doi: 10.1016/j.jhep.2006.05.013
4. Villa E, Fattovich G, Mauro A, Pasino M. Natural history of chronic HBV infection: special emphasis on the prognostic implications of the inactive carrier state versus chronic hepatitis. *Dig Liver Dis*. 2011; 43 Suppl 1:S8–14. doi:10.1016/S1590-8658(10)60686-X
5. Gower E, Estes C, Blach S, Razavi-Shearer K, Razavi H. Global epidemiology and genotype distribution of the hepatitis C virus infection. *J Hepatol*. 2014;61:S45–S57. doi: 10.1016/j.jhep.2014.07.027
6. Lemoine M, Thursz MR. Battlefield against hepatitis B infection and HCC in Africa. *J Hepatol*. 2017;66(3):645–654. doi:10.1016/j.jhep.2016.10.013
7. Riou J, Aït Ahmed M, Blake A, Vozlinsky S, Brichler S, Eholie S, et al. Hepatitis C virus seroprevalence in adults in Africa: a systematic review and meta-analysis. *J Viral Hepat*. 2016;23:244–255. doi:10.1111/jvh.12481

8. Collenberg E, Ouedraogo T, Ganamé J, Fickenscher H, Kynast-Wolf G, Becher H, et al. Seroprevalence of six different viruses among pregnant women and blood donors in rural and urban Burkina Faso: a comparative analysis. *J Med Virol.* 2006;78:683–692. doi:10.1002/jmv.20593
9. Nagalo MB, Sanou M, Bisseye C, Kaboré MI, Nebie YK, Kienou K, et al. Seroprevalence of human immunodeficiency virus, hepatitis B and C viruses and syphilis among blood donors in Koudougou (Burkina Faso) in 2009. *Blood Transfus.* 2011;9:419–424. doi:10.2450/2011.0112-10
10. Simporé J, Granato M, Santarelli R, Aba'a Nsméd R, Coluzzi M, Pietra V, et al. Prevalence of infection by HHV-8, HIV, HCV and HBV among pregnant women in Burkina Faso. *J Clin Virol.* 2004;31(1):78–80. doi:10.1016/j.jcv.2004.06.001
11. Zeba MTA, Sanou M, Bisseye C, Kiba A, Nagalo BM, Wendkuuni Djigma F, et al. Characterisation of hepatitis C virus genotype among blood donors at the regional blood transfusion centre of Ouagadougou, Burkina Faso. *Blood Transfus.* 2014;12 suppl 1:s54–7. doi:10.2450/2012.0089-12
12. Hanafiah KM, Groeger J, Flaxman AD, and Wiersma ST. Global Epidemiology of Hepatitis C Virus Infection: New Estimates of Age-Specific Antibody to HCV Seroprevalence. *Hepatology* 2013;57:1333–42. doi:10.1002/hep.26141
13. Madhava V, Burgess C and Drucker E. Epidemiology of chronic hepatitis C virus infection in sub-Saharan Africa. *Lancet Inf Dis.* 2002;2:293–302
14. Barth RE, Huijgen Q, Taljaard J, Hoepelman A. Hepatitis B/C and HIV in sub-Saharan Africa: an association between highly prevalent infectious diseases. A systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 2010;14(12):e1024–31. doi:10.1016/j.ijid.2010.06.013
15. Rao VB, Johari N, du Cros P, Messina J, Ford N, Cooke GS. Hepatitis C seroprevalence and HIV co-infection in sub Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2015;15(7):819–24. doi:10.1016/S1473-3099(15)00006-7
16. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis.* 2005;5: 558–67. doi:10.1016/S1473-3099(05)70216-4
17. Karoney MJ and Mogisi Siika A. Hepatitis C virus (HCV) infection in Africa: a review. *Pan Afr Med J.* 2013;14:44. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.027
18. WHO. Policy brief: Guidelines for the prevention, care and treatment of persons with chronic hepatitis B infection. March 2015. <http://www.who.int/hiv/pub/hepatitis/hepatitis-b-guidelines/en/> (accessed 18 January 2017)
19. ICF. The DHS Program. <http://dhsprogram.com> (accessed 18 January 2017)
20. Institut National de la Statistique et de la Démographie (INSD) et ICF International, 2012. Enquête Démographique et de Santé et à Indicateurs Multiples du Burkina Faso 2010. Calverton, Maryland, USA : INSD et ICF International. <http://dhsprogram.com/publications/publication-FR256-DHS-Final-Reports.cfm> (accessed 18 January 2017)
21. Lange B, Cohn J, Roberts T, Greenman J, Camp J, Ishizaki A, et al. Dried blood spots specimens for serological diagnosis of hepatitis B and C: two systematic reviews and meta-analyses of diagnostic accuracy studies. 26th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Amsterdam, The Netherlands, 9-12 April 2016.
22. Kania D, A. Bekale M, Nagot N, Mondain AM, Ottomani L, Meda N, et al. Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-care testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C infections in Burkina Faso, West Africa. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(12):E533–41. doi:10.1111/1469-0691.12292
23. Brandão CP, Marques BL, Marques VA, Villela-Nogueira CA, Do Ó KM, de Paula MT, et al. Simultaneous detection of hepatitis C virus antigen and antibodies in dried blood spots. *J Clin Virol.* 2013;57(2):98–102. doi:10.1016/j.jcv.2013.02.014
24. Tuaillon E, Mondain AM, Meroueh F, Ottomani L, Picot MC, Nagot N, et al. Dried blood spot for hepatitis C virus serology and molecular testing. *Hepatology.* 2010;51(3):752–8. doi:10.1002/hep.23407.
25. Bado G, Penot P, N'Diaye MD, Amiel C, Hema A, Kamboulé A, et al. Hepatitis B seroprevalence in HIV-infected patients consulting a public day care unit in Bobo Dioulasso, Burkina Faso. *Médecine et maladies infectieuses* 2013;43:202–207. doi:10.1016/j.medmal.2013.04.001
26. Mohamoud YA, Mumtaz GR, Riome S, Miller D and Abu-Raddad LJ. The epidemiology of hepatitis C virus in Egypt: a systematic review and data synthesis. *BMC Infectious Diseases* 2013, 13:288.
27. Jayaraman S, Chalabi Z, Perel P, Guerriero C, Roberts I. The risk of transfusion-transmitted infections in sub-Saharan Africa. *Transfusion* 2010;50(2):433–42. doi:10.1111/j.1537-2995.2009.002402.x
28. He J, Lin J. HCV prevalence during the age range of peak sexual activity. *Lancet Infect Dis.* 2017;17(2):131–132. doi:10.1016/S1473-3099(17)30003-8
29. WHO Guidelines on hepatitis B and C testing, Policy brief. <http://www.who.int/hepatitis/publications/hepatitis-testing-recommendation-policy/en/> (accessed 18 January 2017)

30. Easterbrook PJ. WHO Guidelines Development Group. Who to test and how to test for chronic hepatitis C infection - 2016 WHO testing guidance for low- and middle-income countries. *J Hepatol.* 2016;65(1 Suppl):S46-66. doi:10.1016/j.jhep.2016.08.002.
31. Protto JP, Plasschaert S, Sartor and Walckiers D. Biological testing for HIV, hepatitis B and C infections. PH / EPI reports n° 2004-011. <https://www.wiv-isp.be/epidemio/epien/birn/biotest.pdf> (accessed 18 January 2017)
32. Layden JE, Phillips R, Opare-Sem O, Akere A, Salako BL, Nelson K, et al. Hepatitis C in Sub-Saharan Africa: Urgent Need for Attention. *Open Forum Infect Dis.* 2014;17:1(2). doi:10.1093/ofid/ofu065
33. Chen DS, Hsu NH, Sung JL, Hsu TC, Hsu ST, Kuo YT, et al. A mass vaccination program in Taiwan against hepatitis B virus infection in infants of hepatitis B surface antigen-carrier mothers. *JAMA.* 1987;257(19):2597-603.
34. Westbrook RH and Dusheiko G. Natural history of hepatitis C. *J Hepatol.* 2014;61(1 Suppl):S58–68. doi:10.1016/j.jhep.2014.07.012
35. Pepin J and Labbe AC. Noble goals, unforeseen consequences: control of tropical diseases in colonial Central Africa and the iatrogenic transmission of blood-borne viruses. *Tropical Medicine and International Health.* 2008;13(6):744-753. doi:10.1111/j.1365-3156.2008.02060.x

REFERENCES

1. Azra C. Ghani, Deborah Hay Burgess, Alison Reynolds, Christine Rousseau. Expanding the role of diagnostic and prognostic tools for infectious diseases in resource-poor settings. *Nature* 2015;528(7580):S50-2.
2. Nature Publishing Group. Estimating the Global Health Impact of Improved Diagnostic Tools for the Developing World. 2006. http://www.rand.org/pubs/research_briefs/RB9293/index1.html.
3. World Health Organization (WHO). Genomics and World Health. Geneva, Switzerland: WHO; 2002. <http://apps.who>.
4. Phillips A, Shroufi A, Vojnov L, Cohn J, Roberts T, Ellman T et al. Sustainable HIV Treatment in Africa through Viral Load-Informed Differentiated Care. *Nature* 2015;528(7580):S68-76.
5. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO): HIV/AIDS. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.
6. World Health Organization (WHO). Paediatric HIV and Treatment of Children Living With HIV. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.
7. WHO. Global update on HIV treatment 2013: Results, impact and opportunities. 2013.
8. World Health Organization (WHO). Deaths and Statistics: Malaria. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.
9. O’Ryan M, Prado V, Pickering LK. A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Semin Pediatr Infect Dis* 2005;16:125-36.
10. World Health Organization (WHO). Global Health Observatory (GHO): TB. Geneva, Switzerland: WHO; 2013.
11. GBD 2015 SDG Collaborators. Measuring the health-related Sustainable Development Goals in 188 countries: a baseline analysis from the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*. 2016 Oct 8;388(10053):1813-50.
12. Murray CJ. Quantifying the burden of disease: the technical basis for disability-adjusted life years. *Bull WHO* 1994;72:429-45.
13. World Health Organization (WHO). The World Health Report 2003: Shaping the Future. Geneva, Switzerland: WHO; 2003.
14. www.who.int/topics/essential_medicines/fr/ last accessed September 30, 2017.

15. Dye C. After 2015: infectious diseases in a new era of health and development. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 May 12;369(1645):20130426.
16. Heesterbeek H, Anderson RM, Andreasen V, Bansal S, De Angelis D, Dye C, et al. Modeling infectious disease dynamics in the complex landscape of global health. *Science* 2015 Mar 13;347(6227):aaa4339.
17. Patel V, Parikh R, Nandraj S, Balasubramaniam P, Narayan K, Paul VK, et al. Assuring health coverage for all in India. *Lancet* 2015;386(10011):2422-35
18. Clinton WJ. Turning the tide on the AIDS pandemic. *N Engl J Med* 2003; 348:1800-2.
19. Gayle HD. Curbing the global AIDS epidemic. *N Engl J Med* 2003; 348:1802-5.
20. Petti CA, Polage CR, Quinn TC, Ronald AR, Sande MA. Laboratory Medicine in Africa: A Barrier to Effective Health Care. *Clin Infect Dis.* 2006 Feb 1;42(3):377-82.
21. Berkley JA, Lowe BS, Mwangi I, et al. Bacteremia among children admitted to a rural hospital in Kenya. *N Engl J Med* 2005;352:39-47.
22. Mulholland EK, Adegbola RA. Bacterial infections a major cause of death among children in Africa. *N Engl J Med* 2005;352:75-7.
23. Parent du Châtelet I, Traore Y, Gessner BD, Antignac A, Naccro B, Njanpop-Lafourcade BM, et al. Bacterial meningitis in Burkina Faso: surveillance using field-based polymerase chain reaction testing. *Clin Infect Dis* 2005 Jan 1;40(1):17-25.
24. Dittrich S, Tadesse BT, Moussy F, Chua A, Zorzet A, Tängdén T, et al. (2016) Target Product Profile for a Diagnostic Assay to Differentiate between Bacterial and Non-Bacterial Infections and Reduce Antimicrobial Overuse in Resource-Limited Settings: An Expert Consensus. *PLoS ONE* 2016;11(8): e0161721
25. Lubell Y, Althaus T, Blacksell SD, Paris DH, Mayxay M, Pan-Ngum W, et al. Modelling the Impact and Cost-Effectiveness of Biomarker Tests as Compared with Pathogen-Specific Diagnostics in the Management of Undifferentiated Fever in Remote Tropical Settings. *PloS ONE* 2016; 11(3):e0152420.
26. Prasad N, Sharples KJ, Murdoch DR, Crump JA. Community prevalence of fever and relationship with malaria among infants and children in low-resource areas. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 2015; 93(1):178-80.

27. Gething PW, Kirui VC, Alegana VA, Okiro EA, Noor AM, Snow RW. Estimating the number of paediatric fevers associated with malaria infection presenting to Africa's public health sector in 2007. *PLoS medicine*. 2010;7(7):e1000301.
28. D'Acremont V, Kilowoko M, Kyungu E, Philipina S, Sangu W, Kahama-Maró J, et al. Beyond malaria--causes of fever in outpatient Tanzanian children. *N Engl J Med*. 2014 Feb 27;370(9):809-17.
29. Benatar SR. Health care reform and the crisis of HIV and AIDS in South Africa. *N Engl J Med* 2004;351:81-92.
30. Daar AS, Thorsteinsdóttir H, Martin DK, Smith AC, Nast S, Singer PA. Top ten technologies for improving health in developing countries. *Nat Genet* 2002 Oct;32(2):229-32
31. Ahmad N. Abou Tayoun, Paul R. Burchard, Imran Malik, Axel Scherer, Gregory J. Tsongalis. Democratizing Molecular Diagnostics for the Developing World. *Am J Clin Pathol* 2014;141:17-24.
32. Archibald LK, Reller LB. Clinical microbiology in developing countries. *Emerg Infect Dis* 2001;7:302-5.
33. Crump J A, Youssef FG, Luby SP, Wasfy MO, Rangel JM, Taalat M, et al. Estimating the Incidence of Typhoid Fever and Other Febrile Illnesses in Developing Countries. *Emerg Infect Dis*. 2003 May; 9(5): 539-44.
34. Amin AA, Marsh V, Noor AM, Ochola SA, Snow RW. The use of formal and informal curative services in the management of paediatric fevers in four districts in Kenya. *Trop Med Int Health* 2003;8(12):1143-52.
35. Feikin DR, Olack B, Bigogo GM, Audi A, Cosmas L, Aura B, et al. The Burden of Common Infectious Disease Syndromes at the Clinic and Household Level from Population-Based Surveillance in Rural and Urban Kenya. 2011; *PLoS ONE* 6(1): e16085.
36. Adazu K, Lindblade KA, Rosen DH, Odhiambo F, Ofware P, Kwach J, et al. Health and demographic surveillance in rural western Kenya: a platform for evaluating interventions to reduce morbidity and mortality from infectious diseases. *Am J Trop Med Hyg* 2005;73:1151-8.
37. Armstrong Schellenberg JR, Adam T, Mshinda H, Masanja H, Kabadi G, Mukasa O, et al. Effectiveness and cost of facility-based Integrated Management of Childhood Illness (IMCI) in Tanzania. *Lancet* 2004;364: 1583-94.

38. Bhattarai A, Ali AS, Kachur SP, Martensson A, Abbas AK, Khatib R, et al. Impact of artemisinin-based combination therapy and insecticide-treated nets on malaria burden in Zanzibar. *PLoS Med* 2007;4(11): e309.
39. Feikin DR, Nguyen LM, Adazu K, Ombok M, Audi A, Slutsker L, et al. The impact of distance of residence from a peripheral health facility on pediatric health utilisation in rural western Kenya. *Trop Med Int Health* 2009 Jan;14(1): 54–61.
40. Hayes JA. Hedging opportunities in health care. *Health Care Strateg Manage*; 1990 (8):12-4.
41. Mboup S, Gershy-Damet G M, Toure Kane C, Belec L. Le défi de la formation dans le domaine du laboratoire de biologie clinique en Afrique. The challenges of training in medical laboratories in Africa. *Médecine et Santé Tropicales* 2014;24 :237-40.
42. World Health Organization. The Maputo Declaration. Maputo-Declaration_2008.pdf. www.who.int/diagnostics_laboratory/
43. World Health Organization. Résolution AFR/ RC58/R2 du Comité régional de l'Organisation Mondiale de la Santé pour l'Afrique. <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/1777/1/AFR-RC58-R2.pdf>
44. Norme ISO 15189, 2012. Laboratoires de biologie médicale - Exigences concernant la qualité et la compétence.
45. Gershy-Damet GM, Rotz P, Cross D, Belabbes el H, Cham F, Ndiokubwayo JB, et al. The World Health Organization African Region Laboratory Accreditation Process: Improving the quality of laboratory systems in the African region. *Am J Clin Pathol*. 2010;134:393-400.
46. African Society for Laboratory Medicine. ASLM2020: Strategies and vision to strengthen public health laboratory medicine in Africa. www.aslm.org/.
47. Braun M, Kabue MM, McCollum ED, Ahmed S, Kim M, L. Aertker, et al. Inadequate coordination of maternal and infant HIV services detrimentally affects early infant diagnosis outcomes in Lilongwe, Malawi. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011; 56:e122-8.
48. Cook RE, Ciampa PJ, Sidat M, Blevins M, Burlison J, Davidson MA, et al. Predictors of successful early infant diagnosis of HIV in a rural district hospital in Zambezia, Mozambique. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2011 Apr;56(4):e104-9.

49. Caliendo AM, Gilbert DN, Ginocchio CC, Hanson KE, May L, Quinn TC, et al. Better tests, better care: improved diagnostics for infectious diseases. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(3): S139-70.
50. Pai NP, Vadnais C, Denkinger C, Engel N, Pai M. Point-of-care testing for infectious diseases: diversity, complexity, and barriers in low- and middle-income countries. *PLoS Med* 2012; 9:e1001306.
51. Making viral load routine - Médecins Sans Frontières- 2016 www.msfaccess.org/makingviralloadroutine. 8 July 2016
52. Amukele TK, Sokoll LJ, Pepper D, Howard DP, Street J. Can Unmanned Aerial Systems (Drones) Be Used for the Routine Transport of Chemistry, Hematology, and Coagulation Laboratory Specimens? *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134020.
53. Amukele TK, Street J, Carroll K, Miller H, Zhang SX. Drone Transport of Microbes in Blood and Sputum Laboratory Specimens. *J Clin Microbiol*. 2016 Oct;54(10):2622-5.
54. World Health Organization. 2014. Technical and operational considerations for implementing HIV viral load testing. World Health Organization, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/hiv/pub/arv/viral-load-testing-technical-update/en/>
55. WHO Guidelines on Hepatitis B and B testing February 2017.
56. Mills EJ, Lester R, Thorlund K, Lorenzi M, Muldoon K, Kanfers S, et al. Interventions to promote adherence to antiretroviral therapy in Africa: a network meta-analysis. *Lancet HIV* 2014 Dec;1(3):e104-11.
57. Lange B, Tuillon E, Easterbrook P, van de Perre P, Ishizaki A, Denkinger C, et al. Médecins Sans Frontières. Dried blood spots as sample collection method for HCV antibody: a systematic review and meta-analysis. www.who.int/entity/hepatitis/publications/annex_5-9-2.pdf
58. Vernet G. Molecular diagnostics in virology. *J Clin Virol* 2004;31:239-47.
59. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin* 2003; 61: 279-93.
60. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987; 155:335-50.
61. Mackay IM, Arden KE, Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res*. 2002;30:1292-305.

62. Breton G, Ndawinz J, Nimbona P, Sylla O, Akamba J-J, Mbangue M, et al. HIV viral load monitoring in four West and Central African countries: how is virological failure managed by caregivers in the OPP-ERA project? IAS 2017;MOPED1181
63. Guthrie R, Susi A. A simple method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*.1963;32: 338-343.
64. Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J Nutr*. 2001;131(5):1631S-6S.
65. Lakshmy R. Analysis of the Use of Dried Blood Spot Measurements in Disease Screening. *Journal of Diabetes Science and Technology*. 2008;2(2): 242-3.
66. Meda N, Tuillon E, Kania D, Kiendrebeogo A, Pisoni A, Zida S, et al. Countrywide epidemiology of B, C and Delta hepatitis in Burkina Faso: the ANRS 12270 clustered cross-sectional study. IAS Paris 2017 WEPED1363.
67. Bonard D, Rouet F, Toni T, Minga A, Huet C, Ekouévi DK, et al. Field Evaluation of an Improved Assay Using a Heat-Dissociated p24 Antigen for Adults Mainly Infected With HIV-1 CRF02_AG Strains in Cote d'Ivoire, West Africa. *JAIDS* 2003;34(3):267–73.
68. De Castro Toledo Jr AC, Januario JN, Rezende RMS, Siqueira AL, De Mello BF, Fialho EL, et al. Dried blood spots as a practical and inexpensive source for human immunodeficiency virus and hepatitis C virus surveillance. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100(4):365-70.
69. Chohan, BH, Emery S, Wamalwa D, John-Stewart G, Majiwa M, Ng'ayo M, et al. Evaluation of a single round polymerase chain reaction assay using dried blood spots for diagnosis of HIV-1 infection in infants in an African setting. *BMC Pediatr* 2011;11:18.
70. Hsiao N-Y, Stinson K, Myer L. Linkage of HIV-infected infants from diagnosis to antiretroviral therapy services across the Western Cape, South Africa. *PLoS One* 2013;8:e55308.
71. Sutcliffe CG, van Dijk JH, Hamangaba F, Mayani F, Moss WJ. Turnaround Time for Early Infant HIV Diagnosis in Rural Zambia: A Chart Review. *PLoS ONE* 2014;9(1): e87028.
72. Rollins N, Mzolo S, Moodley T, Esterhuizen T, van Rooyen H. Universal HIV testing of infants at immunization clinics: an acceptable and feasible approach

- for early infant diagnosis in high HIV prevalence settings. *AIDS* 2009;23,1851-7.
73. Hassan AS, Sakwa EM, Nabwera HM, Taegtmeyer MM, Kimutai RM, Sanders EJ, et al. Dynamics and constraints of early infant diagnosis of HIV infection in RuralKenya. *AIDS Behav* 2012;16:5-12.
 74. Chiduo MG, Mmbando BP, Theilgaard ZP, Bygbjerg IC, Gerstoft J, Lemnge M, et al. Early infant diagnosis of HIV in three regions inTanzania; successes and challenges. *BMC Public Health* 2013;13:910.
 75. Mabey D, Peeling RW, Ustianowski A, Perkins MD. Tropical infectious diseases: diagnostics for the developing world. *Nat Rev Microbiol* 2004;2:231-40.
 76. Wang S, Lifson MA, Inci F, Liang L-G, Sheng YF, Demirci U. Advances in addressing technical challenges of point-of-care diagnostics in resource-limited settings. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016 April;16(4): 449-59.
 77. Singleton J, Osborn JL, Lillis L, Hawkins K, Guelig D, Price W, et al. Electricity-Free Amplification and Detection for Molecular Point-of-Care Diagnosis of HIV-1. *PLoS ONE* 2014;9(11):e113693.
 78. Abdul-Ghani R, Al-Mekhlafi AM, Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: would it come to clinical reality as a point-of-care test? *Acta Trop* 2012;122(3):233-40
 79. Curtis KA, Rudolph DL, Owen SM. Sequence-specific detection method for reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification of HIV-1. *J Med Virol* 2009 81(6):966-72.
 80. Boehme CC, Nabeta P, Henostroza G, Raqib R, Rahim Z, Gerhardt M, et al. Operational feasibility of using loop-mediated isothermal amplification for diagnosis of pulmonary tuberculosis in microscopy centers of developing countries. *J Clin Microbiol.* 2007;45(6):1936-40.
 81. Polley SD, González IJ, Mohamed D, Daly R, Bowers K, Watson J, et al. Clinical Evaluation of a LAMP test kit for Diagnosis of Imported Malaria. *J Infect Dis.* 2013;208(4)::637-44
 82. WHO Expert Group Meeting Report. The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis. 2013.

83. Abdurrahman ST, Emenyonu N, Obasanya OJ, Lawson L, Dacombe R, Muhammad M, et al. The hidden costs of installing Xpert machines in a tuberculosis high-burden country: experiences from Nigeria. *Pan Afr Med J*. 2014 Aug 5;18:277.
84. Nakiyingi L, Nankabirwa H, Lamorde M. Tuberculosis diagnosis in resource-limited settings: Clinical use of GeneXpert in the diagnosis of smear-negative PTB: a case report *African Health Sciences* 2013 Jun; 13(2): 522-4.
85. Helb D, Jones M, Story E, Boehme C, Wallace E, Ho K, et al. Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology. *J Clin Microbiol*. 2010;48(1):229-37.
86. Blakemore R, Story E, Helb D, Kop J, Banada P, Owens MR, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay. *J Clin Microbiol*. 2010;48(7):2495-501.
87. Ritchie AV, Goel N, Sembongi H, Lehga J, Farleigh LE, Edemaga D, et al. Performance evaluation of the point-of-care SAMBA I and II HIV-1Qual whole blood tests *Journal of Virological Methods* 2016;237:143-9
88. Rapport d'activité sur la riposte au SIDA au Burkina Faso ; Global AIDS Response Progress Reporting (GARPR) 2015. Mars 2016. http://www.unaids.org/sites/default/files/country/documents/BFA_narrative_report_2016.pdf last accessed September 30, 2017
89. Global Health Observatory <http://www.who.int/gho/en/>
90. Kania D, Truong TN, Montoya A, Nagot N, Van de Perre P, Tuaillon E. Performances of fourth generation HIV antigen/antibody assays on filter paper for detection of early HIV infections. *J Clin Virol*. 2015 Jan;62:92-7.
91. Rouet F, Kania D, Tuaillon E, Maiga A, Nouhin J, Rouzioux C, et al. Use of reverse transcription-PCR-based assays for quantification of HIV-1 in dried blood spots requires specific HIV-1 RNA isolation for monitoring of antiretroviral treatment efficiency. *J Clin Microbiol*. 2014 Jul;52(7):2740-1.
92. Monleau M, Aghokeng AF, Eymard-Duvernay S, Dagnra A, Kania D, Ngo-Giang-Huong N, et al. Field evaluation of dried blood spots for routine HIV-1 viral load and drug resistance monitoring in patients receiving antiretroviral therapy in Africa and Asia. *J Clin Microbiol*. 2014;52(2):578-86.
93. Kania D, Bekalé AM, Nagot N, Mondain AM, Ottomani L, Meda N, et al. Combining rapid diagnostic tests and dried blood spot assays for point-of-care

- testing of human immunodeficiency virus, hepatitis B and hepatitis C infections in Burkina Faso, West Africa. *Clin Microbiol Infect*. 2013 Dec;19(12):E533-41.
94. Viljoen J, Gampini S, Danaviah S, Valéa D, Pillay S, Kania D, et al. World Health Organization/ANRS 1289 Kesho Bora Study Group. Dried blood spot HIV-1 RNA quantification using open real-time systems in South Africa and Burkina Faso. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2010 Nov;55(3):290-8
 95. Smit PW, Sollis KA, Fiscus S, Ford N, Vitoria M, Essajee S, et al. Systematic review of the use of dried blood spots for monitoring HIV viral load and for early infant diagnosis. *PLoS ONE*. 2014;9(3): e86461.
 96. World Health Organization. Global Report 2011: Global HIV/AIDS response, WHO UNAIDS. 2011. http://www.who.int/hiv/pub/progress_report2011/en/
 97. Murtagh M. HIV/AIDS Diagnostics Technology Landscape: Semi- Annual Update. In: UNITAID Technical report 2012.
 98. Fiscus S, Cheng B, Crowe S, Demeter L, Jennings C, Miller V, et al. HIV-1 viral load assays for resource limited settings. *PLoS Med* 2006 Oct;3(10):e417.
 99. 2015 progress report on the global plan towards the elimination of new HIV infections among children and keeping their mothers alive. http://www.unaids.org/en/resources/documents/2015/JC2774_2015ProgressReport_GlobalPlan
 100. Newell ML, Coovadia H, Cortina-Borja M, Rollins N, Gaillard P, Dabis F et al. Mortality of infected and uninfected infants born to HIV-infected mothers in Africa: a pooled analysis. *Lancet*. 2004;364(9441):1236-43.
 101. Bourne D E, Thompson M, Brody LL, Cotton M, Draper B, Laubscher R, et al. Emergence of a peak in early infant mortality due to HIV/AIDS in South Africa. *AIDS* 2, 2009;101-6.
 102. Violari A, Cotton M F, Gibb D M, Babiker AG, Steyn J, Madhi S A, et al. Early antiretroviral therapy and mortality among HIV-infected infants. *N. Engl. J. Med* 2008 (359): 2233-44.
 103. Roberts T, Bygrave H, Fajardo E, Ford N. Challenges and opportunities for the implementation of virological testing in resource-limited settings. *J Int AIDS Soc*. 2012;15(2):17324.
 104. Schmitz ME, Agolory S, Junghae M, Broyles LN, Kimeu M, Ombayo J, et al. Field Evaluation of Dried Blood Spots for HIV-1 Viral Load Monitoring in Adults

- and Children Receiving Antiretroviral Treatment in Kenya: Implications for Scale-up in Resource-Limited Settings. *JAIDS* 2017;74(4):399-406
105. Arredondo M, Garrido C, Parkin N, Zahonero N, Bertagnolio S, Soriano V, et al. Comparison of HIV-1 RNA measurements obtained by using plasma and dried blood spots in the automated abbott real-time viral load assay. *J Clin Microbiol* 2012;50(3):569-72.
 106. Lofgren SM, Morrissey AB, Chevallier CC, Malabeja AI, Edmonds S, Amos B, et al. Evaluation of a dried blood spot HIV-1 RNA program for early infant diagnosis and viral load monitoring at rural and remote healthcare facilities. *AIDS* 2009 Nov 27;23(18):2459-66
 107. WHO Prequalification of diagnostics program Public report 2016 http://www.who.int/diagnostics_laboratory/evaluations/pq-list/hiv-vrl/160624_amended_final_public_report_0145_027_00.pdf
 108. Taieb F, Tram TH, Ho HT, Pham VA, Nguyen L, Pham BH, et al. Evaluation of Two Techniques for Viral Load Monitoring Using Dried Blood Spot in Routine Practice in Vietnam (French National Agency for AIDS and Hepatitis Research 12338). *Open Forum Infect Dis* 2016 Jul 7;3(3):ofw142.
 109. Inzaule SC, Hamers RL, Zeh CE, Rinke de Wit TF. Stringent HIV Viral Load Threshold for Virological Failure Using Dried Blood Spots: Is the Perfect the Enemy of the Good? *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2016 Jan 1;71(1):e30-3.
 110. Williams BG, Dye C. Antiretroviral drugs for tuberculosis control in the era of HIV/AIDS. *Science* 2003;301(5639):1535-7.
 111. WHO. WHO Risk Assessment as of 23 February 2015. 2015. cited 2015.http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/RiskAssessment_H7N9_23Feb20115.pdf?ua=1
 112. WHO Ebola Response Team. Ebola virus disease in West Africa—the first 9 months of the epidemic and forward projections. *N Engl J Med*. 2014;371(16):1481-95.
 113. WHO. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) maps and epicurves. 2015. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/maps-epicurves-31aug-6sep/en/
 114. Wang S, Xu F, Demirci U. Advances in developing HIV-1 viral load assays for resource-limited settings. *Biotechnol Adv*. 2010;28(6):770-81.

115. Mani V, Wang S, Inci F, De Libero G, Singhal A, Demirci U. Emerging technologies for monitoring drug-resistant tuberculosis at the point-of-care. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014 Nov 30;0:105-17.
116. Shafiee H, Wang S, Inci F, Toy M, Henrich TJ, Kuritzkes DR, Demirci U. Emerging technologies for point-of-care management of HIV infection. *Annu Rev Med* 2015; 66:387-405.
117. Yildiz UH, Inci F, Wang S, Toy M, H. Tekin HC, Javaid A, et al. Recent advances in micro/nanotechnologies for global control of hepatitis B infection. *Biotechnol Adv* 2015;33(1):178-90.
118. Wang S, Inci F, De Libero G, Singhal A, Demirci U. Point-of-care assays for tuberculosis: role of nanotechnology/microfluidics. *Biotechnol Adv.* 2013; 31(4):438649.
119. Jani IV, Peter TF. How point-of-care testing could drive innovation in global health. *N Engl J Med* 2013;368(24):2319-24.
120. Yager P, Domingo GJ, Gerdes J. Point-of-care diagnostics for global health. *Annu Rev Biomed Eng* 2008; 10:107-44
121. Crump JA, Morrissey AB, Nicholson WL, Massung RF, Stoddard RA, Galloway RL, et al. Etiology of severe non-malaria febrile illness in Northern Tanzania: a prospective cohort study. *PLoS neglected tropical diseases.* 2013; 7(7):e2324.
122. Yebyo H, Medhanyie AA, Spigt M, Hopstaken R. C-reactive protein point-of-care testing and antibiotic prescribing for acute respiratory tract infections in rural primary health centres of North Ethiopia: a cross-sectional study. *NPJ primary care respiratory medicine* 2016; 26:15076.
123. Prach LM, Puren A, Lippman SA, Carmona S, Stephenson S, Cutler E, et al. Design and implementation of an external quality assessment program for HIV viral load measurements using dried blood spots. *J Clin Microbiol* 2015;53:964-6.
124. Batwala V, Magnussen P, Nuwaha F. Antibiotic use among patients with febrile illness in a low malaria endemicity setting in Uganda. *Malaria journal* 2011;10:377.
125. World Health Organization. 2013. Consolidated guidelines on the use of antiretroviral drugs for treating and preventing HIV infection: recommendations for a public health approach. World Health Organization, Geneva, Switzerland. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85321/1/9789241505727_eng.pdf?ua1

126. www.who.int/hiv/pub/meetingreports/incidence_assay_wg/en/ last accessed September 30, 2017.
127. Awosanya EJ, Nguku P, Oyemakinde A, Omobowale O. Factors associated with probable cluster of leptospirosis among kennel workers in Abuja. Nigeria Pan Afr Med J 2013;16:144
128. Onyemelukwe NF. A serological survey for leptospirosis in the Enugu area of eastern Nigeria among people at occupational risk. J Trop Med Hyg 1993;96:301-4.
129. Ngbede EO, Raji MA, Kwanashie CN, Okolocha EC, Momoh AH, Adole EB, et al. Risk practices and awareness of leptospirosis in an abattoir in northwestern Nigeria. Sci J Vet Adv 2012;1:65-9.
130. Houemenou G, Ahmed A, Libois R, Hartskeerl RA. Leptospira spp. prevalence in small mammal populations in Cotonou, Benin. ISRN Epidemiology 2013;2013:8
131. Riel J, Baylet R, Rioche M. Seroepidemiological surveys on leptospirosis of livestock in Senegal [in French]. Villes Journ Med Dakar February 1973. Reference in Int J Infect Dis. 2014 Nov;28:47-64.
132. Niang M, Will LA, Kane M, Diallo AA, Hussain M. Seroprevalence of leptospiral antibodies among dairy-cattle kept in communal corrals in periurban areas of Bamako, Mali, West Africa. Prev Vet Med 1994;18:259-65.
133. Dobigny G, Garba M, Tatard C, Loiseau A, Galan M, Kadaouré I, et al. Urban Market Gardening and Rodent-Borne Pathogenic Leptospira in Arid Zones: A Case Study in Niamey, Niger. PLoS Negl Trop Dis. 2015 Oct 5;9(10):e0004097.
134. World Health Organization. Report of the Second Meeting of the Leptospirosis Burden Epidemiology Reference Group. Geneva: WHO; 2011. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44588/1/9789241501521_eng.pdf
135. Bourhy P, Bremont S, Zinini F, Giry C, Picardeau M. Comparison of Real-Time PCR Assays for Detection of Pathogenic Leptospira spp. In Blood and Identification of Variations in Target Sequences. J. Clin. Microbiol. 2011;49(6):2154
136. Torgerson PR, Hagan JE, Costa F, Calcagno J, Kane M, Martinez-Silveira MS, et al. Global Burden of Leptospirosis: Estimated in Terms of Disability Adjusted Life Years. PLoS Negl Trop Dis 2015 Oct 2;9(10):e0004122.