

22 • Chlamydia

Plan du chapitre

- 1• Contexte clinique
- 2• Objectifs
- 3• Prélèvements
- 4• Méthodes de détection
- 5• Interprétation des résultats

1 • Contexte clinique

Spécialités	<i>C. trachomatis</i>	<i>C. pneumoniae</i>	<i>C. psittaci</i>
Ophthalmologie	sérovars A, B, Ba, C trachome sérovars D-K conjonctivite de l'adulte		
ORL		otite, sinusite	
Pneumologie		pneumopathie atypique trachéobronchite asthme	pneumopathie
Gynécologie Obstétrique	sérovars D - K <u>Infection génitale basse :</u> F : cervicite H : urétrite <u>Infection génitale haute :</u> F : endométrite, salpingite, péri-hépatite H : épидидymite <u>Nouveau né :</u> conjonctivite sérovars L1-L3 F et H : ulcération génitale (LGV)*		
Pédiatrie	sérovars D - K pneumopathie		
Rhumatologie	sérovars D-K arthrite réactionnelle Syndrome Fiessenger Leroy Reiter (FSL)	arthrite réactionnelle	
Cardiologie		coronaropathie	

* LGV = lymphogranulomatose vénérienne

2 • Objectifs

La recherche de *C. trachomatis* s'inscrit dans le cadre :

- ◆ du diagnostic étiologique d'une infection génitale symptomatique, haute ou basse, chez l'homme ou la femme,
- ◆ du diagnostic étiologique d'une conjonctivite ou d'une pneumopathie néonatale,
- ◆ du dépistage des infections génitales asymptomatiques chez l'homme ou la femme dans des circonstances particulières :

- dépistage systématique (loi Calmat, 1990)
- dépistage des personnes à risque (âge compris entre 15 et 20 ans, ayant un comportement à risque, consultant les centres de dépistage anonyme et gratuit des porteurs du VIH)
- bilan d'hyperfertilité
- ◆ du diagnostic étiologique des arthrites réactionnelles, syndrome de Reiter,
- ◆ du suivi d'efficacité thérapeutique.

Pour les infections à *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, le diagnostic repose en général sur un sérodiagnostic.

La place de *C. pneumoniae* dans les infections respiratoires est difficile à préciser. Elle varie selon les études, les patients et les pays. *C. pneumoniae* pourrait être à l'origine de 10 à 20% des pneumopathies communautaires.

3 • Prélèvements

1- Recueil

◆ Conditions générales

Les caractéristiques bactériologiques de ces bactéries expliquent les précautions particulières qu'il convient de prendre pour leur mise en évidence dans un produit pathologique. Le prélèvement doit :

- contenir des cellules
- être mis dans un milieu de transport adéquat
- être fait en dehors de toute antibiothérapie

◆ Matériel

- **Écouvillons pour les prélèvements sur les muqueuses** : les écouvillons doivent être adaptés à la technique utilisée. Pour la culture cellulaire, éviter l'écouvillon de coton cytotoxique, préférer les écouvillons à olive plastique pour les femmes et les écouvillons fins en dacron à tige métallique pour les hommes et les prélèvements conjonctivaux. Les cytobrosses peuvent être utilisées pour le prélèvement endocervical. Elles présentent l'avantage d'être abrasives donc de ramener beaucoup de cellules mais présentent l'inconvénient de provoquer des saignements, à éviter chez la femme enceinte et d'un effet néfaste pour la culture cellulaire.

Les écouvillons doivent être déchargés dans un milieu de transport pour les cultures cellulaires ou le diagnostic par les techniques de biologie moléculaire.

Pour l'examen direct des frottis devant être colorés par des anticorps monoclonaux fluorescents, l'écouvillon doit être déroulé sur une lame et le frottis fixé au méthanol ou l'acétone.

- Un **réceptacle stérile** contenant du milieu de transport pour les **liquides de ponction** (péritonéaux, articulaires) ou les **pièces opératoires**,
- Un **pot stérile** pour les **urines** du premier jet dont la quantité ne doit pas excéder 10 ml,

2- Site de prélèvements

- ◆ **Les muqueuses respiratoires** : écouvillonnage de gorge, LBA, brosse.
- ◆ **Les muqueuses génitales** : chez la femme, le prélèvement de l'endocol est réalisé après mise en place d'un spéculum et après avoir éliminé la glaire cervicale. Un prélèvement urétral associé est conseillé, les 2 écouvillons pouvant être déposés dans le même milieu de transport.

Avec les techniques d'amplification génique certains prélèvements non conventionnels comme les prélèvements vulvaires ou les pertes vaginales ont été utilisés pour la détection de *C. trachomatis* et ont donné d'aussi bons résultats que les prélèvements endocervicaux correspondants.

Dans les infections génitales hautes il est possible :

- de réaliser une biopsie d'endomètre à l'aide d'une pince protégée par un cathéter à travers le col
- de pratiquer au cours d'une coelioscopie des prélèvements tubaires (pus, brossage, adhérences) et du liquide dans le cul de sac de Douglas.

Chez l'homme, le prélèvement d'urètre nécessite un écouvillonnage à 3-4 cm du méat. Dans un bilan d'hypofertilité, *C. trachomatis* peut être recherché dans le sperme.

Chez l'homme et la femme, l'urine du premier jet (< 10 ml) peut être utilisée. Chez la femme, il ne faut pas faire la toilette du méat urinaire et ne pas protéger l'orifice vaginal de manière à souiller les urines par les sécrétions vaginales.

Dans le cas de LGV, on effectue un prélèvement d'ulcérations génitales ou une ponction de l'adéno-pathie inguinale.

- ◆ **les conjonctives** : le prélèvement est réalisé à l'aide d'un écouvillon extra fin par un grattage appuyé sur les conjonctives après avoir éliminé les exsudats purulents avec une gaze stérile.
- ◆ **les aspirations d'oreille moyenne**
- ◆ **les liquides articulaires et biopsies synoviales**
- ◆ **les plaques d'athérome**

3- Transport

Un milieu de transport adapté doit être impérativement utilisé. Les écouvillons doivent être déchargés dans un milieu :

- permettant la survie de la bactérie pour la culture cellulaire, comme le 2SP (0,2 M saccharose, 15 mM K₂HPO₄, 6 mM KH₂PO₄) contenant 5% de sérum de veau fœtal,

- ou permettant l'extraction des antigènes ou des acides nucléiques pour les autres techniques.

Le délai et la température de transport vont dépendre de la qualité du milieu. dans le 2SP, le délai de mise en culture ne doit pas excéder 48 h à + 4°C (pour un délai plus long, congeler à - 80°C). Les autres milieux de transport supportent une température ambiante pendant 24 à 48 h et une semaine à + 4°C.

4 • Méthodes de détection

À côté de la culture cellulaire, il existe des méthodes rapides de détection des antigènes ou des acides nucléiques. Toutes les méthodes ne sont pas adaptées à tous les types de prélèvements. La culture cellulaire peut être envisagée quel que soit le prélèvement mais avec des chances de succès variables dépendantes de nombreux paramètres tels que la viabilité de la bactérie dans le prélèvement, la nature du prélèvement, la qualité des cellules réceptrices, la qualité de la révélation.

La plupart des tests rapides n'autorise que la recherche de *C. trachomatis* dans certains prélèvements. Ils sont tous adaptés aux prélèvements endocervicaux, certains également aux prélèvements urétraux masculins. Peu sont adaptés aux prélèvements conjonctivaux et seules les trousse de biologie moléculaire détectant les acides nucléiques après amplification permettent de détecter *C. trachomatis* dans les urines avec une sensibilité correcte.

Pour *C. pneumoniae* et *C. psittaci*, il n'existe pas de méthodes commercialisées de détection spécifique d'espèces. En dehors de la culture et de l'IFD (immunofluorescence directe) sur frottis, l'amplification génique *in vitro* est réalisée par quelques laboratoires spécialisés.

1- Culture cellulaire

- ◆ **Les cellules** : les plus couramment utilisées sont les cellules McCoy (lignée issue d'une synoviale humaine) et HeLa 229 (lignée issue d'un carcinome du col utérin) pour *C. trachomatis* et *C. psittaci* et les cellules HL (issues de poumon humain) et HEP2 pour *C. pneumoniae*.
- ◆ **Le support** : plaque pour culture cellulaire à 24 ou 96 puits ou mieux tube individuel contenant une lamelle
- ◆ **Les milieux** : MEM (milieu essentiel minimum) convient à l'entretien des cellules, supplémenté en glutamine et sérum de veau fœtal.

Il peut être additionné d'antibiotiques et d'antifongiques si nécessaire. Pour la culture des *Chlamydia*, ce milieu d'entretien est additionné de glucose (facteur de croissance) et de cycloheximide (bloquant le métabolisme cellulaire).

- ◆ **Les conditions opératoires** : après ensemencement sur les cellules du milieu 2SP contenant le prélèvement, 3 étapes sont importantes :
 - la centrifugation : une vitesse de centrifugation comprise entre 2500 et 3000 g à 35-37°C pendant 1 heure permet l'adsorption des corps bactériens sur les cellules
 - l'incubation des cellules en milieu de culture pendant 48 à 72 heures à 37°C sous 5% CO₂
 - la révélation des inclusions par des anticorps monoclonaux marqués spécifiques de genre ou d'espèce.

La présence d'une seule inclusion permet d'affirmer l'infection à *Chlamydia*. Il est recommandé de pratiquer des subcultures pour augmenter les chances de succès (2 pour *C. trachomatis*, jusqu'à 5 pour *C. pneumoniae*).

2- Méthode de détection des antigènes

◆ Immunofluorescence directe = IFD

L'IFD est réalisée sur frottis ou sur étalements obtenus par cyto-centrifugation. En théorie, elle est possible sur tous les types de prélèvements mais son interprétation est difficile et tient compte de la qualité des anticorps et de l'expérience de l'examineur. Elle permet de visualiser les corps élémentaires (CE) extracellulaires sur un fond cellulaire. Les performances du test dépendent du réactif utilisé : les anticorps monoclonaux donnent de meilleures caractéristiques morphologiques, les anticorps dirigés contre la MOMP (Major Outer Membrane Protein), spécifiques de l'espèce *C. trachomatis*, produisent une fluorescence nette et donnent moins de fluorescences non spécifiques que ceux dirigés contre le LPS, spécifiques du genre *Chlamydia*. Le seuil de positivité généralement admis est de 10 CE par frottis. L'IFD est le seul test capable de vérifier la qualité du prélèvement (richesse en cellules).

◆ Les techniques immunoenzymatiques EIA et apparentées

Les techniques EIA permettent la détection d'antigènes chlamydiens extraits des prélèvements. Les trousse autorisées sont validées sur prélèvements endocervicaux, certaines sur les prélève-

Différents tests de diagnostic direct d'une infection à Chlamydia				
Méthodes	Délai de réponse	Avantages	Inconvénients	Adaptées à la recherche de
Culture cellulaire	48 à 72 h	spécificité isolement de la souche caractérisation sensibilité aux antibiotiques	sensibilité variable	<i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>C. psittaci</i>
Méthodes antigéniques				
• IFD	< 1 h	contrôle de la qualité du prélèvement	lecture subjective	<i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>C. psittaci</i>
• Elisa et apparentés	2 à 4 h	automatisation	sensibilité 80 % spécificité 95 % test de confirmation	<i>C. trachomatis</i>
• EIA sur membrane	30 min	rapidité	limités aux endocervicaux	<i>C. trachomatis</i>
Méthodes moléculaires				
• Hybridation simple commercialisée	2 h	automatisation	sensibilité, spécificité Elisa	<i>C. trachomatis</i>
• Amplification - laboratoire spécialisé	48 à 72 h	sensibilité, spécificité 95 %	sensibilité aux inhibiteurs des enzymes (faux négatifs) problème de contamination lourdeur de la technique	<i>C. trachomatis</i> <i>C. pneumoniae</i> <i>C. psittaci</i>
- commercialisées	2 à 4 h	automatisation	coût	<i>C. trachomatis</i>

ments urétraux et aucune sur les urines. L'automatisation de ces techniques et l'absence de subjectivité de lecture constituent un avantage sur l'IFD et les rendent accessibles à tout laboratoire.

◆ Les techniques de détection des acides nucléiques

Les techniques de biologie moléculaire permettent la détection des acides nucléiques *C. trachomatis* par hybridation ou par amplification génique (PCR : polymérase chain reaction, LCR : ligase chain reaction, TMA: transcription mediated amplification)

Les tests d'amplification génique commercialisées sont automatisés (PCR, LCR), ou manuels (TMA) et sont capables de détecter *C. trachomatis* dans les prélèvements génitaux, les urines et le sperme. Ces tests commercialisés ont l'avantage de présenter des qualités de reproductibilité et de sécurité. Ils doivent cependant être réalisés dans les conditions rigoureuses d'organisation.

Certains laboratoires développent leur propre méthode de PCR. C'est actuellement la seule possibilité de diagnostic génotypique pour *C. pneumoniae*.

5 • Interprétation des résultats

1- Interprétation d'un résultat positif

Pour *C. trachomatis*, la présence de la bactérie authentifie l'infection causale et entraîne la mise en route d'un traitement adapté. Cependant, il faut connaître les limites de spécificité et les possibilités de faux positifs des méthodes choisies. Pour l'IFD, il faut être exigeant sur la qualité de la fluorescence des CE extracellulaires et retenir le seuil d'au moins de 10 CE par frottis. Pour l'EIA, un test de blocage est indispensable pour confirmer tout résultat positif. Pour les tests d'amplification, il faut s'entourer de contrôles négatifs. La signification clinique d'un seul résultat positif par amplification génique n'est pas établie.

Pour *C. pneumoniae*, la relation de cause à effet est encore plus discutable, si le diagnostic repose uniquement sur un résultat de PCR. D'autres arguments cliniques et sérologiques sont nécessaires. Après une infection des voies respiratoires parfois inapparente, un portage à long terme pourrait expliquer la possibilité de réinfection et la dissémination à l'entourage, comme le prouve une forte séroprévalence dans la population générale. Les tests d'IFD sont particulièrement difficiles à interpréter en raison de nombreux

artefacts de fluorescence dûs à la non spécificité des anticorps dirigés contre le LPS du genre *Chlamydia*. La mise en évidence de *C. psittaci* dans un contexte clinique évocateur permet de poser le diagnostic.

2- Interprétation d'un résultat négatif

Pour *C. trachomatis*, un résultat négatif n'exclut pas le diagnostic, surtout si l'examen a été pratiqué chez une personne symptomatique et à haut risque de MST. Il conviendra en premier lieu de vérifier la qualité du prélèvement et de le refaire pour affirmer ou infirmer le diagnostic. Aucune technique ne possède une sensibilité de 100% même si les techniques d'amplification tentent de s'en rapprocher. Avec ces dernières, la possibilité de faux négatif n'est jamais exclue du fait de la présence d'inhibiteurs des enzymes de l'amplification dans le prélèvement. L'utilisation d'un contrôle interne capable de vérifier les étapes de préparation de l'échantillon et d'amplification est indispensable.

Bibliographie

- DE BARBEYRAC B., BÉBÉAR C. *Chlamydia*. Méd. Mal. Infect. 1997, 27 : 71-83.
- ORFILA J. Chlamydiales. Manuel de Bactériologie Clinique. (Elsevier, Paris) J. Freney, F. Renaud, W. Hansen, C. Bollet. Volume 3, 1731-1748, 1994.
- BLACK C.M. Current methods of laboratory Diagnosis of *C. trachomatis* infections. Clin. Microbiol. Rev. 1997, 10 : 160-184.
- SAIKKU P. *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis - An Update. Scand. J. Infect. Dis. 1997, Suppl 104 : 53-56.

