

Diagnostic d'une infection uro-génitale à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique

Farida HAMDAD, Jeanne ORFILA

Laboratoire de Bactériologie Hygiène, CHU, Amiens, France

RÉSUMÉ

L'infection uro-génitale à *Chlamydia trachomatis* est pauci ou asymptomatique et peut affecter un sujet masculin ou féminin qui transmet cette bactérie à son partenaire sexuel sans le savoir. L'infection persiste à bas bruit pendant plusieurs mois et peut être à l'origine chez l'homme de complications telles que la prostatite et l'épididymite.

Au cours d'une infection persistante, la charge bactérienne est faible ce qui complique le diagnostic biologique. La culture cellulaire et les techniques classiques de détection des antigènes peuvent être négatives, ce qui implique l'utilisation des techniques de détection des acides nucléiques avec amplification génique associée éventuellement à un diagnostic sérologique. Une activation du système immunitaire local et systémique aboutit à la synthèse des anticorps anti-*C. trachomatis* qui sont détectés dans les sécrétions locales et dans le sérum.

Les techniques amplification génique ont amélioré le diagnostic des infections à *C. trachomatis* en permettant sa détection d'une part dans des circonstances cliniques peu explorées telles que l'infection asymptomatique et l'hypofertilité et d'autre part dans des prélèvements jusqu'alors inadaptes aux méthodes classiques.

Le principal avantage de ces techniques est sans doute qu'elles s'adaptent à tous les prélèvements (urines, spermes et tous les liquides biologiques). Ce sont également des méthodes très spécifiques et très sensibles puisqu'elles amplifient un petit nombre d'acides nucléiques présents dans le prélèvement.

Les techniques d'amplification génique se sont suffisamment affinées ces dernières années, pour qu'elles soient aujourd'hui considérées comme des outils de diagnostic de routine.

Mots clés : *Chlamydia trachomatis*, diagnostic direct, prélèvements non invasifs, technique d'amplification génique.

L'infection uro-génitale à *Chlamydia trachomatis* est la plus fréquente des infections sexuellement transmissibles (IST) d'étiologie bactérienne. Elle atteint particulièrement l'homme jeune et la femme en âge de procréer, constituant ainsi un véritable problème de santé publique dans le monde entier.

Les facteurs de risque incluent le jeune âge (15-34 ans), la multiplicité des partenaires sexuels et la non utilisation de préservatif.

La complexité de la physiopathologie de ces infections rend le diagnostic biologique difficile. Celui-ci repose, comme pour toute maladie infectieuse, sur un diagnostic direct (détection de la bactérie, de ses antigènes ou des acides nucléiques) et sur un diagnostic indirect avec mise en évidence des anticorps.

La fréquence de détection de *C. trachomatis* au niveau des voies génitales varie beaucoup selon les méthodes de diagnostic utilisées [8, 11, 12].

La nature de l'infection et la faible sensibilité des tests classiques de diagnostic direct ont entraîné une sous estimation de la prévalence des infections surtout chez l'homme durant de nombreuses années.

Grâce aux techniques d'amplification, il a été précisé que l'homme était le principal réservoir de germes et que la transmission se fait principalement dans le sens homme-femme [26].

RAPPEL BACTERIOLOGIQUE

Le genre *Chlamydia* comprend principalement trois espèces; *C. trachomatis*, *C. pneumoniae*, *C. psittaci*. Seul l'espèce *C. trachomatis* est responsable d'IST et de la lymphogranulomatose vénérienne (LGV).

Bactéries intracellulaires obligatoires, elles se présentant sous forme de corps élémentaires (CE) ou de corps réticulés (CR) selon l'étape de leur cycle de développement. Les CE représentent la forme mature des *Chlamydia*. Ils constituent la seule forme infectieuse de la bactérie et existent en situation extra et intracellulaire. Les CE infectieux sont métaboliquement inertes et sont résistants dans un milieu extracellulaire. Ils sont assimilés aux spores bactériennes.

Seuls les CE extracellulaires sont capables d'infecter une cellule saine et l'internalisation s'achève par la formation d'une inclusion dans le cytoplasme de la cellule hôte. La multiplication intracellulaire représente un événement crucial dans la physiopathologie de l'infection.

Manuscrit reçu : juillet 2005, accepté : juillet 2005

Adresse pour correspondance : Adresse: Laboratoire de Bactériologie-Hygiène, CHU d'Amiens, Place Victor Pauchet, 80054 Amiens Cedex 1

e-mail : Hamdad-Daoudi.Farida@chu-amiens.fr

Ref : HAMDAD F, ORFILA J. Prog. Urol., 2005, 15, 598-601

Les principaux antigènes structuraux de la paroi et de la membrane externe sont représentés par le lipopolysaccharide (LPS), la protéine majeure de la membrane externe (PMME) et les protéines de choc thermique (Hsp). Ces antigènes jouent un rôle fondamental dans le diagnostic biologique direct et indirect des infections à Chlamydia.

MANIFESTATIONS CLINIQUES

Parmi les 19 sérovars (sérotypes) connus de *C. trachomatis*, les sérovars D à K ont un tropisme uro-génital marqué.

Les infections génitales basses : Les urétrites

L'infection à *C. trachomatis* se manifeste chez l'homme, dans la majorité des cas par une urérite subaiguë avec dysurie et goutte matinale (le plus souvent limpide), plus rarement par une urérite aiguë mais, elle reste asymptomatique dans 60 à 80 % des cas [16, 25]. Le risque est en absence de diagnostic et de traitement, l'extension de l'infection vers les voies uro-génitales hautes. L'urérite asymptomatique est un véritable réservoir de germes.

La prévalence en France chez l'homme symptomatique et asymptomatique est respectivement de 13 et 4,4 % [9].

Les infections génitales hautes

Les infections chroniques du tractus génital haut, plus sournoises, peuvent entraîner des altérations tissulaires, fonctionnelles et générer une réponse immune intense. Plusieurs auteurs ont montré une relation entre des antécédents d'infections uro-génitales basses symptomatiques ou asymptomatiques et l'apparition ultérieure d'une hypofertilité masculine [10, 22].

La prostatite

C. trachomatis pourrait être à l'origine de prostatite chez le sujet jeune en relation avec une IST [19, 25], mais le rôle de *C. trachomatis* reste encore discuté bien que la bactérie ait été isolée de biopsies prostatiques [24] et que son ADN ait été mis en évidence dans les sécrétions prostatiques et l'urine après massage prostatique [4, 8, 13]. Des corps miniatures (formes persistantes de *C. trachomatis*) ont également été observés en microscopie électronique dans les sécrétions prostatiques et dans l'éjaculat total de patients ayant une prostatite chronique.

L'épididymite

Chez le sujet de moins de 35 ans, l'épididymite est la complication survenant dans 0,5 à 3% des urétrites à *C. trachomatis* [27].

Histologiquement elle se caractérise par une destruction minimale et une réaction inflammatoire prédominant au niveau péri-canaulaire et intra-épithélial pouvant être la cause d'une hypofertilité chez l'homme [14]. L'importance de cette infection, a été démontrée par des études sérologiques. Cependant, ces études sont peu nombreuses [8, 20].

Chlamydia et hypofertilité masculine

Cliniquement et physiologiquement il existe un lien entre les agents pathogènes et les urétrites, entre l'urérite et l'épididymo-orchite et entre l'épididymo-orchite et l'hypofertilité. Néanmoins, le rôle de *C. trachomatis* dans l'hypofertilité masculine reste encore controversé [3, 18].

L'infection du sperme a un rôle néfaste sur la fertilité; au niveau des voies génitales (obstruction des canaux éjaculateurs), du plasma

séminal (perturbations biochimiques) et au niveau des spermatozoïdes (mobilité) [3, 6]. En effet, l'infection à *C. trachomatis* provoque une baisse de la mobilité des spermatozoïdes et une augmentation des formes anormales (flagelles enroulés) [6, 15].

Des observations au microscope électronique ont montré que les *Chlamydia* se fixent sur les spermatozoïdes, pénètrent dans ces derniers et se fixent près de l'acrosome, où elles peuvent accomplir leur cycle de développement [7]. A ce niveau, les *Chlamydia* se développent et détournent à leur profit le métabolisme énergétique des spermatozoïdes. La diminution de la quantité d'énergie des spermatozoïdes au profit des *Chlamydia* pourrait engendrer une réduction de la mobilité des spermatozoïdes infectés.

Quoi qu'il en soit, la présence de *C. trachomatis* au niveau de l'appareil uro-génital masculin constitue un risque de contamination féminine et donc un risque d'hypofertilité tubaire.

DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE D'UNE INFECTION A *C. TRACHOMATIS*

Diagnostic direct

L'isolement de la bactérie par culture cellulaire est la technique la plus spécifique. Cependant, elle reste très spécialisée, longue et coûteuse et de moins en moins utilisée.

Des tests de diagnostic direct rapides comme l'immunofluorescence directe (IFD), les techniques immuno-enzymatiques (EIA) et apparentées ont été développés et appliqués à la détection des antigènes de la bactérie.

La plupart de ces méthodes de diagnostic direct ne sont pas adaptées aux prélèvements non invasifs comme les urines et le sperme et sont de moins en moins utilisées en raison de leur faible sensibilité.

Les techniques de détection des acides nucléiques et en particulier les techniques d'amplification génique apportent une contribution nouvelle au diagnostic de ces infections.

Prélèvements

Les procédés diagnostiques les plus modernes restent tributaires de la qualité des prélèvements. Etant donné le caractère intracellulaire des *Chlamydia*, les prélèvements doivent contenir des cellules quelle que soit la technique de diagnostic utilisée.

Prélèvement urétral

L'urètre antérieur est le site préférentiel de prélèvement dans les cas d'urétrites non ou post-gonococciques.

Ce prélèvement doit être réalisé avant la première miction du matin ou respecter un délai de trois heures par rapport à la miction précédente. Le jet urinaire provoque un lavage de l'urètre et une élimination des cellules infectées qui est à l'origine d'une diminution de la sensibilité de la plupart des tests classiques de diagnostic direct.

Urines du premier jet

Actuellement, les techniques d'amplification génique ont rendu possible la recherche de *C. trachomatis* dans "l'urine du premier jet", ce qui constitue une importante avancée.

Chez l'homme, ce prélèvement non invasif convient aussi bien chez le sujet symptomatique qu'asymptomatique et évite ainsi les prélèvements urétraux, traumatisants et mal tolérés. Le premier jet (10 à 30 ml) des premières urines du matin représente le prélèvement le mieux adapté. Ce premier jet urinaire permet de récupérer des cel-

lules épithéliales infectées de l'urètre.

Le recueil est réalisé dans un pot stérile et surtout sans toilette préalable.

Sécrétions prostatiques, urines après massage prostatique (UMP) et sperme

Les sécrétions prostatiques sont recueillies spontanément par écouvillonnage urétral ou dans une quantité minimale d'urine après un massage de deux à trois minutes des deux lobes et de la partie médiane de la glande. Le massage prostatique doit être effectué après une vidange vésicale et permet la libération des bactéries ou de ses antigènes [1, 5].

Le sperme est obtenu après masturbation. La recherche de *C. trachomatis* dans le sperme peut s'inscrire dans le cadre de l'exploration d'une hypofertilité du couple.

La mise en évidence de la bactérie dans ce type de prélèvement (urines, spermes, UMP) est pratiquement impossible en culture cellulaire (cytotoxicité des prélèvements) et seules les techniques d'amplification génique sont validées [8, 11, 13].

Biopsies prostatiques: Grâce aux techniques d'amplification géniques, ces prélèvements invasifs peuvent être remplacés par les sécrétions prostatiques.

Méthodes de détection de *C. trachomatis* par amplification

Depuis le milieu des années 90, des techniques d'amplification génique se sont développées. Elles sont très sensibles (86 et 96%) et très spécifique (> 99,5).

Ces méthodes amplifient soit un gène de l'ADN chromosomique de la bactérie; le gène *omp1* codant la PMME, soit l'ARNr présent à raison de 1000 copies par bactérie, soit une séquence de l'ADN extra chromosomique (plasmide) spécifique de *C. trachomatis* présent chez 98% des souches à raison de 10 copies environ par bactérie.

Théoriquement, les techniques qui amplifient l'ARNr possèdent une plus grande sensibilité que les tests d'amplification qui détectent le plasmide ou le gène de la PMME. Cependant, l'ARNr est plus fragile que l'ADN ce qui peut affecter la sensibilité des tests.

Cinq techniques sont commercialisées en France dont trois largement utilisées :

- PCR Amplicor™ Roche Diagnostic,
- LCx-TTM Abbott (LCR),
- Amplified CTTM bio-Mérieux-GenProbe (TMA).

La PCR (Polymerase Chain Reaction) et la LCR (Ligase Chain Reaction) amplifient un segment du plasmide. La TMA (Transcription Mediated Amplification) amplifie l'ARNr après une transcription inverse en ADN complémentaire (ADNc).

L'introduction des automates d'amplification et de détection a permis à beaucoup de laboratoires d'introduire ces technologies en routine.

Très récemment les trousse de LCx™CTT Abbott ont été retirées du marché français et ont été remplacées par une trousse d'amplification en temps réel utilisant une sonde TaqMan

“RealArt™ *C. trachomatis* PCR Reagents”. Cette PCR quantitative amplifie une séquence très conservée de la région III du gène de la PMME.

La PCR en temps réel permet de quantifier les produits d'amplification [23]. L'avantage de cette PCR est sa rapidité, sa spécificité et sa capacité de produire des résultats quantitatifs. Ce sont des techniques qui ont un avenir prometteur pour le diagnostic rapide et la compréhension de la physiopathologie des infections à *Chlamydia*.

Bien qu'étant plus sensibles que la culture cellulaire et l'immunofluorescence directe, les techniques d'amplification génique sont tributaires des inhibiteurs qui peuvent être présents dans les prélèvements et dont la nature n'est pas connue mais, les urines en contiennent très peu en raison de l'effet de dilution [2].

Un résultat négatif par amplification génique n'exclut pas un diagnostic positif surtout si l'examen a été pratiqué chez un patient symptomatique et à haut risque d'infection. Les résultats dépendent de l'absence d'inhibiteurs et de la présence de la cible moléculaire étudiée (plasmide).

Diagnostic indirect: sérologique

La recherche des anticorps est un témoin plus tardif de l'infection et peut se positiver lorsque les voies génitales hautes sont infectées. Le diagnostic sérologique est très utile lors des infections hautes; le stade atteint par la maladie est lié à une diminution des bactéries et une augmentation de la réponse immune.

Le dosage systématique des Ig G et Ig A permet classiquement de distinguer les infections anciennes avec persistance des anticorps, des infections actives où les Ig G et les Ig A ont des taux élevés [13]. Les Ig A ont une demi-vie courte et leur détection serait en faveur d'une infection en évolution. Pour le moment, aucun consensus n'est acquis quant à leur intérêt.

CONCLUSION

L'utilisation des techniques d'amplification génique a significativement amélioré le diagnostic des infections à *C. trachomatis*. A l'heure actuelle le diagnostic biologique est réalisé essentiellement avec ces techniques sur les urines du premier jet, les sécrétions prostatiques et éventuellement sur le sperme. Le prélèvement endourétral n'a plus lieu d'être en pratique clinique.

Les techniques d'amplification génique sont également largement utilisées dans les programmes de dépistage avec la possibilité de recourir à des prélèvements non invasifs qui sont mieux acceptés par les sujets.

Ces techniques ont permis de confirmer la fréquence élevée des infections asymptomatiques, la prévalence élevée chez l'homme et d'apprécier l'existence et la fréquence des infections récurrentes et/ou persistantes.

REFERENCES

1. ASKIENAZY-ELBHAR M., DOLIVO M., IZARD V., JARDIN A., SOUFIR J.C., AUROUX M., KUNSTMANN J.M., HENRY-SUCHET J. : Infection génitale à *Chlamydia trachomatis* chez l'homme et retentissement sur la fécondité. *Andrologie*, 1994 ; 4 : 425-433.
2. BERG E.S., ANESTAD G., MOI H., STORVORLD G., ETAUG K. : False negative results of ligase chain reaction assay to detect *Chlamydia trachomatis* due to inhibitors in urine. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1997 ; 16 : 727-731.
3. CLOSE C.E., WANG S.P., ROBERTS P.L., BERGER R.E. : The relationship of infection with *Chlamydia trachomatis* to the parameters of male fertility and sperm auto-immunity. *Fertil. Steril.*, 1987, 48 : 880-883.

4. CORRADI G.Y., BUCSEK M., PANOVIĆ J., VEREBELI A., KARDOS M., KADAR A., FRANG D. : Detection of *Chlamydia trachomatis* in the prostate by in-situ hybridization and by transmission electron microscopy. *Int. J. Androl.*, 1996 ; 19 : 109-112.
5. DOLIVO M., ASKIENAZY-ELBHAR M. : Intérêt du massage prostatique pour la mise en évidence de *Chlamydia trachomatis* dans l'urètre masculin. *Contracept. Fertil. Sex.*, 1993 ; 21 : 41-44.
6. DIQUELOU J.Y., PASTORINI E., FENEUX D., GICQUEL J.M. : Le rôle de *Chlamydia trachomatis* dans la survenue de mouvements anormaux des spermatozoïdes. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod.*, 1989 ; 18 : 615-625.
7. ERBENGI T. : Ultrastructural observations on the entry of *Chlamydia trachomatis* into human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, 1993 ; 8 : 416-421.
8. GDOURA R., DAOUDI F., BOUZID F., BEN SALAH F., CHAIGNEAUX C., SUEUR J.M., EB F., REKIK S., HAMMAMI A., ORFILA J. : Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen and urethral specimens from male members of infertile couples in Tunisia. *Eur. J. Contracept Reprod Health*, 2001 ; 6 : 14-20.
9. GOULET V., LAURENT E., BIANCHI A. : Les Chlamydioses uro-génitales en France en 1997. *Reseau RENACLA. B. E. H.* 1999 ; 16 : 61-63.
10. GREENDALE G.A., HAAS S.T., HOLBROOK K., WALSH B., SCHACHTER J. and PHILLIPS R.S. : The relationship of *Chlamydia trachomatis* infection and male infertility. *Am. J. of Public Health*, July 1993 ; 83 : 996-1001.
11. HAMDAD F. : Diagnostic d'une infection à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique. [Thèse de Science]. Amiens Université de Picardie. Faculté de Médecine. 2003 : 1-232.
12. HAMDAD-DAOUDI F., ORFILA J., EB F. : Infections uro-génitales masculine à *Chlamydia trachomatis* : Vers une meilleure approche diagnostique. *Andrologie* 2004 ; 14 : 206-215.
13. HAMDAD-DAOUDI F., PETIT J., EB F. : Assessment of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic male partners of infertile couples. *J. Med. Microbiol.*, 2004 ; 53 : 985-990.
14. HORI S., TSUTSUMI Y. : Histological differentiation between chlamydial and bacterial epididymitis : non destructive and proliferative versus destructive and abscess forming immunohistochemical and clinic pathological findings. *Hum. Pathol.*, 1995 ; 26 : 402-427.
15. HOSSEINZADEH S., BREWIS I.A., ELEY A., PACEY A.A. : Co-incubation of human spermatozoa with *Chlamydia trachomatis* serovar E causes premature sperm death. *Hum. Reprod.*, 2001 ; 16 : 293-299.
16. JANIER M., LASSAU F., CASIN I., GRILLOT P., SCIEUX C., ZAVARO A., CHATANG C., BIANCHI A., MOREL P. : Male urethritis with and without discharge : a clinical and microbiological study. *Sex. Transm. Dis.*, 1995 ; 22 : 244-252.
17. KRIEGER J.N., RILEY D.E., ROBERTS M.C., BERGER R.E. : Prokaryotic DNA sequence in patients with chronic idiopathic prostatitis. *J. Clin. Microbiol.*, 1996 ; 34 : 3120-3128.
18. MUNOZ M.G., WITKIN S.S. : Auto-immunity to spermatozoa, asymptomatic *Chlamydia trachomatis* genital tract infection and T lymphocytes in seminal fluid from the male partners of couples with unexplained infertility. *Hum. Reprod.*, 1995 ; 10 : 1070-1074.
19. MUTLU N., MUTLU B., CULHA M., HAMSIOGLU Z., DEMIRTAS M., GOKALP A. : The role of *Chlamydia trachomatis* in patients with non-bacterial prostatitis. *Int. Journal of Clinical Practis*, 1998 ; 52 : 540-541.
20. OCHSENDORF F.R., OZDEMIR K., RABENAU H., FENNER T., OREMEK R., MILBRADT R., DOERR H.W. : *Chlamydia trachomatis* and male infertility : Chlamydia- IgA antibodies in seminal plasma are *Chlamydia trachomatis* specific and associated with an inflammatory response ? *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 1999 ; 12 : 143-152.
21. OSTASZEWSKA I., ZDRODOWSKA-STEFAKOW B., BADA J., PUCILO K., TRYBULA J., BULHAK V. : *Chlamydia trachomatis* : probable cause of prostatitis. *Intern. J. of STD and AIDS*, 1998 ; 9 : 350-353.
22. PAAVONEN J., EGGERT-KRUSE W. : *Chlamydia trachomatis* : impact on human reproduction. *Hum. Reprod.*, 1999 ; 5 : 433-447.
23. POITRAS E., HOUDE A. : La PCR en temps réel : principes et applications. *Rev. Biol. Biotech.*, 2002 ; 2 : 2-11.
24. POLETTI F., MEDICI M.C., ALINOVI A., MENOZZI M.G., SACCHINI P., STAGNI G., TONI M., BENOLDI D. : Isolation of *Chlamydia trachomatis* from the prostatic cells in patients affected by nonacute bacterial prostatitis. *J. Urol.*, 1985 ; 134 : 691-693.
25. STAMM W.E., KOUTSKY L.A., BEDEBETTI J.K., JOURDEN J.L., BRUNHAM R.C., HOLMES K.K. : *Chlamydia trachomatis* urethral infections in men. Prevalence, risk factors and clinical manifestations. *Annals of Internal Medicine*, 1984 ; 100 : 47-51.
26. STAMM W.E. : *Chlamydia trachomatis* - The persistent Pathogen. Thomas Parran Award Lecture. *Sex. Trans. Dis.*, 2001 ; 28 : 684-689.
27. ZDRODOWSKA-STEFAKOW B., OSTASZEWSKA I., DAREWICZ B., PUCILO K., BULHAK V & SZCZURZEWSKI M. : Role of *Chlamydia trachomatis* in epididymitis. Part I : direct and serologic diagnosis. *Med. Sci. Monit.*, 2000 ; 6 : 1113-1118.

SUMMARY

Diagnosis of urogenital infection by *Chlamydia trachomatis*. Contribution of genetic amplification techniques.

The majority of patients with Chlamydia trachomatis infection are not aware of their infection because they do not have symptoms. Therefore, infected individuals may not be identifiable, and chlamydial infection in men may persist for long periods, and can lead to complications such as epididymitis and prostatitis. The large group of asymptotically infected patients is not only at risk of long term sequelae but also sustains transmission within communities. In asymptomatic and in chronic or persistent chlamydial infections, the level of Chlamydia is very low, and consequently chlamydial infections have never been easy to diagnose.

The diagnosis may be based on cell culture, direct detection bacterial antigens, the nucleic acid amplification tests (NAATs) which have become the method of choice, and on the evaluation of antibody titers against various antigenic constituents. Both systemic and local antibodies in secretions can be detected in C. trachomatis. infection.

The introduction of assays based on amplification of genetic material has subsequently increased the sensitivity of detecting chlamydial infections and offer the opportunity to use non invasive specimens such as first void urine and semen to screen infections either in asymptomatic subjects or male partners of infertile couples.

Cell culture or direct detection of bacterial antigens cannot be used for semen and urine samples and are not sensitive enough to rule out infections.

Advantages of NAATs are the ability to detect even a small amount of organisms. This enables a high detection rate for C. trachomatis in symptomatic patients, in asymptomatic individuals with a low number of elementary bodies, and diagnosis of persistent infections.

Key words : Chlamydia trachomatis, direct diagnosis, non invasive tests, genetic amplification techniques.