

CAHIER DE

Formation

Biologie médicale

N° 04

juin 96

BACTÉRIOLOGIE :

LES INFECTIONS

A CHLAMYDIA TRACHOMATIS



CAHIER DE

Formation

Biologie médicale



Ceci est la VERSION NUMERIQUE des CAHIERS BIOFORMA déjà parus et distribués à l'ensemble des LABORATOIRES D'ANALYSES de BIOLOGIE MEDICALE en FRANCE.

▮

TOUT LE CONTENU DE CE FICHER RESTE LA PROPRIETE DE BIOFORMA.
LES DROITS D'AUTEURS SONT PROTEGES A LA B.N.F.

▮

Toute reproduction, toute utilisation, partielle ou totale, des textes, schémas et photos de cet ouvrage, sans l'autorisation écrite de BIOFORMA, seront poursuivies devant les tribunaux compétents.

▮

Seule une impression pour une copie personnelle (étudiant, interne, biologiste de labm) est permise.



BIOFORMA

LES INFECTIONS

A CHLAMYDIA TRACHOMATIS

Docteur F. CATALAN

Médecin Biologiste

Lauréat de l'Académie Nationale de Médecine

Consultant O.M.S. pour les M.S.T.

Avec la collaboration technique de :

A. Milovanovic

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Toute reproduction, même partielle, ne peut être faite
qu'après autorisation des auteurs et de Bioforma.



Cher Confrère,

BIOFORMA a le plaisir de vous faire parvenir le numéro 4 des Cahiers de Formation de Biologie Médicale.

En liaison avec la Direction des contrôles et des Laboratoires de l'Agence du Médicament, le thème des Chlamydiae a été retenu pour répondre à un besoin qui se manifeste avec de plus en plus d'acuité.

Ce document, préparé par un expert scientifique connu de tous, fait le point des techniques les plus récentes et des dernières avancées acquises en la matière.

C'est le but recherché et voulu par BIOFORMA : mettre à la disposition des biologistes des instruments de mise à jour des connaissances dans les domaines sensibles de la santé publique pour aider à la qualité de leur pratique quotidienne.

Nous vous en souhaitons bonne réception et vous prions d'agréer, Cher Confrère, nos confraternelles et cordiales salutations.

Adrien BEDOSSA
Président

Professeur Christian JANOT
Directeur des Laboratoires et des
Contrôles
Agence du Médicament

Association régie par la Loi de 1901-4 rue Pasquier – 75008 Paris – Tél (1) 42 65 20 71 – Fax (1) 47 42 18 10
Siret : 391 155 74 00017 – Code APE : 913 E

SOMMAIRE

Chapitres	Pages
I - Généralités	9
II - Classification	10
III - Le pouvoir pathogène naturel	13
1 - Le trachome	14
2 - Les conjonctivites à inclusions	16
3 - La lymphogranulomatose vénérienne (LVG)	18
4 - Les infections génitales	22
IV - Biologie et physiopathogénie	35
1 - Structure et morphologie	35
2 - Le cycle de multiplication	43
V - Le diagnostic de laboratoire	46
1 - Les modalités de prélèvement	46
2 - Que faire des prélèvements ?	55
3 - La sérologie	60
VI - Le traitement	71

Numéro de fiches	Pages
1 - Recherche directe de Chlamydia trachomatis par immunofluorescence directe	81
2 - Détection de Chlamydia trachomatis dans les produits pathologiques par une méthode immuno-enzymatique	87
3 - Isolement de chlamydia trachomatis sur monocouche cellulaire	91
4 - Microméthode d'isolement en monocouche cellulaire	97
5 - Détection de Chlamydia trachomatis par biologie moléculaire	105
6 - Révélation des inclusions par les méthodes iodées	118
7 - Révélation des inclusions en culture de cellules, par immunofluorescence	121
8 - Révélation des inclusions en culture cellulaire par méthode immuno-enzymatique à la peroxydase	125
9 - Sérologie des Chlamydiae par le test de micro-immunofluorescence.....	129

10 - Sérologie de Chlamydia trachomatis sur cellules infectées.....	137
11 - Dosage immuno-enzymatique des anticorps anti-chlamydia trachomatis.....	141
12 - Modalités de prélèvement et d'utilisation du milieu de transport en vue de l'isolement de Chlamydia trachomatis.....	145

I GÉNÉRALITÉS

L'importance de *Chlamydia trachomatis* dans l'étiologie des maladies sexuellement transmissibles (MST) n'a cessé de croître depuis la fin du siècle passé après la découverte du gonocoque par Neisser. A cette même époque Kröner pressentit que l'ophtalmie purulente du nouveau-né, pouvait être d'une origine infectieuse autre que celle du gonocoque.

Halberstädter et Von Prowasek mettent en évidence en 1907, des inclusions basophiles intra cytoplasmiques chez les sujets atteints de trachome.

Deux ans plus tard en 1909 Lindner met en évidence le même type d'inclusions chez des patients atteints d'urétrite non gonococcique (UNG) et Hayman un an plus tard démontre ce même type d'image chez les enfants porteurs d'une conjonctivite néo-natale.

Les travaux combinés de Fristch, Hofstätter et Lindner permettent en 1910 de démontrer que ces derniers sont de même nature que ceux observés chez les parents de ces enfants.

Wahl en 1911 montre l'association possible d'une urétrite persistant après une gonococcie traitée (urétrite post gonococcique).

Deux ans plus tard Durand, Nicolas et Favre décrivent la lympho granulomatose vénérienne (cliniquement décrite déjà en 1833 par Wallace), et la rattachent à la même étiologie.

En 1957 (presque un demi-siècle plus tard) Tang réussit l'isolement de la bactérie sur l'embryon de poulet, puis Gordon et Quan décrivent en 1965 une technique d'isolement, de l'agent du trachome, sur monocouche de cellules de lignée continue (Mc Coy).

En 1970 Wang et Grayston complètent la connaissance de ce groupe de bactéries grâce à l'immunofluorescence. Cette technique permet à Dwyer, un an plus tard de différencier *Chlamydia trachomatis* de *Chlamydia psittaci* et de reconnaître au sein de l'espèce *trachomatis*, 15 séro-types différents.

Dès 1975 la découverte des anticorps monoclonaux, laisse présager une grande sensibilité dans le diagnostic des maladies infectieuses ; leur commercialisation en 1983 est une étape

importante dans le diagnostic des infections à *Chlamydia trachomatis*, améliorant ainsi la sensibilité de la détection directe.

L'application de la technique ELISA à la sérologie des maladies infectieuses, facilite l'approche du diagnostic rétrospectif des infections à *Chlamydiae*.

Les techniques actuelles de biologie moléculaire bien que non encore standardisées, paraissent très prometteuses dans le domaine des diagnostics difficiles de ce type d'infection, mais des données scientifiques plus approfondies sont nécessaires pour les valider.

■ II. CLASSIFICATION

L'ordre des *Chlamydiales* comprend à ce jour une seule et unique Famille : Les *Chlamydiaceae*, ainsi qu'un seul genre : *Chlamydia* (C.)

A l'heure actuelle trois espèces constituent la famille :

- *Chlamydia trachomatis*
- *Chlamydia psittaci*
- *Chlamydia pneumoniae*.

Compte tenu du bas pourcentage d'homologie qui existe entre *C. psittaci* et *C. trachomatis*, il faut s'attendre à ce que des remaniements surviennent dans un proche avenir, dans la taxonomie.

Ce groupe bactérien très particulier a été désigné au cours du temps sous des dénominations diverses : *Bedsonia*, *Myagawanella*, *Ehrlichia*, *Chlamydozoon*, *Tric* - agents, *Néorickettsies*, puis *Chlamydia*.

Un antigène commun à l'ensemble, constitue l'antigène de groupe, de nature lipopolysaccharidique (LPS), dont la structure contient un noyau, ou core, commun avec les bacilles à Gram négatif et particulièrement les entérobactéries.

Les différentes espèces sont par ailleurs caractérisées par des structures antigéniques spécifiques et finalement, chaque type d'une espèce est porteur d'un ou de plusieurs antigènes spécifiques.

Les antigènes sont pour la majorité des protéines, dont la structure est déterminée par un gène correspondant dont la composition nucléotidique a pu être en partie connue à ce jour, grâce à des techniques de biologie moléculaire.

C'est ainsi que Kingsbury et Weiss en 1968 ont pu démontrer que le degré d'homologie entre *C. trachomatis* et *C. psittaci* n'était que de 10 %, ce qui a été reconfirmé ultérieurement par Peterson et de la Maza.

Cette faible homologie est quelque peu contradictoire avec l'homologie phénotypique, responsable de réactions sérologiques croisées, entre les deux espèces.

Sur ce plan on rapproche de l'espèce *trachomatis*, l'agent de la méningo-pneumonie de la souris.

- *Chlamydia trachomatis* est en fait constituée de trois groupes, formés de sérotypes (ou sérovars) différant par des antigènes spécifiques de type, et responsables de pathologies particulières caractéristiques,

- Le groupe lié au trachome endémique, est formé de quatre sérovars :

A, B, Ba, et C.

- Le groupe de la lymphogranulomatose vénérienne (LGV), est constitué également de trois sérovars très proches :

L1,L2,L3.

- Le groupe lié aux MST et aux conjonctivites non folliculaires, est constitué de huit sérovars et probablement de sous-types dont seulement quelques uns sont connus à l'heure actuelle :

D,E,F,G,H,I,J,K.

L'espèce *psittaci* constitue en fait un groupe hétérogène dont les essais de classification n'ont pas à ce jour donné entière satisfaction.

L'analyse génique des différents types montre des différences sensibles dans la composition, bien que le pourcentage de GC (Guanine-Cytosine) varie dans des limites tout à fait compatibles avec des micro-organismes d'une même espèce (41 % pour *C. psittaci*, 44 % pour *C. trachomatis*).

L'étude des séquences nucléotidiques des différents types montre que l'agent responsable de la méningo-pneumonie de la souris n'a qu'une faible homologie ADN-ADN située dans les limites inférieures acceptables, alors que LGV et Trachome montrent une homologie supérieure à 60 %.

Les études d'hybridation moléculaire avec les résidus résultant de la digestion par des enzymes de restriction, montre des différences possibles avec les différentes souches isolées au sein d'un même sérotype.

Tous les sérotypes de l'espèce *trachomatis* sont pathogènes pour l'homme.

L'espèce psittaci est essentiellement pathogène pour l'animal, où elle provoque des épidémies importantes (zoonoses).

L'homme peut accidentellement s'inscrire dans ce cycle épidémiologique.

Chlamydia pneumoniae provoque des infections respiratoires chez l'adulte, de gravité très variée. Très proche par ses caractéristiques biologiques et sa morphologie de *Chlamydia psittaci*, cette espèce aujourd'hui individualisée, réagit faiblement avec les anticorps monoclonaux de l'espèce *trachomatis*, mais réagit bien avec les anticorps de genre.

L'importante prévalence sérologique de l'espèce *pneumoniae* montre bien son ubiquité et la cause relativement fréquente des infections du tractus respiratoire supérieur chez les enfants d'âge scolaire et les adultes jeunes (Ridgway et Path, 1989).

Les groupes responsables de la pathologie humaine, plus homogènes, donnent lieu à des réactions sérologiques croisées très intenses, alors que la différenciation est possible avec les autres genres, du moins au départ de l'infection.

La classification de l'espèce *trachomatis* en 3 groupes par Wang et Grayston, grâce à l'immunofluorescence, a été modifiée à l'avènement des anticorps monoclonaux, en reconnaissant trois nouvelles variétés (Da, Ia, L2a), antigéniquement très proches de D, I et L2.

Les mêmes auteurs ont en 1991, classé tous les sérotypes de *Chlamydia trachomatis* en 3 groupes :

- C (C, A, H, I, Ia, J, K, L3)
- B (B, Ba, D, Da, E, L1, L2, L2a)
- F (F, G).

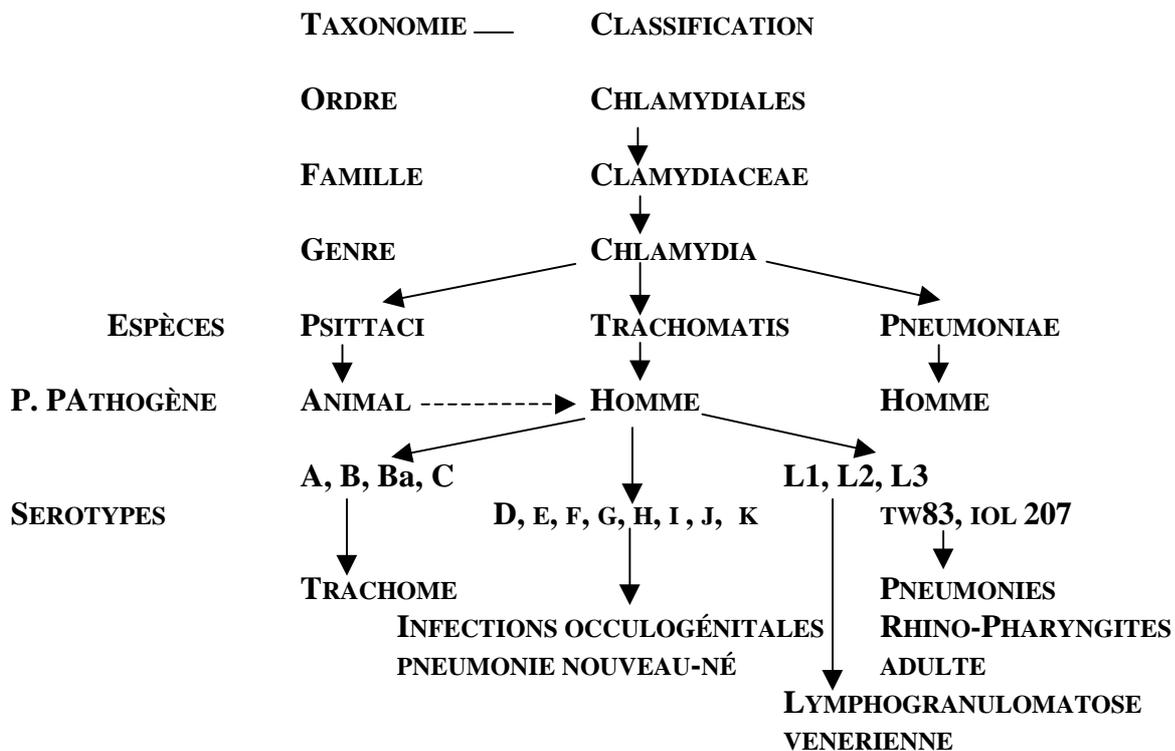
Actuellement des techniques de biologie moléculaire permettent d'établir une cartographie différentielle de restriction, appliquée à l'étude de la structure hétérogène des différents sérovares actuellement connus (Sayada, Frost, Rodriguez, 1991).

III. LE POUVOIR PATHOGÈNE NATUREL

Chlamydia trachomatis a été reconnue au cours de ces dernières décennies, comme un pathogène majeur, provoquant chez l'homme des entités pathologiques diverses que l'on peut classer, sur le plan épidémiologique, en deux groupes principaux :

- Les infections directement transmissibles (contact direct ou sexuellement transmissible). Elles sont le plus souvent dues à *Chlamydia trachomatis* ou *Chlamydia pneumoniae*.
- Les infections transmises à l'homme de façon purement accidentelle comme c'est le cas des infections dues à *Chlamydia psittaci*.

Le **tableau 1** résume les différents aspects pathogènes des chlamydiae chez l'homme.



III.1. Le trachome

Décrite 27 siècles avant J.-C., la maladie commence par une conjonctivite aiguë muco purulente, la plupart du temps compliquée par des infections bactériennes secondaires. Très différente de la conjonctivite aiguë à gonocoques qui elle, est franchement purulente. (Photos 1 et 2)



Photo 1 : Trachome : stade de début conjonctivite folliculaire (photo de l'OMS-WHO).



Photo 2 : Conjonctivite purulente aiguë à gonocoques (photo de A. SIBOULET).

L'évolution se fait vers la kérato conjonctivite folliculaire chronique qui souvent, s'accompagne d'un pannus ou néovascularisation cornéenne. **(Photo 3)**



Photo 3 : Kérato-conjonctivite (OMS-WHO).

La transmission se fait par contact direct d'œil à œil, ce qui conduit à une inflammation chronique qui peut affecter la conjonctive tout entière et laisser des séquelles cornéennes, cause la plus fréquente de cécité.

Dans les pays endémiques la maladie se manifeste au cours de l'enfance et décroît vers l'âge de six à dix ans.

A ce stade-là si l'infection devient inactive le trachome guérit, sans laisser de séquelles pouvant se répercuter sur la vision.

Certains présenteront un trachome modéré à sévère, avec une conjonctivite cicatricielle résultant d'une nécrose des follicules.

Avec le temps et en pays d'infection hyperendémique, la maladie peut conduire à des déformations de la paupière supérieure, les cils venant frotter l'épithélium cornéen qui finira par être lésé (micro-ulcérations cornéennes).

Ce processus peut se dérouler en 25 ou 40 ans et aboutir à la cécité.

Les sérovars A, B, Ba, et C sont habituellement associés au trachome.

III.2. Les conjonctivites à inclusions

La plus fréquente est la conjonctivite à de l'adulte, d'ailleurs beaucoup plus fréquente chez les sujets sexuellement actifs, car tous les sérotypes associés aux infections génitales peuvent provoquer au niveau de l'œil une infection.

Cette localisation se rencontre chez les sujets âgés de 18 à 30 ans avec une plus grande prévalence à 20 ans, et souvent dans ce cas, l'infection génitale précède l'infection oculaire (Dawson 1986).

Le risque de transmission oculaire à partir d'une infection génitale a été évalué par Tullo et coll. en 1981, il serait de 0.3 %.

Il s'agit le plus souvent d'une infection bénigne, de type conjonctivite hyperhémique d'abord unilatérale. (**Photo 4**)



Photo 4: Conjonctivite aiguë hyperhémique à Chlamydia oculo-génitale (photo de A. SIBOULET).

L'évolution vers une kératite ponctuée ou une uvéite antérieure est exceptionnelle.

La conjonctivite peut être isolée ou associée à une urétrite, comme on l'observe dans 60 % des cas d'un syndrome de Reiter (Syndrome de Fissenger, Leroy, Reiter).

On retrouve dans ce cas un antigène HLA-B27 dans plus de 75 % des cas.

Ce type de conjonctivite peut également s'observer à la suite de baignades en piscine.

La présence de *Chlamydia trachomatis* dans les voies génitales basses au moment de l'accouchement, fait courir un grand risque de transmission au nouveau-né.

Selon Wadler (1984) dans 50 % des cas l'infection est bilatérale et la période d'incubation varie de 5 à 14 jours ce qui explique l'échec de la méthode prophylactique de Credé.

La transmission au nouveau-né de l'infection chlamydienne ne se manifestera par une conjonctivite que dans 50 % des cas, mais elle peut provoquer une pneumopathie (Beem et Saxon 1977).

Elle se caractérise par une toux sèche, des râles crépitants à la base des poumons ; le plus souvent la fièvre est modérée.

L'origine chlamydienne de ce type de pneumopathie fut corroborée par Frommel en 1977 qui réussit à isoler *Chlamydia trachomatis* d'une biopsie pulmonaire.

Plus tard Tipple l'isole également dans 73 % des cas de pneumonie chez les moins de six mois.

Chlamydia trachomatis est responsable d'environ 25 ou 30 % des cas de pneumopathies diagnostiqués dans les six premiers mois de vie.

Environ 1 % des nouveau-nés souffrent d'une pneumopathie due à *Chlamydia trachomatis*.

L'augmentation importante du taux des IgG et des IgM spécifiques, permet aisément de faire le diagnostic différentiel avec une pneumopathie virale (Schachter, 1979).

Il semblerait par ailleurs que l'augmentation du taux des anticorps spécifiques dans les larmes est habituelle avant que ne se déclare la pneumopathie (Harrisson, 1978).

Compte tenu de l'origine vénérienne de *Chlamydia trachomatis*, ces infections sont la plupart du temps dues aux sérotypes D à K.

Chez l'adulte la pneumopathie chlamydienne peut s'observer, elle est le plus souvent due à *Chlamydia pneumoniae* (souche Twar) et accidentellement à *Chlamydia psittaci*.

III.3. La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)

Maladie sexuellement transmissible, décrite pour la première fois par Hunter en 1786, puis en 1833 par Wallace, son entité pathologique n'a vraiment été établie qu'en 1913 par Nicolas, Favre et Durand sous le terme de bubon climatérique.

Relativement fréquente dans les pays tropicaux et sub-tropicaux (10 % en Inde selon Sowmini), elle peut s'observer avec une moindre fréquence dans les pays tempérés (Europe, USA), où il s'agit le plus souvent d'importation d'un pays endémique, ou de contacts avec des sujets venant d'un pays d'endémie.

La maladie s'installe à la faveur d'une ulcération à l'emporte-pièce, indolore, aphlegmasique et qui guérira spontanément, ce qui souvent la fait passer inaperçue. Ce chancre est la plupart du temps la porte d'entrée, suivie d'une période d'incubation de 4 à 21 jours, mais qui peut se prolonger jusqu'à 3 ou 4 mois (Siboulet et coll 1987). **(Photo 5)**



Photo 5 : Lympho granulomatose vénérienne avec chancre d'inoculation persistant. Fistulisation de l'adénopathie.

La maladie se manifeste alors, par une adénopathie inguinale de type inflammatoire avec périadénite, douloureuse, souvent unilatérale. **(Photo 6)**



Photo 6 : Adénopathie inguinale bilatérale caractéristique à la période d'état de la lymphogranulomatose vénérienne.

Sa persistance conduit à des lésions destructrices tardives (une à plusieurs années), conséquence de la lymphadénite qui caractérise l'infection. **(Photo 7)** Voir page suivante

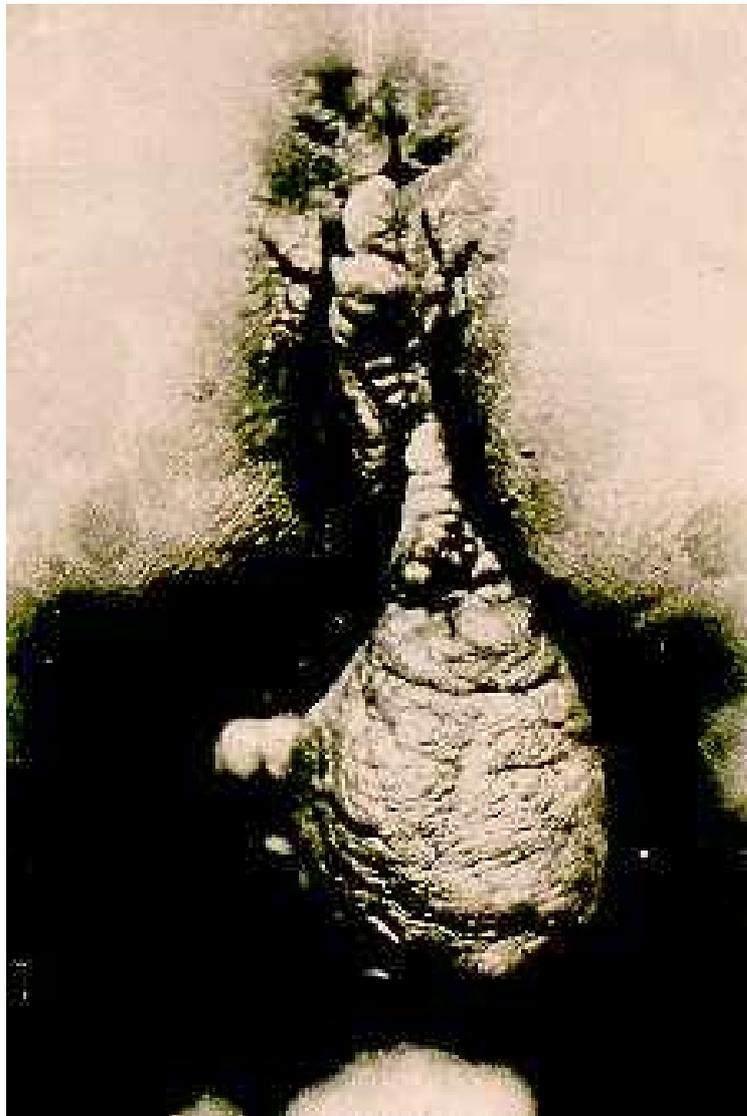


Photo 7 : *Esthionème vulvaire. Complication de la LGV (collection personnelle de Mme SOWMINI Madras - Inde).*

La généralisation est la règle et les localisations intestinales basses ne sont pas rares, provoquant des fistulisations multiples, dues à des micro-ulcérations de la muqueuse rectale et digestive.

Ces lésions se transforment progressivement en lésions granuleuses folliculaires, parfois volumineuses, responsables de rétrécissements qui peuvent perturber le transit et l'évacuation du contenu fécal (syndrome ano-génito-rectal). **(Photo 8)**



Photo 8 : Syndrome ano-génito-rectal au cours d'une LGV (collection personnelle de Mme SOWMINI – Madras - Inde).

Si un traitement n'est pas instauré rapidement au moment du bubon inguinal (ouverture et évacuation du contenu, suivis d'une antibiothérapie adaptée), la fistulisation spontanée est la règle. Elle se fera en plusieurs points (fistulisation dite en pomme d'arrosoir).

La cicatrisation sera longue et l'évolution émaillée de complications locorégionales.

La LGV est produite par les sérotypes L (L1, L2, L3), ils diffèrent considérablement des autres sérotypes connus, par leur tendance à généraliser l'infection.

Cette caractéristique a conduit certains auteurs à considérer ces sérotypes comme faisant partie d'un groupe à part.

La généralisation de l'infection s'accompagne d'une forte réponse immune avec des taux d'anticorps spécifiques, généralement élevés.

III.4. Les infections génitales

Pendant les deux dernières décennies, *Chlamydia trachomatis* a été reconnu comme le majeur pathogène sexuellement transmissible. Cependant bon nombre des infections sont difficiles à diagnostiquer aussi bien chez l'homme que chez la femme, car elles sont peu symptomatiques voire même totalement asymptomatiques. Même lorsque des symptômes attirent l'attention sur la sphère génitale ils ne sont pas spécifiques de *Chlamydia trachomatis*. (CT.)

Fort heureusement les progrès réalisés par les laboratoires ont permis ces dernières années une bien meilleure détection de la bactérie.

L'augmentation considérable des maladies sexuellement transmissibles (MST) durant cette deuxième partie du XX^e siècle, et particulièrement la meilleure connaissance des urétrites non gonococciques (UNG) et des urétrites postgonococciques (UPG), ont contribué à l'intérêt croissant qu'a suscité *Chlamydia trachomatis* comme principal protagoniste.

Bien que l'existence de ces infections soit connue depuis le début de notre siècle, les micro-organismes responsables, ont été étudiés par les ophtalmologistes en tant que pathogènes oculaires (Lindner, 1911 ; Thygeson et Stone, 1942).

C'est en découvrant les mêmes images pathognomoniques dans l'œil des nourrissons nés avec une conjonctivite et dans le col de mères et l'urètre de pères que l'on a pu établir la transmission sexuelle de *Chlamydia trachomatis*. (**Photos 9.1, 9.2, 9.3**)

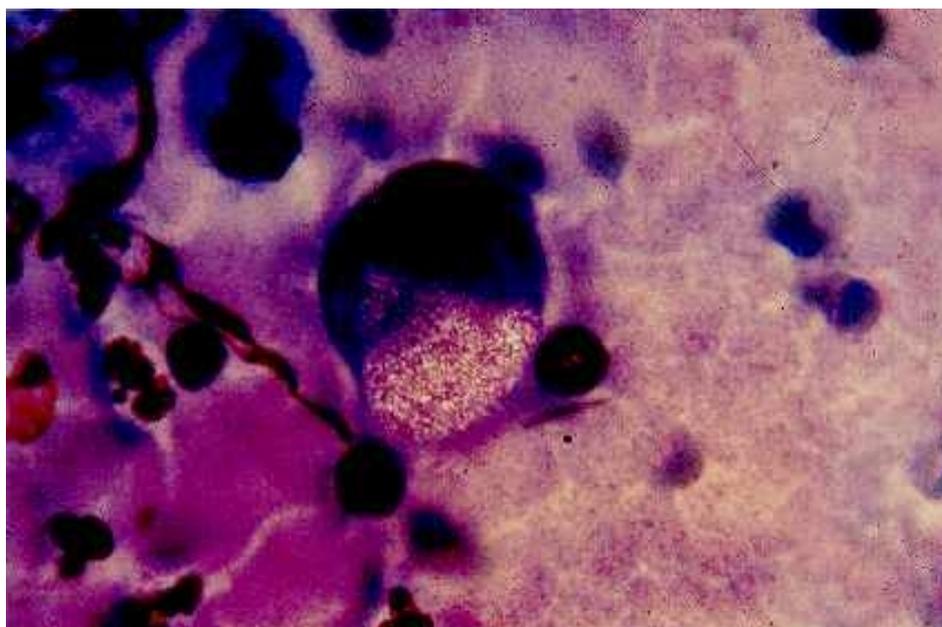


Photo 9.1 : Frottis urétral montrant une cellule épithéliale avec une inclusion chlamydienne prête à éclater.

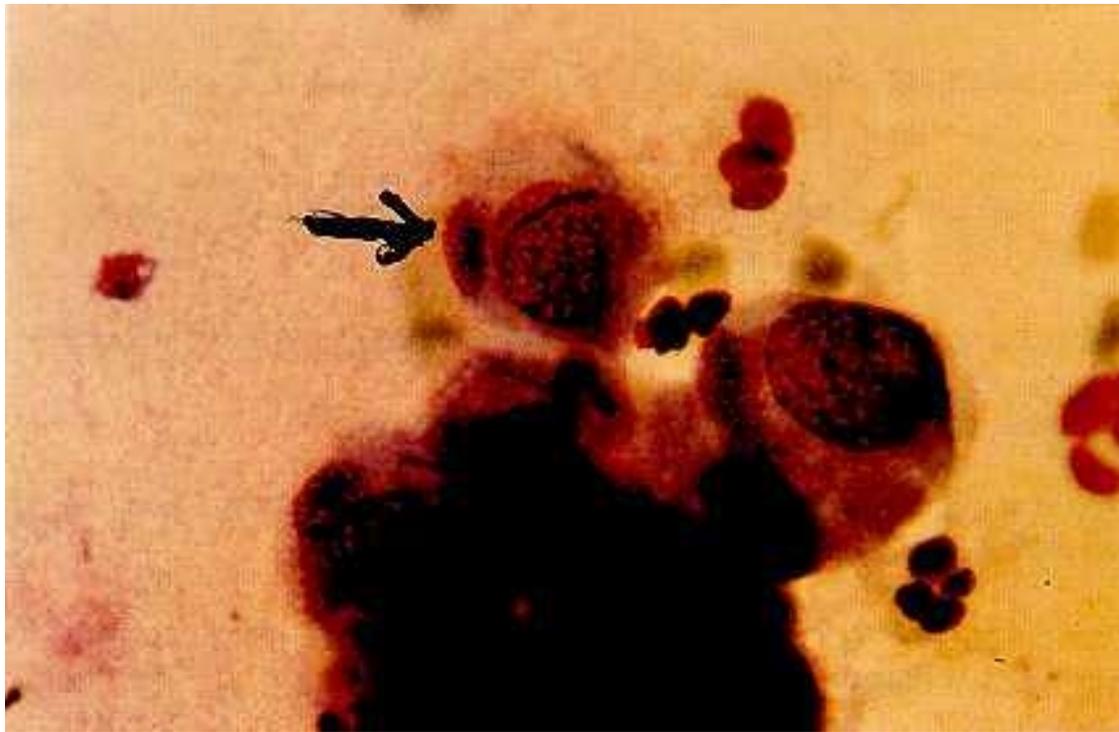


Photo 9.2 : Frottis conjonctival montrant 3 cellules à inclusions (midi, 2 h 30 et 8 h 30).

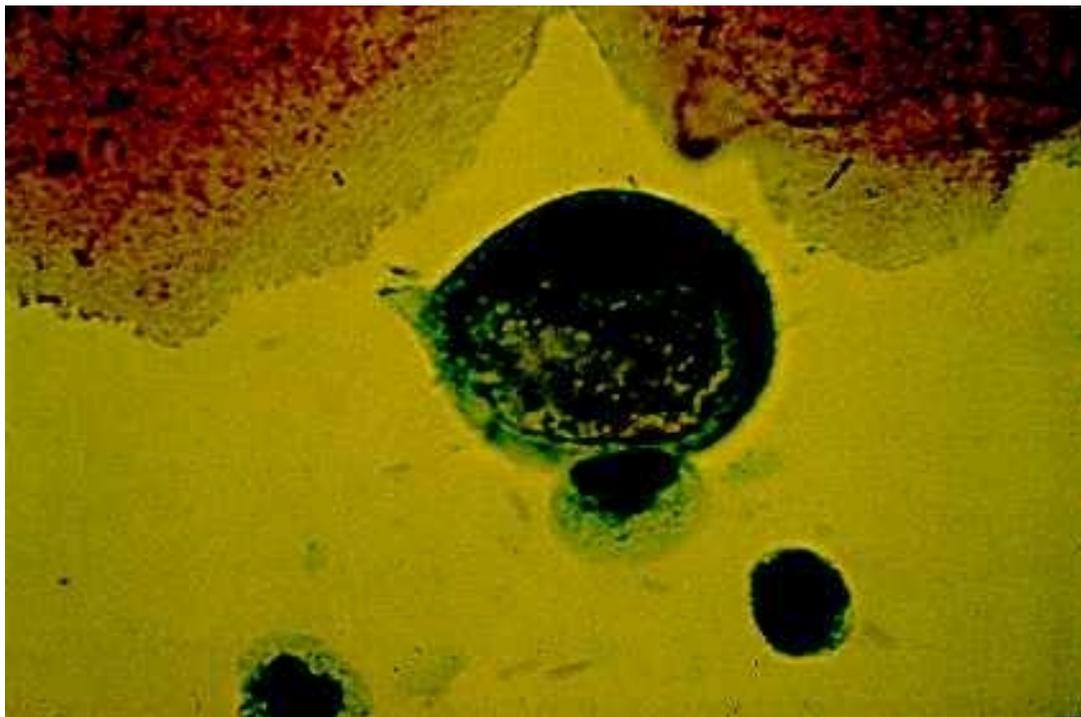


Photo 9.3 : Frottis cervical montrant une cellule à inclusion dans un contexte inflammatoire et desquamatif.

C'est en fait l'observation cytologique qui a permis à Lindner de rattacher environ 30 % des urétrites non gonococciques à l'agent des conjonctivites.

III.4.1 Les infections chez l'homme

Les premières infections génitales dues à *Chlamydia trachomatis* (CT) ont été observées chez l'homme.

Par la suite de nombreuses études épidémiologiques ont permis d'établir la prévalence, très variable en fonction de la population étudiée :

- 3 à 5 % des hommes asymptomatiques vus en consultation de médecine générale,
- 15 à 42 % des personnes suivies dans les consultations de MST.

Washington et son équipe ont pu établir en 1986, qu'environ 1,8 million d'hommes, souffraient d'infection chlamydienne aux USA.

En Europe d'après Mårdh et Taylor Robinson, 20 à 60 % des prélèvements urétraux montrent la présence de CT chez l'homme atteint d'urétrite.

L'urétrite à CT apparaît insidieusement après une période d'incubation difficile à préciser, mais toujours plus longue que l'urétrite gonococcique.

Elle se, caractérise par une dysurie d'intensité légère et un écoulement muco-purulent ou muco-aqueux. (**Photo 10**)



Photo 10 : Urétrite aigüe à gonocoques et à chlamydia.

Selon Mårdh et Taylor Robinson elle peut être totalement asymptomatique dans 20 % des cas.

Il s'agit le plus souvent d'une urétrite non gonococcique et dans ce cas CT est le seul pathogène mis en évidence.

Elle est plus souvent asymptomatique que l'infection gonococcique, mais dans bon nombre de cas l'observation microscopique met en évidence une leucocytose persistante (plus de 4 leucocytes par champ à un grossissement de 1000).

En revanche CT peut être contractée en même temps qu'une gonococcie et, en l'absence d'un traitement adéquat, l'infection chlamydienne se manifesterait beaucoup plus tardivement, alors même que la gonococcie aura été guérie (béta lactamines seules).

On penserait à tort à une récurrence ou à un échec au traitement gonococcique.

La prévalence là encore est très variable selon les populations étudiées et les régions incriminées.

Pour Schachter 70 % des UPG sont dues à CT, pour Mc Cormack 20 % des hommes atteints de gonococcie sont porteurs de CT.

III.4.2 Les complications chez l'homme

L'absence de traitement ou un traitement insuffisant peut entraîner des complications locorégionales

- La prostatite :

Bien que cela n'ait jamais été prouvé de façon formelle Mårdh et Taylor Robinson pensent à une localisation possible au niveau des acini prostatiques.

Pour d'autres auteurs cette localisation est contestée, il s'agirait plutôt d'une réponse de l'organisme à une hypersensibilité de type retardé à CT, par analogie à ce que l'on observe dans le trachome (Grayston et Wang, 1975).

- La rectite :

Bien que l'infection à chlamydia ne soit pas fréquente chez les homosexuels, lorsqu'elle survient elle provoque volontiers une rectite qui peut prendre une allure ulcérateuse quel que soit le sérotype en cause. **(Photos 11, 12 et 13)**

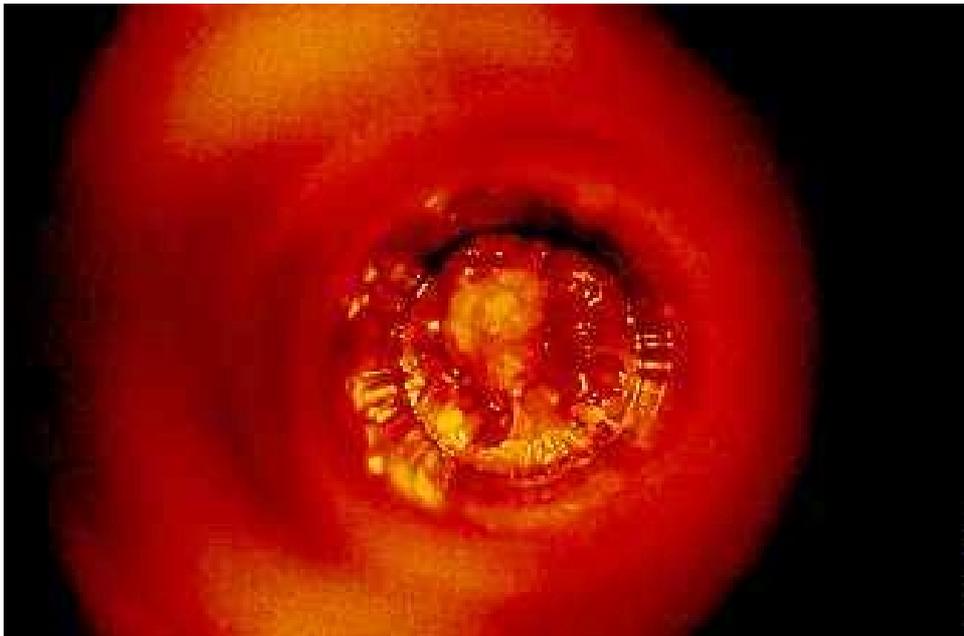


Photo 11 : Rectite à *Chlamydia sérotype G*
(F. BAUER, J. BRUCE, E. PARNEAUD et F. CATALAN
Gastro. Entero. clin. et Biol. 1981, 5, 246 A).



Photo 12 : Ulcération correspondante avant diagnostic et traitement.



*Photo 13 : Ulcération du même patient après traitement
(trois semaines doxycycline per os).*

Il est bien entendu que les sérotypes L sont plus souvent associés à ce type de manifestation clinique.

- L'épididymite

Elle est le plus souvent unilatérale, et survient chez des sujets jeunes. La forme aiguë se traduit par une douleur scrotale qui peut être violente, s'accompagnant d'une augmentation du volume testiculaire, (orchi-épididymite), et de fièvre.

Il y a souvent une urétrite associée, mais ce n'est pas la règle car la plupart du temps elle est asymptomatique et peut passer inaperçue.

Les premiers soupçons de cette complication (Heap, 1975) se sont appuyés sur des faits sérologiques.

Plus tard (Hawkins, 1986) CT a été isolé du liquide de ponction de l'épididyme.

III.4.3 Les infections chez la femme.

De nombreuses études épidémiologiques ont montré que la prévalence de l'infection à CT chez la femme varie considérablement selon les groupes étudiés et les régions.

- Chez les femmes asymptomatiques, la prévalence aujourd'hui est comprise entre 1,5 et 5%

- chez les femmes qui consultent dans un centre anti-vénérien elle peut atteindre 20 % (Schachter, 1975 ; Thelin, 1980 ; Bowie, 1981),

- chez les femmes enceintes la prévalence peut atteindre 7 % (Frommel, 1979 ; Harrison, 1983).

La plus forte prévalence s'observe entre 15 et 25 ans (isolement de CT en culture), elle décroît ensuite avec l'âge.

En revanche la prévalence des anticorps sériques augmente avec l'âge.

L'infection génitale peut suivre deux voies :

- la voie urétrale provoquant alors une urétrite qui peut passer inaperçue ou produire un syndrome urétral (dysurie, pollakiurie, ténesmes vésicaux...)

- la voie génitale basse, où elle évoluera de façon ascendante jusqu'aux voies de la fertilité, qu'elle risquera de compromettre.

Bien que les manifestations cliniques puissent être mineures, voire inexistantes, l'ascension aux voies génitales hautes peut revêtir un caractère de gravité certain (salpingite aiguë, péritonite etc ...).

- La cervicite à CT :

Elle se caractérise le plus souvent par une réaction inflammatoire plus ou moins intense, s'accompagnant de sécrétions purulentes. (**Photo 14**)



Photo 14 : Cervicite : sécrétion purulente prélevée au niveau du col, étalée et colorée par la méthode de Gram. On observe la présence de quelques bactéries Gram négatif dans une cellule mononucléée (probablement un macrophage).

Pour certains auteurs elles manquent dans 50 % des cas.

Certaines études épidémiologiques montrent qu'environ 20 % des femmes porteuses de CT au niveau du col sont totalement asymptomatiques et ont un col cytologiquement normal (Rees, 1977 ; Paavonnen, 1981).

Ce dernier auteur a décrit des modifications cytologiques, chez les femmes atteintes de cervicite (atypies cellulaires, présence de lymphocytes, cellules métaplasiques pouvant contenir des inclusions etc ...). Aucune de ces anomalies n'est spécifique de CT, et ne peut être retenue comme critère de diagnostic.

Malgré tout CT demeure l'une des principales causes de cervicite (Oriel, 1972).

La présence d'un ectropion semble faciliter l'infection (Svensson, 1981), d'ailleurs d'autres auteurs ont établi une corrélation entre l'étendue de l'ectropion et la fréquence relative de l'infection (Harrisson, 1985).

CT a une affinité particulière pour l'épithélium cylindrique (endocol, endomètre).

Certains auteurs ont voulu associer des modifications structurales de l'épithélium à la présence de CT, mais compte tenu de la fréquence de l'infection, aucune étude n'a pu affirmer la relation de cause à effet entre ces anomalies et la présence du micro-organisme (dysplasies, cancer du col).

- L'endométrite :

Certaines études de Mårdh ont montré en 1986 que 40 % des endométrites sont dues à CT.

Il s'agit là, de la propagation ascendante à travers le canal endocervical, d'une infection située au niveau de l'urètre ou au niveau du col.

Elle se caractérise par une infiltration lymphoplasmocytaire diffuse du stroma, et quelquefois on peut observer des micro-ulcérations.

C'est à partir de cette localisation que surviennent les complications, et l'observation attentive de la cytologie du frottis cervico-vaginal, doit attirer l'attention s'il y a présence de cellules lympho-plasmocytaires.

Lorsqu'il existe une réaction folliculaire au niveau du stroma, il y a généralement des IgA sécrétoires dans l'exudat du col, alors que ce n'est pas le cas en l'absence de follicules lymphoïdes.

CT jouerait un rôle indiscutable dans la genèse de l'endométrite post partum. Elle se manifeste généralement dans les jours, voire les mois qui suivent l'accouchement.

Elle s'observerait d'après Wager (1980) dans 22 à 30 % des cas, et serait une des causes possibles d'obturation tubaire, chez des femmes ayant eu déjà une grossesse, comme le laisserait supposer la présence d'anticorps spécifiques, dans le sérum de ces patientes.

III.4.4 Les complications chez la femme

Mårdh et Weström les premiers, ont montré à l'aide de la coelioscopie que l'incidence de l'infection chlamydienne au niveau des trompes de Fallope était de 30 % au moins, ce que d'autres auteurs ont confirmé ultérieurement (Bowie, 1981 ; Paavonnen, 1982 ; Kristensen, 1985).

La salpingite en est la manifestation clinique la plus fréquente et de très nombreuses études ont précisé cette entité pathologique par une classification très précise et une description parfois riche en images (Henry-Suchet, 1981, 1983 ; Abeille, 1980).

Par ailleurs le rôle indiscutable de CT dans la survenue d'une grossesse extra-utérine, a été démontré (Chaim, 1989) et confirmée par de nombreuses autres études.

La conséquence majeure de l'Ascension de CT dans les voies génitales hautes est étayée par des modifications et des délabrements irréversibles des structures tubaires.

Ces modifications surviennent progressivement, elles sont constituées par :

- Un processus inflammatoire à point de départ muqueux qui gagne la sous-muqueuse assez rapidement. Un exudat riche en cellules blanches remplit la lumière des trompes. Ultérieurement ce phénomène se propagera jusqu'aux séreuses, où l'on peut observer un dépôt de fibrine.

- Perturbations au niveau de la mobilité des cils de l'épithélium.

- Section des cils.

A la coelioscopie les trompes apparaissent congestionnées, et un liquide purulent se déverse par l'extrémité, dans la cavité péritonéale. (**Photo 15**)

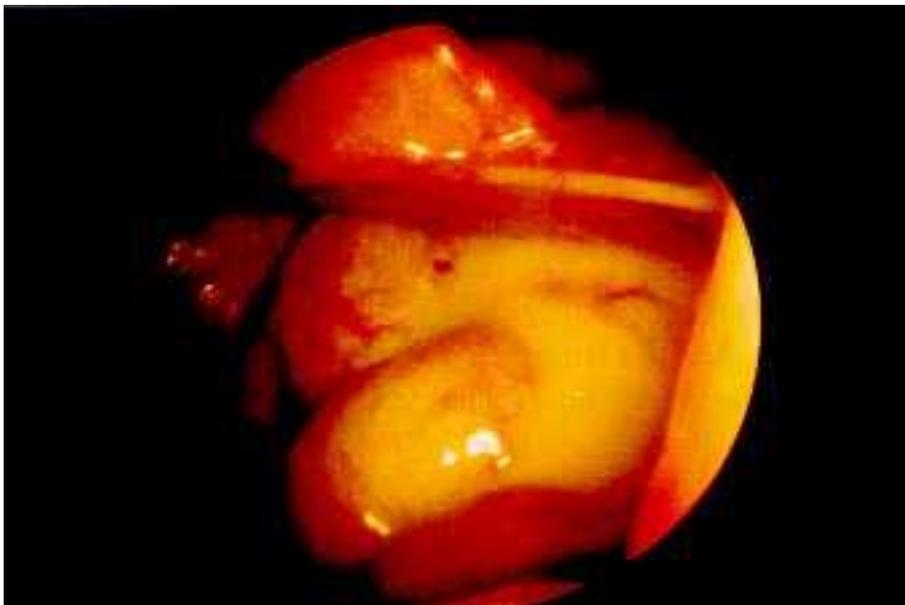


Photo 15 : Déversement de pus dans le péritoine au cours d'une salpingite aiguë (collection de Mme HENRY-SUCHET J., France).

La mobilité des trompes est inversement proportionnelle à l'importance de l'inflammation.

Ce processus peut évoluer vers la nécrose et la lyse tissulaire, en réalisant un abcès tubaire. (**Photo 16**)



Photo 16 : *Abcès tubaire ponctionné par cœlioscopie* (collection personnelle du Dr Paulo NAUD – POA, Brésil).

- réparation cicatricielle des lésions, entraînant des rétrécissements puis enfin, l'obturation définitive des trompes. (**Photo 17**)



Photo 17 : Hystéro Salpingographie montrant les rétrécissements tubaires.

Lorsque ce tableau s'observe des deux côtés, la stérilité en découle, en l'absence de plasticie tubaire.

Souvent l'infection des voies génitales basses est passée totalement inaperçue et le premier signe qui doit attirer l'attention est une douleur pelvienne ou, du bas-ventre.

Aucun signe clinique n'est spécifique de la maladie, certains manquent souvent, et il vaut mieux recourir au laboratoire pour avoir une certitude dans le diagnostic.

IV. BIOLOGIE ET PHYSIOPATHOGÉNIE

Il est indispensable de bien connaître la physiologie de la bactérie, pour se placer dans les conditions optimales, de recueil, de transport le cas échéant, et de conservation, afin de parvenir à un diagnostic le plus parfait possible.

IV.1. Structure et morphologie des chlamydiae

Toutes les espèces de Chlamydia ont le même aspect morphologique, mais au sein de chaque espèce existe un polymorphisme qui résulte du cycle d'évolution caractéristique de ces bactéries.

Incapables d'emmagasiner l'énergie qui est produite au cours du métabolisme et qui leur est nécessaire pour la multiplication, elles sont obligées d'emprunter les structures existant dans les cellules eucaryotes, qu'elles parasitent.

Elles sont donc des parasites obligatoires énergéto-dépendantes,

On peut différencier trois formes fondamentales :

1) *Le corps élémentaire (CE)*

Il est la forme infectante, et aussi la forme de survie, la forme de résistance de la bactérie.

Il est constitué d'une membrane externe rigide, imperméable aux macromolécules, et résistant à l'action de la trypsine, aux basses températures.

Ces propriétés permettent de conserver les particules infectantes par congélation aux températures inférieures à - 80 °C.

Par contre la chaleur à 56 °C les détruit rapidement, ainsi que les détergents et certains antibiotiques.

Le CE a une configuration sphérique, et en microscopie électronique il offre une partie centrale opaque aux électrons (aspect de nucléoïde central). (**Photo 18 et 18 bis**)

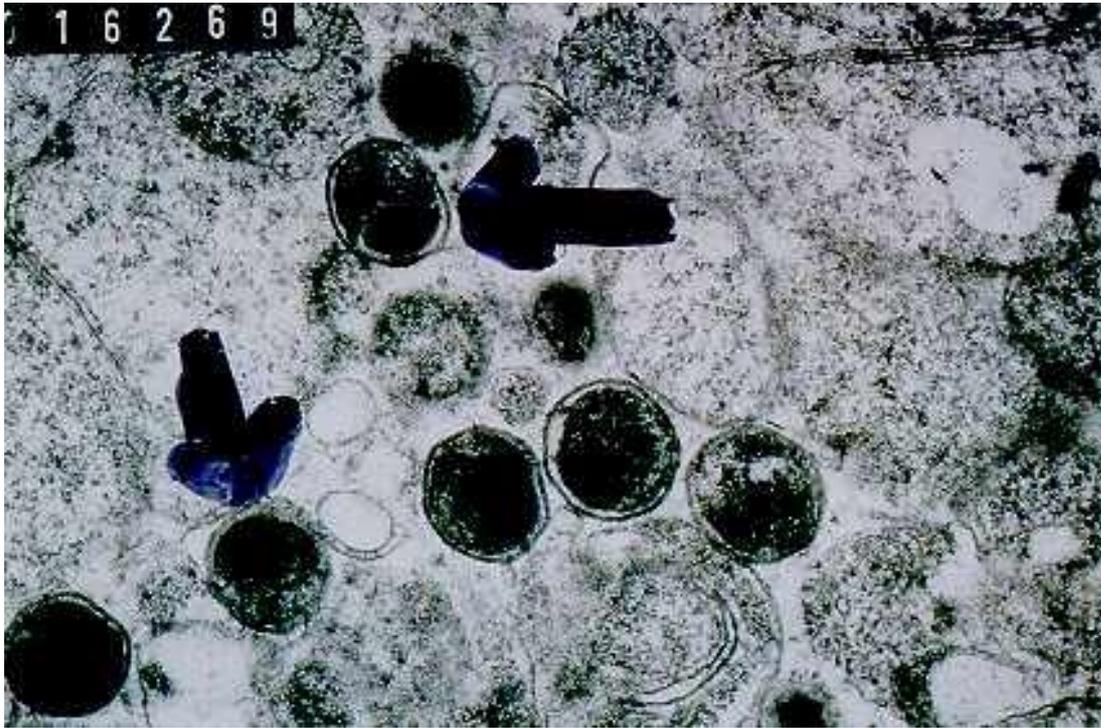
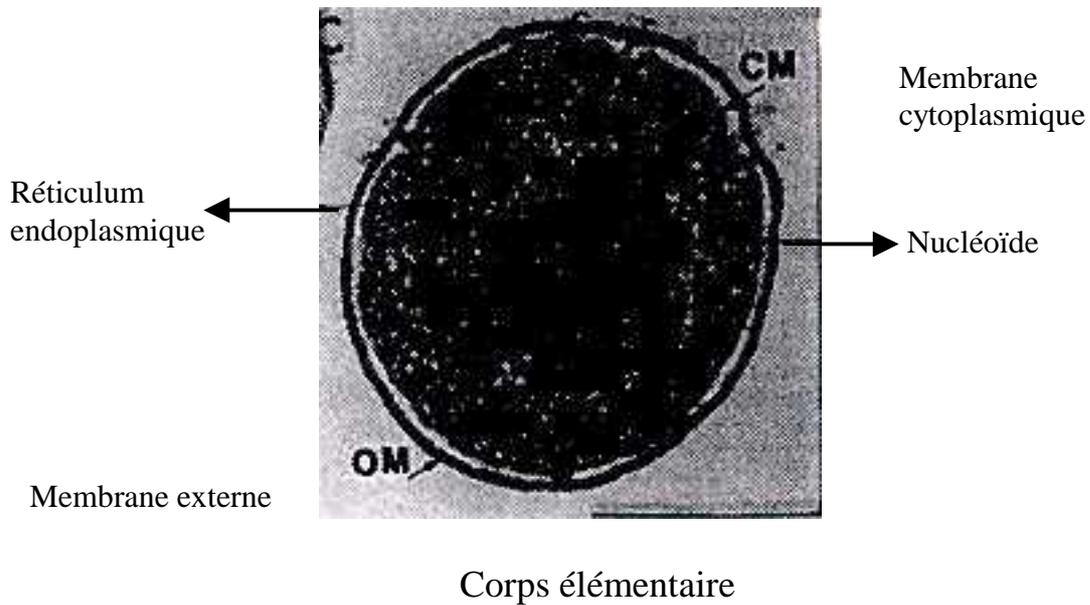


Photo 18 : Coupe d'une inclusion de Chlamydia trachomatis L2, dans le cytoplasme de cellules HeLa 229 montrant des CE. Les flèches montrent la morphologie de 2 corps intermédiaires.



150.000x (Caldwell et al.⁸⁶ 1981)

Photo 18 bis : Corps élémentaires vus en microscopie électronique, dans une inclusion cytoplasmique d'une cellule HeLa 229 infectée par une souche D après 48 heures.

Sa taille est de 0.2 à 0.4 micron. Sa structure est identique à celle des autres formes morphologiques.

Le cytoplasme est limité à la périphérie par une paroi constituée de trois feuillets, elle-même recouverte d'une membrane externe comprenant également 3 feuillets.

Le feuillet externe a une structure complexe et contient la presque totalité des structures antigéniques.

Certains auteurs ont mis en évidence des traces d'acide muramique, d'autres ne l'ont pas retrouvé. En revanche elle contient un lipopolysaccharide qui est formé d'une substance proche de l'acide 2-céto-3-desoxy-octanique.

La couche externe est d'aspect granuleux, la couche interne est constituée de protéines contenant de la cystéine, et qui ont une configuration hexagonale, probablement liée à la présence de ponts disulfures. Cette disposition semble conférer à la particule sa rigidité.

2) *Le corps réticulé (CR)*

Il représente la forme métabolique de la bactérie ou forme transformée qui lui permet de se diviser. **(Photo 19)**



Photo 19 : Corps réticulés observés en microscopie électronique dans une cellule HeLa 229 infectée depuis 36 heures avec une souche D de Chlamydia trachomatis.

Sa paroi n'est pas rigide, car la membrane externe est plus mince que celle du CE (elle représente 5 % du poids sec de la bactérie contre 12 % pour le CE).

Sa taille est de 0.5 à 1 micron, pléiomorphique par la souplesse de sa paroi.

3) *Le corps intermédiaire (CI)*

Il est la forme de maturation de la bactérie, ou plutôt la forme de transition entre le CR et le CE, le matériel génétique commence à se condenser pour conférer la morphologie définitive et sa fonction au CE. **(Photo 18)**

IV.1.1 La membrane externe

Elle est une structure particulièrement importante pour la bactérie, car c'est à travers elle que se font les échanges nutritifs, mais aussi et surtout les échanges d'énergie, à partir des mitochondries de la cellule hôte.

La structure de la membrane externe qui est identique pour les trois types décrits, contient de nombreuses protéines et précurseurs de protéines. Certaines d'entre elles sont riches en cystéine, et la plupart sont antigéniques.

Parmi les antigènes constitutifs de la paroi, tous les membres du genre portent un antigène fixant le complément. Il s'agit d'un acide 2-ceto-3-desoxyoctanique. Cet antigène serait présent également sur la membrane cytoplasmique des cellules infectées. C'est un lipopolysaccharide (LPS).

Caldwell et Schachter ont montré en 1982 que les protéines principales de la paroi sont antigéniquement distinctes pour les 3 espèces de chlamydia. Elles constituent la protéine majeure de la membrane externe (MOMP). Ces dernières sont antigéniquement complexes et ont des poids moléculaires compris entre 39 et 45 KDaltons (Kd). Des différences s'observent au sein même du genre (Wilbert et New Hall, 1.982). (**Photo 20**)

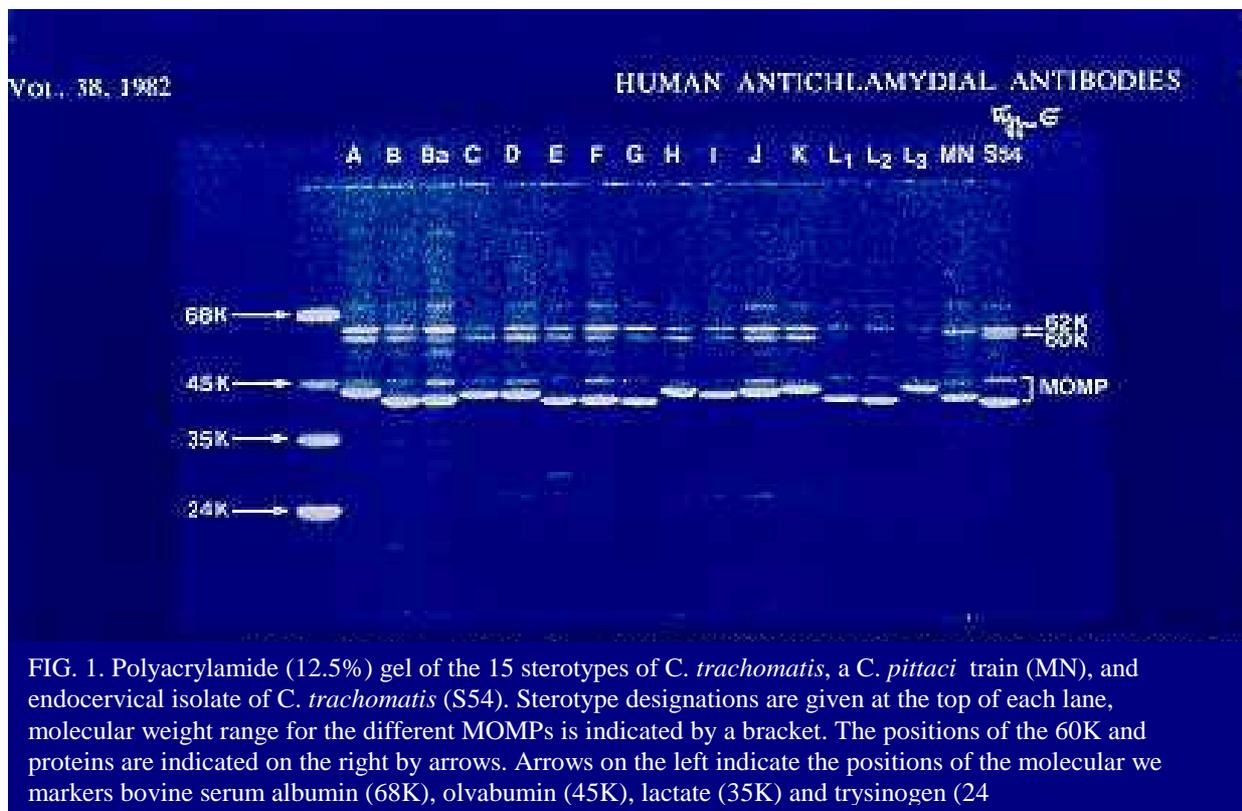


Photo 20 : Hétérogénéité de la protéine majeure de la membrane externe (MOMP) au sein de l'espèce *trachomatis* (Wilbert et New Hall, 1982).

L'observation en microscopie électronique démontre qu'il n'existe pas de couche de peptidoglycane interposée entre la membrane externe et la membrane interne. Cette constatation semble paradoxale par le fait que de faibles doses de pénicilline inhibent la multiplication des CR.

Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'existence au niveau des membranes de la paroi de tétrapeptides comparables à ceux du peptidoglycane, liés de façon covalente. En revanche ces explications sont insuffisantes pour expliquer la sensibilité de ces micro-organismes aux substances inhibitrices de la synthèse du peptidoglycane.

Hatch en 1984 décrit que les CE de *Chlamydia psittaci* possèdent, en dehors de la MOMP, des protéines riches en cystéine de poids moléculaires 62, 59, 12 Kd. En revanche, les CR des sérotypes L de *Chlamydia trachomatis* sont pauvres en protéines cystéinées et de ce fait beaucoup plus sensibles à l'action des détergents que les CE. Cette plus grande sensibilité montre qu'en réalité il s'agirait des ponts disulfures, créés entre deux molécules de cystéine qui assureraient la rigidité caractéristique des CE.

En dehors de ces substances antigéniques de base on doit distinguer une grande variété d'antigènes dans la composition des parois bactériennes qui peuvent être rassemblés en 3 grands groupes :

IV.1.2 Les Antigènes spécifiques de genre

Les plus connus sont les LPS, caractéristiques des bactéries Gram-négative ils sont responsables de la réponse pyrogène lors de l'inoculation à l'animal, ainsi que des réactions immunologiques croisées entre les 3 espèces. On les met en évidence à tous les stades de la multiplication cellulaire.

Ils peuvent être extraits par les solvants organiques et particulièrement par l'éthyl ester désoxycholate de soude (Scheemeer, Krauss, 1982).

Il est constitué d'un complexe lipide-hydrates de carbones, presque similaire à l'acide 2-céto-3-désoxyoctanoïque (KDO) qui est le composant caractéristique des bactéries Gram-négative. Il est lié dans la partie la plus interne de la molécule à une chaîne latérale de carbohydrates, où l'on peut mettre en évidence la d-glucosamine et le gulose, isomère peu fréquent du glucose. Immunologiquement le LPS aurait une activité identique à celle du mutant Re des salmonelles, probablement liée à un épitope commun aux deux germes. Produit en excès, il apparaît à la surface de la cellule hôte, où il peut activer le complément et conduire à la lyse cellulaire. En revanche, il est beaucoup moins actif que celui des entérobactéries et, de ce fait, le nombre de cellules détruites est minimum. Bien qu'il soit doté d'une action inductrice de cytokines nécrosantes (T.N.F.), le LPS ne provoque pas de phénomène d'hypersensibilité de type retardé. En revanche, un épitope spécifique des chlamydiae a été identifié.

D'après Nurminen (1984) le poids moléculaire du LPS serait de 3 Kd, mais d'autres auteurs ont décrit des composés de 25 à 200 Kd. Il s'agirait de polymères du LPS de Nurminen.

IV.1.3 Les antigènes spécifiques d'espèce

L'étude par électrophorèse en gel de polyacrylamide (Caldwell, 1975) a montré des différences significatives entre les différentes espèces de chlamydia, ainsi que des différences mineures au sein même de l'espèce trachomatis.

Une protéine de 155 Kd commune aux différents groupes de *Chlamydia trachomatis* ne se rencontre pas chez *Chlamydia psittaci*. Cette protéine située dans la membrane externe est thermolabile (Salari et Ward, 1981).

D'autres antigènes spécifiques d'espèce se situent dans la complexité de la MOMP qui par ailleurs contient des épitopes spécifiques de genre, d'espèce et de type.

L'utilisation à partir des années 80 d'anticorps monoclonaux a permis de localiser les épitopes spécifiques de genre et d'espèce au niveau de la région constante de la MOMP alors que les antigènes spécifiques de type se situent dans la région variable (Newhall et Basinsky, 1986).

Une protéine de 60 Kd serait également spécifique d'espèce, elle jouerait un rôle primordial dans le phénomène d'adhésion au cours de l'infection des cellules eucaryotes. Dans ce groupe de protéines, une d'entre elles (57 Kd) jouerait un rôle primordial dans le déclenchement des délabrements tissulaires observés au cours des complications chez la femme.

IV.1.4 Les antigènes spécifiques de type

Ce sont eux qui ont permis à Wang et Grayston de diviser *Chlamydia trachomatis* en 15 sérotypes. Les anticorps correspondants à ces antigènes neutralisent l'infection. D'après Schachter et Caldwell ces anticorps joueraient un rôle important dans l'immunité acquise.

Parmi les antigènes de nature protéique l'un d'eux aurait un poids moléculaire de 28 à 30 Kd (Hourihan, 1980).

Au cours du cycle de multiplication des chlamydiae ces structures antigéniques subissent des modifications, à tel point que de vingt antigènes situés dans la MOMP du CE de L2, quatre seulement sont détectés dans le CR.

IV.1.5 Structures nucléaires

Les particules de chlamydia sont constituées par les 2 types d'acides nucléiques :

a) ADN bicaténaire d'un poids moléculaire de $6,6 \cdot 10^8$ Daltons.

Il serait constitué de 600 à 850 paires de Kilobases. Il représente l'un des plus petits nucléoïdes observé chez les procaryotes.

L'ADN des différentes espèces de chlamydia possède peu de régions communes mais sont situées en des régions identiques. Ceci explique le bas pourcentage d'homologie entre les différentes espèces.

Depuis Mc Clenaghan (1984) l'étude du fractionnement de l'ADN à l'aide d'endonucléases de restriction a permis de différencier les différentes espèces d'une part, et par une combinaison adéquate de ces enzymes, les différents types et sous-types. (**Figure 1**)

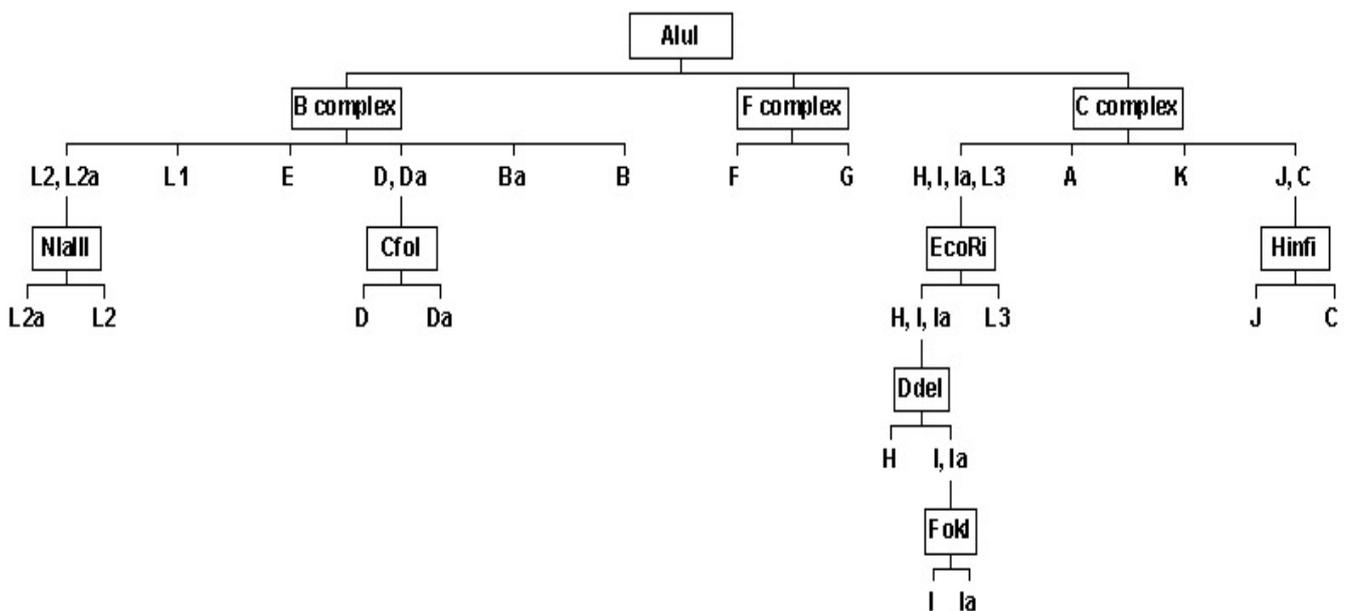


Figure 1 : Référence bibliographique

*(SAYADA et Coll., FEMS, Letters 1991).

b) ARN : mis à part l'ARN messager qui dérive directement de la transcription de l'ADN, l'ARN se situe dans le cytoplasme des cellules. Il est composé de l'ARN 21 S, 16 S, 4 S.

La proportion diffère entre le CR et le CE, ce dernier étant en majorité constitué par du 4 S.

c) Les plasmides : Chaque espèce possède un ou plusieurs plasmides dont le rôle est peu connu mais semble intimement lié à la résistance microbienne aux antibiotiques.

IV.2. Le cycle de multiplication

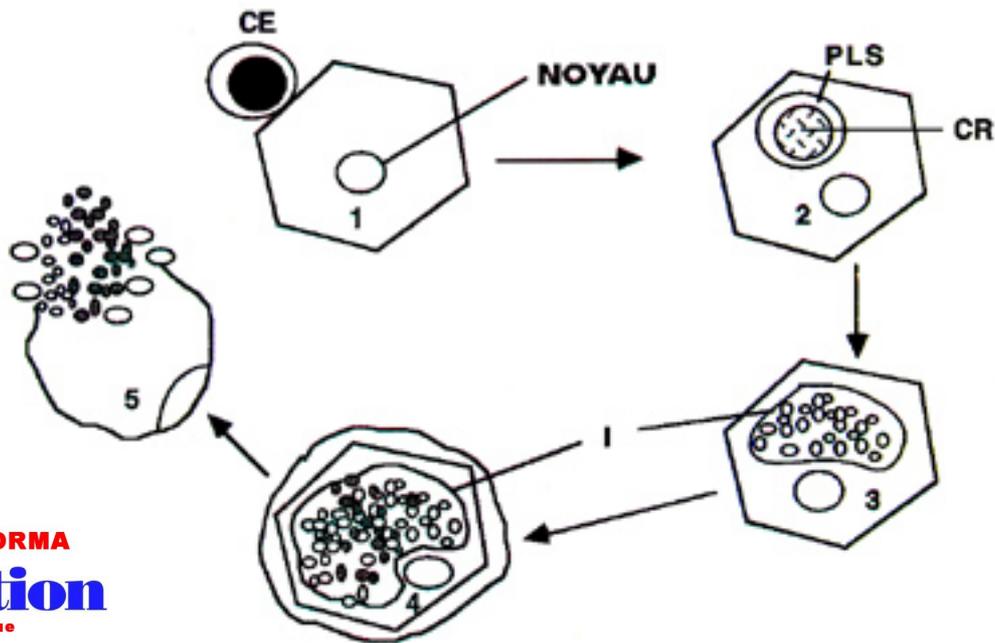
Il se réalise dans les cellules eucaryotes infectées par le corps élémentaire, seule particule capable d'infecter et d'initier le cycle de multiplication. Le CE adhère à la cellule par l'intermédiaire de lectines contenues dans la membrane externe.

De cette adhésion découlent des phénomènes enzymatiques qui laisseront pénétrer la particule par endocytose. Une vacuole entoure la particule et dans les 2 heures qui suivent on observe une transformation du CE qui perd son caractère opaque aux électrons pour devenir morphologiquement identique au CR.

A partir de la 6^e heure commencent à s'observer les premières divisions qui se poursuivent jusqu'à la 24^e ou 30^e heure. Il apparaît alors dans le cytoplasme cellulaire une véritable colonie bactérienne qui offre une image pathognomonique : l'inclusion.

Au fur et à mesure que cette multiplication se poursuit le titre infectieux augmente, il est maximal vers la 36^e heure pour *Chlamydia psittaci*, 48^e heure pour *Chlamydia trachomatis* et 60^e heure pour *Chlamydia pneumoniae*. (**Figure 2**)

CYCLE. DE MULTIPLICATION DES CHLAMYDIAE (SCHEMA)



CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

1 CE = CORPS ELEMENTAIRE
2 CR = CORPS RETICULE
2 PLS = PHAGO LYSOSOME

3-4 I = INCLUSION
5 = ECLATEMENT CELLULAIRE
LIBERATION DES PARTICULES

Figure 2

Sur le plan expérimental, les cellules sensibles à l'infection par *Chlamydia trachomatis* le plus habituellement utilisées sont : cellules HeLa 229, Hep2, Mc Coy, L 929.

Il s'agit de cellules de lignée continue, de manipulation facile.

Mis à part pour les souches L de CT, il est nécessaire, pour favoriser le contact entre la bactérie et la cellule hôte, de recourir à une centrifugation douce.

Il semblerait d'après Ward (1986) que de nombreux facteurs non spécifiques puissent influencer la sensibilité à l'infection (Synthèse éphémère du récepteur cellulaire, action des hormones, perte du pouvoir infectant de la bactérie). Par ailleurs des facteurs spécifiques semblent également intervenir.

Les travaux de Kuo (1973), de Levy (1979), semblent démontrer que le récepteur cellulaire serait de nature N-acétyl-glucosamine et serait actif en présence d'acide sialique. Par ailleurs il a été prouvé que la liaison des particules à la cellule hôte se faisait par l'intermédiaire de 2 polypeptides de 18 et 30 Kd qui seraient absents des CR (Wenman et Meuser, 1986). La protéine de plus haut poids moléculaire varie d'un type de maladie à un

autre et d'un site d'infection à un autre. Il varie de 23 à 32 Kd. Les anticorps dirigés contre ces protéines bloquent l'infectiosité des CE (Caldwell et Perry, 1982).

Après l'adhésion à la membrane cellulaire la particule va pénétrer dans la cellule en utilisant des mécanismes de phagocytose ainsi que des mécanismes de pynocytose (Pearce, 1986). Cette pénétration peut être bloquée par les basses températures. Elle relèverait d'un mécanisme spécifique (Moulder, 1978).

La cellule hôte développe des microvillosités qui enveloppent les particules adhérentes. En revanche, la présence de cytochalazine B, qui est un inhibiteur de la formation des microfilmants n'empêche pas le mécanisme de pénétration (Sompolinsky et Ritchmond, 1974).

Certaines protéines structurales situées dans la membrane externe semblent jouer un rôle dans le mécanisme d'endocytose, par l'activité enzymatique qu'elles possèdent.

Après la phagocytose, la particule chlamydienne survit grâce à un mécanisme de blocage de la fusion avec les lysosomes cellulaires, qui serait en relation avec des protéines contenues dans la membrane externe. **(Photo 21)**

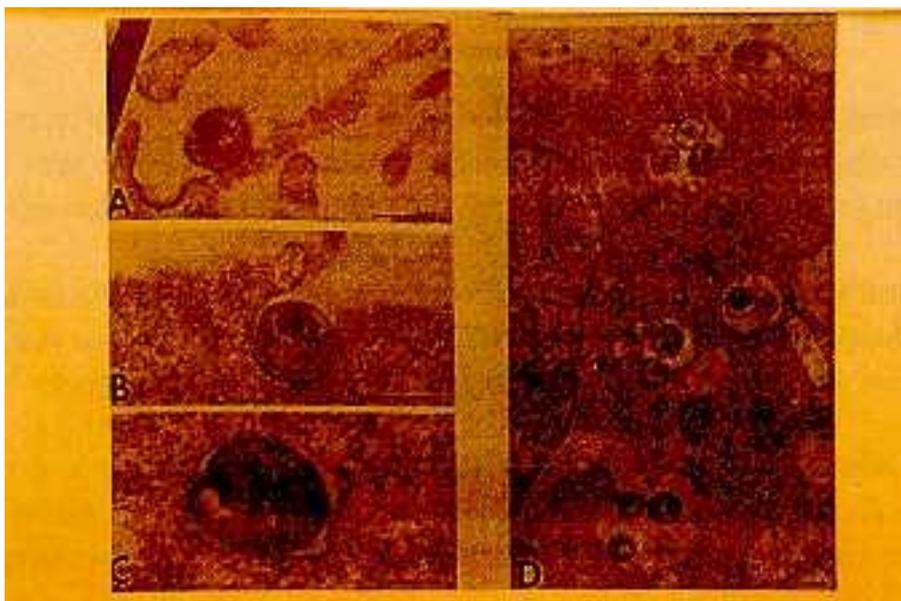


Photo 21 : Infection d'une cellule eucaryote (Mc Coy) par le CE de *Chlamydia trachomatis* phagocytose de la particule (A, B et C) et début de division (Photo D) (Source : Wyrick et all. 678,1986).

Le cycle de multiplication décrit peut être perturbé, et c'est ainsi que l'on peut assister à un réel accouchement de l'inclusion par un mécanisme d'exocytose, ou bien encore le cycle de multiplication peut être interrompu à un stade immature où la microscopie électronique montre des formes structurales aberrantes qui adhèrent à la membrane de la vacuole. Ces

formes se transmettent de cellule à cellule au moment de la division cellulaire (Shatkin, 1985 ; Ritchmond, 1985).

Ces formes peuvent être à l'origine d'infections latentes (Storz, 1971).

Si *Chlamydia trachomatis* trouve ses récepteurs sur les cellules cylindriques des épithélia muqueux, *Chlamydia psittaci* et *pneumoniae* trouvent leur récepteurs sur les macrophages (Byrne et Moulder, 1978).

■ V. LE DIAGNOSTIC DE LABORATOIRE

Le diagnostic d'une infection due à *Chlamydia trachomatis*, repose essentiellement, sur la mise en évidence de l'agent pathogène, dans le produit pathologique.

V.1. Les modalités de prélèvement

Les examens bactériologiques ont pour seul but de mettre en évidence, le micro-organisme responsable à partir d'un prélèvement. Toutefois la plupart des chlamydiae sont fragiles, et dépérissent rapidement lorsqu'elles se trouvent dans un environnement peu favorable.

L'utilisation des milieux, dits de transport, ne convient que pour préserver durant un temps très court, la survie de quelques micro-organismes et leur pouvoir infectieux. Aucun n'est parfait, mais surtout, aucun ne permet de conserver la totalité des micro-organismes.

Le diagnostic bactériologique consiste à mettre directement en évidence le germe supposé responsable d'une infection. Lorsqu'il s'agit du passage accidentel, d'un micro-organisme dans une cavité fermée (péritoine, collection purulente) en général, seul est présent le micro-organisme en cause.

Il en est différemment, lorsque le sujet infecté a ses systèmes de défense diminués (syndrome d'immunodéficience acquise) et dans ce cas, des germes commensaux peuvent se multiplier anormalement, et déborder les systèmes de défense, déjà déficients.

Au niveau des muqueuses, contrairement à l'épiderme, il n'existe pas de cornification (kératinisation) mais de nombreuses glandes sécrètent des substances acides ou alcalines, riches en protéases qui digèrent et détruisent les bactéries, ou virus pathogènes, ou non adaptés. En revanche, ces muqueuses sont peuplées d'une très nombreuse flore

microbienne qui adhère aux cellules dont elle tire les éléments nutritifs permettant sa survie,

dans un parfait équilibre, ce qui, maintient une écologie particulière, caractéristique.

Ces orifices naturels se continuent vers l'intérieur par un épithélium cylindrique, uni ou pluristratifié (endomètre, urètre, intestin, trachée). Les cellules qui constituent ces épithéliums cylindriques excrètent du mucus riche en protéases (lysozyme, trypsine etc...) et possèdent des cils vibratiles qui entraînent ce mucus et participent ainsi au phénomène de défense locale.

C'est en fait dans cette importante écologie bactérienne et virale que réside la difficulté d'incriminer la responsabilité d'une bactérie plutôt que d'une autre. En revanche, l'isolement ou la détection de chlamydia au cours d'une manifestation pathologique suffit à incriminer son pouvoir pathogène.

Prélever, c'est recueillir la preuve d'une relation de cause à effet (réaction inflammatoire).

Il est impératif d'appliquer rigoureusement des critères adaptés à la région que l'on doit explorer, en fonction de la symptomatologie clinique, et de raccourcir le plus possible le temps qui sépare le moment où l'on prélève de celui où l'on ensemence les milieux appropriés.

Il faut songer que les bactéries, en dehors de leur milieu habituel sont très sensibles aux variations de température, de pH, ou de pression d'oxygène.

En se basant sur ces quelques généralités, on peut définir les critères que l'on doit appliquer pour effectuer un bon prélèvement, dans les différents cas de figure qu'offre la pathologie humaine.

EN TOUT ETAT DE CAUSE SONGER :

- *que les échantillons doivent être recueillis au cours de phase aiguë de la maladie ;*
- *qu'il est souvent préférable d'obtenir des cellules intactes ;*
- *qu'il faut transporter les échantillons au laboratoire le plus rapidement possible ;*
- *que les basses températures évitent la prolifération des bactéries saprophytes, qui souvent fait échec à toute tentative d'isolement. La qualité du prélèvement conditionne les résultats qui orientent vers une thérapeutique adaptée.*

V.1.1 Les prélèvements génitaux

Il faut distinguer 3 cas de figure :

- Les infections qui provoquent des lésions, rares dans le cas des chlamydioses ; elles peuvent avoir par ailleurs une origine bactérienne, parasitaire, ou virale.
- Les infections qui provoquent des écoulements. Ces dernières peuvent s'accompagner ou non de phénomènes inflammatoires,
- Les infections asymptomatiques : relativement fréquentes.

L'aspect clinique, toutefois s'il permet de mieux appréhender les modalités du prélèvement, ne suffit pas en général pour faire un diagnostic précis, base indispensable à une thérapeutique adaptée et efficace.

Une infection peut en cacher une autre dans plus de 30 % des cas, d'où la nécessité de poursuivre un examen bactériologique jusqu'au bout, ce qui permettra d'enrayer au plus vite la raison de la consultation et surtout cassera la chaîne de contamination.

Pour les infections s'accompagnant d'écoulements inflammatoires : il s'agit le plus souvent d'urétrites, de cervicites, point de départ de complications profondes graves.

La recherche des agents pathogènes responsables doit être systématique et prioritaire.

On recherchera Chlamydia trachomatis : au niveau du col et de l'urètre par examen direct immunoenzymatique, culture, hybridation, ou encore amplification génique.

Le col doit être dégagé de manière à observer son orifice externe dont on notera l'aspect de la muqueuse, l'abondance et la couleur de la sécrétion endo-cervicale.

Il est impératif de bien nettoyer le col afin d'éliminer la glaire cervicale, parfois abondante et très adhérente.

Sa présence peut empêcher le contact avec la muqueuse endo-cervicale, siège le plus fréquent de l'infection. Les écouvillons doivent être guidés à travers une cavité vaginale ouverte par un spéculum à usage unique, dans la mesure du possible, et bien éclairé.

Dans tous les cas, seule la culture peut :

- confirmer un direct positif,
- confirmer une infection évolutive,
- affirmer la stérilisation après traitement,
- évaluer la sensibilité du germe aux antibiotiques.

La sérologie doit être systématique, car elle permet de suspecter déjà une localisation profonde, source de complications graves ultérieures qu'il faudra traiter différemment.

Les infections génitales aiguës (I.G.A.) se répercutent inexorablement au couple dans son ensemble.

L'examen bactériologique de la femme seule ne conduit à rien. Il faut exiger d'examiner aussi le ou les partenaires. C'est le rôle du médecin d'avancer les arguments suffisamment persuasifs.

V.1.2 Les infections chez l'homme

Le matériel utilisé pour le prélèvement doit permettre de ramener suffisamment de cellules cylindriques, réservoir réel de l'infection, et en même temps de préserver l'infectiosité des particules libres. **(Photo 22)**

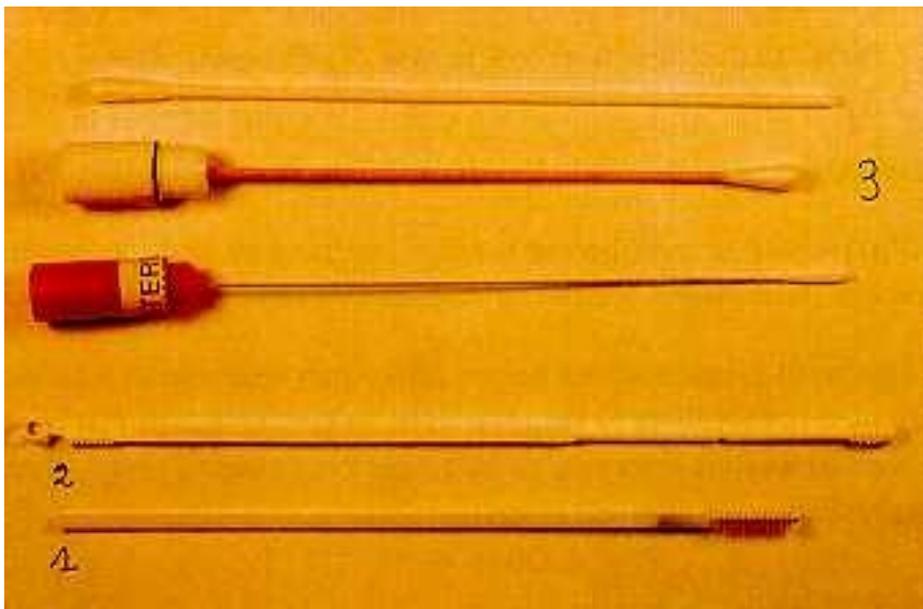


Photo 22 : Les différents types d'écouvillons qui peuvent être utilisés pour le recueil d'échantillons cervicaux, urétraux et autres...

1) La mini-brosse (cytobrush) est l'instrument qui ramène la plus grande quantité de cellules mais il est généralement douloureux et mal supporté par le patient. (**Photo 23**)

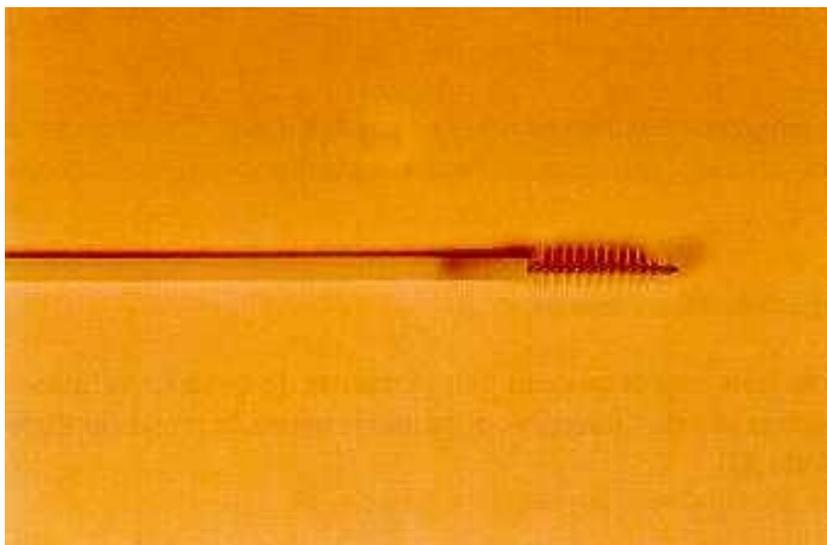


Photo 23 : Quelques exemples de matériel de prélèvement : la brosse.

La douleur peut être atténuée en trempant l'extrémité dans le milieu de recueil.

Il est nécessaire d'introduire la mini-brosse sur une longueur de trois ou quatre centimètres, ce que la longueur propre de la brosse permet de réaliser aisément.

Le brossage doit être rapide et précis pour ne pas provoquer de douleurs inutiles et pour ce faire, il est nécessaire de bien immobiliser la verge de la main gauche gantée, en imprimant une pression sur le gland pour écarter les lèvres du méat. Le patient se tient debout, face au médecin préleveur, qui le rassurera en lui expliquant le geste.

2) L'écouvillon plastique ou bactopick

Entièrement en matière plastique neutre, cet écouvillon est muni d'un manche qui porte un étranglement au-delà duquel se trouve une olive terminale, munie d'un grossier pas de vis.

L'olive est introduite dans l'urètre à une distance de quatre centimètres en lui imprimant un mouvement de vis. L'écouvillon est alors retiré lentement mais d'un seul geste droit. Les cellules grattées lors de l'introduction sont emprisonnées dans les sillons du pas de vis.

Si l'urètre est sec, on facilitera l'introduction de l'écouvillon après avoir trempé l'olive dans le milieu de recueil.

Ce type de prélèvement est mieux supporté que la brosse. La qualité du prélèvement est tout aussi bonne.

3) L'écouvillon Dacron

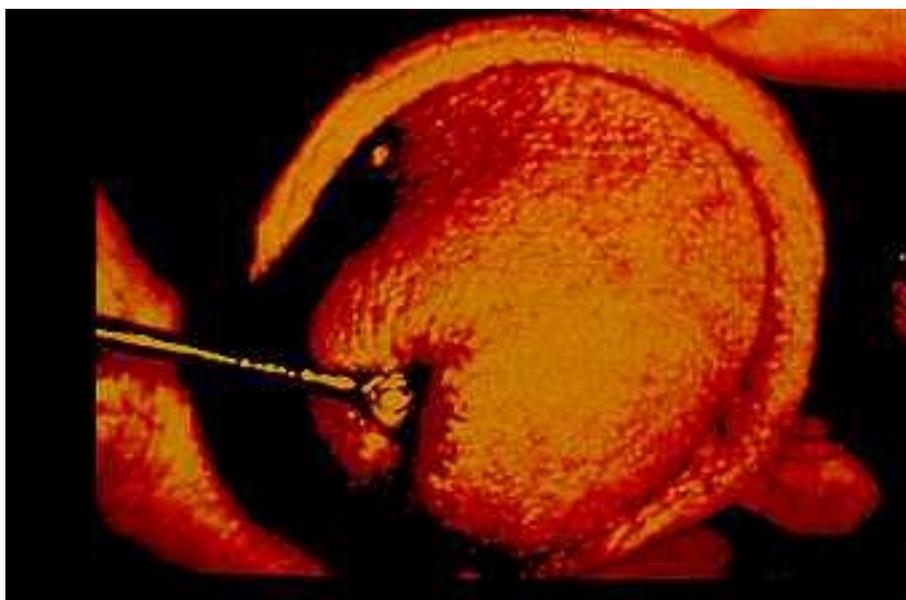
Ces écouvillons contiennent un tampon terminal ovoïde en Dacron porté par un manche cylindrique en plastique ou en aluminium.

Généralement bien supportés, ils ramènent cependant une trop faible quantité de matériel. Ils peuvent être à l'origine de résultats faussement négatifs particulièrement lorsqu'ils sont utilisés pour effectuer un frottis. Les cellules sont retenues par le tampon et ne sont qu'incomplètement libérées dans un milieu liquide ou lors d'appositions sur lame.

4) Autre matériel

L'anse de platine ne permet pas de recueillir une quantité de cellules suffisante pour permettre une interprétation correcte des résultats, elle doit être proscrite.

La curette ophtalmologique peut être utile à condition d'émousser au préalable ses bords tranchants à l'aide d'une feuille de papier émeri. Elle a longtemps été utilisée avec succès par SIBOULET et collaborateurs. En vérité, tout autre mode de prélèvement est à proscrire au niveau des voies génitales basses. **(Photo 24)**



*Photo 24 : Curette ophtalmologique introduite dans le canal urétral
(collection André Siboulet, 1975).*

A propos des complications (Prostatite, vésiculite épидидymite) l'aspiration biopsie pourra être pratiquée au cours de manœuvres exploratrices (urétrographie, échographie etc ...).

V.1.3 Les infections génitales chez la femme

Les infections des voies génitales basses chez la femme peuvent passer totalement inaperçues dans plus de 40 % des cas. L'infection asymptomatique peut rester ainsi latente, ou évoluer à bas bruit en provoquant des complications au niveau des annexes. Le diagnostic est relativement facile lors des infections basses localisées, mais il devient plus délicat lorsque l'infection est compliquée, car elle est haut située et souvent inaccessible au prélèvement par les voies basses.

L'infection des cellules épithéliales n'est possible que si les particules infectantes (corps élémentaires) reconnaissent sur la membrane des récepteurs spécifiques qui permettent l'adhésion et le déclenchement du mécanisme d'endocytose.

Ces récepteurs sont présents sur les cellules métaplasiques et les cellules cylindriques, donc c'est au niveau de l'endocol qu'il faudra rechercher le foyer d'infection ou bien au niveau de la zone de jonction, ou même au niveau des zones de remaniement. En tout état de cause, le grattage cellulaire est de règle, et tout matériel qui le permet conviendra.

La cytobrush (Medskan Fumouze) paraît toute indiquée, pour ramener un grand nombre de cellules de l'endocol, en revanche elle a l'inconvénient de piéger une grande quantité de glaire qui gênera l'homogénéisation de l'échantillon.

La patiente sera mise en position gynécologique, sur la table d'examen. Un spéculum en plastique à usage unique, non lubrifié, est introduit dans la cavité vaginale.

La partie vaginale du col sera bien dégagée en ouvrant le spéculum. **(Photo 25)**



Photo 25 : Spéculum ouvert montrant l'orifice du col et la portion vaginale de l'utérus (collection André Siboulet).

Repérer l'orifice externe du col et le nettoyer à l'aide d'un écouvillon ou d'un tampon en coton.

Si un examen bactériologique est demandé, on aura tout intérêt à réaliser d'abord un prélèvement au niveau du col pour la recherche de *Neisseria Gonorrhoeae*.

Introduire ensuite la cytobrush dans l'orifice externe du col, en lui imprimant un mouvement de rotation pour bien balayer toute la surface de l'endocol et emprisonner les cellules dans les poils de la cytobrush que l'on retire d'un geste rapide.

Il est fréquent que ce geste provoque un saignement sans conséquence.

En l'absence de cytobrush, on peut utiliser le bactopick et/ou l'écouvillon dacron, mais la quantité de cellules retenues dans les sillons de l'olive terminale est bien moindre.

L'infection peut aussi concerner l'urètre, et il est bon de terminer en pratiquant un prélèvement à ce niveau, après avoir retiré le spéculum. Souvent douloureux il faut être rapide et précis.

V.1.4 Autres sites de prélèvements

Bien que nous ayons fait un tour complet à propos de la pathologie génito-urinaire, il est toutefois bon de préciser quelques points particuliers, où chlamydia doit être recherchée.

1) Le trachome

Le trachome, à son début se traduit essentiellement par une conjonctivite folliculaire. En pays d'endémie souvent, l'œil est surinfecté, et il est préférable de faire le prélèvement au niveau de la paupière supérieure qui sera retournée, de façon à exposer la muqueuse palpébrale, siège de l'infection. Un grattage doux sera pratiqué à l'aide d'une spatule, d'une curette ophtalmologique n° 3, préalablement émoussée ou d'un écouvillon en dacron, ou mieux un triangle de membrane de nitrate de cellulose.

2) Les prélèvements oculaires

- Écouvillonnage de la conjonctive à l'écouvillon dacron,
- recueil de la sécrétion purulente,
- raclage doux de la conjonctive et de la cornée,
- ponction de l'humeur aqueuse.

Dans ce contexte, il est à noter que l'on peut effectuer un prélèvement de qualité à l'aide d'un carré de nitrate de cellulose appliqué directement sur la muqueuse oculaire. En retirant le carré, à l'aide d'une pince, on entraîne des cellules réalisant ainsi une empreinte qu'il suffit de colorer ou de mettre dans un milieu de transport.

3) Les ulcérations liées à chlamydia trachomatis

De nombreuses publications ont rapporté l'isolement de chlamydia trachomatis, au niveau d'ulcérations rectales chez l'homosexuel, bien que le pourcentage soit relativement faible.

Compte tenu de l'abondance de l'écologie bactérienne au niveau du tube digestif distal, il est impératif de diriger le prélèvement directement au contact de la muqueuse à l'aide d'un anoscope non lubrifié ou mieux au niveau des ulcérations observées à l'occasion d'une colofibroscopie. **(Photo 26)**



Photo 26 : Anoscope pour les prélèvements rectaux.

Le matériel utilisé pour le prélèvement sera le même que celui utilisé pour les autres types de prélèvements.

Au niveau des ulcérations, souvent surinfectées, il est nécessaire de nettoyer la plaie à l'aide d'une compresse stérile, humectée de sérum physiologique stérile. Les bords de la plaie seront grattés (curette, spatule métallique, bactopick, vaccinostyle) de façon à racler un nombre suffisant de cellules infectées.

4) Les prélèvements pulmonaires

Seuls les lavages broncho-alvéolaires (L.B.A.) ou la biopsie sous fibroscopie sont acceptables. Les sécrétions aspirées et a fortiori les expectorations ne sont d'aucune utilité pour faire un diagnostic d'infection pulmonaire.

5) Les affections ORL à chlamydia

On peut trouver à ce niveau, aussi bien des sérotypes sexuellement transmissibles (D--K) que *Chlamydia pneumoniae*, beaucoup plus fréquent qu'on ne le pense.

On peut utiliser l'écouvillon dacron, ou la cytobrush. Dans ce cas, il faudra balayer les piliers postérieurs du pharynx; ou mieux le cavum.

V.2. Que faire des prélèvements ?

Tout dépend des conditions de transport et des techniques que l'on veut appliquer à la recherche du chlamydia.

La condition idéale est réalisée lorsque le prélèvement peut être inoculé directement (prélèvement au laboratoire), ou observé rapidement.

Si ces conditions ne peuvent être réalisées, tout échantillon prélevé sur écouvillon, doit immédiatement être déchargé dans un milieu de transport. Le milieu est composé de tampon phosphate, de saccharose, de sérum animal, et d'un cocktail d'antibiotiques. Il est impératif de ne pas laisser en place l'écouvillon, sauf si un bactopick a été utilisé. L'aluminium, ou le bois du manche qui porte le dacron, risque de libérer des substances toxiques dans le milieu, qui pourraient interférer sur le résultat (inhibiteurs donc faux négatifs).

Tous les échantillons doivent être transportés à + 4 °C, ou à température ambiante, et ils doivent parvenir au laboratoire dans les plus brefs délais ; la durée du transport influence considérablement les résultats quantitatifs. Cette durée ne doit pas excéder 24 heures à + 4 °C, pour une période plus longue il faut conserver le prélèvement à - 70 °C ou dans l'azote liquide, en tenant compte que la congélation-décongélation diminue la quantité de particules viables, donc infectieuses.

Certaines recherches peuvent aujourd'hui bénéficier de nouvelles techniques immuno-enzymatiques ou d'hybridation avec ou sans amplification. Dans ce cas les échantillons seront déchargés dans les milieux appropriés à chaque technique et acheminés à température ambiante. **(Photo 27)**



Photo 27 : Milieu de transport pour technique PCR.

NE PAS OUBLIER :

- *qu'un échec, est le plus souvent lié à un prélèvement non conforme,*
- *qu'on augmente la sensibilité des techniques bactériologiques en répétant les prélèvements dans le temps,*
- *qu'on ne gagne pas à disperser les prélèvements sous prétexte de rechercher les compétences, car l'effet écouvillon risque d'interférer et incriminer à tort la bonne foi du biologiste !*

La technique de choix pour démontrer une infection évolutive à chlamydia est de reproduire « in vitro » l'inclusion caractéristique qui se développe dans les cellules infectées. Il s'agit le plus souvent de monocouches de cellules permissives telles que : Hep 2, Hela 229, Mc Coy, L 929 et beaucoup d'autres lignées plus rarement utilisées (BHK21, HL).

V.2.1 La recherche des particules par immunofluorescence (Fiche technique n° 1)

C'est une technique simple, elle nécessite une apposition de l'écouvillon qui a servi au prélèvement sur la surface délimitée de la lame.

Il est impératif de dérouler l'écouvillon sur la lame en imprimant une pression ferme pour l'exprimer, tout en étalant son contenu, ou souvent il est préférable de décharger

l'écouvillon dans 100 mcl de tampon PBS et de déposer 20 mcl de la suspension obtenue dans 2 puits d'une lame pour fluorescence.

Il faut être extrêmement prudent dans l'interprétation des résultats, et particulièrement rigoureux dans la technique de coloration. Le réactif est un anticorps monoclonal conjugué à un fluochrome et pour un œil non averti, des artefacts peuvent interférer, surtout lorsque l'étalement n'est pas soigneusement fait. Il est impératif de colorer en même temps un témoin négatif et un témoin positif et de comparer les images observées dans chaque cas.

La qualité des réactifs utilisés interfère sur la sensibilité et la spécificité.

V.2.2 La recherche des antigènes chlamydiens (Fiche technique n° 2)

Cette recherche se fait par des techniques immuno-enzymatiques ou de chemiluminescence. L'échantillon doit être prélevé dans un tube contenant le tampon d'extraction qui accompagne les trousse de détection mais il ne faut en aucun cas utiliser le tampon d'une trousse et faire la réaction avec les réactifs d'une autre, sous peine d'avoir des résultats erronés. **(Photo 28)**



Photo 28 : Milieux de transport pour la recherche de CT par une technique Immuno Enzymatique.

Certaines firmes utilisent des protéases pour extraire les protéines de l'échantillon, dans ce cas le 2 SP utilisé pour la culture ne conviendra pas, car il contient du sérum. Par contre, les conditions du transport peuvent être moins impératives que dans le cas de la culture, et les délais prolongés sans interférer sur les résultats.

La sensibilité et la spécificité de ces techniques sont à peu près identiques, mais dans ces conditions, le rapport qualité prix est à prendre en considération. Il est toutefois conseillé de contrôler par une culture les résultats positifs, surtout pour des valeurs relativement basses (DO, RLU etc...).

V.2.3 L'isolement en cultures cellulaires (voir fiches techniques n° 3 et 4)

C'est la méthode de référence, elle nécessite néanmoins une certaine habitude des cultures cellulaires et une structure adéquate, qu'une faible demande ne peut pas toujours justifier. De plus il est préférable que la détection des inclusions se fasse à l'aide d'un anticorps monoclonal conjugué, cependant d'autres méthodes de coloration peuvent être réalisées avec des résultats, certes moins bons, mais acceptables (fiches n° 6, 7 et 8).

L'échantillon est à cet effet prélevé dans un tube contenant un milieu de transport qui permet de préserver l'infectiosité en protégeant les cellules infectées. (**Photo 29**)

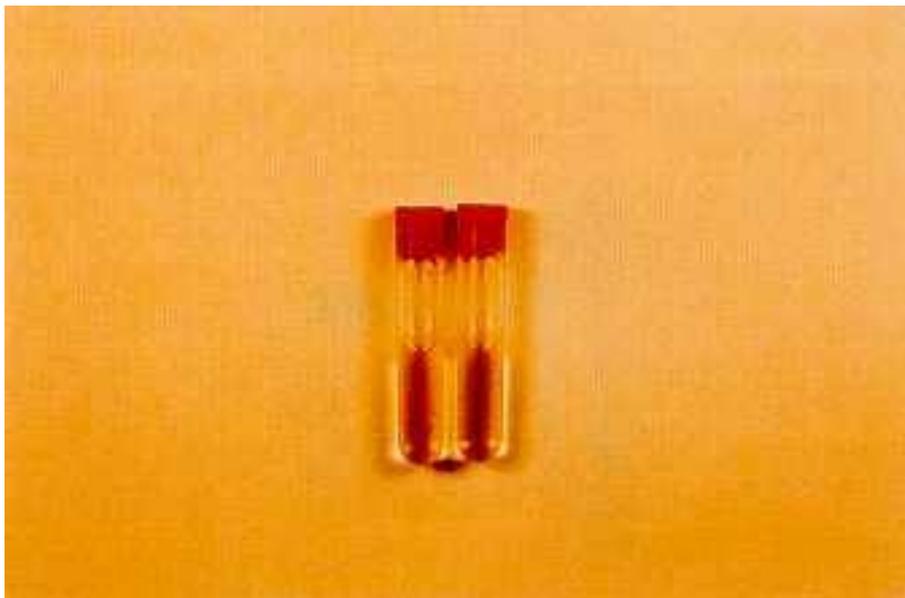


Photo 29 : Milieu 2 SP pour le recueil des échantillons, en vue de la recherche de CT par culture.

Il s'agit le plus souvent de 2 SP (Bio-diagnostic), milieu liquide contenant du saccharose 0.2 ou 0.4 M dans une solution saline tamponnée, et enrichie de 3 ou 5 % de sérum de veau fœtal. Le seul impératif est que le tube parvienne au laboratoire dans les 24 heures, et qu'il soit inoculé dès l'arrivée, pour augmenter les chances de récupérer les particules infectantes.

Ce milieu contient un mélange inhibiteur (Gentamycine, Vancomycine, Amphotéricine B) qui évite la prolifération des bactéries fréquemment associées.

Dans la mesure du possible, le transport à basse température est toujours conseillé.

Lorsque le délai de transport dépasse 24 heures, il est évident que les chances de conserver l'infectiosité diminuent rapidement et deviennent aléatoires. Dans le cas où la recherche ne pourrait être effectuée à l'arrivée au laboratoire, il faut congeler l'échantillon progressivement à - 80 °C au moins, mais la congélation diminue le titre infectieux.

La sensibilité et la spécificité de la technique sont excellentes.

V.2.4 Les techniques d'hybridation

Elles sont intéressantes par la rapidité d'exécution. Par ailleurs, l'utilisation de conjugués utilisant un réactif chemiluminescent permettent une lecture automatisée d'une grande sensibilité.

Les réactifs contiennent des sondes séquentielles de DNA capables de s'hybrider avec les fragments du RNA ribosomal des chlamydiae contenues dans l'échantillon. Le recueil doit alors se faire dans un tampon spécial (**photo 30**) où les protéines sont au contraire dénaturées. De nombreuses techniques ont été proposées, la plupart ont l'avantage de permettre une détection isolée (test unitaire), ce qui donne une grande souplesse, pour un petit nombre d'échantillon.



***Photo 30** : Milieu de transport pour la recherche de Chlamydia par hybridation et chemiluminescence.*

La méthode commercialisée est fondée sur le fait qu'une séquence de RNA simple brin (échantillon) forme un hybride stable, double brin avec une séquence complémentaire

spécifique de DNA (sonde marquée); Le nombre d'hybrides est d'autant plus abondant, qu'il y a. de séquences RNA spécifiques dans l'échantillon.

Un système de séparation adéquat permet d'éliminer les sondes non hybridées.

L'intensité lumineuse captée par un luminomètre est comparée au témoin négatif. Un témoin positif est obligatoirement inséré pour s'assurer de la bonne réalisation de la réaction.

V.2.5 Les techniques d'amplification

Différentes techniques permettent à ce jour d'accéder à une démultiplication de la cible grâce à des séquences oligonucléotidiques (amorces) spécifiques de séquences de DNA ou de RNA qui dans un contexte particulier (solutions tampon, conditions de température, etc ...) propres à chaque réactif, permettent de synthétiser le fragment situé en aval de l'amorce hybridée. En se plaçant ainsi dans des conditions expérimentales alternées, d'assemblage et de séparation du brin, il est possible de répéter les opérations de synthèse afin d'obtenir une quantité mesurable de la cible (amplicons).

La grande sensibilité et spécificité de ces techniques (PCR, LCR, TMA) rend possible la détection de chlamydia dans les échantillons qui ne conviennent pas habituellement à l'application des autres méthodes (urines, sperme, liquides de ponction et d'exsudation).

En revanche, leur très grande sensibilité peut être un piège ! (contamination par les amplicons). Cela nécessite de s'entourer de témoins étalonnés et de témoins internes, pour dépister les faux positifs (contaminants) et les faux négatifs (présence d'inhibiteurs, qui bloquent le processus d'amplification).

V.3. La sérologie

Les réactions sérologiques ne sont pas conseillées pour le diagnostic des infections conjonctivales ou génitales basses à *Chlamydia trachomatis*. La détection de hauts titres d'anticorps (> à 1/256^e) peut évoquer un diagnostic de Lymphogranulomatose vénérienne, de pneumonie, de salpingite, de périhépatite et d'épididymite. Cela est particulièrement confirmé si des anticorps de type IgM et ou IgA sont détectés, ou si une séroconversion est constatée dans le sérum. La haute prévalence du taux d'anticorps anti-chlamydiae dans différentes populations sexuellement actives limite l'utilisation de la sérologie pour le diagnostic, mais elle représente un élément d'investigation valable, dans le dépistage des complications.

Un organisme infecté répond en règle générale en fabriquant des anticorps qui peuvent être purement locaux et/ou qui sont détectés dans le sang. Ces anticorps varient dans le temps, et cette variation peut être révélée par les différentes techniques disponibles.

La plupart du temps, les techniques Elisa, qui utilisent des extraits antigéniques fixés sur un support inerte, ne donnent qu'une idée globale des anticorps, généralement ceux dirigés contre des antigènes de groupe (LPS) ou d'espèce (MOMP). Ces réactions conviennent uniquement à des fins de dépistage. Elles permettent en revanche de détecter les IgA et les IgM. (**Photo 31**)

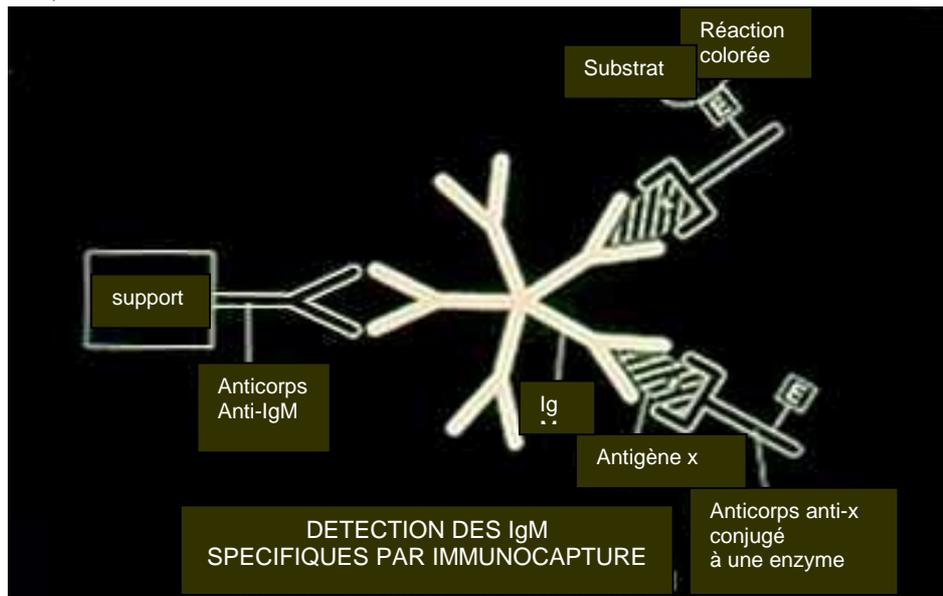


Photo 31 : Détection des IgM spécifiques par immunocapture, dans les techniques Elisa.

Dès lors une détection ponctuelle du taux d'anticorps, ne peut avoir qu'une valeur relative. Un taux faible d'anticorps peut s'observer aussi bien au début d'une infection, qui pourra se compliquer, qu'au décours d'une infection localisée traitée. La persistance d'un taux d'anticorps, stable dans le temps n'est pas forcément en rapport avec une infection évolutive. En règle générale, une primo-infection donnera une réponse humorale avec IgM et ou IgA, mais un taux bas éphémère risque de ne pas être détectable par les techniques habituelles.

D'après Bowie (1977), des hommes sélectionnés ayant une urétrite à Chlamydia trachomatis pour la première fois, ont une réponse humorale spécifique à IgM qui dure environ 1 mois.

Des études expérimentales sur l'animal, montrent également, l'apparition d'IgM tout au début de l'infection.

Tous les travaux cités concluent à la disparition plus ou moins rapide des IgM. En revanche les IgG persistent.

- A propos des IgA

Les muqueuses, siège habituel des infections à chlamydia, sécrètent des IgA spécifiques. Elles sont constituées d'un dimère d'IgA 7S où 2 molécules sont reliées par une pièce intermédiaire (chaîne J + composant sécrétoire).

Le composant sécrétoire provient d'un précurseur transmembranaire synthétisé par les cellules bordantes des muqueuses.

Il facilite le transport épithélial de l'IgA et protège la molécule de la protéolyse.

Les IgA sécrétoires enveloppent les antigènes, inhibant ainsi l'adhérence aux cellules muqueuses.

Les muqueuses par ailleurs, possèdent un système immunitaire local (MALT). Au contact de l'antigène, les cellules immuno-compétentes initient un cycle de maturation et finissent, après migration, dans le stroma des muqueuses qu'elles infiltrent.

L'importance de ces systèmes a été parfaitement mis en exergue dans la thèse de Bertrand Xerri, 1991.

Là encore, le taux peut être faible, lorsqu'il est détecté par les techniques de MIF, souvent plus élevé par les techniques Elisa mais dans tous les cas ces techniques sont peu adaptées aux liquides biologiques autres que le sérum.

En pratique, la sérologie à elle seule n'a de valeur diagnostique que dans des cas bien précis qui sont :

- un taux d'anticorps même bas, si ce sont des IgM,
- un taux d'anticorps nettement plus élevé sur un deuxième prélèvement effectué à 15 jours ou trois semaines d'intervalle (à condition que le titre de ce deuxième prélèvement soit 4 fois plus élevé que le premier),
- un taux d'anticorps très élevé, associé à des anticorps sécrétoires (IgA).

Enfin, notons que les taux d'anticorps sont habituellement plus élevés dans les infections systémiques (LGV, salpingite, Fitz-Hugh-Curtis) que dans les infections des muqueuses superficielles, ceci aussi bien pour les IgG que pour les IgM.

Les anticorps anti-chlamydia trachomatis peuvent être détectés par différentes méthodes sérologiques qui incluent la réaction de fixation du complément, la micro-immunofluorescence, la fluorescence avec un antigène déterminé et les techniques ELISA ou immuno-enzymatiques.

V.3.1 La micro-immunofluorescence (M.I.F.) (fiche technique n ° 9)

Décrite en 1970 par Wang et Grayston, cette méthode a permis de séparer *Chlamydia trachomatis* en 15 sérotypes différents. Cette individualisation était basée sur une différence de réactivité des différentes souches vis-à-vis d'immunsérums connus, obtenus chez l'animal (souris).

La MIF permet donc de détecter des anticorps spécifiques de groupe, d'espèce et de type. Cette méthode de détection des anticorps est un adjuvant précieux dans le diagnostic des infections à *Chlamydiae*, et tout particulièrement au cours des complications.

La micro-immunofluorescence de Wang et Grayston utilise différents sérotypes provenant de souches différentes de *Chlamydia trachomatis* cultivées sur œufs de poule embryonnés ou sur culture cellulaire. Après purification, la suspension de particules est déposée sur une lame qui est séchée puis fixée à l'acétone. Elle demeure la méthode de référence en matière de sérologie chlamydienne. Des méthodes simplifiées permettent aujourd'hui de différencier des anticorps dirigés contre les différentes espèces (*psittaci*, *pneumoniae*, *trachomatis*).

Principe

Des particules chlamydiennes isolées (CE et CR) sont obtenues et partiellement purifiées, soit à partir de membranes vitellines d'œufs de poule embryonnés infectés, soit à partir de cultures de cellules infectées.

Une quantité infime de cet antigène est déposée et fixée sur une lame.

Les sérums à étudier, ainsi que les témoins, sont dilués au 16e dans une solution saline tamponnée (PBS).

Chacune de ces dilutions est déposée sur l'alvéole contenant l'antigène.

Après un temps de contact variable, la dilution est éliminée, la lame lavée plusieurs fois avec du PBS, séchée et dans un deuxième temps, une anti-globuline marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine, préalablement diluée est déposée dans l'alvéole contenant l'antigène.

On peut utiliser une anti-globuline anti-IgG, anti-IgA ou anti-IgM afin de révéler les différentes classes d'anticorps.

La lecture se fait au microscope équipé en épifluorescence.

En cas de réaction positive, l'anticorps fixe l'anti-globuline qui épouse la morphologie des particules. Celles-ci apparaissent fluorescentes avec une coloration vert-pomme d'autant plus intense que la quantité d'anticorps fixée est plus grande. (**Photo 32**)

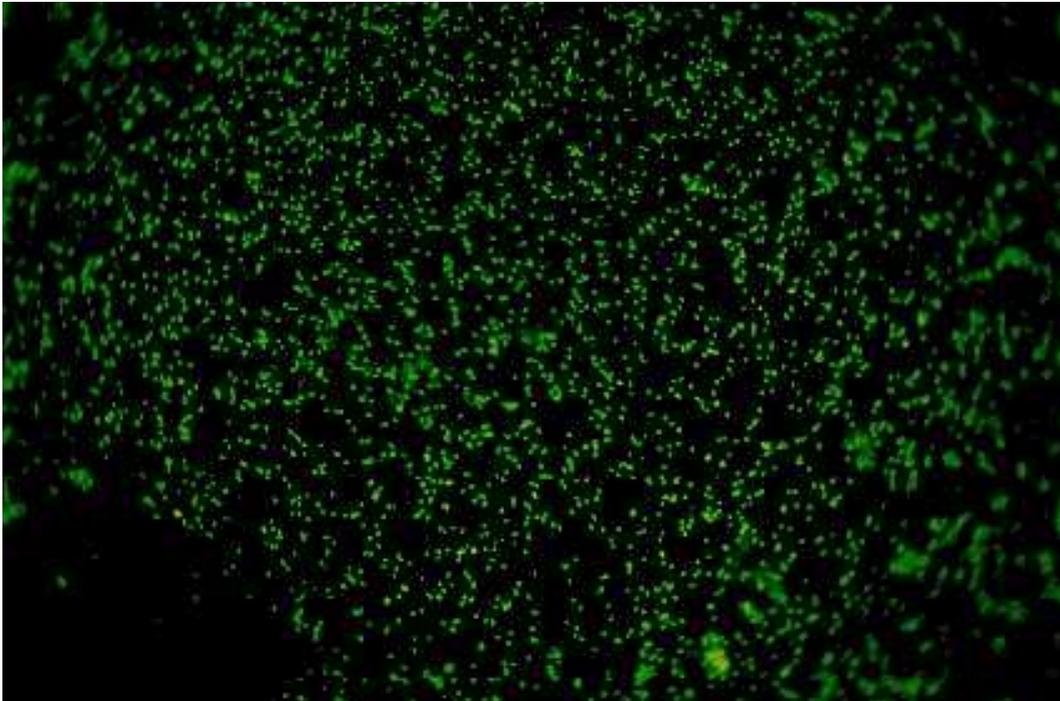


Photo 32 : Particules fluorescentes après fixation des anticorps sériques révélés par une antiglobuline conjuguée FITC (Source d'antigène: souche L2 purifiée).

La M.I.F. en présence d'un seul antigène L2 s'avère le test le plus simple car il donne des réactions immunologiques croisées avec la totalité des sérotypes de *Chlamydia trachomatis*. La méthode peut être utilisée pour mesurer à la fois les anticorps de type IgG et de type IgM après préparation des lames. Certains auteurs ont même utilisé directement des cellules infectées avec un sérotype de CT (L2) pour détecter les anticorps. Les résultats sont souvent différents de ceux obtenus avec les techniques utilisant des corps purifiés. Ils manquent de reproductibilité et les cellules infectées peuvent interférer de manière non spécifique (consulter fiche n° 10).

V.3.2 Les autres techniques

1) La réaction de fixation du complément: (Photo 33)



Photo 33 : Photographie montrant la réactivité de 12 sérums de patients, en présence d'un extrait brut de CT (Virion) et du complexe hémolytique. La ligne supérieure représente les témoins sérums. Les dilutions verticales vont de 10 à 160^e.

La réaction de fixation du complément est aussi une méthode complexe et est seulement indiquée dans le diagnostic de la Lymphogranulomatose vénérienne et de la Psittacose, elle est peu utilisée dans le cadre des infections à CT.

Dans sa forme classique, cette méthode utilise un antigène brut, thermostable, de nature glucido-lipido-polypeptidique (LPS) extrait de la paroi de Chlamydia.

Cet antigène est commun à toutes les espèces de chlamydia, c'est un antigène de groupe.

Cette réaction ne permet donc pas de distinguer les infections à *Chlamydia trachomatis* de celles à *Chlamydia psittaci* ou *pneumoniae*; ce qui limite son emploi. Elle garde cependant sa valeur dans des affections disséminées telles que la LGV, les périhépatites ou les pneumopathies du nourrisson où en général elle se montre fortement positive.

Cependant, des extraits protéiques de la membrane périphérique des particules Chlamydiennes peuvent aussi être utilisés dans cette technique avec les mêmes remarques que pour la technique générale, mais ces réactions sont alors spécifiques d'espèce (réaction d'hémolyse conditionnée). Ces antigènes peuvent être obtenus à partir de membranes vitellines infectées ou de cultures de cellules.

2) Elisa

Il s'agit d'une méthode immuno-enzymatique.

Principe: (*voir fiche n ° 11*)

Des protéines contenues dans la membrane externe des particules chlamydiennes purifiées sont extraites et solubilisées par des détergents à faible concentration.

Puis, ces protéines sont fixées sur un support inerte (billes, tubes en polystyrène ou cupules de plaques de microtitration).

On les met en contact avec le sérum pré-dilué, et l'anticorps réagit avec la protéine fixée pour former un complexe immun qui est révélé par un deuxième anticorps qui sert de vecteur à un enzyme (Péroxydase, phosphatase alcaline, β galactosidase).

L'activité enzymatique sera enfin démontrée en présence d'un substrat spécifique, par exemple l'orthonitrophenyl phosphate (ONPP), pour la phosphatase alcaline.

La coloration qui en résulte est appréciée par spectrophotométrie. Cette coloration est proportionnelle à la quantité d'enzyme fixée, donc d'anticorps. (**Photo 34**)

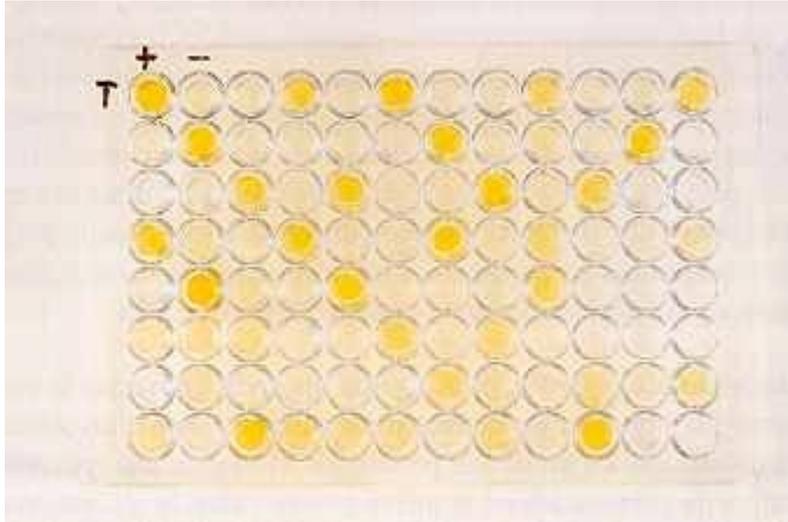


Photo 34 : *Plaqué de microtitration pour la détection des anticorps anti-chlamydia. L'enzyme utilisée est la phosphatase alcaline en présence de l'ONPP*

Les témoins sont figurés par + ou -

Entre chaque étape, il faut procéder à des lavages soigneux, afin d'éviter le bruit de fond qui interfère avec la spécificité de la réaction

3) Les méthodes qualitatives

Il est possible de caractériser les anticorps spécifiques de CT, de déterminer exactement quelle protéine ils reconnaissent et de suivre l'évolution de ces anticorps dans le temps.

Le principe de la technique consiste à recueillir et purifier une grande quantité de particules chlamydiennes.

Après avoir obtenu une suspension contenant 10^9 à 10^{10} unités formant inclusion (UFI), les protéines de surface, contenues dans les membranes externes sont dénaturées à l'aide d'une solution de SDS à 1 % (Dodécyl sulfate de soude) en présence de 2 Mercapto-éthanol à 2 % qui casse les ponts disulfures.

Dans ces conditions des protéines différentes vont migrer à des niveaux différents en fonction de leur poids moléculaire et de leur charge globale.

Cette séparation se pratique en gel de polyacrylamide vertical. Ce gel peut avoir une concentration constante (10 ou 12 %) ou au contraire avoir une concentration croissante, réalisant ainsi un gradient de séparation. Dans un compartiment situé aux deux extrémités du gel, est déposé un mélange de protéines de poids moléculaire connu en guise de témoin. Il permettra de définir le poids moléculaire des protéines du mélange contenu entre les 2 compartiments externes. La préparation chlamydienne dénaturée est déposée à la surface du gel. Toutes ces opérations se pratiquent dans des conditions de pH et force ionique qui dépendent de la taille des protéines à séparer. On peut ainsi modifier ces paramètres si l'on désire amplifier une région particulière de protéines caractéristiques (protéines riches en cystéine, MOMP, LPS).

Le gel est placé entre deux électrodes, et le courant engendré provoque la migration des protéines (3 à 5 heures). La migration est correctement suivie à l'aide d'un indicateur coloré, qui cependant migre plus vite que les molécules protéiques. Mais pour une concentration donnée de protéines la migration du colorant atteint le même niveau ; ainsi la séparation est toujours pratiquement identique.

Lorsque la séparation est jugée suffisante, le gel est pris en sandwich entre 2 feuilles de Nitrocellulose. En appliquant des électrodes sur les volets du sandwich, et en immergeant l'ensemble dans un grand volume de tampon, on peut réaliser une électro-élution des protéines du gel, qui se fixeront (pour la majorité d'entre elles) sur la nitrocellulose, plus facile à manier et à conserver que le gel lui-même.

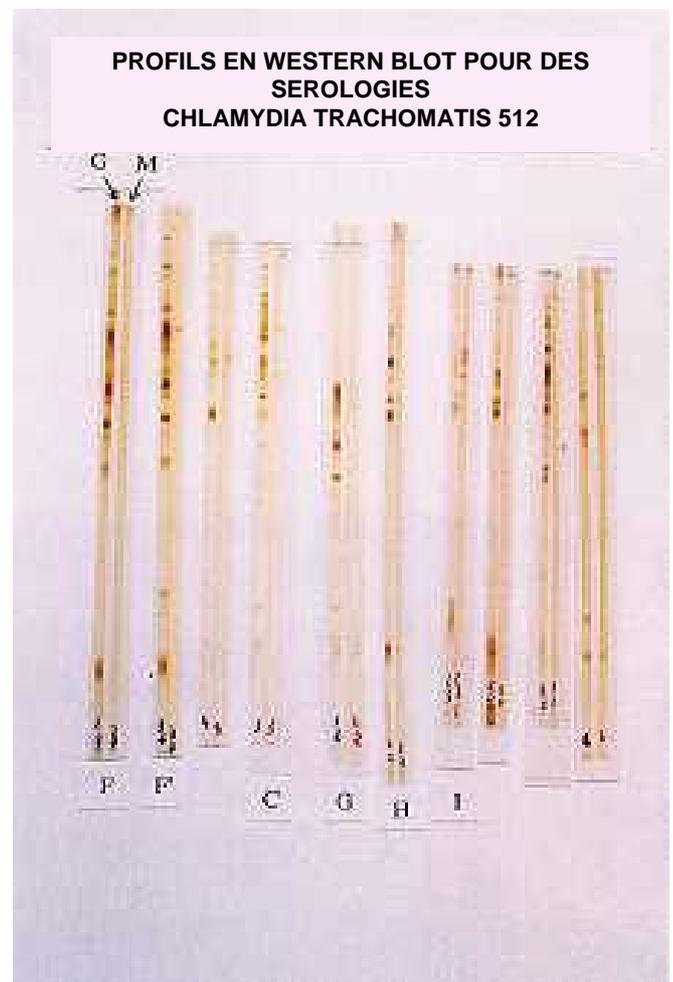
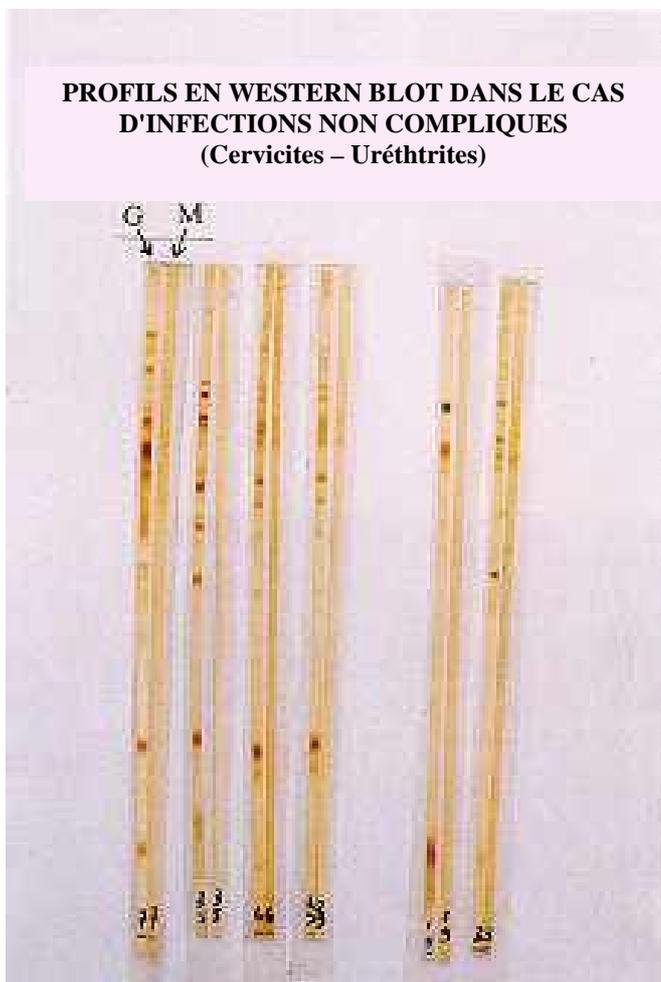
Des bandelettes de 4 mm de largeur sont découpées verticalement (dans le sens de la migration), elles contiennent l'empreinte de toutes les protéines des chlamydiae préalablement séparées.

Les sérums, ainsi que tout autre liquide biologique peuvent être mis en contact avec ces bandelettes. En règle générale 1 heure à 1 heure 30 mn suffisent pour que les anticorps spécifiques se fixent sur les protéines spécifiques.

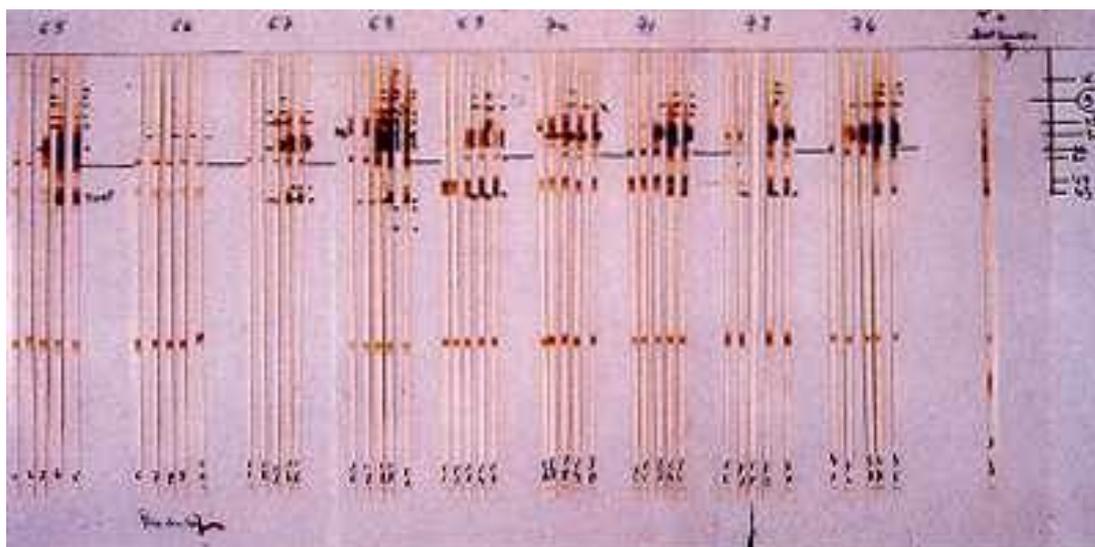
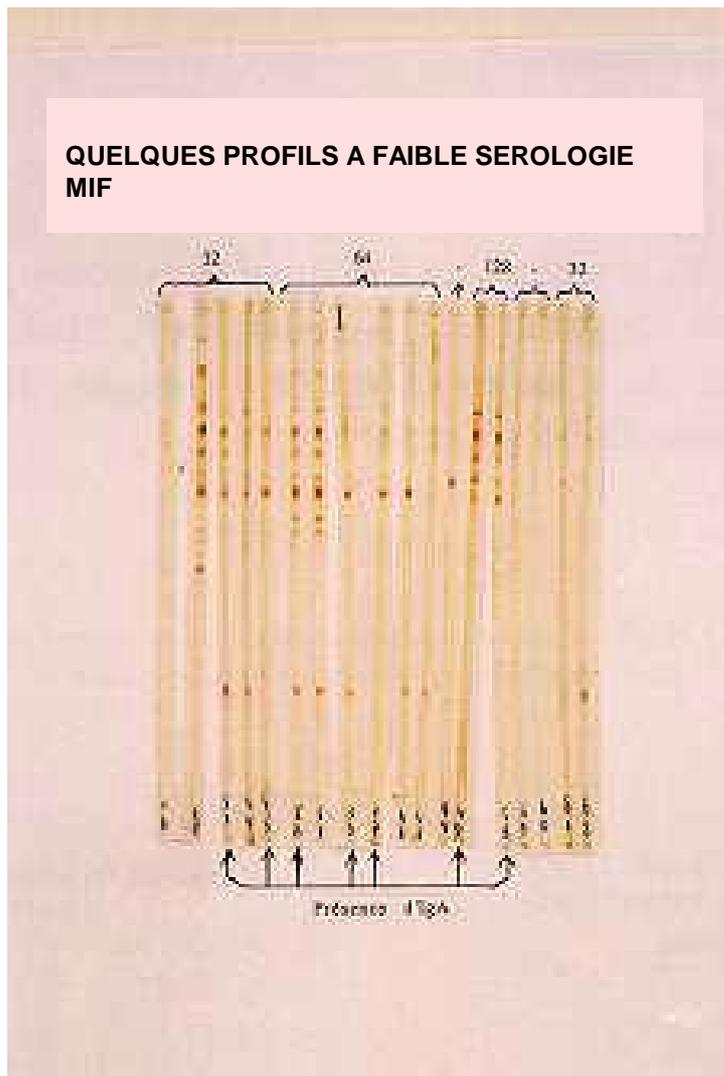
Des lavages successifs et répétés (3 lavages suffisent) permettent d'éliminer les protéines non fixées, elles seront révélées par une antiglobuline marquée à la peroxydase ou mieux à la phosphatase alcaline en présence du substrat correspondant (**DAB**, **NBT** + **BCIP**).

Les protéines apparaissent en bleu violet si l'enzyme est la phosphatase alcaline, en brun s'il s'agit de la peroxydase. La coloration est d'autant plus intense que la quantité d'anticorps dans le sérum est plus élevée. Cette méthode de détection des anticorps permet en outre de définir s'il s'agit d'IgG, IgA, ou IgM. De plus le profil réalisé, par les anticorps présents dans le sérum est souvent caractéristique du type d'infection (infection profonde, infection ancienne : séquelle sérologique, présence marquée d'IgM etc ...). Elle permet de mieux juger la cinétique des anticorps, que les méthodes classiques dites de dépistage (MIF, Elisa, Fixation du complément) aussi bien chez l'homme que chez l'animal (Thèse de F. Branger ; Thèse de B. Xerri.) (Vannka, Glasner, Sarov, 1988). **(Photos 35, 36, 37 et 38)**

*Photos 35 - 36 - 37 : Profils obtenus en Immuno-blot. Les protéines sont extraites de L2.
Le 2^e anticorps est marqué à la peroxydase.*



QUELQUES PROFILS A FAIBLE SEROLOGIE MIF



*Photo 38 : Evolution des anticorps anti-chlamydia chez le lapin, après ingestion d'une souche D.
(9 lapins : 68 → 74 ; cinq prélèvements effectués à 8 jours d'intervalle)*

CONCLUSION

L'extraordinaire abondance des techniques proposées à ce jour pour la détection de chlamydia trachomatis reflète souvent les insuffisances de chacune d'entre elles,

Certaines sont plus sensibles que d'autres, en termes de signal ; elles présentent chacune des avantages et des inconvénients.

Quelle qu'en soit la valeur intrinsèque, aucune méthode ne relève du miracle, et si le prélèvement au départ est déficient, le résultat posera alors plus de problèmes qu'il n'en résoudra.

Chacun croit savoir, mais il n'est pas évident que l'on sache réellement ! Aussi faut-il toujours être prudent, et ne pas considérer un résultat biologique comme une entité, mais plutôt comme un atout majeur, qui doit être interprété dans un contexte épidémiologique et clinique. Si un doute persiste, il est nécessaire de reconsidérer les facteurs qui peuvent interférer à chacune des étapes qui mènent au diagnostic, et ne pas hésiter à... recommencer !

■ VI. LE TRAITEMENT

L'Organisation Mondiale de la Santé, a défini les modalités du traitement classique des infections à CT lors de la réunion d'un groupe d'experts internationaux en Septembre 1989.

Ces modalités, issues de consensus internationaux, étayés par de nombreux travaux scientifiques, ont pris en considération les conséquences sanitaires, économiques et sociales des M.S.T., dont les chlamydiae viennent en tête.

Parfois, le coût de nouvelles molécules peut entraîner une hésitation à leur prescription, mais il faut les opposer au coût des traitements inadéquats et à celui que génèrent les rechutes, l'extension de l'infection aux partenaires, et les complications y compris la stérilité, source indiscutable de lourdes charges, particulièrement dans les pays industrialisés.

Les grandes lignes de la conduite à tenir, ne sont que des recommandations, mais certainement pas une obligation. Le médecin est bien sûr seul juge de la thérapeutique à instaurer, en tenant compte du contexte clinique, épidémiologique et de la sensibilité actuelle aux différents antibiotiques.

Voici résumées ces recommandations :

VI.1. Infections localisées (urètre, endocol, rectum)

- Doxycycline 100 mg per os durant 7 jours,
- ou Tétracycline 500 mg per os 4.fois par jour pendant 7 jours.

En cas d'intolérance aux tétracyclines :

- Erythromycine 500 mg per os 4 fois par jour pendant 7 jours,
- ou Sulfisoxazole 500 mg per os 4 fois par jour pendant 10 jours (sulfamides).

Il est inutile de rajouter du Triméthoprime qui n'augmente pas l'activité vis-à-vis de *Chlamydia trachomatis*.

Afin d'assurer le meilleur résultat thérapeutique, il est indispensable de traiter le ou les partenaires désignés.

Si la nécessité, d'un contrôle s'imposait, ce qui ne paraît pas nécessaire lorsqu'il n'y a pas de résistance connue aux antibiotiques préconisés en première intention, il est impératif d'attendre 6 semaines après l'arrêt du traitement.

VI.2. Chez la femme enceinte

Dans un contexte épidémiologique déterminé, la recherche de *Chlamydia trachomatis* devrait être systématique lors de la première visite prénatale et le cas échéant (femmes à risque) de renouveler cette recherche au cours du 1^{er} trimestre.

En cas de résultat positif :

- Erythromycine 500 mg per os 4 fois par jour pendant 7 jours.

En cas d'intolérance on devra se contenter de 250 mg per os 4 fois par jour pendant 14 jours. Les partenaires devront être traités comme précédemment (VI. 1).

En cas d'impossibilité d'ingérer l'érythromycine on pourra essayer

- amoxicilline 500 mg per os, 3 fois par jour pendant 7 jours.

VI.3. Conjonctivite du Nouveau-Né

Éliminer l'étiologie gonococcique

Sirop d'érythromycine : 50 mg/Kg de poids et par jour en 4 doses pendant 2 semaines.

VI.4. Pneumopathie du Nouveau-Né

L'étiologie chlamydienne est étayée par l'isolement du germe et/ou la sérologie comparée du nourrisson et de la mère

La présence d'IgM a ici une forte valeur diagnostique. Le traitement préconisé pour la conjonctivite sera appliqué ici durant trois semaines.

VI.5. Lymphogranulomatose vénérienne

- Doxycycline 100 mg per os 2 fois par jour pendant 14 jours,
ou
- Tétracycline 500 mg per os 4 fois par jour pendant 14 jours.

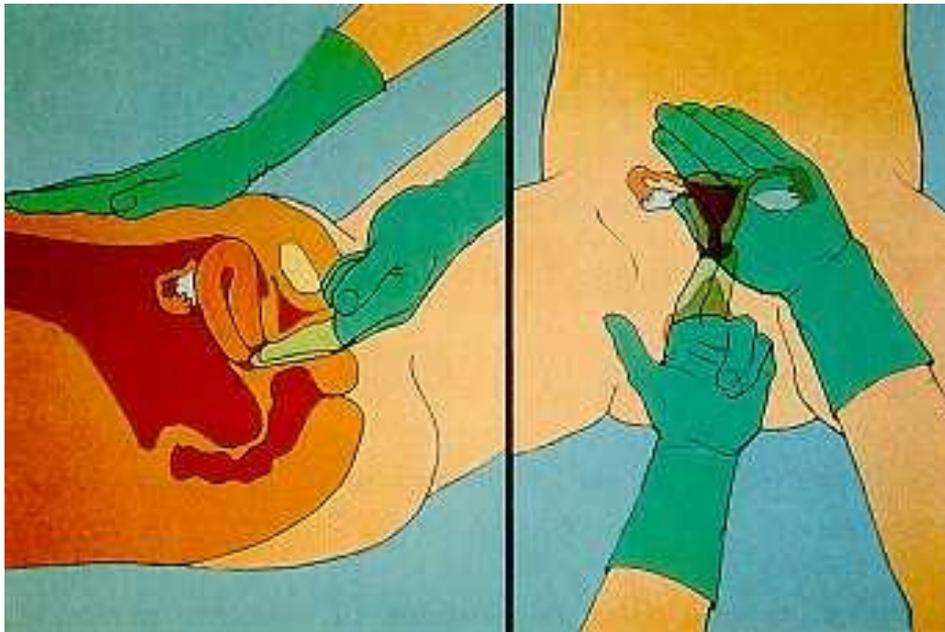
En cas d'impossibilité de donner des cyclines (allergie, intolérance, effets secondaires, etc...) on pourra prescrire:

- . Sulfamides 1 g per os 4 fois par jour pendant 14 jours,
ou
- . Erythromycine 500 mg per os, 4 fois par jour pendant 14 jours

Le médecin jugera de l'opportunité de prolonger ou non cette thérapeutique.

VI.6. Les formes compliquées (syndrome pelvien, Prostatovésiculorchi-épididymites)

Toute douleur provoquée, chez la femme, par une palpation bi-manuelle doit faire suspecter une inflammation pelvienne. A fortiori si la douleur s'accompagne d'écoulement endocervical, et des saignements spontanés. Il faut se souvenir que *Chlamydia trachomatis* est souvent le responsable majeur, seul ou associé à d'autres germes (gonocoques, anaérobies, mycoplasmes). **(Photo 37 bis)**



Photos 37 bis : Palpation bi-manuelle du pelvis pour favoriser la sécrétion au niveau de l'épithélium. (CDC - Atlanta).

Si le diagnostic est incertain, il ne faut pas hésiter à hospitaliser dans ce cas, le traitement recommandé a été:

- Cefoxitine, 2 g IV, 4 fois par jour associé à Doxycycline 100 mg IV, 2 fois par jour,
- ou .
- Chloramphénicol (Thiamphénicol) 500 mg IV 4 fois par jour associé à Gentamycine 1,5 mg par Kg de poids, IV toutes les 8 heures,
- ou
- Clindamycine 900 mg IV toutes les 8 heures associé à Gentamycine 1,5 mg par Kg toutes les 8 heures.

Ces traitements doivent être poursuivis pendant 4 jours, ou bien 48 heures après l'amélioration des malades.

Le relais sera pris avec

- Doxycycline 100 mg per os 2 fois par jour pendant 10 à 14 jours,
- ou
- Tétracycline 500 mg per os par jour pendant 10 à 14 jours.

S'il n'y a pas eu hospitalisation le traitement ambulatoire comportera :

- un traitement en dose unique à visée gonococcique, plus : (double infection possible)
- Doxycycline 100 mg per os, 4 fois par jour pendant 10 jours, plus : (visée anti-chlamydia)
- Métronidazole 500 mg per os, 3 fois par jour pendant 10 jours (anaérobies éventuellement associés).

Dans le cas d'une impossibilité à utiliser ces médicaments on peut recourir à

- Triméthoprim (80 mg) - Sulfaméthoxazole (400 mg) 10 comprimés 1 fois par jour pendant 3 jours, puis 2 comprimés 2 fois par jour pendant 7 à 10 jours, plus :
- Métronidazole, 500 mg per os 3 fois par jour pendant 10 jours, ou encore
- Kanamycine 2 g, IM en dose unique (gono) ; plus:
- Tétracycline 500 mg per os, 4 fois par jour, ou Doxycycline 100 mg per os, 2 fois par jour pendant 10 jours.
- Métronidazole (anaérobies), 500 mg per os, 3 fois par jour pendant 10 jours.

Dans le domaine des complications dues à *Chlamydia trachomatis*, une conférence de consensus s'est tenue à Grenoble ([1993) dans laquelle un groupe d'experts a retenu les recommandations suivantes (J. Henry-Suchet Médecine et Maladies Inf. 1993).

Elle distingue les infections utéro-annexielles avec manifestations cliniques (endométrite, salpingite aiguë et subaiguë) et les infections utéro-annexielles silencieuses. Le traitement proposé est basé sur une poly-antibiothérapie, en prenant en considération la gravité de l'affection, le coût des antibiotiques et la compliance s'agissant habituellement d'une population jeune. La revue de la littérature médicale sur le sujet fait état d'une efficacité variant de 85 à 95 %, efficacité contestable.

Les propositions retenues dans ce cas ont été les suivantes

1) Cas aigus et subaigus

- Amoxicilline + acide clavulanique, 3 à 6 g par jour, IV pendant 4 à 6 jours puis per os (2 à 3 g par jour) pendant 5 à 10 jours + antichlamydien 4 à 6 semaines.

En cas d'échec associer ampicilline (6 à 12 g), gentamycine et metronidazole pendant au moins 15 jours.

- Amoxicilline + acide clavulanique en association avec Doxycycline ou plus récemment la Ciprofloxacine.
- Céphalosporines de 3^e génération : cefoxitine, cefotaxime, cefoperazone, ceftriaxone associées au métronidazole et une cycline ou autre molécule nouvelle.
- Aminosides associés avec une β lactamine et un antichlamydien.
- Le metronidazole particulièrement actif sur les germes anaérobies souvent associés (Bactéroïdes) doit être associé à un anti-chlamydien et une céphalosporine.

- Les macrolides et apparentés :

- La clindamycine, antibiotique à large spectre a la faveur des auteurs américains. Son activité à la fois sur les Gram positifs et les Gram négatifs lui attribue une place de choix, d'autant plus que son activité sur *Chlamydia trachomatis* n'est pas à déconsidérer.

Pour l'instant la clindamycine par voie IV est associée à la gentamycine et à un anti-chlamydien.

- La roxithromycine, efficace in vitro sur *Chlamydia trachomatis* est mieux tolérée que l'Erythromycine, et a une meilleure diffusion tissulaire, elle peut se substituer efficacement à l'Erythromycine.

- L'azithromycine par voie parentérale ou per os, a pu être utilisée dans des traitements en monodose (traitement minute) dans certains cas de chlamydie non compliquée (Ridjway, 1995).

La durée du traitement est en règle générale de 10 jours avec des doses à définir en fonction de la gravité.

- Céphalosporines de 2^e ou 3^e génération 2 à 8 g, IV, pendant 4 à 6 jours suivi par ceftriaxone, 2 g, IM pendant 5 à 7 jours, plus métronidazole et antichlamydien.

ou

- Clindamycine IV, 2.50 g, IV par jour suivi de 1 80 g, per os par jour, elle pourra être associée à une quinolone.

Les traitements proposés sont confortés par une cœlioscopie qui outre sa valeur diagnostique présente un intérêt thérapeutique indiscutable, diminuant ainsi les risques séquellaires.

L'adjonction d'anti-inflammatoires corticoïdes, ou non stéroïdiens, accélère indiscutablement la guérison et favorise la diffusion des antibiotiques dans les tissus. Ils seront prescrits après la défervescence des symptômes aigus, et poursuivis pendant 2 ou 3 semaines.

Le traitement du partenaire est de règle.

2) Cas silencieux

S'il s'agit d'une séroconversion récente, le traitement sera fondé sur les recommandations de l'OMS. S'il s'agit d'une découverte sérologique indiquant une infection profonde, ce traitement sera poursuivi pendant 3 semaines.

Dans les cas chroniques, découverts à l'occasion d'une coélicoscopie, l'infection chlamydienne latente est la règle, il est impératif d'associer un antichlamydien et des anti-inflammatoires, en le poursuivant plusieurs mois.

Des études récentes ont montré enfin une action très prometteuse des nouvelles molécules. Il s'agit essentiellement des fluoro-quinolones et des Céphalosporines de 3^e génération.

Qu'est-il donc à l'heure européenne des moyens de lutte contre les infections génitales ?

Quelles voies nouvelles s'ouvrent, dans ce domaine, à l'orée du XXI^e siècle ?

VI.7. Les Fluoro-Quinolones

Chef de file de ce nouveau groupe, l'acide nalidixique a d'abord été utilisé comme antiseptique urinaire. Des molécules analogues comme l'acide Oxolinique et la Cinoxacine, utilisés dans le même domaine, ont constitué les Quinolones de 1^{re} génération.

Des modifications au niveau du double noyau quinolone et des substitutions au niveau des chaînes latérales ont permis de synthétiser de nouvelles molécules, les fluoro-quinolones : Norfloxacin, Ciprofloxacine, Rosoxacine, Enoxacine, Fleroxacine, Ofloxacine, Lomefloxacine et Temafloxacine.

Comme les quinolones de première génération, les fluoro-quinolones ont pour cible la DNA gyrase qui intervient dans la synthèse du DNA. En bloquant ainsi son action, les quinolones s'avèrent bactéricides.

L'absorption intestinale est bonne ce qui permet leur administration per os, et fournit une bio-disponibilité de 95 %, qui peut être modifiée en présence de Mg⁺⁺ ou Al⁺⁺ (apportés par les aliments). Le taux de fixation aux protéines sériques est relativement bas pour l'Ofloxacine (8 %) mais peut atteindre 60% pour l'Enoxacine. Le pic sérique est obtenu 1 à 2 heures après l'administration orale et peut atteindre 16 mg/l pour l'Enoxacine.

La demi-vie est variable, elle est de 3 heures pour la Cinoxacine et de 12 ou 13 heures pour la Fleroxacine et la Pefloxacine, ce qui permet leur administration en 2 prises orales journalières. La diffusion tissulaire est bonne en règle générale et les taux atteints dépassent largement les taux sériques, pouvant atteindre dans les urines 100 fois ces taux. Cependant le passage méningé est difficile.

- Activité sur Chlamydia trachomatis

- L'Ofloxacine montre une activité in vitro, indiscutable sur les souches isolées de chlamydia trachomatis.

D'autres molécules ont une activité identique : Témofloxacine, Ciprofloxacine alors que la Fleroxacine et la Péfloxacine n'ont qu'une activité modérée semblable à celle de la Clindamycine.

Des très nombreuses études cliniques pratiquées de 1985 à 1991, il se dégage les données suivantes :

- La Ciprofloxacine en dose unique de 250 mg n'a aucune activité sur l'urétrite non gonococcique masculine.

En traitement prolongé (500 mg ou 750 mg durant 7 jours), le succès est minime chez l'homme alors que chez la femme, on peut atteindre 77 % de guérison après une semaine.

- La Rosoxacine et la Norfloxacine ne montrent pas plus d'activité.

Par contre, toutes les études montrent une bonne activité de l'Ofloxacine à 200 mg pendant 7 jours, avec des pourcentages de guérison allant de 91 à 100 % après 2 semaines de traitement.

Une étude française portant sur 13 cas de pneumonie à chlamydia psittaci a montré une bonne efficacité de l'Ofloxacine avec une posologie de 200 mg toutes les 8 heures.

CONCLUSION

Les protocoles thérapeutiques appliqués aux MST doivent être constamment adaptés aux nouvelles exigences, des agents microbiens. Ces exigences naissent d'une perpétuelle lutte de survie, des bactéries face aux agents anti-microbiens qu'on leur oppose.

C'est pourquoi, toutes les données nouvelles, concernant ces changements doivent être portées à la connaissance des équipes médicales spécialisées, afin qu'elles puissent apporter les modifications et les rectifications qui s'imposent.

Bien que très prometteuses dans leur efficacité, ces nouvelles molécules à peine ont-elles vues le jour que déjà des résistances commencent à se manifester à propos des Gonocoques essentiellement !

Espérons que l'Europe nouvelle permettra une plus grande facilité d'échanges et de ce fait une action plus concertée, donc plus efficace, face à ces MST qui, immuables, caractérisent le comportement humain, dans le cours du temps.

RECHERCHE DIRECTE DES CHLAMYDIAE PAR IMMUNOFLUORESCENCE

I. PRINCIPE

La technologie récente a permis d'obtenir, chez la souris, des anticorps monoclonaux dotés d'une grande affinité et d'une haute spécificité. Ils ne reconnaissent qu'un ou plusieurs épitopes dans un antigène donné. Ces anticorps monoclonaux sont produits par une cellule hybride formée par la fusion d'une cellule B productrice d'anticorps (cellule immune), provenant d'une souris immunisée, et d'un lymphocyte malin (myélome multiple de souris) déficient en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase (HGPRT). En présence d'aminoptérine (milieu sélectif), la voie principale de synthèse des nucléotides dérivés des purines et des pyrimidines est bloquée et seules peuvent alors survivre les cellules hybrides par la HGPRT des cellules immunes. Cet hybride hérite, par ailleurs, du pouvoir de synthèse des anticorps des cellules immunes et de l'immortalité des cellules myélomateuses.

Par une méthode de dilution limite, ces hybrides sont sélectionnés. Ils forment un clone homogène qui sécrète un seul type d'anticorps. Cet anticorps, obtenu en grande quantité (plusieurs mg/ml), est purifié dans sa fraction gammaglobulinique et directement couplé à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC), il constitue un réactif capable de se fixer sur l'antigène spécifique.

Les anticorps commercialisés reconnaissent des protéines de surface MONIP et des lipopolysaccharides du groupe Chlamydia et permettent la détection des particules libres chez les sujets infectés.

II. RÉACTIFS

Exemple: Kit Syva Microtrack.

La trousse est constituée de :

- 1 flacon contenant 5 ml d'anticorps monoclonal Chlamydia, conjugué au FITC. Il contient du Bleu Evans à la concentration de 1/2500. Ce réactif reconnaît les différents sérotypes de Chlamydia trachomatis,
- 1 tube contenant du liquide de montage, livré avec le réactif.
- Eau distillée et solution tampon (PBS) : ces réactifs ne sont pas fournis avec la trousse.

III. MATERIEL

- Lames pour fluorescence portant 1 ou 2 alvéoles circulaires, (**Photo 39**)



Photo 39 : Lames pour IF direct (Syva Microtrack).

- Micropipettes de distribution (type Finpipette, Gilson, Eppendorff) réglables de 0 à 50 ml,
- Cônes plastiques à usage unique adaptables,
- Ecouvillons en coton avec manche de bois rigide (pour les femmes) ou en aluminium souple (pour les hommes), cependant le bactopick ou la cytobrush peuvent convenir.

- Pissette avec eau distillée,
- Microtubes plastiques contenant 0,3 ml de PBS,
- Microscope à épifluorescence équipé d'un objectif 95 x ou 100 x à immersion (en eau ou huile) et 2 oculaires de 10 x ou 12 x.

■ IV. PRÉLÈVEMENTS

- Au niveau de l'urètre, les prélèvements sont effectués à l'aide d'un écouvillon coton à manche souple en aluminium ou à l'aide de bactopick. Il est inséré à travers l'orifice méatique, à 2 ou 3 cm dans le canal urétral, et retiré lentement en lui imprimant un mouvement de rotation.
- Au niveau du col, un bactopick rigide est inséré dans l'orifice externe du col ; après avoir pris soin d'éliminer la glaire cervicale, il est laissé en place une minute, en lui imprimant un mouvement de rotation.

■ V. CONFECTION DES FROTTIS

Dans les deux cas, les écouvillons sont :

- soit appliqués sur la surface des lames de verre bien dégraissées (alcool, éther), essuyées et propres (Kleenex). Un mouvement de rotation appuyé est alors imprimé à l'écouvillon dans une alvéole de la lame ;
- soit placés dans un tube contenant 0,1 ml de PBS, agité et exprimé sur les parois du tube, à l'aide d'une pince, en lui imprimant un mouvement de rotation appuyé, de façon à ce que la totalité de son contenu soit déchargée dans le PBS.

A l'aide d'une micropipette, 10 µl sont déposés dans l'alvéole d'une lame.

Après séchage (hotte à flux laminaire, étuve, séchoir) les lames sont fixées dans l'acétone à + 4 °C pendant 10 minutes, puis séchées dans un courant d'air froid.

VI. LA REACTION

- Déposer sur chaque alvéole à colorer 30 mcl ou 20 mcl du réactif conjugué.
- Laisser 30 ou 20 minutes à température ambiante mais en chambre humide pour éviter toute dessiccation.
- Chasser le réactif avec un jet de pissette contenant du PBS, pendant quelques secondes.
- Monter la lame encore humide avec une lamelle et une goutte de liquide de montage.
- Observer au microscope à fluorescence, d'abord à un grossissement de 500. Si des points brillants sont observés, passer au grossissement 950 ou 1 000 avec l'objectif à immersion.

Les particules chlamydiennes sont de petits éléments sphériques fluorescents, de taille variable (0,2 à 0,8 micron), isolés ou associés par 3 à 8 éléments, colorés en « en vert pomme » . La répartition doit être homogène, identique à celle observée par la lame témoin positif. (**Photos 40 et 41**)

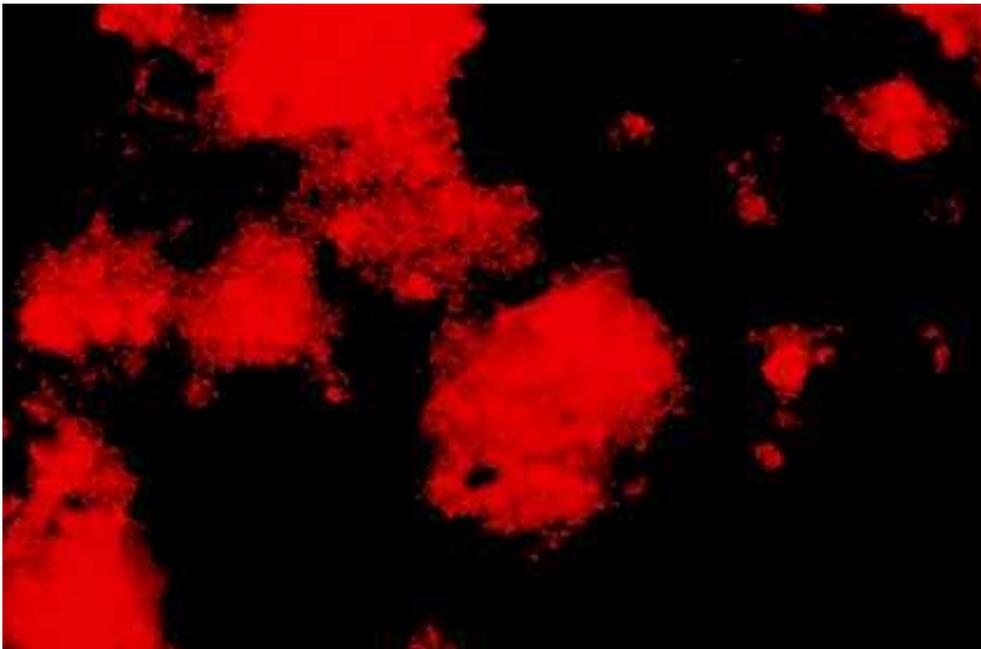


Photo 40 : Etalement coloré avec un monoclonal conjugué au FITC ne montrant pas de particules fluorescentes.

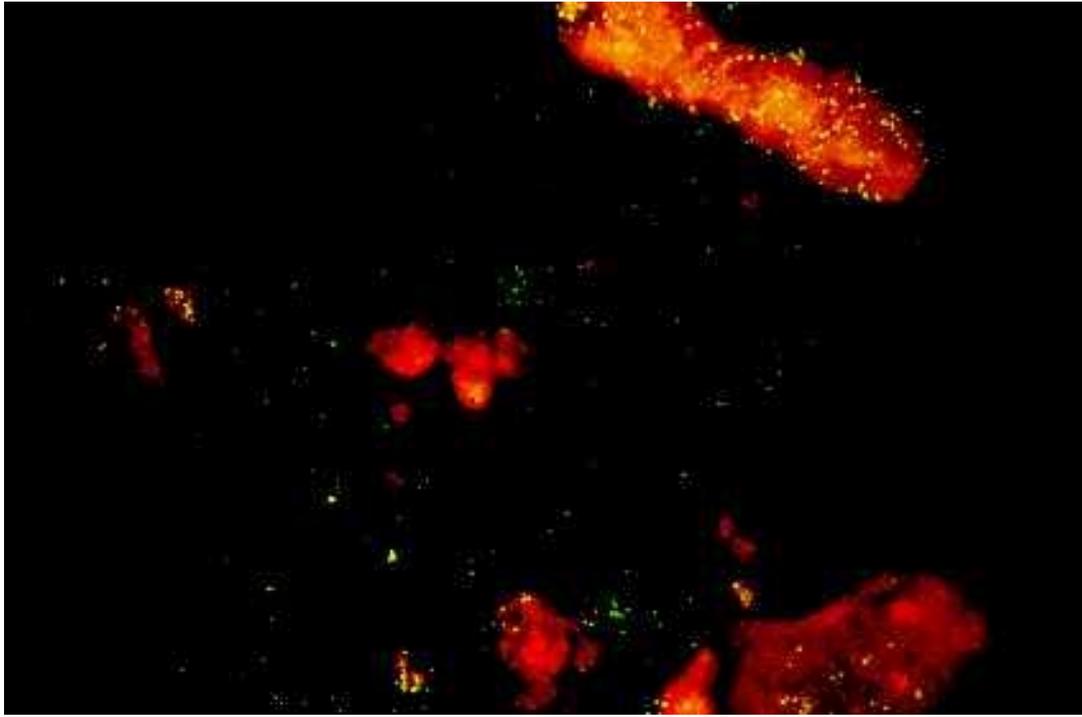


Photo 41 : Étalement positif pour CT (IF directe).

Dans chaque série de coloration, il est nécessaire de colorer une lame témoin positif et une lame témoin négatif. (Elles sont commercialisées également par la même firme et une fois colorées, elles peuvent conserver leur fluorescence, dans le liquide de montage, lorsqu'elles sont conservées à + 4 °C et à l'obscurité.)

■ VII. QUELQUES CONSEILS

- Eviter toujours de lire plus de 5 lames à la suite, sans observer les témoins (toutes les 3 lames).
- Si un doute persiste, ne pas hésiter à observer les témoins pour comparer la morphologie des particules, à la fluorescence observée.
- Vérifier toujours la proximité d'amas cellulaires ou de cellules isolées près des zones contenant les particules fluorescentes.
- Se méfier toujours d'une trop grande richesse en particules, surtout si elles sont réparties de façon hétérogène.
- Une dessiccation partielle du réactif en périphérie peut donner l'illusion d'une positivité liée à la précipitation du conjugué. Dans ce cas, les particules sont de taille très irrégulière et le nombre diminue vers le centre du frottis.
- Ne pas hésiter à faire contrôler un examen « douteux » ou à conseiller une recherche par culture.

FICHE TECHNIQUE N° 2

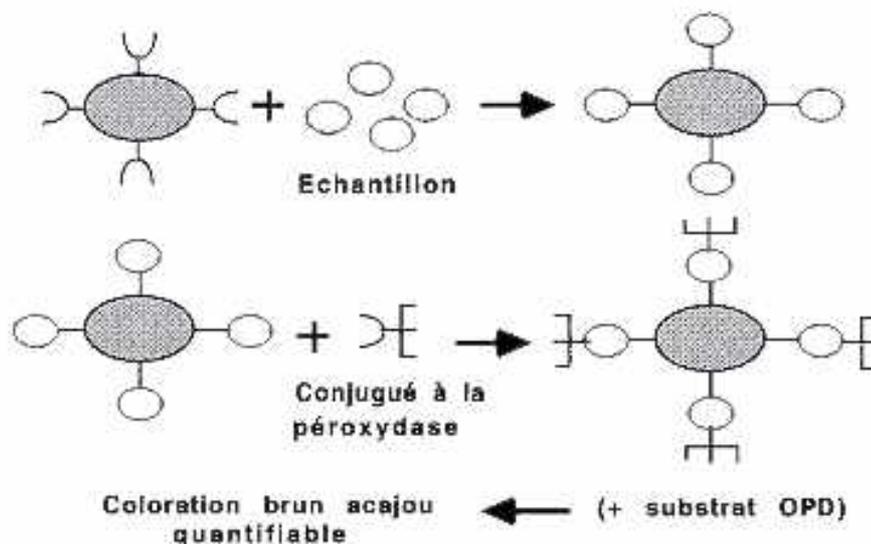
DETECTION DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS DANS LES PRODUITS PATHOLOGIQUES PAR UNE METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE

I. PRINCIPE

La réaction de détection est basée sur le fait que des anticorps anti-Chlamydiae, fixés sur des billes de polystyrène, sont aptes à fixer des substances spécifiques extraites des particules Chlamydiennes. Le complexe ainsi formé est secondairement révélé par un anticorps anti-Chlamydiae conjugué à la Péroxydase du raifort. L'orthophénylène diamine (OPD) réagit avec l'enzyme fixé et donne, en présence de H_2O_2 , une réaction colorée d'autant plus intense que la quantité de conjugué fixé est plus grande ce qui, en fait, est fonction de la concentration d'antigène extraite de l'échantillon.

Exemple : Chlamydiazyme Abbot.

II. SCHEMA DE LA RÉACTION



III. MATERIEL ET REACTIFS (Exemple)

- Trousse « Chlamydiazyme » Abbot.
- Réactif OPD (Abbot) – H₂ SO₄/N.
- Micropipettes réglables de 50 à 200 mcl.
- Pinces métalliques recouvertes aux extrémités de manchons en plastique.
- Micropipettes réglées à 1 000 ml.
- Cônes en plastique à usage. unique, adaptés aux micropipettes.
- Pentawash II (Abbot) avec système de pompe et d'alimentation du liquide de lavage.
- Lecteur quantum (Abbot).
- Bain Marie.
- Tubes à essai, portoirs, Vortex ou Whirlimixer.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

IV. PRELEVEMENTS

Utiliser les écouvillons fournis par la firme (STD, Sample Collection and Transport - Kits).

- Au niveau de l'urètre, les prélèvements sont effectués à l'aide d'un écouvillon coton à manche souple en aluminium. L'écouvillon est inséré à travers l'orifice méatique, à 2 ou 3 cm dans le canal urétral, et retiré lentement en lui imprimant un mouvement de rotation.
- Au niveau du col, un écouvillon de coton à manche de bois, rigide, est inséré dans l'orifice externe du col, après avoir pris soin d'éliminer la glaire cervicale. Il est laissé en place une minute, en lui imprimant un mouvement de rotation.

Plonger, ensuite, les écouvillons dans les tubes de « transport » qui contiennent 0,1 ml de solution de conservation.

* Les billes traitées sont incubées avec les échantillons dilués dans le diluant, en même temps que les témoins appropriés contenus dans la trousse. L'échantillon conserve sa réactivité 3 jours au moins et 5 jours au plus.

■ V. MODE OPERATOIRE

- 1 - Reprendre les échantillons par 1 ml de liquide de dilution.
- 2 - Reprendre 200 mcl des contrôles (1 positif et 3 négatifs) par 1 ml du même liquide.
- 3 - Agiter les tubes au Vortex, 3 fois 15 secondes.
- 4 - Exprimer l'écouvillon sur la paroi du tube pour en extraire tous les éléments cellulaires.
- 5 - Répartir dans les plaques autant de billes qu'il y a d'échantillons ainsi que les 4 contrôles.
- 6 - Recouvrir la plaque d'un papier adhésif et incuber 2 heures à 37° C.
- 7 - Laver 4 fois les billes avec le Pentawash.
- 8 - Rajouter 200 mcl d'anticorps anti-Chlamydiae et recouvrir d'une feuille de papier adhésif.
- 9 - Incuber 1 heure à 37° C.
- 10 - Laver comme en 7.
- 11 - Rajouter 200 mcl de conjugué dans chaque puits et recouvrir d'une feuille de papier adhésif.
- 12 - Incuber 1 heure à 37° C.
- 13 - Laver comme pour les étapes 7 et 10.
- 14 - Transférer les billes dans les tubes à essai, portant les références des échantillons et des témoins.
- 15 - Ajouter 300 mcl de substrat et incuber 30 minutes à la température du laboratoire.
- 16 - Ajouter 1 ml d'H₂SO₄/N.
- 17 - Lire en DO à 492 nm au spectrophotomètre ou au Quantum. Faire le zéro avec un blanc substrat. Lire les contrôles négatifs, le contrôle positif et les échantillons.



Photo 42 : Détection de particules chlamydiennes Immunoenzymologiques, (Chlamydiazyme) ; de gauche à droite : échantillon positif, témoin positif, témoin négatif.

La valeur seuil est donnée par la lecture des négatifs.

Le positif doit montrer un $DO \geq 1\ 000$.

La sensibilité de la méthode est supérieure à 80 %.

La spécificité dépasse 95 %, ce qui en fait un test reproductible et intéressant, lorsque la culture n'est pas possible.

Dans tous les cas d'une notion à haut risque d'infection à Chlamydia (consultation M.S.T. ou partenaire de patient ayant une infection à Chlamydia), conseiller toujours une culture si le Chlamydiazyme est négatif.

Le test E.I.A., s'applique uniquement aux prélèvements urétraux et/ou cervicaux.

Un test positif implique la présence de l'antigène chlamydien mais ne permet pas d'opiner sur l'évolutivité de l'infection, Seule la culture demeure, dans ce cas, la réaction de référence qui montre l'infectivité de l'échantillon.

FICHE TECHNIQUE N° 3

ISOLEMENT DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS SUR MONOCOUCHE CELLULAIRE

I. PRINCIPE

Technique bactériologique en tubes individuels.

Chlamydia trachomatis est une bactérie parasite intracellulaire obligatoire. Les cellules infectées montrent une inclusion intracytoplasmique, caractéristique qui permet le diagnostic.

Cependant, cette image manque souvent dans les produits pathologiques (examen direct) car les cellules lésées libèrent facilement le contenu de l'inclusion sous forme de particules rondes libres dont la petite taille ne permet pas de les reconnaître avec une simple coloration.

Cependant, l'inclusion pathognomonique peut être reproduite *in vitro* sur des cellules réceptrices, cultivées en monocouche sur une lamelle de verre contenue dans un tube à fond plat. Une technique adéquate permet d'infecter plusieurs cellules en même temps. Les inclusions sont alors révélées par une méthode de coloration, après 48 heures ou 72 heures d'incubation.

II. LE MILIEU DE CONSERVATION

C'est un milieu stérile tamponné composé de 0,2 M de saccharose ; 0,02 M de $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$; 5 % de sérum de veau fœtal ; 20 mg/1 de gentamycine ; 100 mg/1 de vancomycine, 2,5 mg/1 de fungizone et du rouge de phénol (BIO-DIAGNOSTIC).

Un millilitre de milieu est réparti en tubes plastique. Dès que l'échantillon est placé dans le tube, il conserve son pouvoir infectant 24 heures à + 4 °C et plusieurs mois à - 80 °C.

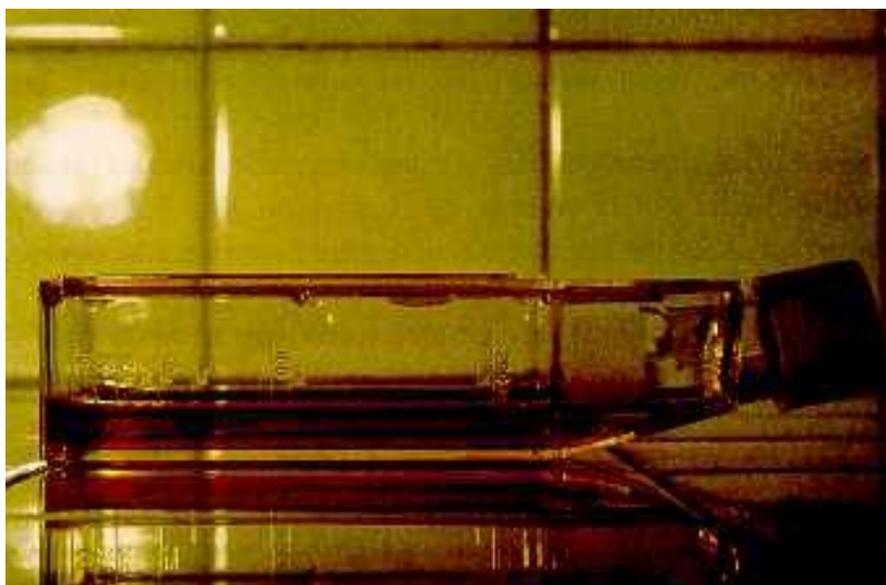
III. LES CELLULES UTILISEES

Les lignées cellulaires qui conviennent à l'isolement sont des lignées :

- Mc Coy,
- L929,
- HeLa 229,
- BHK 21,
- HEP2.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

Les cellules sont entretenues dans un flacon type Falcon de 75 cm² ou 25 cm², contenant le milieu de croissance*, jusqu'à obtention, sur la paroi, d'une couche cellulaire uniforme observée au microscope inversé. (**Photo 43**)



***Photo 43** : Flacon de 75 cm² contenant la couche cellulaire.
et observé au microscope inversé.*

* Il s'agit du milieu MEM à base de sels de Earle, auquel sont ajoutés 2 mM/ml de glutamine, 10 % de sérum de veau foetal, 20 mg/l de gentamycine, 0,5 % de glucose et du CO₃HNa pour ramener le pH à 7,5.

Lorsque la couche est homogène, les cellules sont « décollées » par une protéase (trypsine ou trypsine EDTA) de la manière suivante :

- Aspirer le milieu de culture.
- Laver la couche cellulaire avec une solution de Earle ou Hanks ou PBS (sans Ca ni Mg) pH 7,4 - 7,6 :
 - 10 ml pour un flacon de 75 cm²
 - 5 ml pour un flacon de 25 cm²
- Ajouter la solution de trypsine à 0,25 % environ (commercialisée à 2,5 %) :
 - 5 ml pour un grand flacon
 - 1 ml pour un petit flacon
- Laisser agir 1 à 2 minutes pour les cellules Mc Coy.
5 à 10 minutes pour les cellules HeLa.
- Décanter la solution de trypsine.

Dès que la couche cellulaire se décolle (si besoin est, tapoter manuellement contre les parois du flacon), reprendre les cellules en milieu de croissance.

- 10 ml pour un grand flacon*
- 5 ml pour un petit flacon*

*La suspension cellulaire est ajustée à 200 000 cellules/ml (s'aider d'une cellule de Malassez ou de Thoma ou d'une chambre de comptage à usage unique) et répartir à raison de 1 ml par tube à fond plat (Bijoux Gibco) ou par puits (plaques type Costar 24) pourvus d'une lamelle de verre circulaire de 14 mm de diamètre. **(Photo 45)**

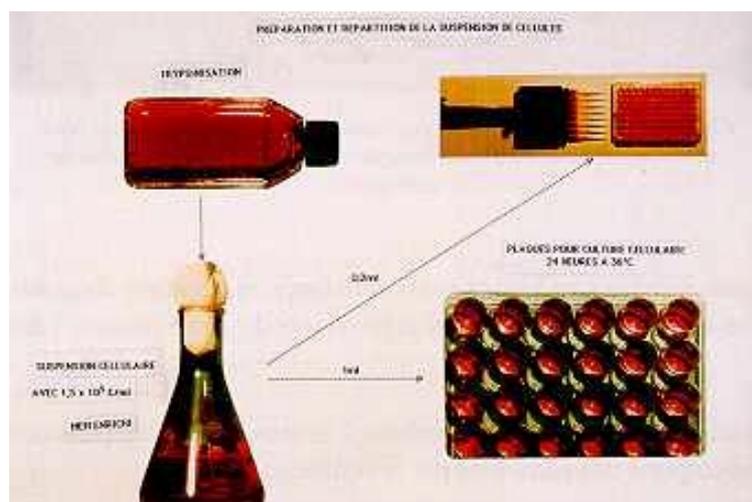


Photo 45 : Autres récipients utilisés pour la culture cellulaire en vue de l'isolement de CT.

La suspension répartie est incubée à 36 °C en présence de 5 % deCO₂ pendant 24 heures. Un passage sur un nouveau flacon sera effectué à partir de la solution mère, ajusté à une concentration de façon à obtenir une couche uniforme dans les temps voulus.

IV. INOCULATION DES ECHANTILLONS

Les échantillons conservés à - 80 °C ont été prélevés sur un milieu tamponné hypersaccharosé (2SP). Si l'échantillon peut être inoculé immédiatement, on peut se contenter du milieu de culture cellulaire pour le recueil. Dans ce cas, la conservation de l'échantillon à + 4 °C suffit à condition de ne pas dépasser 24 heures. (**Photo 44**)

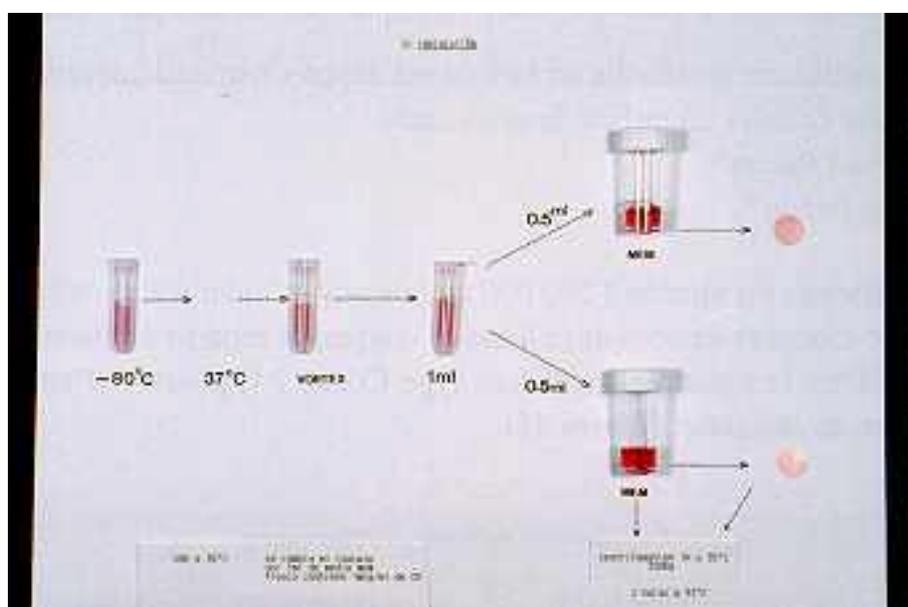


Photo 44 : Milieu de transport contenant l'échantillon inoculé sur tube individuel contenant une lamelle (à droite) où s'est déposée la couche cellulaire.

Les échantillons homogénéisés au Vortex sont centrifugés en quantités aliquotes sur les lamelles contenant la couche cellulaire (2 lamelles par prélèvement de 1 ml) pendant 1 heure à 2 500 t/mn à 35 °C.

Après la centrifugation, les cellules sont incubées 2 heures à 36 °C en présence de 5 % deCO₂ pour permettre l'absorption des particules par la cellule.

Ensuite, le milieu est retiré et remplacé par du milieu neuf complet, contenant une concentration de cycloheximide à 0,5 ou 1 mcg/ml, selon la lignée cellulaire utilisée. Les tubes ou les plaques sont alors incubées 48 heures ou 72 heures dans les mêmes

conditions. Une lamelle est alors colorée par l'une des techniques proposées (voir fiches techniques de coloration en annexe).

La présence des inclusions cytoplasmiques caractéristiques et pathognomoniques de l'infection à *Chlamydia* s'effectuera en microscopie optique ordinaire, d'abord au faible grossissement, puis au fort grossissement à l'immersion.

■ V. CONTROLE DES RESULTATS

Dans chaque série, il faut prévoir 2 témoins :

- le témoin positif est réalisé en inoculant 2 tubes ou 2 puits (plaques) avec une souche positive connue (souche de référence),
- le témoin négatif correspond à une ou deux souches cellulaires non inoculées.

Les témoins positifs doivent montrer 4 ou 5 inclusions par champ microscopique. Un titrage préalable permet de définir la dilution qu'il faut réaliser pour la souche témoin qui sera conservée en aliquotes dans le 2SP conservé à - 80 °C.

FICHE TECHNIQUE N° 4

MICROMETHODE D'ISOLEMENT EN MONOCOUCHE CELLULAIRE

Cette technique permet de s'adapter à un grand nombre de prélèvements (> ou = à 30 prélèvements). Couplée à des techniques de révélation de type immunologique, elle s'est avérée une méthode sensible, spécifique, rapide et relativement peu onéreuse.

I. MATERIEL NECESSAIRE ET RÉACTIFS (pour 30 prélèvements)

- Microtubes plastiques contenant 1 ml de 2SP (BIO-DIAGNOSTIC).
- Portoirs.
Ces portoirs supportent 96 microtubes et reproduisent le schéma des plaques de microtitration.
- 1 cellule de Malassez avec lamelle de montage ou des lames pour dénombrement à usage unique.
- 2 plaques de microtitration, à fond plat, traitées pour culture de tissus (Nunc 96) stériles.
- Milieu MEM/sels de Earle contenant 0,5 % de glucose, 2 mM de glutamine, 10 % de sérum de veau foetal, 0,5 mg/l de cycloheximide, 20 mg/l de gentamycine.
- 1 flacon de 25 cm² de cellules Hep 2 formant monocouche.
- 1 solution de trypsine à 2,5 % en PBS.
- 1 solution de Earle.
- 1 centrifugeuse thermostatée, équipée de nacelles pour microplaques.
- 1 congélateur à - 80 °C ou un système de conservation à azote liquide.
- 1 microscope inversé équipé d'un système d'épifluorescence avec objectif 10 x et oculaire 10 x.
- Feuilles de papier filtre ou Kleenex.
- Anticorps monoclonal conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (Ortho, Biosys, Argène, Biotrol, etc)
- 1 agitateur « Multi Tube Vortexer SMI ».
- 1 micropipette à 12 canaux, réglable de 50 à 200 mcl et des cônes stériles qui s'y adaptent.

II. MODE OPERATOIRE

A - La veille du jour prévu pour l'inoculation, les cellules Hep 2 obtenues en monocouche confluente sont séparées avec la solution de trypsine à 0,25 % dans la solution de Earle légèrement alcaline (pH = 8) puis diluées dans du MEM sans cycloheximide. La suspension est ajustée à 300 000 cellules/ml à l'aide de la cellule de Malassez, 200 µl sont distribués dans les puits des deux plaques (20 µl de suspension) en évitant le périmètre extérieur (seulement 60 puits seront ainsi distribués).

B - Les plaques sont incubées à 36 °C + CO₂ (5 %) jusqu'au lendemain.
(Photo 46 et 46 bis)

Photos 46 et 46 bis : Monocouche cellulaire (Hep2) obtenue en microplaques (96 puits).

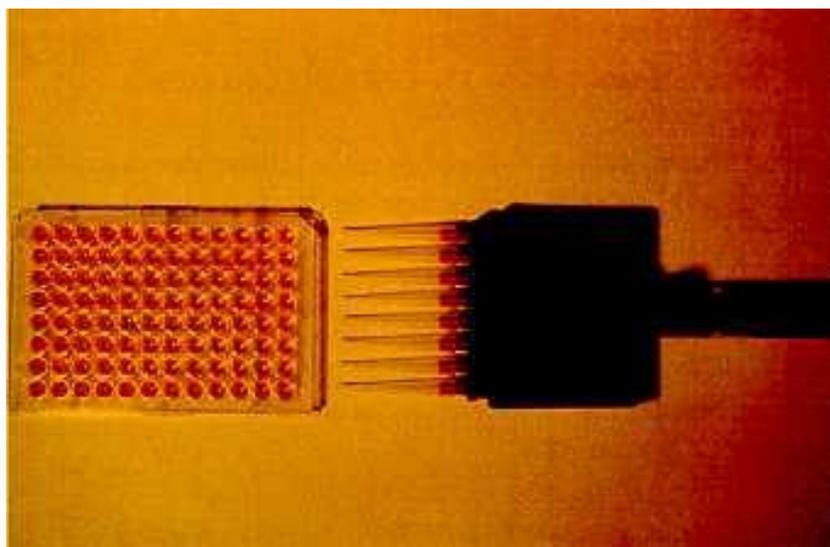
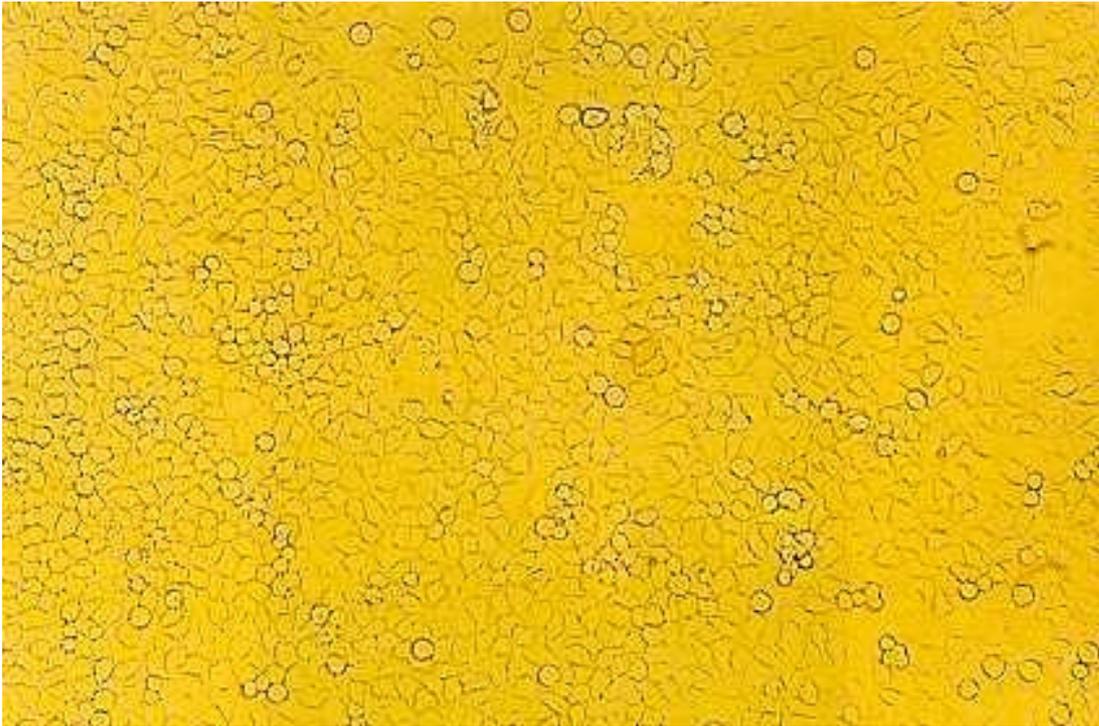


Photo 46



Photos 46 bis

C - Les échantillons sont alors brutalement décongelés au bain Marie à 37 °C. Le portoir est agité durant 15 secondes dans le multitube Vortexer pour bien homogénéiser le prélèvement. (**Photo 47**)



*Photo 47 : Echantillons en 2SP décongelés
brutalement et vortexés pour homogénéiser les
particules.*

A l'aide de la pipette Titertek distribuer 100 mcl de chaque échantillon (10 échantillons peuvent être distribués à la fois) dans deux rangées de chaque plaque.

Exemple : Les échantillons 1 et 2 sont prélevés et 100 mcl sont distribués dans les rangées A et B de chaque plaque. Dans ces conditions, chaque prélèvement est répété 4 fois et ainsi chaque plaque reçoit 30 prélèvements en double exemplaire.

D - Centrifuger les plaques 1 heure à 2 000 t/mn à 25 °C. Pour éviter toute contamination, il est préférable d'envelopper les plaques dans du papier aluminium pour le temps de centrifugation.

E - Incuber les plaques 2 heures à 36 °C sous CO₂.

F - Rejeter le milieu en retournant brutalement la plaque sur un cristalliseur, puis sur plusieurs épaisseurs de papier filtre. Recouvrir alors la couche cellulaire avec 200 mcl de milieu complet. Incuber les plaques pendant 48 heures à 36 °C sous 5 % de CO₂.

■ III. REVELATION DES INCLUSIONS ET LECTURE DES PLAQUES

A - Après 48 heures d'incubation, une des deux plaques est sortie. Le milieu est retiré par retournement brutal sur un cristalliseur suivi de plusieurs tapotements sur des feuilles de papier filtre ou de Kleenex.

B - 100 mcl du mélange acétone 9 volumes eau distillée 1 volume et conservé à - 20 °C, sont distribués dans chaque puits, pour fixer la couche cellulaire, pendant 10 minutes à - 20 °C.

C - Les puits sont lavés 2 fois avec du tampon Phosphate pour immunofluorescence.

D - 30 mcl du réactif monoclonal conjugué sont distribués dans chaque puits et laissés en contact 20 minutes avec la couche cellulaire fixée.

E - Recommencer les lavages comme en C et rincer une fois à l'eau distillée, pour éliminer toute trace de tampon qui pourrait cristalliser et gêner la lecture au microscope.

F - Observer les plaques au microscope inversé en fluorescence. La présence d'inclusions se révèle par la présence de masses fluorescentes bien limitées, observées au moins dans deux puits. **(Photo 48)**

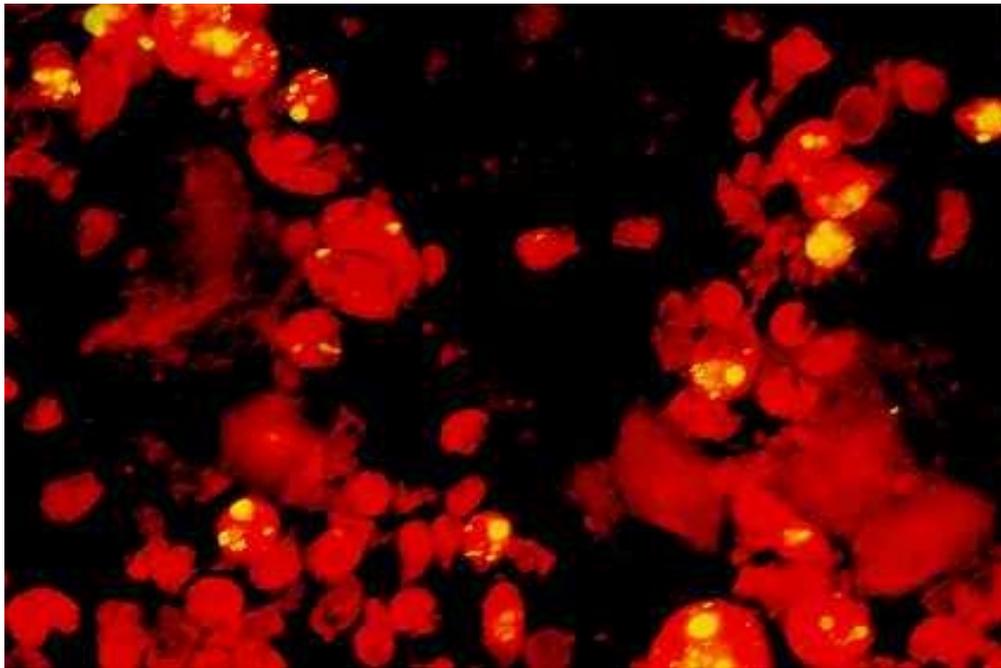


Photo 48 : Révélation des inclusions intra cytoplasmiques dans la monocouche cellulaire infectée.

■ IV. CONTRÔLE

Dans chaque série, il faut prévoir 2 témoins :

- Le témoin positif est réalisé en inoculant 2 tubes ou 2 puits (plaques) avec une souche positive connue (souche de référence) ;
- Le témoin négatif correspond à une ou deux couches cellulaires non inoculées.

Les témoins positifs doivent montrer 4 ou 5 inclusions par champ microscopique. Un titrage préalable permet de définir la dilution qu'il faut réaliser pour la souche témoin qui sera conservée en aliquotes dans 2SP conservé à -80°C .

En général, il faut compter 10 à 15 minutes d'observation pour une plaque entière. La position du puits lu est directement donnée par une réglette de positionnement située sur la platine du microscope.

Les échantillons trouvés positifs sont notés et les puits correspondants de la plaque, conservée à 36°C , sont grattés avec une pipette ou un manchon de caoutchouc stérile. Les

cellules sont recueillies dans 1 ml de 2SP et peuvent être conservées à - 80 °C comme témoin positif ou pour des examens complémentaires : typage, antibiogramme, repiquage.

Pour les puits trouvés négatifs, une nouvelle coloration doit être effectuée après 72 heures d'incubation, en procédant de la même manière.

L'utilisation d'un anticorps monoclonal valable rend cette technique fiable, tout en simplifiant les manipulations.

FICHE TECHNIQUE N° 5

DETECTION DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

I. TECHNIQUE D'HYBRIDATION

Exemple : PACE 2 : GEN-PROBE

Le principe repose sur l'utilisation d'une sonde à ADN marquée par une molécule d'ester d'acridinium, qui s'unit spécifiquement avec l'ARN ribosomal des chlamydiae, en formant un hybride stable qui peut être séparé des sondes libres par des billes magnétiques. Les sondes libres sont débarrassées de l'ester d'acridinium par hydrolyse sélective.

La lecture se fait automatiquement, en mesurant la luminescence naturelle de l'ester d'acridinium contenu dans les hybrides. **(Photos 49a et 49b)**

Photos 49a et 49b : Schémas de la technique d'hybridation PACE 2 (GEN-PROBE).

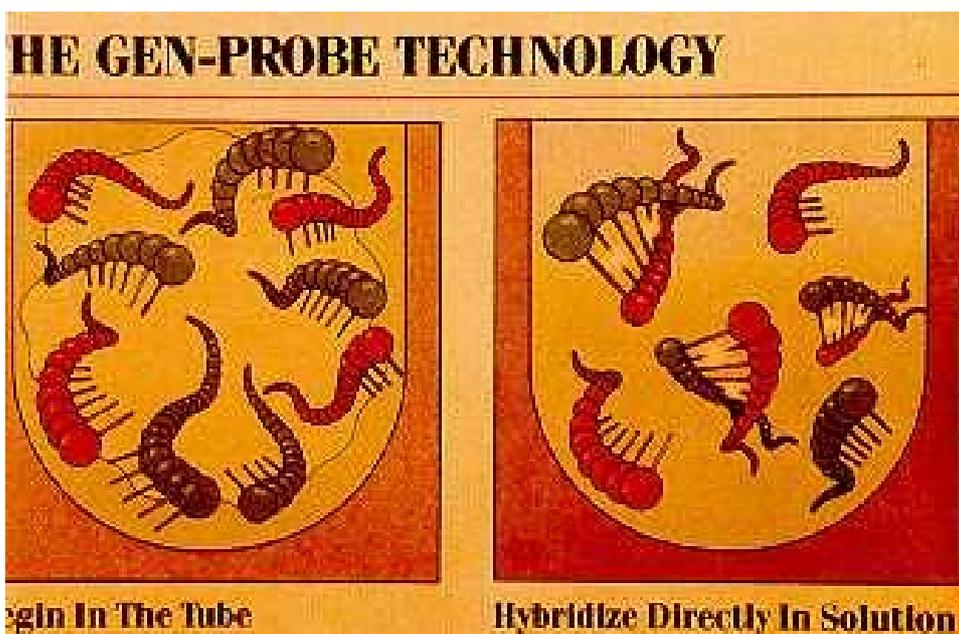


Photo 49a

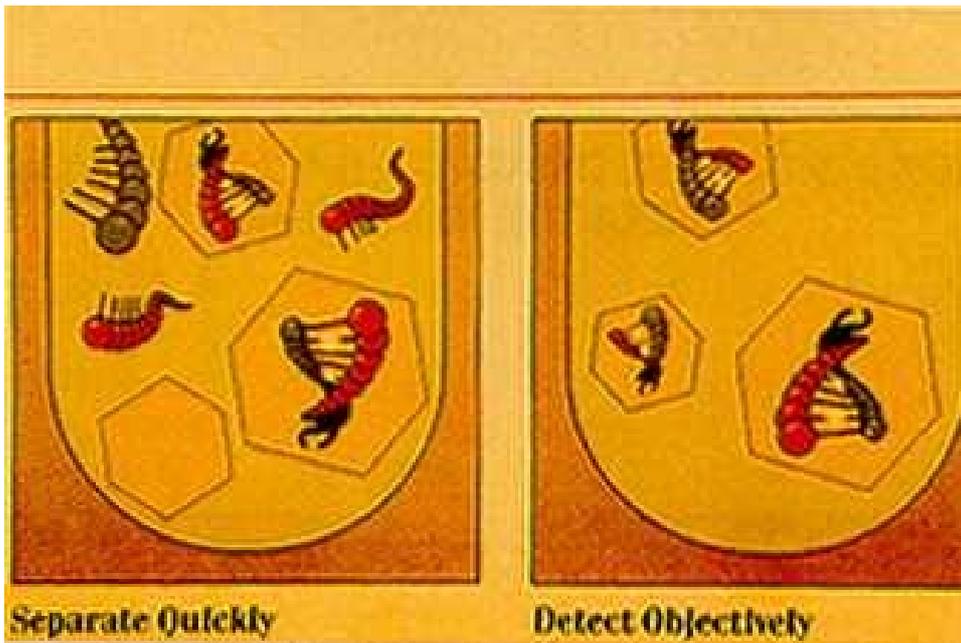


Photo 49b

I.1. Comment et où prélever :

Les échantillons sont obtenus par écouvillonnage des muqueuses génito-urinaires et/ou oculaires.

Les écouvillons utilisés à cet effet doivent être transportés dans le milieu prévu à cet effet. **(Photos 50a et 50b)**

Photos 50a et 50b : Matériel de prélèvement à utiliser pour les techniques d'hybridation (GEN-PROBE).

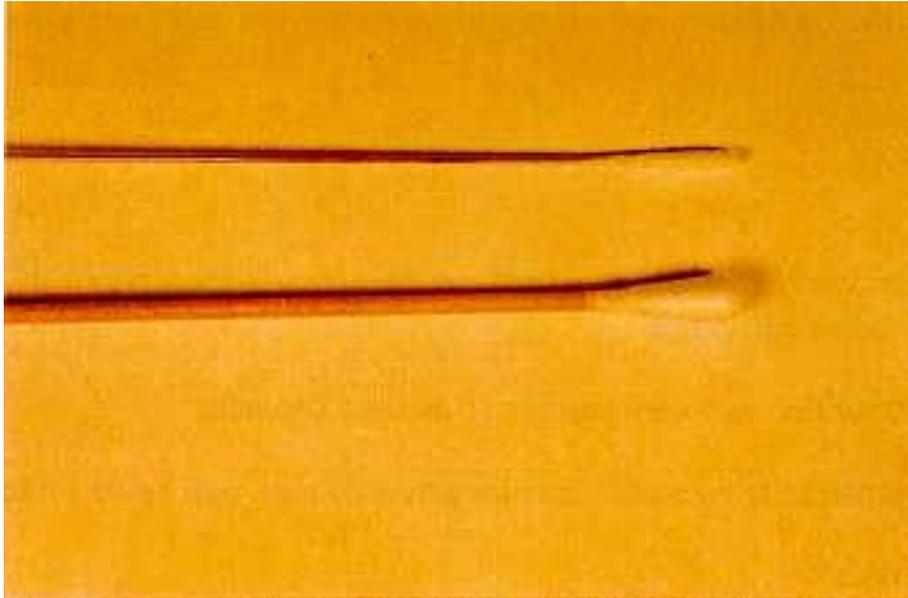


Photo 50a



Photo 50b

Pour les prélèvements urétraux il faut éviter d'uriner dans l'heure qui précède le recueil.

Pour les prélèvements cervicaux il est indispensable de bien nettoyer la glaire avec l'un des écouvillons que l'on jette, de façon à ce que le deuxième écouvillon vienne au contact direct de muqueuse de l'endocol.

Pour les prélèvements oculaires enfin, nettoyer le pus s'il y en a, puis gratter les paupières supérieure et inférieure de chaque œil, en commençant par le moins atteint.

Les tubes de transport contenant les échantillons peuvent rester sept jours entre 2 et 25 °C.

I.2. Protocole :

Si les prélèvements ont été conservés au froid, les ramener à la température du laboratoire avant de procéder à la réalisation du test.

Agiter chaque échantillon au vortex pendant au moins 5 secondes.

Exprimer l'écouvillon en le pressant contre les parois du tube, puis agiter à nouveau au vortex.

Préparer les réactifs :

- Vortexer le Tampon d'hybridation pendant 10 secondes et le réchauffer à 60 °C en retournant le tube pendant 3 à 4 minutes, vortexer à nouveau, pipetter 6 ml et les mettre dans le Réactif de Sonde lyophilisé. Laisser 2 mn à température ambiante et vortexer 10 secondes pour homogénéiser, puis noter la date de reconstitution.
- Noter le nombre d'échantillons afin de préparer la quantité de réactif nécessaire.
- Préparer le nombre de tubes correspondant au nombre d'échantillons, les numéroter, et prévoir 3 tubes supplémentaires pour les témoins négatifs et un tube pour le témoin positif. Mettre les tubes sur le portoir magnétique, vortexer chaque tube pendant 5 secondes.
- Distribuer dans chaque tube 100 µl de chaque échantillon ainsi que les témoins correspondants.
- Rajouter 100 µl du réactif sonde, au fond de chaque tube en prenant soin de ne pas toucher les parois du tube.
- Couvrir avec les cartes collantes en s'assurant de la parfaite obturation de chaque tube, secouer alors le portoir 3 à 5 fois pour bien mélanger.
- Incuber à 60 °C pendant une heure.
- Préparer le lecteur et s'assurer qu'il y a suffisamment de réactif de détection 1 et 2 pour compléter les tubes.
- Après le temps d'incubation écoulé, retirer le portoir du bain-marie, puis les cartes collantes, et distribuer dans chaque tube 1 ml de solution de séparation, puis bien mélanger.
- Couvrir à nouveau avec les cartes collantes, agiter et incuber au bain-marie à 60 °C pendant 10 minutes.
- Retirer les tubes et les cartes collantes, et les placer sur la base magnétique pendant 5 minutes, puis renverser en maintenant ensemble le portoir et sa base. Secouer 2 ou 3 fois et absorber sur une feuille de papier absorbant.

- Remplir chaque tube avec la solution de lavage, laisser agir 20 minutes et de la même façon éliminer l'eau de lavage, secouer alors les tubes pour remettre les particules en suspension.

- Sélectionner le protocole approprié sur l'appareil de lecture.
- Essuyer les bords de chaque tube et insérer dans le lecteur dans l'ordre : les trois négatifs, le positif, puis les échantillons dans l'ordre attribué.

I.3. Calcul des résultats

Les résultats sont calculés sur la différence existant entre la réponse des échantillons et la moyenne des trois références négatives. Ils sont exprimés en RLU (unités relatives de lumière). Le lecteur inscrit la réponse pour chaque échantillon en le comparant à un seuil déterminé qui détermine ainsi la positivité ou la négativité.

La valeur des témoins négatifs doit être inférieure à 200 RLU et supérieure à 20 RLU.

La valeur du témoin positif devra être supérieure ou égale à 600 RLU.

■ II. LES TECHNIQUES D'AMPLIFICATION

Le principe consiste à amplifier au préalable la cible à détecter, afin d'améliorer la performance du test, de le rendre plus sensible, tout en conservant une excellente spécificité.

Plusieurs méthodes d'amplification sont aujourd'hui disponibles et pour ne parler que des plus courantes nous citerons :

II.1. La PCR

Une séquence d'ADN contenue dans le plasmide cryptique des Chlamydiae est balisée par un couple d'amorces biotinylées complémentaires des régions proches de la séquence à amplifier. En présence de polymérase et de désoxynucléotides triphosphates, ces amorces vont s'étirer dans le sens 5'-3' en recopiant la région-cible et créer ainsi un « amplicon ».

En séparant les brins ainsi formés, les amorces sont libérées puis réutilisées pour former de nouveaux amplicons.

Il suffit de répéter ainsi les cycles une trentaine de fois pour obtenir une quantité substantielle de matériel. **(Photo 51)**

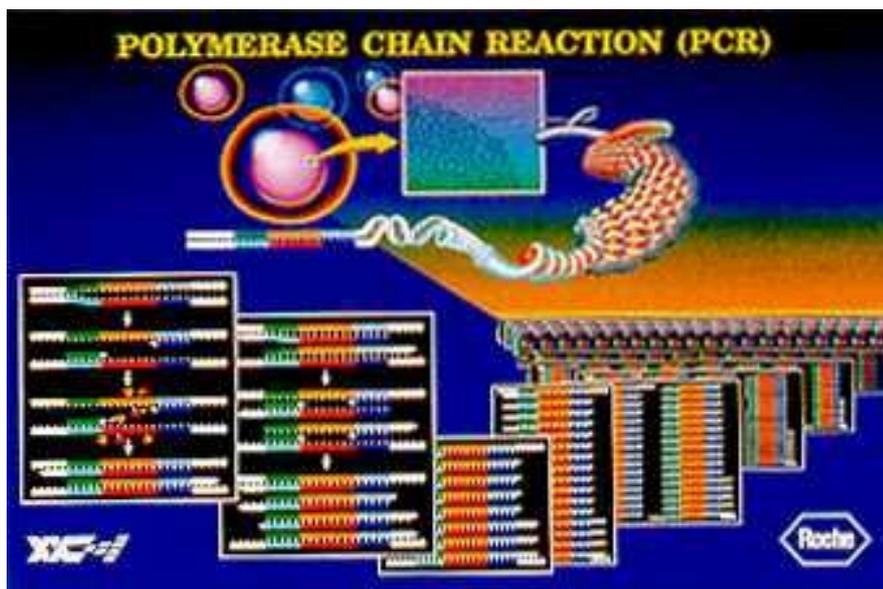


Photo 51 : Schéma montrant la chaîne d'amplification au cours de la PCR (Amplificor-Roche).

Des sondes oligonucléotidiques spécifiques des amplicons sont fixées sur des plaques, elles permettent ainsi la capture des amplicons produits au cours de l'amplification.

Un conjugué avidine-péroxydase se lie aux amplicons biotinylés, ils seront révélés par un substrat composé de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et d'une solution de tetraméthylbenzidine (TMB), en constituant un produit coloré dont l'intensité mesurable est d'autant plus intense que la quantité d'amplicons présente est plus grande,

La caractéristique du test commercialisé (Amplificor-Roche) réside dans l'utilisation de désoxyuridine à la place de la thymidine, si bien que les amplicons nouvellement formés contiennent tous de la désoxyuridine.

Une contamination éventuelle, se produisant au cours d'une manipulation, contient obligatoirement des nucléotides à base de désoxyuridine.

Le test utilise un enzyme, l'Ampérase qui contient de l'uracileNnglycosylase (UNG), capable d'entraîner la destruction d'un ADN préformé contenant la désoxyuracile. L'enzyme est lui-même dénaturé par une température supérieure à $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, ce qui l'empêchera de détruire les amplicons qui se formeront au cours du nouveau cycle.

Cette précaution évite bien des déboires, relativement fréquents dans le domaine de l'amplification utilisant l'hybridation DNA-DNA.

II.2. La TMA ou Transcription Médiated Amplification

Nous allons développer plus longuement cette technique puisqu'elle utilise le même lecteur que celui déjà décrit dans la technique de détection par hybridation (PACE 2, GEN-PROBE).

Cette réaction est basée sur la capacité de fixation de deux amorces oligonucléotidiques, sur des paires de bases complémentaires spécifiques.

Cette fixation se faisant en présence des différents nucléotides et d'agents liants, elle aboutit à une amplification des brins d'acide nucléique-cible, l'ARN ribosomal de chlamydia trachomatis, grâce à un intermédiaire de l'ADN fabriqué en présence de la Reverse Transcriptase contenue dans le mélange réactionnel, et de RNA polymérase. (Photos 52, 53 et 54)

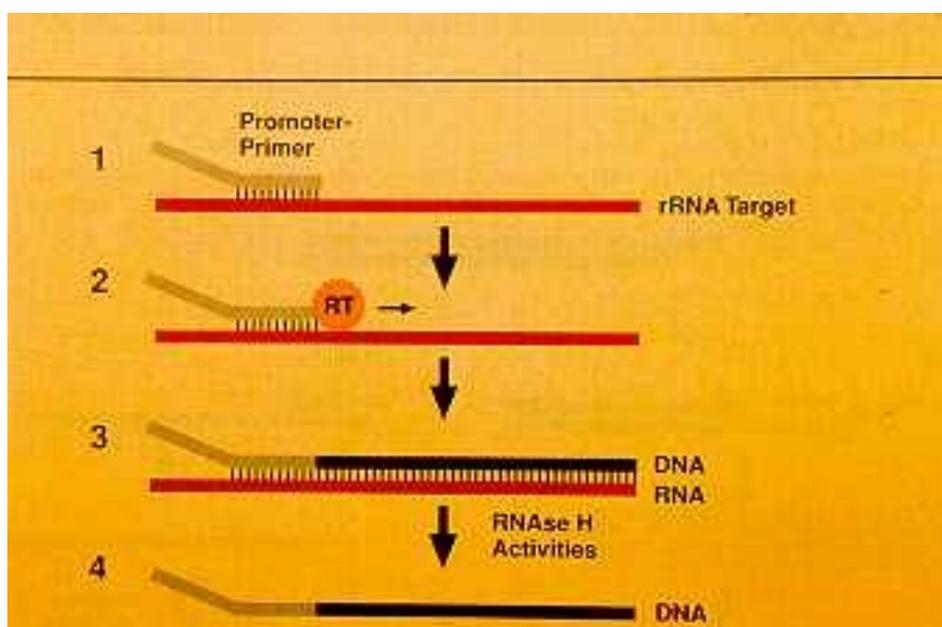


Photo 52 : Les trois premières séquences de l'amplification dans le processus TMA (Gen-Probe).

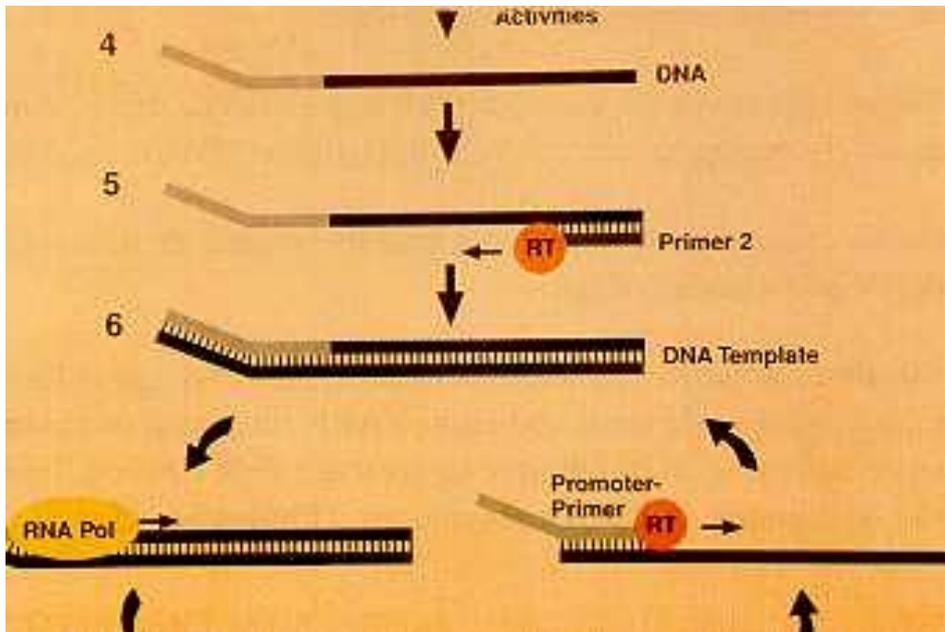


Photo 53 : Les séquences suivantes dans l'amplification TMA.

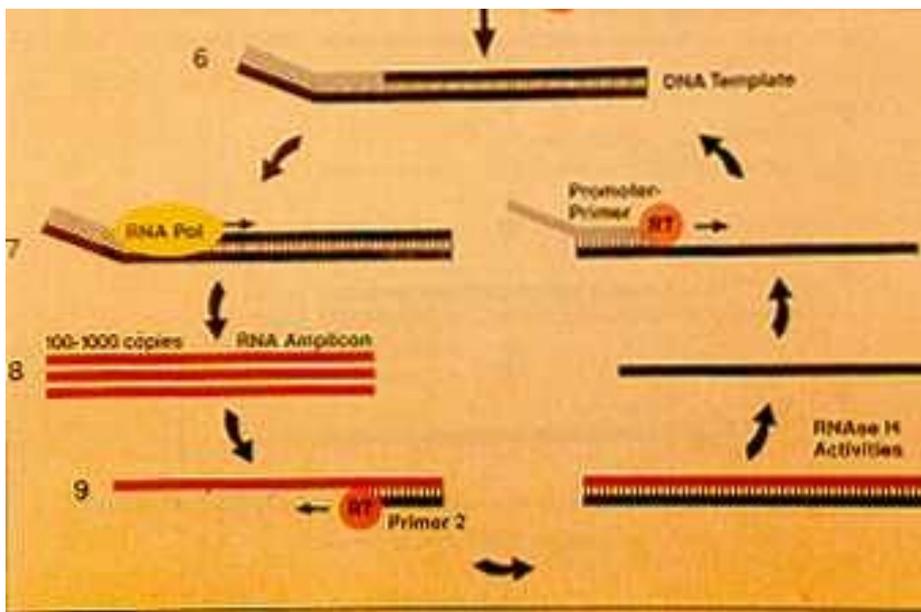


Photo 54 : Fin des séquences d'amplification au cours de la TMA.

Les séquences amplifiées (Amplicons) sont détectées par hybridation à l'aide de sondes d'ADN simple brin marqué avec un ester d'acridinium.

En présence d'eau oxygénée en milieu alcalin, il se produit une dégradation en N-méthyl-acridone activée qui libère des photons dont la quantité est proportionnelle au nombre d'hybrides formés. **(Photos 55a et 55b)**

Photos 55a et 55b : Principe de l'activation de l'ester d'acridinium, et production de photons dans les processus d'hybridation et d'amplification (Gen-Probe).

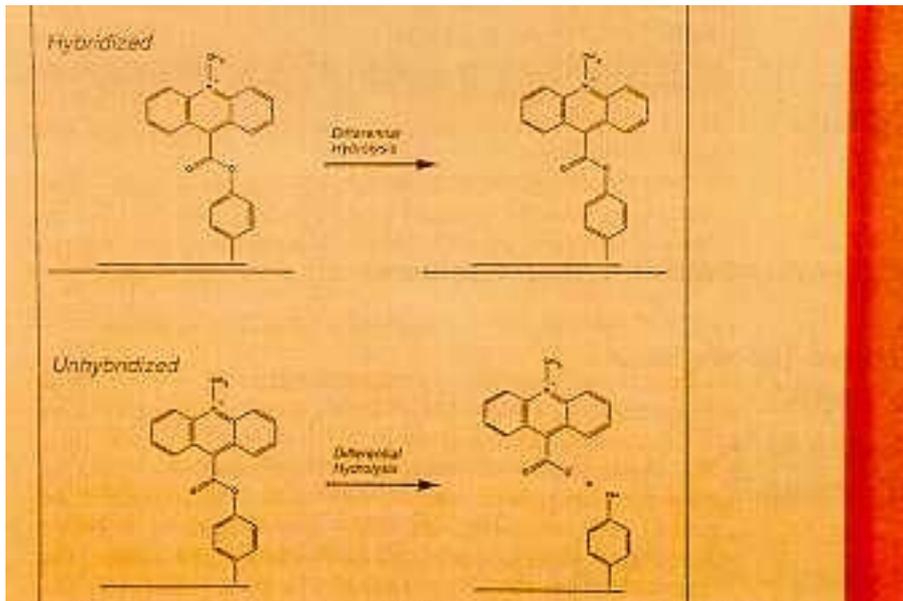


Photo 55a

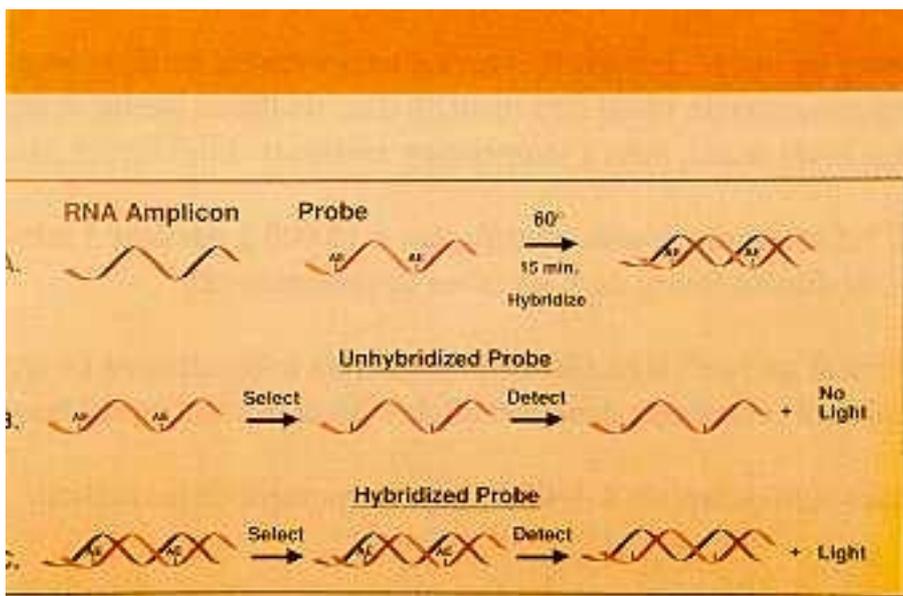


Photo 55b

La quantité de lumière émise au cours de la réaction chimique est mesurée dans un photoluminomètre.

La présence ou l'absence, dans l'échantillon, de l'acide nucléique-cible est calculée automatiquement par rapport à la valeur seuil, donnée par les témoins.

II.2.1 Recueil et conservation des échantillons

La recherche de *Chlamydia trachomatis* peut être effectuée dans tous les échantillons : **urètre, col, urines, sperme, liquides de ponction, biopsies...**

Ils seront transportés au laboratoire et conservés au réfrigérateur jusqu'au moment de l'analyse, réalisée dans les sept jours.

II.2.2 Préparation du matériel et des échantillons

La réaction proprement dite nécessite :

- **Un bain-marie à 95 °C**
- **Un bloc chauffant à 42 °C**
- **Un bloc chauffant à 60 °C.**

Les réactifs sont conservés entre 2 °C et 8 °C.

Les mêmes précautions que celles déjà décrites devront être prises à propos du recueil des échantillons génitaux, au niveau du col et de l'urètre.

- En ce qui concerne les urines, le patient évitera d'uriner durant les deux heures qui précèdent le prélèvement. Un minimum de 10 ml sera recueilli dans un flacon stérile, et transporté au laboratoire dans les plus brefs délais, mais à température ambiante. Elles seront stockées à 4 °C.

Avant la réaction, 1,5 ml d'urines sont centrifugées à 15 000 g pendant 5 minutes, le culot est repris par 200 µl de diluant fourni dans les tubes de prélèvement.

- En ce qui concerne le sperme : la totalité de l'éjaculat est collectée dans un récipient, et après liquéfaction, 0,1 ml sont centrifugés dans 200 µl de PBS et le culot repris dans le diluant.

Tous les échantillons sont conservés à + 4 °C jusqu'au moment de la réaction.

II.2.3 La réaction

Chaque série de réactions doit comporter des contrôles d'amplification (positif et négatif), préparés en ajoutant 20 µl de chaque contrôle à 400 µl de tampon de dilution.

- Reconstituer le réactif enzymatique lyophilisé avec 1,5 ml de tampon de dilution de l'enzyme, agiter et attendre 5 minutes avant de l'utiliser.
- Vortexer les échantillons et transférer 50 µl à travers la couche d'huile dans les tubes de réaction préparés à cet effet.

- Recouvrir les tubes avec une carte collante en s'assurant de la parfaite obturation, puis placer les tubes dans le bloc chauffant à 95 °C pendant 10 minutes.
- Transférer les tubes dans un bloc chauffant à 42 °C pendant 5 minutes, puis retirer doucement la carte collante et ajouter 25 mcl de réactif enzymatique dans chaque tube. Eviter les éclaboussures.
- Placer une nouvelle carte collante, vérifier que tous les réactifs sont bien sous la couche d'huile et replacer à 42 °C pendant 60 minutes.
- Sans retirer le portoir du bloc chauffant, retirer la carte collante, ajouter 20 mcl du réactif d'arrêt dans chaque tube. Retirer le portoir du bloc quelques instants puis le replacer à 42 °C pendant 10 minutes.
- Pendant ce temps d'incubation vortexer et chauffer le tampon d'hybridation 3 ou 4 minutes. Pipetter 6 ml de tampon d'hybridation (sonde lyophilisée), attendre 2 minutes et vortexer puis chauffer 2 minutes à 60 °C.
- Retirer doucement la carte collante, et ajouter 100 mcl de réactif sonde dans chaque tube, puis couvrir avec une nouvelle carte collante, mélanger et porter sur le bloc chauffant à 60 °C pendant 15 minutes.
- Retirer le portoir et la carte collante puis ajouter 300 mcl de réactif de sélection dans chaque tube, couvrir, agiter et replacer 10 minutes à 60 °C.
- Sortir les tubes, laisser refroidir et lire au photoluminomètre avec le protocole approprié.
- Le seuil doit être supérieur ou égal à 50 000 RLU.
- Le contrôle négatif < 12 500 RLU.
- Le contrôle positif > à 750 000 RLU.

REMARQUES

L'amplification, l'hybridation et la sélection sont dépendantes de la température et du temps, il est donc impératif de veiller à ce que les blocs chauffants soient bien aux températures désirées : 95 °C, 60 °C et 42 °C ; et de veiller à ne pas dépasser 120 minutes.

Par ailleurs il faut prendre un soin tout particulier à l'agitation des tubes avant les différentes incubations, une mauvaise homogénéisation peut entraîner des résultats aberrants ou ininterprétables.

Le fait d'utiliser une sonde DNA simple brin complémentaire du RNA ribosomal, entraîne au départ une plus grande quantité de cibles puisqu'en présence de Chlamydiae le RNA est présent à plusieurs milliers de copies. Cela est particulièrement intéressant lorsque le nombre de bactéries est peu important au départ.

Les amplicons du fait de leur composition (RNA) sont beaucoup plus fragiles dans le milieu extérieur et donc les risques d'une contamination du milieu ambiant par les amplicons sont moindres. Ce risque est d'autant plus réduit par l'utilisation de tubes individuels.

Enfin la réalisation de la réaction est d'une grande simplicité puisqu'elle ne nécessite pas de lavages.

II.3. La LCR ou Ligase Chain Réaction

Elle utilise deux paires de sondes oligonucléotidiques, complémentaires de la même séquence nucléotidique mais séparées par un intervalle libre qui sera comblé par une Ligase. Ainsi les sondes reliées et la séquence sélectionnée vont servir de matrice pour le cycle suivant. **(Photo 56)**

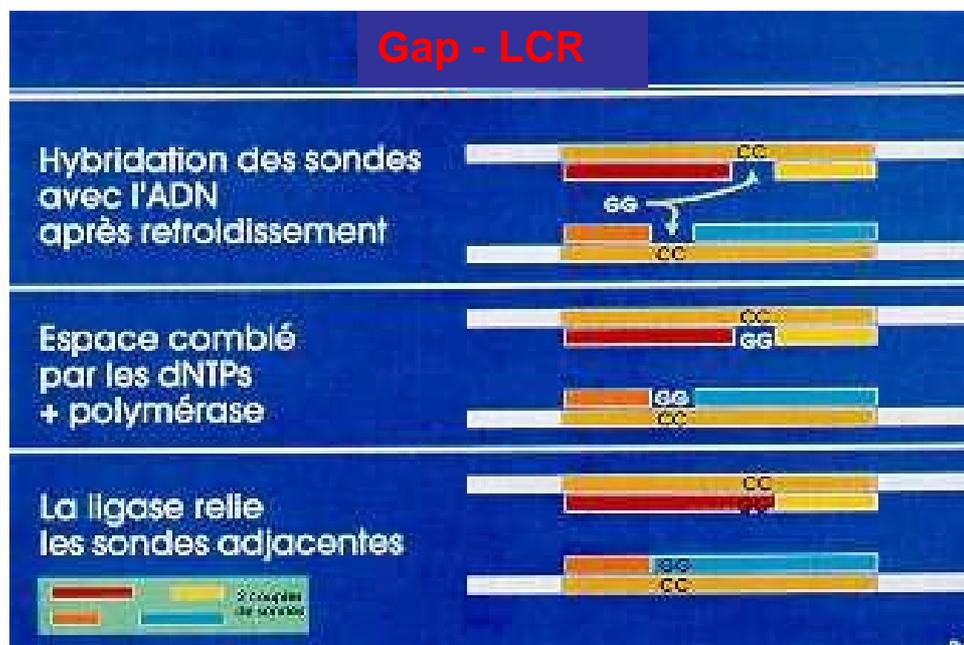


Photo 56 : Schéma d'amplification au cours de la LCR (Abbot).

Toutes les techniques d'amplification proposées ont des sensibilités à peu près comparables.

Compte tenu des possibilités de multiplication des séquences-cibles à des taux extrêmement élevés (plusieurs millions) il faut s'entourer de précautions draconiennes pour éviter une possible contamination, ce qui conduirait inéluctablement à un faux positif.

Dans le cas d'une amplification portant sur des séquences de DNA qui résistent longtemps dans le milieu extérieur, il est préférable de séparer les pièces de préparation des échantillons de celles où se réalise l'amplification, et peut-être même la lecture.

A l'heure actuelle, il est possible de réduire les risques de contamination du milieu extérieur par les amplicons, en utilisant des enzymes du type de l'Ampérase.

En revanche, un résultat négatif n'exclut pas une possible infection, étant donné qu'il peut y avoir dans l'échantillon des substances inhibitrices qui empêchent l'amplification de se faire. Il faudrait pouvoir tester systématiquement l'échantillon en présence d'une quantité de cible connue.

FICHE TECHNIQUE N° 6

REVELATION DES INCLUSIONS A CHLAMYDIA TRACHOMATIS PAR LES COLORANTS IODES

I. METHODE 1 : COLORATION A L'IODE

- Fixer la couche cellulaire à l'alcool méthylique pendant 10 minutes, directement dans le récipient de culture.
- Laver deux fois au PBS.
- Recouvrir la lamelle avec 1 ml d'une solution alcoolique d'iode à 2,5 % et laisser 10 minutes à température ambiante.
- Rejeter le colorant et sans laver, recouvrir avec 1 ml d'une solution à 5 % d'iodure de potassium (IK) pendant 10 minutes.
- Rejeter le colorant.
- Monter la lamelle, côté cellules dans une goutte de glycérine iodée.
- Rechercher au microscope la présence d'inclusions à Chlamydiae (objectif 20 x ou 10 x). Elles apparaissent brun marron sur un fond cellulaire jaunâtre. (**Photo 57**)



Photo 57 : Inclusion cytoplasmique colorée par la solution Iodo-Ioduré.

- La coloration est due au leucodérivé que l'iode forme avec le glycogène accumulé par *Chlamydia trachomatis*, au cours du cycle de multiplication. Certaines souches n'en produisent pas et la coloration peut manquer de sensibilité. De plus, le glycogène ne s'accumule qu'entre la 48^e et la 60^e heure d'évolution de l'inclusion. Lorsqu'il y a peu d'inclusions dans l'échantillon, cette coloration peut manquer de sensibilité. Ses avantages : elle est rapide et peu onéreuse.

A) PBS - pH7

B) Solution à 2,5 % d'iode dans l'alcool

Dissoudre 2,5 g d'iode dans 100 ml d'alcool éthylique absolu.

C) Solution à 5 % d'iode dans l'iodure de potassium (IK)

Dans l'ordre :

- Dissoudre 5 g d'IK dans 50 ml d'eau distillée.
- Ajouter les cristaux d'iode.
- Agiter puis ajouter 50 ml d'alcool éthylique absolu.

D) Glycérine iodée

Mélanger en parties égales glycérine et solution à 5 % d'iode dans l'IK.

■ II. METHODE 2 : COLORATION A L'IODE

- Fixation des cellules à l'alcool méthylique pendant 10 minutes.
- Coloration au lugol (30 minutes).
- Montage des lamelles (cellules baignant dans la glycérine iodée).
- Observation au microscope à fond clair : les inclusions apparaissent en brun plus ou moins foncé.

FORMULE DU LUGOL

- Iodure de potassium 10 g
- Eau distillée 1100 ml
- Iode bisublimé (Prolabo) 5 g



Agiter jusqu'à dissolution complète.

Compléter à 1 000 ml.

FICHE TECHNIQUE N° 7

REVELATION DES INCLUSIONS A CHLAMYDIAE EN CULTURE DE CELLULES PAR IMMUNOFLUORESCENCE

METHODES DIRECTES OU INDIRECTES A L'AIDE DE SÉRUMS MONO OU POLYCLONAUX

I. METHODE

- Inoculation des cellules avec les prélèvements.
- Au bout de 48 à 60 heures d'incubation, pratiquer la réaction.
- Décanter le surnageant.
- Fixer les cellules au méthanol pendant 10 minutes à la température du laboratoire.
- Laver deux fois pendant 5 minutes au tampon PBS (voir II, 1).
- Bien égoutter ou sécher au séchoir manuel (air froid).

1 - Recouvrir de sérum anti-Chlamydiae convenablement dilué et incuber pendant 30 minutes à 37 °C (Voir II, 2).

- Rincer au tampon PBS puis effectuer un bain de 5 à 10 minutes avec une légère agitation magnétique.
- Sécher légèrement au séchoir manuel.

2 - Recouvrir d'antiglobuline couplée à l'isothiocyanate de fluorescéine (méthode indirecte), convenablement diluée et contre-colorée au Bleu Evans (1/10 000). (Voir II, 3). - Incuber 30 minutes à 37 °C.

- Rincer au tampon PBS puis effectuer un bain de 5 à 10 minutes.

3 - Monter les cellules dans une goutte de tampon alcalin et observer au microscope.

■ II. REACTIFS

1 - Tampon PBS

0,01 M p H = 7,2/7,3

- PO₄HNa₂ 4 g
- ClNa 19,125 g
- PO₄H₂K 0,5025 g
- Eau distillée 2,5 l

2 - Le sérum anti-chlamydiae

Des sérums humains contenant des anticorps chlamydiens à un titre supérieur à 1/128 sont recueillis, mélangés et conservés à - 20 °C. Lorsqu'une quantité suffisante est obtenue (250 ml), le flacon est décongelé, titré vis-à-vis de Chlamydia trachomatis, filtré, réparti en aliquotes conservées à - 80 °C,

Pour son utilisation, il sera utilisé à 2 dilutions inférieures au titre.

*Exemple : Titre du sérum en micro-immunofluorescence = 1/256.
Titre d'utilisation 1/64 en tampon PBS.*

Un anticorps monoclonal, spécifique de l'espèce Chlamydia et commercialisé (Ortho Diagnostic, Biosoft, Biotrol, Syva-Biomérieux, Biosys) peut aussi être utilisé. Dans ce cas, la coloration s'arrête à ce stade et on passe directement à l'étape I-3.

3 - Antiglobuline humaine marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine

(Institut Pasteur, Biosys, Institut Mérieux, etc ...)

■ III. LIQUIDE DE MONTAGE

Glycérine 1 vol.

Tris 0,1 M pH = 8,5 1 vol.

OU

Glycérine 1 vol.

PO₄, HK₂ 0,2 M pH = 9 1 vol.



■ IV. RESULTATS

Les lames montées doivent être observées en fluorescence avec une source de lumière puissante (HbO200 à vapeurs de mercure), un filtre BG 12 d'excitation et un filtre d'arrêt K 535.

Les cellules montrent une fluorescence rouge carmin (due au Bleu Evans ou au contre colorant lié aux anticorps monoclonaux commercialisés !).

En cas de positivité, les inclusions montrent. des masses « vert pomme » intra-cellulaires, juxta-nucléaires, ovales, rondes ou entourant parfois le noyau cellulaire, mais toujours bien limitées. (**Photo 58**)

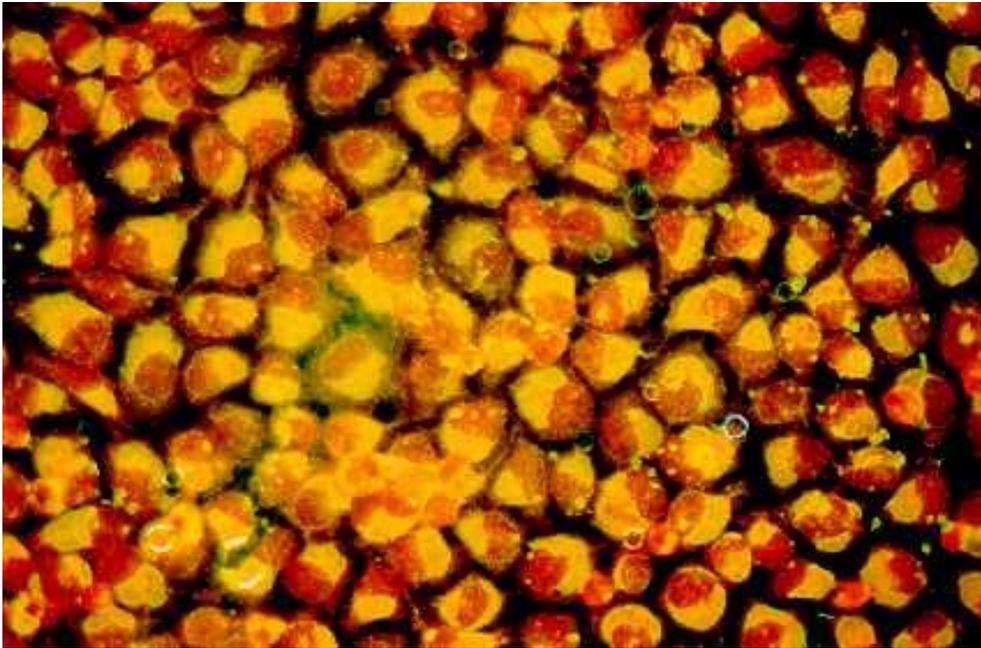


Photo 58 : Inclusions colorées par un anticorps anti-chlamydia polyclonal.

Attention ! Une contamination bactérienne ou mycélienne (levure) peut donner des masses fluorescentes, mais toujours extracellulaires.

Les inclusions sont toujours intracellulaires.

Se référer toujours aux lames témoin positif et témoin négatif.

Une seule inclusion observée est pathognomonique. Cependant, lorsque la culture a été effectuée en plaques, se méfier toujours d'une contamination à partir d'un puits voisin positif. Dans ce cas, l'autre lamelle confirme la positivité. S'il y a une discordance, il faut se référer à la clinique et, dans le doute, ne pas hésiter à reconvoquer le patient.

FICHE TECHNIQUE N° 8

REVELATION DES INCLUSIONS A CHLAMYDIAE EN CULTURE CELLULAIRE PAR METHODE IMMUNO-ENZYMATIQUE A LA PEROXYDASE

I. METHODE

- Aspirer le milieu surnageant de la couche cellulaire.
- Fixer les cellules à l'alcool méthylique, 10 minutes à température du laboratoire directement dans leur récipient.
- Laver 2 fois au tampon PBS (2 x 5 minutes) et bien égoutter.
- Recouvrir de sérum anti-chlamydiae (Voir II, 1) et laisser agir une heure à température du laboratoire.
- Laver 2 fois au tampon PBS (2 x 5 minutes) (Voir II, 2) et bien égoutter.
- Recouvrir d'antiglobuline couplée à la peroxydase (Voir II, 3) et laisser agir à la température du laboratoire pendant une heure.
- Ajouter le substrat (Voir II, 4) que l'on laisse agir 15 minutes à température de laboratoire.
- Rincer 2 fois à l'eau distillée (2 x 5 minutes).
- Décoller les lamelles (Voir II,5) et les monter sur une lame porte-objet, la couche cellulaire renversée sur une goutte de glycérine tamponnée.
- Observer au microscope à fond clair : les inclusions apparaissent colorées en marron plus ou moins foncé, de consistance plus ou moins granuleuse.

II. REACTIFS

1 - Le sérum anti-chlamydiae

Des sérums humains contenant des anticorps anti-chlamydiae à un titre supérieur à 1/128 sont recueillis clarifiés, mélangés et conservés à - 20 °C. Lorsqu'une quantité suffisante est obtenue (250 ml), le flacon est décongelé, titré vis-à-vis de *Chlamydia trachomatis*, filtré, réparti en aliquotes conservées à - 80 °C.

Pour son utilisation, il sera utilisé à 2 dilutions inférieures au titre.

Exemple : Titre du sérum en micro-immunofluorescence = 1/256.

Titre d'utilisation, 1/64 en tampon PBS.

Il existe, dans le commerce, des anticorps monoclonaux (Argène, Biosys, Ortho, etc ...) qui peuvent être utilisés dans ce type de coloration.

2 - Le tampon PBS pH = 7,2

- Cl Na 8,5 g
- PO₄ HNa₂ (12 H₂O) 8,62g
- PO₄H₂K (2 H₂O) 2,48 g
- Eau distillée 1 litre
- 1 pincée d'azoture de Na

3 - Antiglobuline humaine couplée à la peroxydase

Institut Pasteur, Biosys, etc...

4 - Substrat : milieu de Graham et Karnovsky

- Dissoudre 5 mg de 3-3'de aminobenzidine-tétrahydrochloride dans 100 ml de tampon Tris - HCl.
- Filtrer et ajouter H₂O₂ à 110 volumes qsp 0,5 % de concentration finale.
- Des réactifs prêts à l'emploi sont commercialisés (Argène, Biosys...)

TAMPON TRIS - HCl 0,1 M pH = 7,6

- Tris-Hydroxy-aminométhane 12,14 g
- H₂O distillée 1 000 ml
- Cl H normale 80 ml
- 1 pincée d'azoture de sodium.

5 - Pour sortir les lamelles, il est conseillé d'utiliser un fer à souder muni d'une pointe et de percer le fond plastique des tubes où des plaques utilisés pour la culture et retournés sur une feuille de papier filtre.

Les lamelles colorées tombent sur la feuille de papier filtre sous l'effet de la pression exercée par le fer à souder. Il suffit alors de prendre la lamelle avec une pince, par une extrémité, sans trop serrer pour éviter de la casser.

III. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les anticorps fixés sur les inclusions captent l'antiglobuline conjuguée qui réagit alors avec le substrat.

L'inclusion est le siège d'une réaction enzymatique colorée en présence d'H₂O₂ en brun acajou.

Le fond cellulaire est totalement muet, mais il peut être révélé par un contre-colorant à l'hématoxyline (culture Set Ortho Diagnostic). (**Photo 59**)

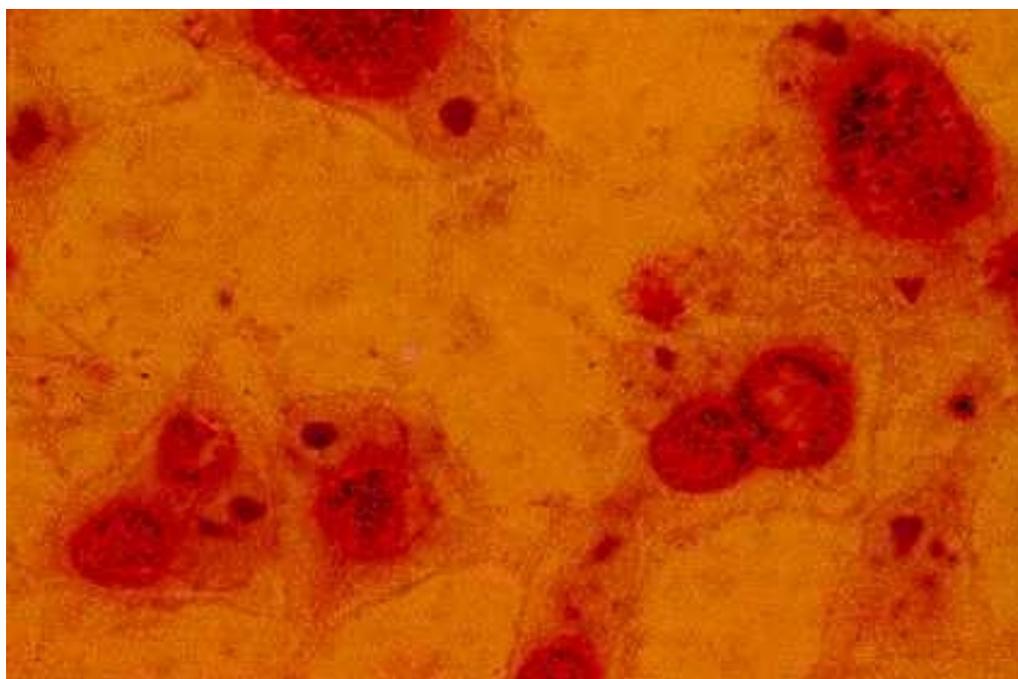


Photo 59 : Inclusions colorées par le réactif culture set (ortho).

La présence d'une masse acajou ovale ou ronde ou bifide, bien limitée, évoque la présence d'inclusions chlamydiennes. (**Photo 60**)

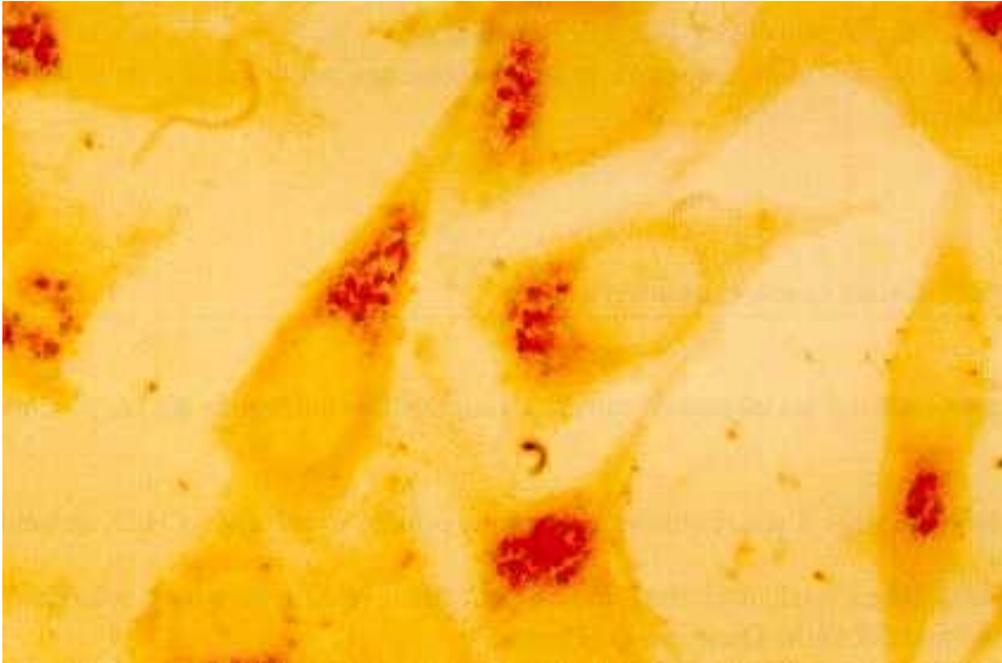


Photo 60 : Jeunes inclusions (36 heures d'infection) colorées en brun par le DAB (Di Amino Benzidine) à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-chlamydia.

Attention! Une contamination bactérienne ou à levures peut donner une réaction faussement positive. Dans ce cas, les masses observées manquent de régularité et sont plus nombreuses.

FICHE TECHNIQUE N° 9

SÉROLOGIE DES CHLAMYDIAE PAR LE TEST DE MICRO-IMMUNOFLUORESCENCE

I. PRINCIPE

Des particules vivantes de Chlamydia (corps élémentaires et corps réticulés) sont obtenues et partiellement purifiées, soit à partir de membranes vitellines d'œuf de poule embryonné, soit à partir de cultures de cellules infectées. Nous prendrons comme exemple un réactif commercialisé dont les antigènes sont des suspensions de Chlamydia psittaci et Chlamydia trachomatis, obtenues simultanément sur culture de cellules et partiellement purifiées.

II. REACTIFS

Exemple :

- Kit Biosys (Biosys) comportant 6 lames de 9 alvéoles (3 x 3). Chaque alvéole est compartimentée en deux et chaque compartiment contient une goutte séchée et fixée d'une suspension de Chlamydia psittaci, d'une part, et de Chlamydia trachomatis d'autre part.

Un conditionnement plus économique comporte 9 lames de 18 alvéoles.

Dans ce cas, les antigènes sont déposés à la plume, côte à côte, sur la même alvéole.

- La trousse contient :

Une solution tampon (PBS) pour les dilutions des sérums et les lavages.

Une antiglobuline humaine conjuguée au FITC comportant du bleu Evans pour contre-colorer le fond de la préparation.

Liquide de montage ou glycérine tamponnée.

2 sérums témoins positifs : 1 positif fort qui titre $1/256^{\circ}$ et un positif faible qui titre $1/32^{\circ}$.

1 sérum négatif

■ III. MATÉRIEL

- 1 microscope à fluorescence équipé d'un système d'épifluorescence.
- Objectif à immersion 95 x ou 100 x pour fluorescence.
- Oculaires 10 x.
- Titertek à 8 canaux ou 12 canaux, réglés de 0 à 50 mcl.
- Cônes à usage unique, s'adaptant au titertek.
- Bacs à coloration pour 20 lames horizontales.
- 1 bâton aimanté pour le bac.
- 1 agitateur magnétique.
- Feuilles de papier filtre, ou séchoir à cheveux, pour sécher les lames.
- Lamelles pour monter les lames.
- 1 plaque de microtitration (Nunc) de 96 puits.

■ IV. PRÉLÈVEMENT

Le sang est prélevé stérilement à la veine du pli du coude, Après rétraction du caillot, le sérum est décanté, le plus stérilement possible. Il doit être parfaitement limpide et clair. Il sera conservé à $- 20^{\circ}\text{C}$, si la réaction ne peut être pratiquée immédiatement.

■ V. MODE OPÉRATOIRE

A - Les sérums à tester, ainsi que les témoins, sont dilués à $1/16^{\circ}$ dans le PBS (on peut se servir d'une plaque de microtitration en mettant 10 mcl de sérum pur et 150 mcl de tampon).

B - 20 mcl sont répartis dans chaque alvéole des lames à 18 alvéoles ou dans chaque 1/2 alvéole des lames à 9 alvéoles.

C - Incuber 30 minutes à 37 °C en chambre humide (quelques millilitres d'eau distillée, disposés dans une boîte de pétri où est déposée la lame).

D - Rincer avec un jet de pissette et placer la lame dans le bac à coloration qui contient 100 ml de PBS et la barrette aimantée.

Le bac est posé sur l'agitateur magnétique à petite vitesse.

Laver 10 minutes pour une seule lame et 2 fois 5 minutes pour plusieurs lames.

E - Sécher les lames entre deux feuilles de papier buvard ou au séchoir avec air froid (pour éviter d'altérer l'antigène ou les anticorps).

F - Déposer 20 mcl de globuline antihumaine marquée.

G - Incuber 30 minutes à 37 °C comme en C.

H - Rincer comme en D.

Sécher et monter avec une goutte de liquide de montage et une lamelle 24 x 60 mm.

■ VI. LECTURE

L'observation des lames doit se faire impérativement à l'objectif à immersion 95 x ou 100 x.

Commencer la lecture par les témoins positifs et négatifs. Si le titre observé concorde avec le titre donné, procéder à l'observation des sérums.

La lecture se fait en deux étapes.

1 DÉPISTAGE DES SÉRUMS PORTEURS D'ANTICORPS

Tous les sérums à étudier sont dilués à 1/16°. Ceux qui contiennent des anticorps montrent une multitude de petites sphères fluorescentes, image de la goutte d'antigène déposée. Parfois, quelques traînées de corps isolés s'observent en dehors de cette limite. **(Photos 61 et 62)**



Photo 61 : Dépistage des anticorps anti-chlamydiae par technique MIF (lames).

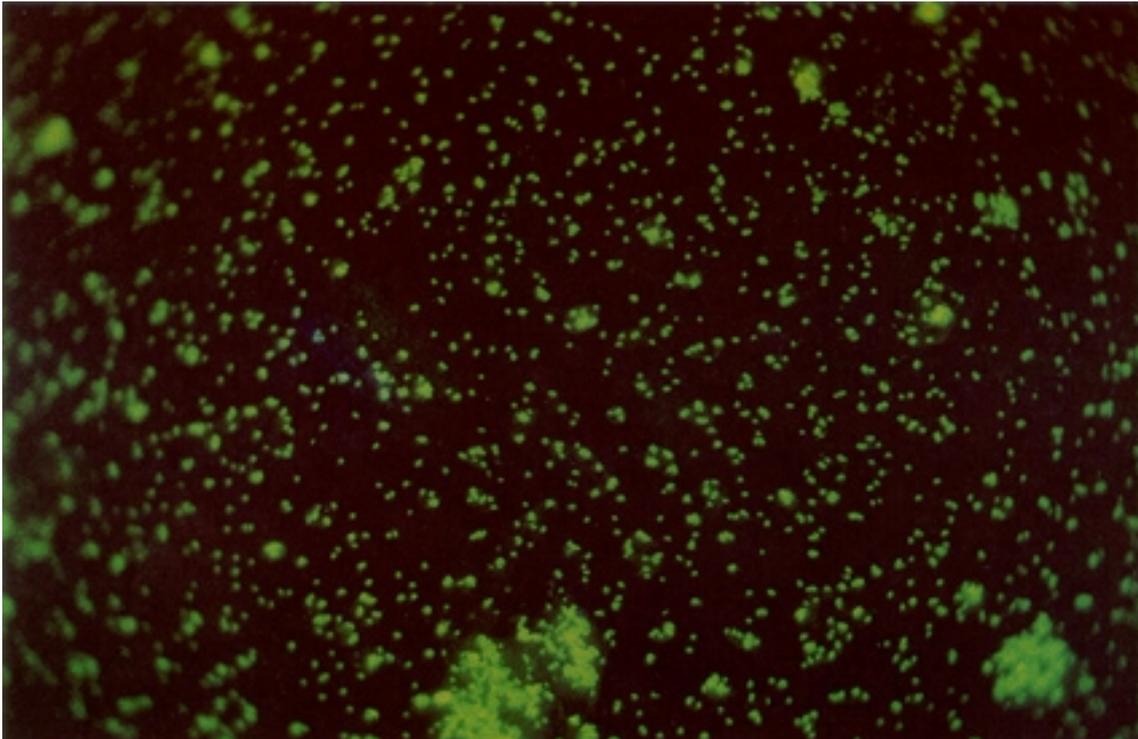


Photo 62 : Présence d'anticorps anti-chlamydia (sérum positif).

Les sérums négatifs ne montrent pas de corpuscules fluorescents, ou très faiblement. Dans ce cas, si les particules sont bien distinctes, quoique peu fluorescentes, il ne faut pas hésiter à refaire l'examen.

2 CONFIRMATION ET TITRAGE

Les sérums trouvés positifs en 1 sont repris le lendemain, mais à trois dilutions différentes : 1/16 - 1/64 - 1/256. Le titre est donné en fonction de l'intensité de la fluorescence observée à la dilution la plus forte. La limite de positivité est donnée par les témoins positifs (3 + ; 2 + ; 1 +).

Si une fluorescence 3 + s'observait encore à la dilution 1/256^e, il serait nécessaire de diluer plus fortement le sérum.

■ VII. INTERPRÉTATION

La grande sensibilité de la micro-immunofluorescence permet de considérer un titre supérieur à 32 comme significatif d'une infection ancienne ou débutante à *Chlamydia trachomatis*. La présence d'antigènes de groupe explique les réactions croisées avec

Chlamydia psittaci, alors que la présence d'antigènes d'espèce explique les réactions croisées entre les différents sérotypes de Chlamydia trachomatis.

1 MICRO-IMMUNOFLUORESCENCE : 16 - 32

- Chlamydia trachomatis : 16-32
- Chlamydia psittaci : 16-32

Orientation : infection probablement ancienne à Chlamydia trachomatis ou à Chlamydia psittaci. Recontrôler l'examen sur un prélèvement ultérieur.

2 MICRO-IMMUNOFLUORESCENCE : 64

- Chlamydia trachomatis : 64
- Chlamydia psittaci : < ou = 16

Orientation : infection probablement récente en cours d'évolution ou au décours après traitement. Le titre d'anticorps peut demeurer en plateau très longtemps après l'infection. Il faut impérativement rechercher, quel que soit le titre observé, une séro-conversion. Détermination du titre d'anticorps sur deux prélèvements distants de 2 à 3 semaines avec augmentation du titre d'au moins 4 fois dans le deuxième sérum, T2 = 4T1. Faire une recherche d'IgM.

3 MICRO-IMMUNOFLUORESCENC : > ou = 256

- Chlamydia trachomatis : > ou = 256
- Chlamydia psittaci : > ou = 64

Orientation : Le taux élevé indique une infection récente ou une complication à Chlamydia trachomatis à confronter avec les observations cliniques. Une recherche bactériologique et une recherche d'IgM s'imposent. Recontrôler 2 à 3 semaines après.

■ VIII. PIÈGES À ÉVITER

1 LECTURE DIFFICILE

- Sérums précipités ou contaminés. Les précipités ou les gammaglobulines agrégées sont toujours source de fluorescence non spécifique.
- Ne pas frotter la lamelle couvre-objet sur la lame.
- Solution de dilution contaminée (préparée avant le jour de la manipulation).
- Séchage des dilutions de sérums pendant les incubations.
- Lavages insuffisants entre les étapes.
- Eau de lavage contenant de fines particules.
- Poussières apportées par l'air de séchage.
- Ne pas sécher à l'air chaud.
- Lames rayées.

2 ERREURS LIÉES À LA FLUORESCENCE

- Mauvaise dilution ou homogénéisation du conjugué.
- Conjugué dilué conservé trop longtemps.
- Conjugué (concentré ou dilué) exposé plusieurs fois à la lumière.
- Conjugué détérioré par un agent physique, température ou contamination.
- Lavage à l'eau courante qui peut parfois être acide et entraîner la dissociation du complexe Ag-Ac.
- Lame exposée à l'air sans protection.

3 FAUSSE COLORATION FLUORESCENTE

- Sérums présentant trop de gammaglobuline agrégées.
- Concentration des sérums erronée.

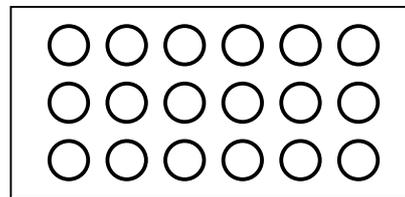
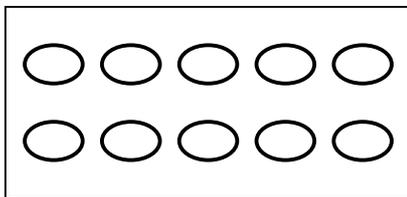
FICHE TECHNIQUE N° 10

SÉROLOGIE DES CHLAMYDIAE SUR CELLULES INFECTÉES

I. PRINCIPE

Les anticorps sériques se fixent sur les particules des Chlamydiae, qu'elles soient libres ou dans la vacuole où s'est effectué le cycle de multiplication. Ces anticorps, détectés par une antiglobuline marquée à l'isothiocyanate de fluorescéine, révèlent la totalité de l'inclusion dans les cellules infectées.

II. MATÉRIEL ET RÉACTIFS



- Lames pour immunofluorescence contenant 2 rangées de 5 puits ou 3 rangées de 6 puits.
- Titertek à canaux multiples (8 canaux ou 12 canaux) réglables de 0 à 50 mcl.
- Cônes à usage unique.
- Solution tampon phosphate pH = 7,2/7,3 (PBS);

Cl Na : 17,0 g

PO₄ HNa₂ : 3,5 g

PO₄ H₂K : 1,075 g

Eau distillée qsp : 2,5 litres

- Solution de Bleu Evans à 1/25^e en eau distillée.
- Tampon de montage PBS glycérine pH = 8,5.

Cl Na	:	8,0 g
PO ₄ HNa ₂	:	1,9 g
PO ₄ H ₂ K	:	0,02 g
Eau distillée qsp	:	1 litre

Ajouter 1 volume de PBS à 9 volumes de glycérine, avec agitation légère et en évitant la formation de bulles.

- Antiglobuline humaine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC).
- Microscope équipé d'un système d'épifluorescence, objectif 20 ou 25 X, oculaires 10 X
- Hotte à flux laminaire vertical pour virologie.

III. PRÉPARATION DE L'ANTIGÈNE

Il existe, dans le commerce, des kits comportant des lames prêtes à l'emploi (Virgo-Eurobio, par exemple).

- Une monocouche de cellules Mc Coy ou HeLa 229 est infectée avec une souche de Chlamydia convenablement diluée, de façon à obtenir de 40 à 60 % de cellules infectées après 48 heures d'incubation.
- Décanter le milieu surnageant et laver 2 fois la couche cellulaire avec la solution de Earle, préchauffée et stérile.
- Trypsiner et suspendre les cellules en milieu complet de croissance, additionné de cycloheximide et de glucose.
- Ajuster la suspension cellulaire à 1×10^6 cellules/ml et déposer 10 mcl sur chaque alvéole.
- Incuber 16 heures à 37 °C.
- Rejeter le milieu et fixer les cellules à l'acétone 10 minutes à température du laboratoire.
- Conserver les lames à + 4 °C ou - 20 °C.

■ IV. PRÉLÈVEMENT

Le sang est prélevé stérilement à la veine du pli du coude. Après rétraction du caillot, le sérum est décanté, le plus stérilement possible. Il doit être parfaitement limpide et clair. Il sera conservé à - 20 °C, si la réaction ne peut être pratiquée immédiatement.

Les sérums sont dilués à 1/16 - 1/64 - 1/256 dans le PBS.



■ V. MODE OPÉRATOIRE

- Ramener les lames à la température du laboratoire, puis déposer sur chaque alvéole 15/20 mcl de chaque dilution de sérum à tester.
- Incuber 30 minutes à 37 °C en chambre humide.
- Rincer puis effectuer un bain en tampon PBS (10 minutes) avec une légère agitation magnétique.
- Égoutter et sécher légèrement au séchoir manuel (air froid).
- Déposer l'antiglobuline humaine marquée à la fluorescéine (15/20 mcl/alvéole) et incuber 30 minutes à 37 °C en chambre humide.
- Rincer puis bain de 10 minutes en tampon PBS contenant 3 gouttes/100 ml de bleu Evans, avec agitation magnétique et égoutter.
- Hydrater les alvéoles au tampon alcalin glycérimé.
- Observer au microscope à fluorescence, objectif 20 X à sec ou 25 X à l'immersion, oculaire 10 X.

VI. INTERPRETATION DES RESULTATS

La présence d'anticorps dans le sérum se révèle par une fluorescence vert-pomme intense, des inclusions dans les cellules infectées. Les cellules non infectées apparaissent rouge carmin ou incolores. (**Photo 63**)

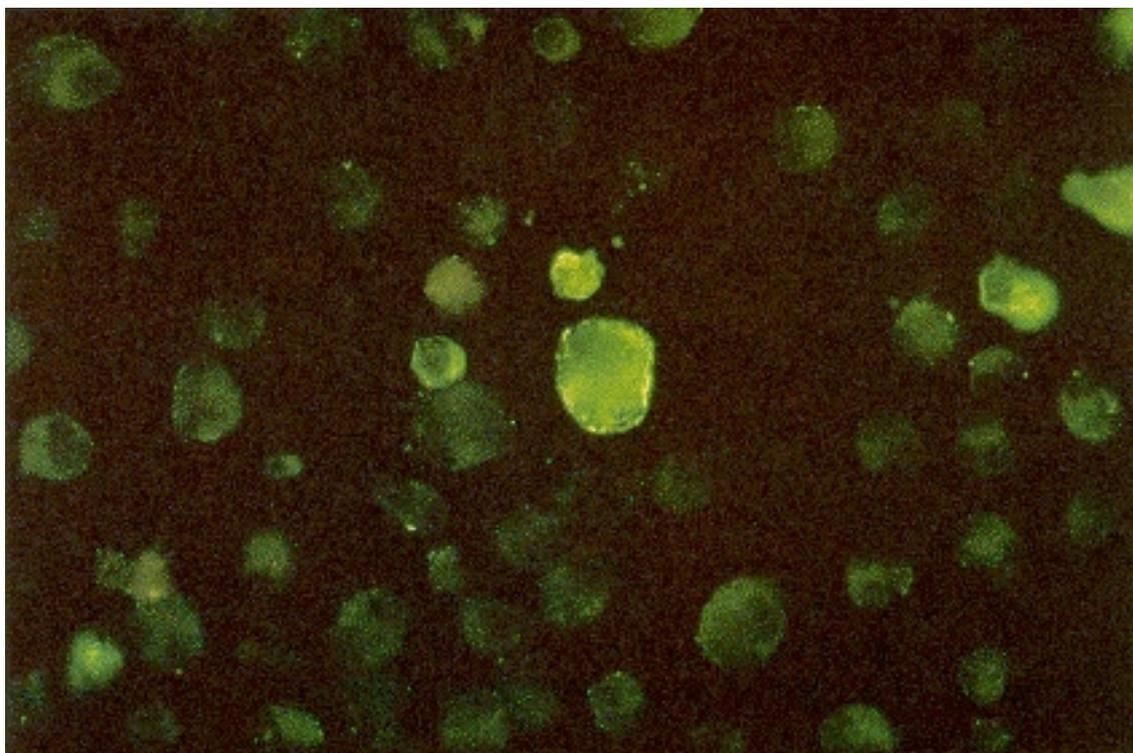


Photo 63 : Inclusions fluorescentes dans une couche cellulaire (Hep2) faiblement infectée (15 % de cellules) par une souche L2.

La validité des réactifs doit être confirmée avec un témoin positif connu et un témoin négatif connu.

A l'état normal, un sérum négatif ne doit montrer aucune fluorescence à la dilution la plus faible.

Un sérum positif au 1/16 et négatif à 1/64 doit être recontrôlé 15 à 21 jours après sur un nouveau prélèvement.

Tout sérum montrant une fluorescence à la dilution 1/64 ou au-delà est considéré positif.

Attention ! Un sérum contaminé ou hyperlipémique peut donner une fluorescence parasite qui gêne la lecture. Il ne faut pas hésiter à refaire l'examen sur un nouveau prélèvement.

DOSAGE IMMUNO-ENZYMATIQUE DES ANTICORPS ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS

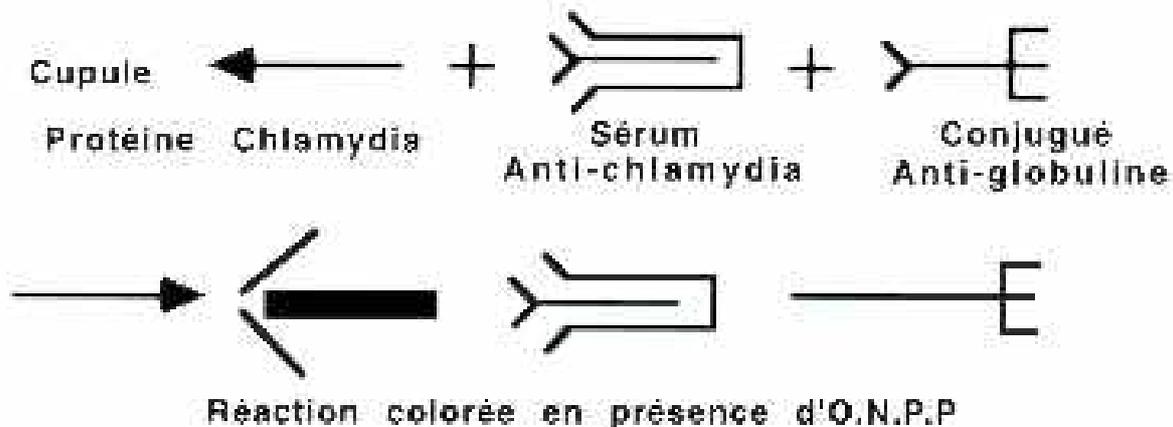
I. PRINCIPE

La paroi des particules Chlamydiennes (corps élémentaires ou corps réticulés) est composée d'un grand nombre de complexes gluco ou lipido-protidiques, dont certains sont immunogènes. La plupart de ces constituants sont insolubles et labiles, donc plus ou moins altérés par les méthodes physico-chimiques d'extraction.

Les détergents à faible concentration solubilisent certains de ces constituants, qui peuvent alors être fixés sur un support inerte comme, par exemple, les cupules en polystyrène des plaques de microtitration.

Dans ces conditions, les anticorps sériques se lient à l'antigène protéique, fixé sur la paroi de la cupule et, dans un deuxième temps, ils fixent, par les fractions Fc, une antiglobuline humaine marquée à la phosphatase alcaline (PA) qui, en présence d'orthonitrophenyl phosphate (ONPP), donne une coloration jaune, dont l'intensité dépend de la quantité d'anticorps fixée.

Schéma de la réaction



Réaction

- 1 - Diluer les sérums à étudier au 1/100^e en tampon dilution.
 - Distribuer 100 mcl de chaque sérum dilué.
 - Prévoir :
 - 1 cupule de témoin positif (A2),
 - 1 cupule de témoin négatif (A3),
 - 1 cupule de Blanc réactif (A1).
 - laisser 90 minutes à 37 °C.
- 2 - Laver 3 fois (Remplir les cupules avec 200 mcl de solution, attendre 1 à 2 minutes, vider, sécher, recommencer 3 fois).
- 3 - Distribuer 100 mcl de substrat et incuber 30 minutes à 37 °C.
- 4 - Laver comme en 2.
- 5 - Ajouter 100 mcl de conjugué et incuber 90 minutes à 37 °C.
- 6 - Rajouter 100 mcl de Na OH/N dans le fond des cupules et agiter légèrement.
- 7 - Lire à 405 mn dans l'heure qui suit l'arrêt de la réaction.

■ II. REACTIFS (Exemple)

- **Trousse Chlamydia trachomatis IgG-EIA test Kit** (Labsystem).

- **Tampon dilution** (stade un mois reconstitué).

Diluer le flacon à 1/2 dans de l'eau distillée.

- **Sérum négatif.**

Reconstituer avec 2 ml d'eau distillée.

Laisser 10 minutes à température du laboratoire avant l'utilisation.

Conserver à - 20 °C en aliquotes.

- **Sérum positif.**

Reconstituer de façon identique au témoin négatif.

- Le conjugué à la P.A.

Diluer au 1/50° dans le liquide de dilution (0,6 + 29,4 de tampon : 30 ml).
A préparer 10 minutes avant l'emploi.

- Tampon substrat 30 ml.

Vérifier sa limpidité.
Prêt à l'emploi.



- Substrat = O. Nitro Phényl Phosphate comprimés.

1 comprimé + 2,5 ml de substrat (5 mg de ONPP).

- Tween 20

(Stabilité une semaine).
Diluer à 1/500° en eau distillée.
Vérifier sa limpidité.

- Solution d'arrêt : Na OH/N.

(A préparer soi-même). Non fournie.

■ III. MATERIEL

- Spectrophotomètre 405 nm pouvant lire automatiquement les microplaques ELISA (Dynatech, Elisa Processor Behring, Organon Technica, etc ...).
- Pipettes munies d'embouts jetables (Fin Pipette 10 et 100 mcl - Eppendorff, Gilson, etc...)
- Étuve à 37 °C.
- Montre avertisseur.

■ IV. PRELEVEMENT

Le sang est prélevé stérilement à la veine du pli du coude. Après rétraction du caillot, le sérum est décanté, le plus stérilement possible. Il doit être parfaitement limpide et clair. Il sera conservé à - 20 °C, si la réaction ne peut être pratiquée immédiatement.

■ V. REACTION

Sortir une plaque de réaction, ainsi que les réactifs, de leur emballage 10 à 15 minutes avant de faire la réaction, pour stabiliser la température.

■ VI. LECTURE

Elle est exprimée en unités Densité Optique (DO), convertie en Unités Immuno-Enzymatiques (UIE).

$$\text{UIE} = \frac{\text{DO échantillon} - \text{DO Blanc}}{\text{DO positif} - \text{DO Blanc}} \times 100$$

■ VII. INTERPRETATION

-	< 10 UIE	
+/-	10-20	Refaire un test plus tard (15 à 21 jours après le premier)
+	20-60	Vérifier par IgM (Infection précoce ou ancienne)
++	60-110	Vérifier par IgM
+++	< 110	

FICHE TECHNIQUE N° 12

MODALITES DE PRELEVEMENT ET D'UTILISATION DU MILIEU DE TRANSPORT EN VUE DE L'ISOLEMENT DE CHLAMYDIA TRACHOMATIS

I. MILIEU DE TRANSPORT

Il s'agit du 2SP, milieu saccharosé tamponné, qui permet une bonne survie des particules infectantes pendant 24 heures et plus, à basse température et une conservation définitive à - 80 °C (BIO-DIAGNOSTIC).

Ce milieu est enrichi avec du sérum de veau fœtal et une solution d'antibiotiques qui évitera la prolifération microbienne qui peut accompagner le prélèvement.

II. NATURE DU PRELEVEMENT

A) Chez l'homme

Il s'agit essentiellement d'un raclage doux urétral ou d'un raclage conjonctival, rectal, pharyngé ou enfin au niveau d'une lésion.

Dans le cas du prélèvement urétral, il est indispensable d'utiliser soit une curette ophtalmologique n° 3, soit un Bacto-Pick. Ce matériel sera enfoncé de 3 à 4 cm dans le canal urétral, puis le produit de raclage vigoureusement agité dans le milieu de transport.

B) Chez la femme

Il s'agira, dans tous les cas, d'un grattage au niveau de l'orifice du col, si possible au niveau de la jonction exo-endocervicale, Le matériel utilisé sera également le Bacto-Pick, en prenant bien soin de ne pas faire saigner la patiente. Ce qui est difficile compte tenu de la tendance hémorragique particulière au cours des infections à Chlamydia.

Un prélèvement urétral doit être effectué en même temps que le prélèvement cervical.

C) Des liquides d'exsudation (liquide articulaire, liquide péritonéal, etc ...) peuvent être valables pour cette recherche. Il faut transporter ces liquides dans les plus brefs délais au laboratoire.

III. QUELQUES CONSEILS

- Dans tous les cas, un prélèvement sanguin pourra être un adjuvant majeur pour établir le diagnostic, pour suivre l'évolution d'une infection à Chlamydia trachomatis.

- Il faut toujours prendre les dispositions pour que le prélèvement ainsi effectué parvienne au laboratoire, soit déposé le jour même dans de l'eau et des glaçons, soit dans les 24 heures dans de la carboglace. Si le grattage a été correctement effectué, il ramène une quantité suffisante de cellules infectées pour permettre une survie des particules infectantes.

Passé ce délai, les possibilités d'isolement diminuent rapidement et considérablement. Il faut alors prendre soin de transporter le prélèvement à basse température (-20 °C à - 0 °C).

Lorsque plusieurs échantillons sont prélevés au cours de la même séance, il est conseillé de placer chaque prélèvement dans le réfrigérateur jusqu'au moment du transport. Si l'inoculation des cellules, en vue de l'isolement, ne peut être effectuée le même jour, il est conseillé de congeler le prélèvement de façon progressive.

- 1 heure dans le freezer du réfrigérateur,
- 4 heures à - 20 °C/- 35 °C,
- emmagasiner à - 80 °C ou dans l'azote liquide.

- Il est inutile d'effectuer le prélèvement à partir du premier jet urinaire ou au niveau du vagin, ou au niveau de l'anus, si ce dernier n'est pas fait sous le contrôle d'un anoscope.

De la bonne observation de ces règles dépend tout le succès de la culture.

- Le prélèvement au niveau de l'urètre, chez l'homme, pourra être avantageusement facilité en trempant au préalable le Bacto-Pick dans le milieu de transport, ce qui facilite son introduction à la profondeur voulue.

- Pour chaque patient, il est conseillé de prélever deux échantillons.

- Chaque tube porte une étiquette où sont notés :

- les nom et prénom du patient,
- la date du prélèvement,
- le siège du prélèvement ou l'origine de l'échantillon.

CAHIER DE **BIOFORMA**
Formation
version numérique

■ IV. PREPARATION DU 2SP

Milieu de transport et de conservation pour l'isolement des Chlamydiae par culture sur cellules, à partir de divers échantillons : col, urètre, sperme, urines, voies génitales hautes de la femme... etc.

Saccharose : 68,44 g

K_2HPO_4 : 2,084 g

KH_2PO_4 : 1,084 g

H_2O : 1 000 ml

La solution de base peut être autoclavée à 100° pendant 15 minutes, ou filtrée sur millipore (0,45 µ).

A cette solution de base on rajoute extemporanément :

- 10 % de sérum de veau fœtal décomplémenté,
- 50 γ /ml de streptomycine ou 40 γ /ml de gentalline,
- 100 γ /ml de vancomycine,
- 2,5 γ /ml de fungizone, spéciale pour cultures cellulaires (SQUIBB),
- 2 à 3 ml de rouge de phénol à 0,5 %.

Solution à distribuer sous 1 ml pour la macrométhode, et sous 0,6 ml en microtubes pour la microméthode.

Les tubes seront conservés ensuite à - 20 °C.

BIBLIOGRAPHIE

- Beem, M. O. et Saxon, E. M. (1977a). Respiratory tract colonization and a distinctive pneumonia syndrome in infants infected with *Chlamydia trachomatis*. N. Eng. J. Med., 1977, Vol. 296, 306-310.
- Bowie, W. R., Wang, S. P., Alexander, E. R. et al. (1977a). Etiology of nongonococcal urethritis. Evidence for *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum*. J. Clin. Invest., May 1977, Vol. 59, 735-742.
- Bowie, W. R., et Jones, H. (1981). Acute pelvic inflammatory disease in outpatients : association with *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*, Ann. Intern. Med., 1981, Vol. 95,685-688.
- Bowie, W. R., Alexander, E. R. et Holmes, K. K. (1981). Eradication of *Chlamydia trachomatis* from the urethra of men with nongonococcal urethritis. Sex. Transm. Dis., 1981, Vol. 8, 79-81.
- Branger, F. (1989). Intérêt du western blot dans le diagnostic des uréthrities à *Chlamydia trachomatis*. Thèse pour le Diplôme d'Etat de Docteur en Médecine, 1990.
- Byrne, G. I. et Moulder, J. W. (1978). Parasite-specified phagocytosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia trachomatis* by L and HeLa cells. Infect. Immun., 1978, Vol. 19, 827-832.
- Caldwell, H. D., Kuo, C. C. et Kenny G. E. (1975). Antigenic analysis of chlamydiae by two-dimensional immunoelectrophoresis. J. Immunol., 1975, Vol. 115, 969-975.
- Caldwell, H. D. et Perry, L. J. (1982). Neutralization of *Chlamydia trachomatis* infectivity with antibodies to the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. Infect. Immun., 1982, Vol. 35, 1024-1031.
- Caldwell, H. D. et Schachter, J. (1982). Antigen analysis of the major outer membrane protein of *Chlamydia* spp. Infect. Immun., 1982, Vol. 35, 1024-1031.
- Chaim, W., Sarov, B., Sarov, I., Piura, B., Cohen, A. et Insler, V. (1989). Sérum IgG and IgA antibodies to *Chlamydia* in ectopic pregnancies. Contraception, jul. 1989, Vol. 40, 59-71.
- Dawson, C. R. (1986). Eye disease with chlamydial infections. En : Chlamydial infections. Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D. et Ward, M. (eds.). Proceedings of the Sixth International Symposium on Human Chlamydial infections, Cambridge University Press, 1986, 135-144.
- Durand, A. Nicolas et Favre (1913). Lymphogranulomatose inguinale subaigüe d'origine génitale probable, peut-être vénérienne. Bulletins et mémoires de la société médicale des Hôpitaux de Paris, 1913, Vol. 35, 274-279.

- Dwyer, R.S.C., Treharne, J. D., Jonse, B.R. et Herring, J. (1972). Chlamydial infections results of micro-immunofluorescence tests for detection of type-specific antibody in certain chlamydial infections. *Br. J. Vener. Dis.*, 1972, Vol. 48, 452-459.
- Fritsch, H. O., Hosftätter, A. et Lindner, K. (1910). Experimentelle Studien Zur Trachomfage. *Graefe's Archiv. für Ophtalmologie*, 1910, Vol. 76, 547.
- Frommel, G. T., Rothenberg, R., Wang, S. P. et Mc Intosh, K. (1979). Chlamydia infection of mothers and their infants. *J. Pediatr.*, 1979, Vol. 95, 28-32.
- Frost, E. H., Deslandes, D.S., Veilleux, S. et Bourgaux-Ramoisy, D. (1991). Typing *Chlamydia trachomatis* by detection of restriction fragment length polymorphism in the gene encoding the major outer membrane protein. *J. Infect. Dis.*, 1991, Vol. 163, 1103-1107.
- Gordon, F. B. et Quan, A. L. (1965). Isolation of the trachoma agent in cell culture. *Soc. Exp. Biol. Med.*, 1965, Vol. 118, 354-359.
- Halberstadter, L. et Von Prowazek, S. (1907). La nature parasitaire des inclusions dans le trachoma. *Arb. K. Gsndtsamte.*, 1907, Vol. 26, 44-47.
- Hanuka, N., Glasner, M., Sarov, I. Detection of IgG and IgA antibodies to *Chlamydia trachomatis* in sera of patients with chlamydial infections : use of immunoblotting and immunoperoxydase assay., 1988, *Sex. Transm. Dis.*, 15, 93-99.
- Harrison, H. R., English, M. G., Lee, C. K. et Alexander, E. R. 1978). *Chlamydia trachomatis* infant pneumonitis. *N. Eng. J. Med.*, 1978, Vol. 298, 702-708.
- Harrison, H. R., Alexander, E. R., Weinstein, L., Lewis, M., Nash, M. et Sim, D. A. (1983a). Cervical *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmal infections in pregnancy. *J.A.M.A.*, 1983, Vol. 250, 1721-1727.
- Harrison, H. R., Boyce, W. T. et Haffner, W. H. J (1983b). The prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* and mycoplasmal infections during pregnancy in an American Indian population. *Sex. Trans. Dis.*, 1983, Vol 10, 184-186.
- Hatch, T. P., Allan, I. et Pearce, J. H. (1984). Structural and polypeptide differences between envelopes of infective and reproductive live cycle forms of *Chlamydia* spp. *J. Bacteriol.*, Jan. 1984, Vol. 157, 13-20.
- Hayman, B. (1910). Über die Fundorte der Powazetz'schen Körperchen. *Berliner Klinische Wochenschrift*, 1910, Vol. 47, 663-666.
- Heap, G. (1975). Acute epididymitis attributable to chlamydial infection : preliminary report. *Med. J. Aust.*, 1975, Vol. 1, 718.
- Henry-Suchet, J., Catalan, F., Loffredo, V., Sanson, M. J., Debache, C., Pigeau et Coppin, R. (1981). *Chlamydia trachomatis* associated with chronic inflammation in abdominal specimens from women selected for tuboplasty. *Fertil. Steril.*, 1981, Vol. 36, 599-605.

- Henry-Suchet, J., Utzmann, C., De Brux, J., Ardoin, A., Catalan, F., Serfaty, D. et Loffredo, V. (1985). Microbiological study of chronic histological inflammation associated to tubal sterility, role of *Chlamydia trachomatis*. 6th Int. Meet. Int. Soc. for STD Research. 31 Juillet - 2 Août 1985, Brighton, 33.
- Henry-Suchet, J. (1993). J. Médecine et Maladies Inf., 1993.
- Hourihan, J. T., Rota, T. R. et Mac Donald, A. B. (1980). Isolation and purification of a type-specific antigen from *Chlamydia trachomatis* propagated in cell culture utilizing molecular shift chromatography. J. Immunol., 1980, Vol. 124, 2399.
- Hunter, J. M. et Sommerville, R. G. (1984). Erythromycin stearate in treating chlamydial infection of the cervix. Br. J. Vener. Dis., 1984, Vol. 60, 387-389.
- Kingsbury, D. T. et Weiss, E. (1968). Lack of deoxyribonucleic acid homology between species of the genus *Chlamydia*. J. Bacteriol., 1968, Vol. 96, 1421-1423.
- Kristensen, G. B., Bollerup, A. C., Lind, K., Mårdh, P. A., Ladehoff, I., Sorensen, F. et Lind, I. (1985). Infections with *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* in women with acute salpingitis. Genitourin. Med., 1985, Vol. 61, 179-184.
- Kuo, C. C., Wang, S. P. et Grayston, J. T. (1973). Effect of polycations, polyanions and neuraminidase on the infectivity of trachoma-inclusion conjunctivitis and lymphogranuloma venereum organisms in HeLa cells : sialic acid residues as possible receptors for trachoma-inclusion conjunctivitis. Infect. Immun., 1973, Vol. 8, 74-79.
- Levy, N. J. (1979). Wheat germ agglutinin blockage of chlamydial attachment sites. Antagonisms by N-acetyl-D-glucosamine. Infect. Immun., 1979, Vol. 25, 946-953.
- Lindner, K. (1911). Gonoblennorrhöe : Einschlussblennorrhöe und Trachoma Albrecht von Graefes. Arch. Ophthalmol., 1911, Vol. 78, 380.
- Mårdh, P. A. et Taylor-Robinson, D. (1984). Chlamydial infections, Orion Diagnostica, 1984.
- Mårdh, P. A. et Weström, L. (1984). Factors that might influence the outcome of studies on the etiology and epidemiology of acute pelvic inflammatory disease. Scand. J. Gastroenterol. Suppl., 1984, Vol. 91, 73-86.
- Mc Clenaghan, M., Herring, A. J. et Aitken, I. D. (1984). Comparison of *Chlamydia psittaci* isolates by DNA restriction endonuclease analysis, Infec. Immun., Aug. 1984, Vol. 45, 384-389.
- Mc Cormack, W.M. (1986). Chlamydial infections in men. En : Chlamydial infections. Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D. et Ward, M. (eds.). Proceedings of the Sixth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Cambridge University Press., 1986, 251-254.
- Moulder, J. W., Levy, N. J. et Schulman, L. P. (1980). Persistent infection of mouse fibroblasts (L cells) with *Chlamydia psittaci* : evidence for a cryptic chlamydial form. Infect. Immun., 1980, Vol. 30, 874-883.

- Newhall, W. J. et Basinski, M. B. (1986). Purification and structural characterization of chlamydial outer membrane proteins. En : Chlamydial infections. Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D. et Ward, M. (eds). Proceedings of the Sixth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Cambridge University Press, 1986, 93-96.
- Nurminen, W., Wahlström, E., Kleemola, M., Leinonen, M., Saikku, P. et Mäkelä, P.H. (1984). Infect. Immun., 1984, Vol. 44, 609-613.
- Oriel, J. D., Reeve, P., Powis, P. et al. (1972). Chlamydial infection: isolation of Chlamydia from patients with nonspecific genital infection. Br. J. Vener. Dis., 1972, Vol. 48, 429-436.
- Paavonen, J., Saikku, P., von Knorring, J., Aho, K. et Wang, S. P. (1981). Association of infection with *Chlamydia trachomatis* with Fitz-Hugh-Curtis syndrome. J. Infect, Dis., 1981, Vol. 114, 176.
- Paavonen, J. et Vesterinen, E. (1982). Chlamydia trachomatis in cervicitis and urethritis in women. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 1982, Vol. 32, 45-54.
- Paavonen, J., Vesterinen, E., Meyer, B. et Saksela, E. (1982a). Colposcopic and histologic findings in cervical chlamydial infection. Obstet. Gynecol., Jun. 1982, Vol. 59, 712-714.
- Paavonen, J., Vesterinen, E. et Mardh, P. A. (1982b). Infertility as a sequelae of chlamydial pelvic inflammatory disease. Scand. J. Infect. Dis. Suppl., 1982, Vol. 32-73-79
- Pearce, J. H. et Prain, C. J. (1986). Intracellular association of Chlamydia psittaci with lysosomes during infection of Mc Coy cells. En : Chlamydial infections. Oriel, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D. et Ward, M. (eds). Proceedings of the sixth International Symposium on Human Chlamydial Infections, Cambridge University Press., 1986, 43-46.
- Peterson,, E. M. et de la Maza, L. M. (1983). Characterization of *Chlamydia* DNA by restriction endonuclease cleavage. Infect. Immun., 1983, Vol. 41, 604-608.
- Rees, E., Tait, I. A., Hobson, D. et Johnson, F. W. A. (1977). Chlamydia in relation to cervical infection and pelvic inflammatory disease. En : Nongonococcal urethritis and related infections. Holmes, K. K. et Hobson, D. (eds.), Am. Soc. Microbiol., Washington, D. C., 1977, 67-76.
- Richmond, S. J. (1985). Division and transmission of inclusions of *Chlamydia trachomatis* in replicating Mc Coy cell monolayers. FEMS Letters, 1985, Vol. 29, 49-52.
- Ridgway, G. L. et Path (1989). Congrès MST. Barcelone, 1989.
- Ridgway, G. L. et Path (1995). Azithromycin in the management of *Chlamydia trachomatis* infections. Intern. J. of STD & AIDS, 1996, 7 (Suppl. 1), 5-8.

Rodriguez, P., Vekris, A., Debarbeyrac, B., Dutti, H. B., Bonnet, J. et Bebear, C. (1991). Typing of *Chlamydia trachomatis* by restriction endonuclease analysis of the amplified major outer membrane protein gene. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, Vol. 29, 3-5.

- Salari, H. S. et Ward, M. E. (1981). Polypeptide composition of *Chlamydia trachomatis*. J. Gen. Microbiol., 1981, Vol. 123, 197-207.
- Sayada, C., Denamour, E., Xerri, B., Orfila, J., Catalan, F. et Elion, J. (1991). Rapid genotyping of the *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein by the polymerase chain reaction, FEMS Letters, 1991, Vol. 83, 73-78.
- Schachter, J., Holt, J., Goodner, E., Grossman, M., Sweet, R. et Mills, J. (1979). Prospective study of chlamydial infection in neonates. Lancet, 1979, Vol. 2, 377-380.
- Shatkin, A. A., Orlova, O. E., Popov, V. L., Beskina, S. R., Pankratova, V. N., Pogachova, I. F., Soldatova, S. I., Smirnova, N. S. et Shcherbakova, N. I. (1985). Persistent chlamydial infection in cell culture. Vestnik. Akad. Med. Sci. USSR, 1985, Vol. 3, 51-54.
- Siboulet, A., Catalan, F., Bohbot, J.M., Siboulet, A. (1987). Manuel des Maladies Sexuellement Transmissibles. Ed. Masson, S.A., 1987.
- Sompolinski, D. et Richmond, S. (1974). Growth of *Chlamydia trachomatis* in Mc Coy cells treated with cytochalasine B. Appl. Microbiol., 1974, Vol. 28, 912-914.
- Storz, J. (1971.). *Chlamydia and chlamydia-induced diseases*. Springfield, Illinois. C. C-Thomas, 1971.
- Svensson, L., Weström, L. et Mardh, P. A. (1981). Acute salpingitis with *Chlamydia trachomatis* isolated from the fallopian tubes : clinical, cultural and serological findings. Sex. Transm. Dis., 1981, Vol. 8, 51-55.
- Tang, F.T., Chang, H.L., Huang Y.T. et Wang, K.C. (1957). Studies on the aetiology of trachoma with special reference to isolation of the virus in chick embryo. clin. Med. J., 1957, Vol. 75, 429-447.
- Tipple, M. A., Beem, M. O. et Saxon, E. B. (1979). Caractéristiques cliniques de la pneumonie non fébrile associée à une infection à *Chlamydia trachomatis* chez les nourissons de moins de 6 mois. Pediatrics, 1979, Vol. 7, 103-108.
- Thelin, I. et al. Contact tracing in patients with genital chlamydial infection. Br. J. Vener. Dis., 1980, 56, 259.
- Thygeson, P. et Stone Jr, W. (1942). Epidemiology of inclusion conjunctivitis. Arch. Ophthalmol., 1942, Vol. 27, 91-122.
- Tullo, A. B. et al. (1981). The presentation and incidence of paratrachoma in adults. J. Hyg., 1981, Vol. 87, 63-69.
- Wadler, M. (1984). Pregnancy and the neonate. Br. Med. J., Feb. 1984, Vol. 288, 624-627.
- Wager, G. P., Martin, D. H. et Koutsky, L. (1980). Puerperal infections morbidity : relationship to route of delivery and to antepartum *Chlamydia trachomatis* infection. Am. J. Obstet. Gynecol., 1980, Vol. 138, 1028-1033.

Wahl, von (1911). Deutsche Medizinische Wochenschrift, 1911, Vol. 37, 118.

Wang, S. P. et Grayston, J. T. (1967). Pannus with expérimental trachoma and inclusion conjunctivitis agent infection of Taiwan monkeys. Am. J. Ophtalmol., 1967, Vol. 63 (part III), 1133-1145.

Wang, S. P. et Grayston, J. T. (1970). immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum and related organisms in a new microtiter indirect immunofluorescence test. Am. J. Ophtalmol., 1970, Vol. 70, 367-374.

Ward, M. E. (1986). Outstanding problems in chlamydial cell biology. En : Chlamydial infections. Oriol, D., Ridgway, G., Schachter, J., Taylor-Robinson, D. et Ward, M. (eds.). Proceedings of the Sixth International Symposium on Human chlamydial infections, Cambridge University Press, 1986, 3-14.

Wenman, W. M. et Meuser, R. U. (1986). Chlamydia trachomatis elementary bodies possess proteins which bind to eucaryotic cell membranes. J. Bacteriol., 1986, Vol. 165.

Xerri, B. (1991). Synthèse locale d'anticorps anti-chlamydiae dans les larmes après stimulation antigénique intestinale. Thèse doctorat en médecine, 1991.

Zorn, B., Abeille, J. P., Legros, R., Catalan, F., Ionesco, M. et De Brux, J. Liquide péritonéal et infection à Chlamydia trachomatis. Gynécologie, 1986, 37, 4, 286-294.

Nous remercions particulièrement le Docteur Antonia Maria Mari Tur, qui nous a permis de puiser dans sa thèse, soutenue en mai 1994 à Barcelone, des sources bibliographiques particulièrement riches.

In : *Contribucion al estudio de las enfermedades de transmisión sexual producidas por chlamydia trachomatis. (I. aportación bibliográfica)*. Antonia Maria Mari Tur - 1994

Cahiers de formation déjà parus

- | | |
|--------------------------------------|---------------------------------------|
| N° 1 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 15 : <i>DÉPISTAGE</i> |
| N° 2 : <i>IMMUNOANALYSE</i> | <i>DE LA TRISOMIE 21</i> |
| N° 3 : <i>PARASITOLOGIE</i> | N° 16 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (2)</i> |
| N° 4 : <i>BACTÉRIOLOGIE</i> | N° 17 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 5 : <i>HORMONOLOGIE</i> | <i>A (VHA) et E (VHE)</i> |
| <i>GAZOMÉTRIE</i> | N° 18 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> |
| N° 6 : <i>G.B.E.A.</i> | <i>TOME II</i> |
| N° 7 : <i>IMMUNO-ALLERGIE (1)</i> | N° 19 : <i>VAGINITES ET VAGINOSES</i> |
| N° 8 : <i>HÉMOGLOBINES GLYQUÉES</i> | N° 20 : <i>HÉMOSTASE ET THROMBOSE</i> |
| <i>LIPIDES</i> | N° 21 : <i>VIRUS DES HÉPATITES</i> |
| N° 9 : <i>DOSAGE DES MÉDICAMENTS</i> | <i>B (VHB), DELTA (VDH),</i> |
| <i>TOME I</i> | <i>C (VHC), AUTRES</i> |
| N° 10 : <i>HÉMATOLOGIE</i> | N° 22 : <i>SYNDROME</i> |
| <i>CAS ILLUSTRÉS</i> | <i>DES ANTI-PHOSPHOLIPIDES</i> |
| N° 11 : <i>AMIBES ET FLAGELLÉS</i> | N° 23 : <i>PARASITES SANGUINS</i> |
| <i>INTESTINAUX</i> | N° 24 : <i>BIOCHIMIE PEDIATRIQUE</i> |
| N° 12 : <i>LES MALADIES A PRIONS</i> | N° 25 : <i>LES MOISSISSURES</i> |
| N° 13 : <i>AUTOIMMUNITÉ</i> | <i>D'INTÉRÊT MÉDICAL</i> |
| <i>ET AUTOANTICORPS</i> | |
| N° 14 : <i>L'EXPLORATION</i> | |
| <i>DE LA THYROÏDE</i> | |

BIOFORMA est la structure nationale qui gère et organise la formation continue conventionnelle des directeurs et directeurs adjoints de L.a.b.m. privés.

Cette formation continue est financée par les trois Caisses Nationales de l'Assurance Maladie (C.N.A.M.T.S., C.C.M.S.A., et C.A.N.A.M.) dans le cadre de la convention passée entre elles et les trois syndicats de biologistes. (S.d.B., S.N.M.B., et S.L.B.C.).

A ce titre, BIOFORMA édite des cahiers de formation comme celui-ci.

Ces ouvrages sont distribués à chaque laboratoire d'analyse de biologie médicale, privés et hospitaliers, aux inspecteurs des DRASS, aux pharmaciens et médecins conseils des CRAM, aux responsables de la DGS et du Ministère de la Santé. Les précédents numéros, ou épuisés en version papier, seront disponibles à la consultation sur le site Internet www.bioforma.net à partir de 2002.

Ces livres ne sont pas en vente dans le commerce et le tirage est de 6 500 exemplaires.