

Utilisation du papier filtre dans la gestion du programme de lutte contre le SIDA au Cameroun

Marie-Claire OKOMO ASSOUMOU (1), Dieudonné ADIOGO (2), Irène YATABENE BOBIOKONO (3), Peter NDUMBE (4)

(1) *Assistant d'Immunologie-Parasitologie, département de Microbiologie, Hématologie et Maladies Infectieuses, FMSB ;*

(2) *Assistant d'Immunologie-Microbiologie; département de Microbiologie, Hématologie et Maladies Infectieuses, FMSB ;*

(3) *Médecin-généraliste, FMSB ;*

(4) *Professeur d'Immunologie-Microbiologie; Chef de département de Microbiologie, Hématologie et Maladies Infectieuses, FMSB.*

RESUME

Le dépistage de l'infection constitue un élément important de lutte contre la pandémie du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Afin de réaliser des tests diagnostiques fiables et peu coûteux, nous avons évalué le papier filtre comme support de collecte et de conservation des produits sanguins. Des sérums venant de 248 femmes enceintes ont été testés pour évaluer la séroprévalence du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et la fiabilité du papier filtre en utilisant 3 tests : un test de dépistage rapide (Camstix), un test immunoenzymatique (ELISA) et un test de confirmation (Inno-Lia). Sur 248 femmes enceintes enrôlées, 4% étaient séropositives. La fiabilité du papier filtre a été évalué sur 85 sérums; 26 et 28 échantillons étaient respectivement positifs sur Camstix et sur ELISA selon la forme du spécimen (sérum normal ou fixé sur papier filtre). Les différences observées entre les deux formes n'étaient pas statistiquement significatives dans les deux tests (Camstix : $p=0,74$; ELISA : $p=1$). La séropositivité de 22 patients établis sur Camstix et sur ELISA était confirmée par le test Inno-Lia. L'analyse comparative des résultats obtenus sur le matériel fixé ou non sur papier filtre indique que ce dernier est un support fiable de collecte et de conservation des produits sanguins. Nous recommandons que le papier filtre soit vulgarisé dans les politiques de gestion épidémiologique et de suivi thérapeutique.

Mots clés: VIH, papier filtre, diagnostic

ABSTRACT

Diagnosis constitutes an important element in the control of HIV/AIDS. In a search for a cheap and easy transport system, we evaluated the use of filter paper as a means of collection and conservation of blood products. Sera from 248 pregnant women were tested to evaluate the seroprevalence of HIV and the use of filter paper. The tests used in this study were a rapid test (Camstix), an enzyme immunoassay (ELISA) and a confirmation test (Inno-lia). Of the 248 pregnant women enrolled, 4% were positive. Eighty five samples of normal serum were also tested; 26 and 28 samples respectively were positive on Camstix and ELISA (the samples were normal serum or filter paper samples). Statistically, there was no significant difference between the two tests (Camstix : $p = 0.74$; ELISA : $p=1$). Confirmation using Inno-lia test was done on the 22 samples positive on Camstix and ELISA. A comparison between the results obtained from samples fixed on filter paper and normal serum show that filter paper is a possible support for collection and conservation of blood products. We recommend that the filter paper be extensively used in epidemiological studies and diagnosis.

Key words: HIV, filter paper, diagnostic

Introduction

La pandémie VIH/SIDA touche tous les continents sans discrimination de race, de sexe, d'âge ou de statut social. En 1998, 33,4 millions de personnes étaient infectées par le VIH de par le monde, dont 22,5 millions se retrouvent en Afrique subsaharienne (ONUSIDA/OMS, 1998). Au Cameroun, le nombre de séropositifs est en augmentation constante, de 0,5% en 1987, la prévalence était évaluée à 7,2% dans la population générale en 1998 (MinSanté/CNLS, 1999).

Le VIH, agent infectieux responsable de la maladie SIDA, est transmis essentiellement lors des rapports sexuels, par contact avec le sang contaminé ou de la mère à l'enfant.

Ainsi, une femme enceinte peut transmettre le virus à son enfant pendant la grossesse, lors de l'accouchement ou au cours de l'allaitement. Le risque de transmission verticale est élevé en Afrique, de l'ordre de 30 à 40% (Lot et al, 1998 ; Lepage et al, 1993) contre 13 à 20% en Europe (Blanche et al, 1989 ; Watsop, 2000) et 25 à 30% aux USA (Oleske et al, 1990 ; Johnson et al, 1989) en l'absence de traitement.

Le SIDA est une maladie grave, elle ne dispose pas de traitement curatif ou préventif. La trithérapie, traitement de choix actuel, est un espoir pour les malades mais son prix reste prohibitif pour la majorité des personnes vivant dans les pays en voie de développement.

Ainsi, la prévention reste primordiale dans la lutte contre l'infection par le VIH/SIDA et le diagnostic biologique constitue l'un des maillons essentiels de cette prévention. La précocité de l'examen biologique permettra de limiter considérablement la transmission involontaire du virus, de

Correspondant :

Dr M.C. OKOMO ASSOUMOU
Centre Des Etudes et de Contrôle des Maladies Transmissibles
Faculté de Médecine et des Sciences Biomédicales
BP 8445, Université de Yaoundé I
Tél: 31 20 51 Fax : 31 27 33 e-mail : csccd@icnet.cm

prévenir les surinfections ayant pour conséquence l'évolution rapide vers le SIDA et de prendre en charge le patient.

De nombreux tests sérologiques sont actuellement commercialisés. Pour établir le diagnostic, l'algorithme conventionnel associe un test immunoenzymatique de type ELISA (Enzyme linked Immunosorbent Assay) et un test de confirmation, le western-blot. Cependant, d'autres associations sont possibles car la plupart des tests VIH présents sur le marché sont de spécificité et de sensibilité élevées. Ces associations reposent sur l'utilisation des tests de principe ou de préparation antigénique différents. Mais la réalisation de ces tests n'est pas souvent aisée ; les difficultés rencontrées sont notamment liées au coût du matériel de prélèvement et à la conservation du matériel sanguin. Les moyens de conservation approximatifs peuvent altérer la qualité des résultats du laboratoire. Comme support de collecte et de conservation, le papier filtre s'est avéré efficace dans la détermination du taux de séroprévalence de l'infection à VIH chez les nouveaux-nés et leur mère (Hoff et al, 1988 ; Cassol et al, 1992 ; Vai et al, 1987); il a été également utilisé dans d'autres pathologies comme la rubéole (Massad et al, 1995), la varicelle (Azevedo-Neto et al, 1996), les filarioses (Makoto Itoh et al, 1998) ou encore l'hépatite A (De Almeida et al, 1999 ; Gil et al, 1997).

Afin de trouver un matériel fiable et peu coûteux pour la collecte et la conservation des produits sanguins, nous avons évalué l'usage du papier filtre et son apport dans les programmes de lutte contre l'infection à VIH/SIDA au Cameroun.

Matériels et Méthodes

Echantillons sanguins

La population d'étude était constituée de 248 femmes enceintes âgées de 15 à 42 ans, fréquentant la maternité principale de l'hôpital central et de l'hôpital de Biyem Assi à Yaoundé. Après le consentement préalable des patientes, le sang était prélevé par ponction intraveineuse. 3 types d'échantillons sanguins ont été utilisés :

-le sérum normal obtenu après coagulation du sang pendant 1 heure à température ambiante. Ce sang est ensuite centrifugé à 3000 tours par minute pendant 15 minutes. Le sérum obtenu est aliquoté dans des cryotubes et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

-le sérum fixé sur papier filtre ou «papier filtre sérum»

-le sang fixé sur papier filtre ou «papier filtre sang»

65 autres sérums provenant de la sérothèque de notre laboratoire ont été incorporés dans cette étude.

Le papier filtre utilisé se présente sous la forme d'un rectangle (11 X 8 cm). Il est fabriqué par Scheicher&Schuell en Allemagne. Chaque rectangle présente à sa surface 5 disques dont le volume maximal d'absorption de chacun est de 50 μl . Ainsi, ce volume de sang ou de sérum est déposé délicatement sur le disque puis séché pendant 2 à 3 heures. Après séchage à température ambiante, le papier filtre est

introduit dans une enveloppe et conservé à -20°C jusqu'à utilisation.

Elution

Le matériel fixé était récupéré en incubant le disque dans du tampon spécifique. Pour chaque échantillon, 2 disques étaient prélevés, découpés et introduits dans un tube où ils étaient incubés pendant 1 heure sous agitation dans 400 μl de tampon (Chlorure de sodium 0,145M ; azide de sodium 0,5mg/l ; Tween-20 0,5 ml/l). Après absorption du liquide, un éluat de 150 μl était récupéré et utilisé pour le test sérologique de l'infection à VIH.

Tests sérologiques

Le sérum normal et les éluats étaient testés pour la présence d'anticorps dirigés contre les Ag du VIH. Trois tests sérologiques dont deux de dépistage (Camsix et Enzygnost anti-HIV 1/2 Plus) et un de confirmation (Inno-lia HIV confirmation) ont été utilisés : Camstix , Camdiagnostix, Cameroun ; Enzygnost anti-HIV 1/2 Plus, Behring et Inno-Lia HIV confirmation, Innogenetics.

Analyses statistiques

La taille de l'échantillon a été calculée sur ordinateur PC compatible en utilisant le logiciel SigmaStat 2.0. L'analyse statistique des résultats a été faite avec le logiciel Epi Info 6.

Résultats

Détermination de la séroprévalence de l'infection à VIH chez la femme enceinte

La taille théorique de l'échantillonnage était déterminée à 207 sérums sur SigmaStat 2.0. La sérologie VIH a été faite sur 248 échantillons. En utilisant le test Camstix, nous avons trouvé 10 sérums positifs correspondant à une prévalence de 4% de femmes enceintes. L'âge des patientes variait entre 15 et 42 ans. Lorsqu'on regarde la répartition des séropositives en fonction des tranches d'âge, nous en avons trouvé 0, 2, 3, 1, et 0 respectivement dans les tranches d'âge de 15-19, 20-24, 30-34, 35-39 ans et plus de 40 ans.

Evaluation de la fiabilité du papier filtre comme support de collecte

Pour évaluer la fiabilité du papier filtre comme support de collecte, nous avons comparé les échantillons à l'état de sérum normal à ceux sous la forme de papier filtre sérum. Nous avons utilisé 2 tests de principe différent, Camstix et Enzygnost anti-HIV 1/2 Plus. 85 échantillons ont été utilisés pour cette étude. Les résultats obtenus avec Camstix sont présentés dans le *tableau 1*. On note en effet que sur 85 échantillons testés, 26 étaient à la fois positifs sous la forme de sérum normal et sous la forme de papier filtre sérum ; 2 échantillons étaient positifs à l'état de sérum normal et négatifs sous la forme de papier filtre sérum ; 57 échantillons étaient à la fois négatifs sous les deux formes. L'analyse statistique sur Epi Info 6 indique qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux formes de matériels utilisés ($p = 0,74$).

Tableau 1 : Comparaison du sérum normal avec le papier filtre sérum (Camstix)

Papier filtre sérum	Sérum normal		Total
	Positif	Négatif	
Positif	26	0	26
Négatif	2	57	59
Total	28	57	85

Tableau 2 : Comparaison entre le sérum normal et le papier filtre sérum (ELISA)

Papier filtre	Sérum normal		Total
	Positif	Négatif	
Positif	28	0	28
Négatif	0	57	57
Total	28	57	85

Tableau 3 : Détermination du meilleur échantillon sanguin après fixation sur papier filtre

Papier filtre sérum	Papier filtre sang		Total
	Positif	Négatif	
Positif	6	1	7
Négatif	0	21	21
Total	6	22	28

Ces 85 échantillons ont été aussi analysés avec le test ELISA. Les résultats présentés dans le *tableau 2* montrent que 28 échantillons étaient à la fois positifs à l'état de sérum normal et sous la forme de papier filtre sérum ; 57 échantillons étaient négatifs sous les deux formes. Aucune discordance n'a été observée. L'analyse statistique sur Epi Info 6 montre qu'il n'y a pas de différence significative selon que l'on travaille avec le sérum normal ou avec le papier filtre sérum ($p = 1$).

Analyse des échantillons fixés sur papier filtre

Pour déterminer l'échantillon sanguin donnant le meilleur résultat après fixation sur le papier filtre, nous avons comparé le papier filtre sang au papier filtre sérum du même prélèvement. 28 échantillons ont été analysés avec le test Camstix. Les résultats consignés dans le *tableau 3* montrent que 6 échantillons étaient à la fois positifs sous la forme de

papier filtre sérum et sous la forme de papier filtre sang ; 21 étaient à la fois négatifs pour les deux types de matériel. La différence notée dans le cas d'un échantillon n'était pas statistiquement significative ($p = 0,75$ sur Epi Info 6).

Validation des résultats obtenus sur papier filtre : utilisation d'un test de confirmation

22 échantillons à l'état de sérum normal et sous forme de papier filtre sérum ont été analysés avec les tests Camstix et ELISA. Les résultats obtenus sur ces derniers ont été comparés avec ceux obtenus avec le test de confirmation Inno-Lia. Les données présentées dans le *tableau 4* montrent que les 22 échantillons, quelque soit la forme utilisée, étaient positifs avec les tests Camstix et ELISA. Analysés avec le test de confirmation, ces 22 échantillons étaient également positifs. 100% de concordance ont été observés avec les résultats des tests de dépistage.

Tableau 4 : Comparaison de 22 sérums confirmés positifs sur Inno-lia avec les résultats obtenus sur papier filtre avec Camstix et ELISA

	Camstix		ELISA	
	Papier filtre sérum	Sérum normal	Papier filtre sérum	Sérum normal
Positif	22	22	22	22
Négatif	0	0	0	0
Concordance avec Inno-lia	100	100	100	100

Discussion

Notre étude a porté sur l'évaluation de la séroprévalence de l'infection à VIH chez la femme enceinte et sur l'expérimentation locale du papier filtre comme support de collecte et de conservation des échantillons. La femme est une cible importante de l'infection à VIH/SIDA. Le risque de contracter l'infection lors d'un rapport hétérosexuel non protégé est 2 à 4 fois supérieur pour les femmes que pour les hommes (De Turenne, 1996). Les femmes sont également plus vulnérables aux autres maladies sexuellement transmissibles (MST) qui augmentent le risque de transmission du VIH (Laga et al, 1993 ; Royce et al, 1997 ; Wasserheit, 1992). L'infection à VIH chez la femme enceinte est particulièrement grave par le fait qu'elle est susceptible de transmettre le virus à son enfant.

Les femmes enceintes ont été recrutées à la maternité principale de l'hôpital central de Yaoundé et de l'hôpital de Biyem Assi, institutions fréquentées par une proportion importante des femmes enceintes de la ville de Yaoundé. Ces femmes étaient âgées de 15 à 42 ans, tranche d'âge directement concernée par l'infection à VIH car elles sont sexuellement actives. 4% de femmes enceintes (n = 248) étaient séropositives. Cette prévalence n'est pas très différente de celle observée dans d'autres études faites au Cameroun (Ndumbe et al, 1994 ; Mbopi et al, 1998 ; Mbu et al, 1999). Ce taux d'infection chez la mère est proportionnel au risque de contamination chez l'enfant. Cette prévalence de 4%, relativement faible, permet d'envisager la mise sous traitement à la Zidovudine (AZT) des femmes enceintes séropositives dans le programme national de lutte contre le SIDA (PNLS). Le risque de transmission de la mère à l'enfant est fortement réduit par la prise de la Zidovudine (Connor et al, 1994). Par ailleurs, à côté de ce risque de transmission verticale, une femme enceinte, connaissant son statut sérologique pourra également se protéger contre les surinfections, causes possibles de l'évolution rapide vers la maladie SIDA.

En prenant en compte tous ces éléments, le test de dépistage de l'infection à VIH apparaît nécessaire et vivement conseillé chez la femme enceinte. Le diagnostic biologique revêt donc une importance capitale dans la limitation de la propagation de l'infection à VIH.

Pour pallier les difficultés rencontrées dans la réalisation des tests diagnostiques, nous avons expérimenté le papier filtre comme outil de collecte et de conservation des échantillons sanguins. Le papier filtre sérum, le papier filtre sang et le sérum normal étaient tous conservés à -20°C pour minimiser les différences dues aux facteurs physiques. Les échantillons fixés sur papier filtre peuvent être conservés pendant quelques jours à température ambiante, au moins 12 mois à 4°C et pendant des années à -20°C (Makoto et al, 1998 ; De Almeida et al, 1999).

Dans notre étude, 2 disques de papier filtre (sang ou sérum) correspondant à 100µl de l'échantillon déposé ont été utilisés ; C'est le volume nécessaire pour obtenir une quantité minimale d'immunoglobulines (Ig) dans l'échantillon.

Lorsqu'on compare les résultats obtenus sur les échantillons fixés sur le papier filtre et le sérum normal aucune différence significative n'est notée. Ces données suggèrent clairement que le papier filtre n'altère pas le matériel. Les discordances observées entre les différents échantillons selon la forme utilisée ne sont pas statistiquement significatives. Ces discordances peuvent être liées à une légère perte des Ig dans les échantillons fixés sur le papier filtre comme observée dans une étude sur l'hépatite A (De Almeida et al, 1999). Elles peuvent également être dues au fait que nous avons utilisé 2 disques de sang correspondant à 100µl de sang déposés ; Ce volume de sang est équivalent à 40µl de sérum (Makoto et al, 1998) alors que le test Camstix nécessite 100µl de sérum selon les instructions du fabricant. L'utilisation consécutive de deux tests de dépistage permet d'obtenir des résultats proches de la réalité de l'état sérologique du patient. Pour valider les résultats obtenus, le test de confirmation a été effectué sur les échantillons positifs avec les tests de dépistage. L'obtention de 100% de concordance entre ces derniers et le test de confirmation a permis de conclure que le papier filtre est un support fiable de collecte et de conservation du matériel sanguin. De plus, un tel support de collecte facilitera le transport sans risque des échantillons.

En prenant en compte l'ensemble des résultats, nous recommandons l'utilisation de 3 disques de papier filtre pour avoir une quantité optimale d'Ig dans l'échantillon

après fixation ; l'utilisation du papier filtre dans les campagnes de dépistage à grande échelle dans le programme national de lutte contre le SIDA (PNLS) afin de réduire les coûts liés à l'acquisition du matériel de prélèvement ; la vulgarisation du papier filtre dans toutes les politiques de gestion épidémiologique et de suivi thérapeutique.

References

AZEVEDO-NETO R.S., SILVEIRA A.S.B., ZANETTA D.M.T., BURATTANI M.N., COSTA J.M., PANNUTTI C.S., SOUZA VAUF., MASSAD E. (1996). Transmission dynamics of varicella-zoster virus (VZV) in Sao Paulo, Brazil (Abstract). 7th International Congress for Infectious Diseases, International Society for Infectious Diseases, Hong-Kong. 10-13 Juin, 17-18.

BLANCHE S., ROUZIQUX C., MOSCATO M.L., VEBER F., MAYAUX M.J., JACOMET C., TRICOIRE J., DEVILLE A., VIAL M., FIRTION G. (1989). A prospective study of infants born to women seropositives for human immunodeficiency virus type 1. *N Engl J Med* 320, 1643-1648.

CASSOL S.A., LAPOINTE N., SALAS T., HANKINS C., ARELLA M., FAUVEL M., DELAGE G., BOUCHER M., SAMSON J., CHAREST J. (1992). Diagnosis of vertical HIV-1 transmission using the polymerase chain reaction and dried blood spot specimens. *J. Acquir Immune Defic Syndr* 5, 113-119.

CONNOR E.M., SPERLING R.S., GELBER R. (1994). Reduction of maternal infant transmission of human immunodeficiency virus type 1 with zidovudine treatment. *N Engl J Med* 331, 1173-1180.

DE ALMEIDA L.M., SOARES AZEVEDO R., ARPON MARANDINO GUIMARAES A., DA SILVA FREIRE COUTIHO E., STRUCHHNER C.J. and MASSAD E. (1999). Detection of antibodies against hepatitis A virus in eluates of blood spotted on filter-paper : a pilot study in Rio de Janeiro, Brasil. *Trans R Soc T Med Hyg* 93, 401-404.

DE TURENNE (1996). La femme : la première cible du SIDA. *Sidalerte* n° 51 Mars.

GIL A., GONZALEZ A., DAL-RE R., DOMINGUEZ V., ASTASIO P., AGUILAR L. (1997). Detection of antibodies against hepatitis A in blood spots dried on filter paper. Is this a reliable method for epidemiological studies ? *Epidemiology and Infection* 118, 189-191.

HOFF R., BERARDI V.P., WEIBLEN B.J., MAHONEY-TROUTT L., MICHELL M.L., GRADY G.E. (1988). Seroprevalence of human immunodeficiency virus among childbearing women. Estimation by testing samples of blood from newborns. *N Engl J Med* 318, 525-530.

JOHNSON J.P., NAIR P., HINES S.E., SEIDEN S.W., ALGER L., REVIE D.R., O'NEIL K.M., HEBEL R. (1989). Natural history and serologic diagnostic of infants born to human immunodeficiency virus infected women. *Am J Dis Child* 143, 1147-1153.

LAGA M., MANOKA A., KIVUVU M., MALELE B., TULIZA M., NZILA N., GOEMAN J., BEHETS F., BATTER V., ALARY M. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women : results from a cohort study ». *AIDS* 7, 95-102.

LEPAGE P., VAN DE PERRE P., MSHUATI P., HITIMANA D., SIMONON A., VAN GOETHEM C. (1993). Mother to child transmission of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and its determinants : a cohort study in Kigali, Rwanda. *Am J Epidemiol* 137, 589-599.

LOTF, LAPORTE A. (1998). Epidémiologie et situation actuelle. Paris-Douin (Girard PM, Katlama CH., Pialoux G).

MAKOTO ITOH, NIPULGUNAWARDEN K., XU-GUANG QIU, MIRANI V. WEERASOORIYA, EISAKU KIMURA (1998). The use of whole blood absorbed on filter paper to detect *Wuchereria bancrofti* circulating antigen. *Trans R Soc T Med Hyg* 92, 513-515.

MASSAD E., AZEVEDA-NETO R.S., BURATTINI M.N., ZANETTA D.M.T., COUTINHO F.A.B., YANG H.M., MORAES J.C., PANNUTI C.S., SOUZA VAUF., SILVEIRA A.S.B., STRUCHNER C.J., OSELKA G.W., CAMARGO M.C.C., OMOTO T.M., PASSOS S.D. (1995). Assessing the efficacy of a mixed vaccination strategy against rubella in Sao Paulo, Brazil. *Int J Epidemiol* 24, 842-850.

MBOPI KEOU F.X., MBU R., MAUCLERE P., ANDELA A., TETANYE E., LEKE R., CHAOUAT G., BARRE-SIMOUSSI F., MARTIN P., BELEC L. (1998). Antenatal HIV prevalence in Yaounde, Cameroon. *Int J STD AIDS* 9, 400-402.

MBU R.E., MAKI F.I.M., LEKE R.J.K. (1999). The impact of HIV infection on pregnancy outcome in Yaounde. *Biodiagnostics and therapy*, March 27-28.

MIN SANTE/CNLS/GTZ/BUREAU EPIDEMIOLOGIE. (1999). L'infection VIH/SIDA : situation épidémiologique et stratégies de lutte.

NDUMBE P.M., SKALTSKY J., JOLLET-JEMELKA H.I. (1994). Seroprevalence of hepatitis and HIV infection among rural pregnant women in Cameroon. *APMIS* 102, 662-666.

OLESKE J., OXTOBY M., DENNY T., GOODE L., SCHNECK M. (1990). Connore. Perinatal infection with HIV-1 in Newark. (Abstract). VIth International Conference on AIDS, San Francisco.

ONUSIDA/OMS. (1998). Le point sur l'épidémie du SIDA. ROYCE R.A., SENA A., CATES W. Jr, COHEN M.S. (1997). Sexual transmission of HIV. *N Engl J Med* 336, 1072-1078.

VAI S., CAVALLO R., ANGERETTI A., FERRARA B., BONGIASCA G., VOGLINO G., MERLINO C. (1987). Stability of specific antibodies in blood collected on filter paper disks. *Gionale Batteriologica Virologica Immunologica*, 80, 253-261.

WASSERHEIT J. (1992). Epidemiological synergy : interrelationships between human immunodeficiency virus infection and other sexually transmitted diseases. *Sex Trans Dis* 19, 67-77.

WATSOP D.C. (2000). Séroprévalence de l'infection à VIH chez les femmes enceintes dans la ville de Mbouda (Ouest-Cameroun). Thèse de Médecine, FMSB-Yaoundé 5-14.

Received: 16/09/2000

Accepted: 04/02/2001