

# Infection uro-génitale masculine à *Chlamydia trachomatis* : Vers une meilleure approche diagnostique

Farida HAMDAD- DAOUDI, Jeanne ORFILA, François EB

Laboratoire de Bactériologie- Hygiène, CHU d'Amiens. Amiens

## RESUME

Les *Chlamydia* sont des bactéries intracellulaires responsables principalement d'infections sexuellement transmissibles (IST). Ces infections sont très souvent asymptomatiques et constituent un risque important de complications et de transmission. Le diagnostic direct d'une infection symptomatique à *Chlamydia trachomatis* peut être réalisé par la mise en évidence de la bactérie vivante par culture cellulaire, de ses antigènes par immunofluorescence directe (IFD) ou par les techniques immunoenzymatiques et apparentées, de ses acides nucléiques par hybridation moléculaire ou par amplification génique. Au cours d'une infection asymptomatique, chronique ou persistante, la charge bactérienne est faible et les bactéries sont très souvent non cultivables et expriment des antigènes différents. La culture cellulaire et les techniques habituelles de mise en évidence des antigènes peuvent être négatives, ce qui implique l'utilisation des techniques de détection des acides nucléiques avec amplification associée éventuellement à un diagnostic sérologique.

L'utilisation des techniques d'amplification a considérablement amélioré le diagnostic direct des infections à *Chlamydia* et offre, en plus, l'opportunité d'utiliser des prélèvements non invasifs (urine du premier jet, sperme) pour le dépistage des sujets asymptomatiques.

**Mots clés** : *Chlamydia trachomatis*, infections uro-génitales, diagnostic biologique, prélèvements non invasifs, amplification génique

## I. INTRODUCTION

Les infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis* ont une répartition mondiale.

Ces infections ont été reconnues comme un problème de santé publique majeur en raison des complications qu'elles engendrent. Elles sont aujourd'hui au premier rang des infections sexuellement transmissibles (IST) avec une estimation de 92 millions de nouveaux cas chaque année dans le monde [54]. Ce nombre est certainement sous estimé, particulièrement chez les hommes qui subissent moins de dépistage que les femmes [45]. Les glandes sexuelles annexes, chez l'homme, jouent un rôle de réservoir de germes et augmentent la probabilité de contamination féminine [15, 43].

L'incidence est variable suivant les populations, l'activité sexuelle et l'âge. Les facteurs de risque incluent le jeune âge (15-34 ans), la multiplicité des partenaires sexuels, la non utilisation de préservatif.

Les infections à *C. trachomatis* évoluent selon deux modes, aigu et chronique ce qui soulève la question de la persistance de la bactérie malgré la réponse immune de l'hôte et une antibiothérapie active [2].

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 de ses acides nucléiques) et sur un diagnostic indirect avec mise en évidence des anticorps. A l'heure actuelle, deux questions se posent :

Correspondance :

Dr Farida HAMDAD-DAOUDI - Laboratoire de Bactériologie- Hygiène, CHU d'Amiens, Place Victor Pauchet, 80054 Amiens Cedex 1. - Tel. 03.22.66.84.30 - Fax 03.22.66.84.98 - Email Hamdad-Daoudi.Farida@chu-amiens.fr

1- Quelles sont les méthodes de diagnostic direct les plus fiables ?

2- Quel test choisir en fonction :

i) du contexte clinique ;

ii) du prélèvement à étudier ;

iii) de la rapidité du résultat désirée.

Des traitements antibiotiques efficaces et peu coûteux sont disponibles, mais la difficulté diagnostique fait que ces infections très souvent asymptomatiques restent non traitées.

## II. PHYSIOPATHOLOGIE DE L'INFECTION

### A *C. TRACHOMATIS*

Les *Chlamydia* ont un tropisme marqué pour les cellules épithéliales des muqueuses.

Bactéries intra-cellulaires obligatoires, les *Chlamydia* se présentent sous forme de corps élémentaires (CE) ou de corps réticulés (CR) selon l'étape de leur cycle de développement. 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.

Au cours d'une infection à *Chlamydia*, la réaction inflammatoire déclenchée par le lipopolysaccharide (LPS) est suivie de l'apparition d'une réaction immunitaire humorale et cellulaire. Une activation du système immunitaire local et systémique aboutit à la synthèse des anticorps anti- *C. trachomatis* détectés dans les sécrétions locales et dans le sérum, mais c'est le système lymphocytaire qui joue le rôle le plus important. Ces réactions peuvent soit limiter soit éradiquer une infection aiguë mais, dans certains cas, apparaît une infection chronique et persistante.

La persistance de l'infection se manifeste par des modifications morphologiques des CE et des modifications d'expression d'antigènes chlamydiens avec une synthèse continue de Heat shock protein (Hsp), un antigène immunopathogène et une réduction de la synthèse de la protéine majeure de la membrane externe (PMME), un antigène qui induit la formation d'anticorps protecteurs.

Les phagocytes non professionnels (cellules épithéliales) infectés par les *Chlamydia* produisent des substances pro-inflammatoires (chimiokines, cytokines, facteurs de croissance et autres médiateurs cellulaires). L'interféron gamma (INF $\gamma$ ) inhibe l'infectiosité des *Chlamydia* [35], la quantité de bactéries diminue mais quelques corps persistent et continuent d'entraîner des réactions inflammatoires. Ces réactions sont nécessaires et suffisantes pour provoquer des infections chroniques et des inflammations intenses conduisant à la destruction tissulaire à l'origine des séquelles telle que l'hypofertilité. Ces complications surviennent après une longue persistance du microorganisme ou plusieurs réinfections [17].

## III. MANIFESTATIONS CLINIQUES (Tableau 1)

Parmi les 18 sérovars (sérotypes ou types antigéniques) connus de *C. trachomatis*, les sérovars D à K ont un tropisme uro-génital marqué. L'influence du sérovar sur le développement de l'infection uro-génitale n'est pas claire [6]. Les sérovars dominants isolés en Europe et en Amérique du Nord sont les sérovars E (50%), F (20%) et D (10%).

Chez l'homme *C. trachomatis* est responsable de la grande majorité des urétrites non gonococciques et post-gonococciques qui peuvent se compliquer par des épидидymites et par voie de conséquence d'une hypofertilité. Cependant l'hypofertilité due aux IST à *C. trachomatis* est plus communément décrite chez la femme que chez l'homme.

### 1. Les infections génitales basses : Les urétrites

L'urétrite à *C. trachomatis* peut-être secondaire à une urétrite gonococcique. L'urétrite non spécifique est le terme qui désigne l'infection sexuellement transmissible non gonococcique.

Après une période d'incubation de 10 à 20 jours, l'urétrite se caractérise par un prurit, des brûlures discrètes, une dysurie, un écoulement généralement discret renfermant des polynucléaires.

Dans 20 à 30% des cas, l'évolution peut se faire spontanément vers la guérison en une à trois semaines mais l'infection peut évoluer pendant des semaines rendant le sujet particulièrement dangereux quant à la contamination de ses partenaires sexuels. L'urétrite à *C. trachomatis* est asymptomatique dans 50% des cas et constitue un véritable réservoir de germe [27, 46]. En France, la prévalence chez l'homme asymptomatique est de l'ordre de 4,4 % et de 13% chez l'homme symptomatique [18].

### 2. Les infections génitales hautes

#### a) Les prostatites

La prostatite est l'apanage du sujet de plus de 50 ans et elle est volontiers chronique. Les principaux symptômes sont la douleur, des brûlures mictionnelles et de l'éjaculation. La cause la plus fréquemment reconnue chez les sujets âgés ou chez les sujets présentant une anomalie urétrale est classiquement les agents responsables d'infection de l'arbre urinaire plutôt que ceux des IST [10].

*C. trachomatis* pourrait être à l'origine de prostatites chez le sujet jeune en relation avec une IST [37, 40], mais le rôle de *C. trachomatis* reste discuté bien que la bactérie ait été isolée de biopsies prostatiques [31] et que l'ADN chlamydien ait été mis en évidence dans les sécrétions prostatiques et l'urine après massage prostatique [13, 16, 22, 23]. Des corps miniatures ont également été observés en microscopie électronique dans les sécrétions prostatiques et dans l'éjaculat total de patients ayant une prostatite chronique [13].

#### b) Les épидидymites

Chez l'homme de plus de 50 ans, l'épididymite est essen-

**Tableau 1 : Pouvoir pathogène de *Chlamydia trachomatis* [1].**

Sérovars	Infections aiguës	Complications / Infections chroniques
A → C	Kératoconjonctivite	Trachome cicatriciel, cécité
D → K	Infections sexuellement transmissibles <ul style="list-style-type: none"> <li>• chez la femme               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Cervicite</li> <li>- Urétrite</li> </ul> </li> <li>• Chez l'homme               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Urétrite</li> </ul> </li> <li>• Dans les deux sexes               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conjonctivites</li> </ul> </li> <li>• Nouveau-nés               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Conjonctivite</li> <li>- Pneumopathie</li> </ul> </li> </ul>	Endométrite, salpingite, GEU, infertilité tubaire, syndrome de Fitz-Hugh-Curtis  Epididymite, prostatite hypofertilité  Syndrome de Reiter, arthrite réactionnelle
L1 → L3	Lymphogranulomatose vénérienne	Trouble de drainage lymphatique

tiellement une complication de l'infection de l'arbre urinaire. Chez le sujet de moins de 35 ans, l'épididymite est la complication survenant dans 0,5 à 3% des urétrites à *Chlamydia* [24, 29, 57].

Les épидидymites à *Chlamydia* sont très souvent peu évocatrices mais, il faut noter la présence d'une masse évoquant une tumeur testiculaire [34, 39, 53]. Il semble que l'infection gagne l'épididyme par les voies déférentes et plus rarement par les voies lymphatiques.

Sur le plan histologique, l'épididymite à *C. trachomatis* se caractérise par une destruction minimale et une réaction inflammatoire prédominant au niveau péricanalaire et intra épithélial [25].

L'importance de cette infection, cause de stérilité chez l'homme, a été démontrée par des études sérologiques. Cependant, ces études sont peu nombreuses [38].

L'inoculation directe intra-épididymaire de *Chlamydia muridarum* (souche de *C. trachomatis* de la pneumonie de la souris) au rat Wistar provoque une épидидymite accompagnée d'une masse testiculaire similaire à celle observée chez l'homme [28].

Cette infection n'a pas l'attention qu'elle mérite comparée à l'inflammation pelvienne chez la femme.

### **c) *Chlamydia* et hypofertilité masculine**

Cliniquement et physiologiquement il existe un lien entre les agents pathogènes et les urétrites, entre l'urétrite et l'épididymo-orchite et entre l'épididymo-orchite et l'hypofertilité. Néanmoins, le rôle de *C. trachomatis* dans l'hypofertilité masculine est controversé [9, 16, 36, 41].

L'infection modifie le spermogramme et l'action directe de *C. trachomatis* sur la mobilité du spermatozoïde a été mise en évidence *in vitro* [26].

Une épидидymite expérimentale a été créée chez le rat par inoculation dans les canaux déférents et chez la souris par injection directe intra-épididymaire. Chez la souris, une diffusion de l'infection en amont et en aval de l'épididyme a été mise en évidence [20, 21].

L'étude de la fertilité des souris infectées a montré une baisse de la fécondité en rapport très probablement avec une diminution de la mobilité des spermatozoïdes et non par des lésions fibrosantes ou obstructives du canal épидидymaire [20, 21].

Même si le rôle de *C. trachomatis* chez l'homme est encore controversé, la présence de *C. trachomatis* au niveau de l'appareil urogénital masculin est un risque de contamination féminine et donc un risque d'hypofertilité tubaire [15, 16, 43].

### **3. La lymphogranulomatose vénérienne (LGV)**

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

Relativement fréquente dans les pays tropicaux et subtropicaux, elle peut s'observer dans les pays tempérés où il s'agit le plus souvent d'importation d'un pays endémique ou d'un contact avec des sujets venant d'un pays endémique.

La LGV ou maladie de Nicolas-Favre est due aux sérovars L1, L2, L2a, et L3 de *C. trachomatis* qui possèdent un tropisme ganglionnaire et réticulo-endothélial. Ces sérovars diffèrent des autres sérovars, par leur tendance à généraliser l'infection.

La tranche d'âge présentant le plus de risque se situe entre 20 et 40 ans.

Les lésions primaires génitales ou anales sont ulcérées et transitoires. La LGV peut se compliquer de lymphadénite, rectite, fistule et évoluer vers la chronicité.

#### 4. La proctite

Elle peut être due aux sérovars D à K ou L1 à L3. Elle est l'apanage des hommes homosexuels. La proctite due aux sérovars D à K est asymptomatique ou peu symptomatique alors que celle due aux sérovars L1 à L3 est généralement plus grave.

#### 5. Syndrome de Fiessinger- Leroy- Reiter

Dans 70 à 80% des cas, l'antigène HLA B 27 objective un terrain prédisposant. Les patients possédant cet antigène sont plus susceptibles de développer le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter [32]. Ce syndrome est un rhumatisme inflammatoire aigu ou subaigu associé à une atteinte urétrale et conjonctivale.

*C. trachomatis* est l'un des agents habituels de ce syndrome. Ce syndrome est 20 fois plus fréquent chez l'homme que chez la femme [30].

Le tableau I résume les principales manifestations cliniques de *C. trachomatis*.

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

L'isolement de la bactérie par culture cellulaire est la technique la plus spécifique. Cependant, elle reste très spécialisée, longue et coûteuse. Des tests de diagnostic direct rapides comme l'immunofluorescence directe, les techniques immunoenzymatiques et apparentées ont été développés et appliqués à la détection des antigènes de la bactérie. Les techniques de détection des acides nucléiques et en particulier les techniques d'amplification génique apportent une contribution nouvelle au diagnostic de ces infections.

La sérologie est un témoin plus tardif de l'infection et se positive lorsque les voies génitales hautes sont contaminées.

#### A) DIAGNOSTIC DIRECT

##### 1. 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.

##### a) Prélèvements uro-génitaux

• **Prélèvement urétral** : l'urètre antérieur est le site préférentiel de prélèvement dans les cas d'urétrites non ou post-gonococciques.

L'écouvillon est introduit dans le canal urétral à trois ou quatre centimètres du méat. Une rotation de l'écouvillon permet

l'arrachement des cellules du revêtement urétral qui renferment éventuellement les *Chlamydia*. L'écouvillon est immergé dans un milieu de transport.

Ce prélèvement doit être réalisé avant la première miction du matin ou respecter un délai de 3 heures par rapport à la miction précédente. Le jet urinaire provoque un lavage de l'urètre et une élimination des cellules infectées. Ceci est à l'origine d'une diminution de la sensibilité de la plupart des tests de diagnostic.

• **Urine du premier jet** : 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.

• **Prélèvement d'urines après massage prostatique et de 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 des antigènes.

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 est pratiquement impossible en culture cellulaire (cytotoxicité des prélèvements) et seules les techniques d'amplification génique sont validées.

• **Suspicion de LGV** : le prélèvement est réalisé par ponction du bubon.

• **Rectites** : pour les atteintes rectales, il est indispensable de réaliser les prélèvements de lésions ulcérotives sous anoscopie.

##### b) Les prélèvements oculaires

Les prélèvements oculaires sont réalisés par grattage de la conjonctive inférieure dans les conjonctivites isolées ou associées à une urétrite. Les exsudats purulents doivent être éliminés au préalable avec un tampon stérile.

c) **Les liquides articulaires** dans le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter

#### 2. Conditions de prélèvement

Les milieux et les conditions de transport des prélèvements sont adaptés à la technique de détection utilisée par le laboratoire. Seule la culture cellulaire exige des conditions strictes de transport, de délai et de température, de manière à ne pas affecter la viabilité de la bactérie.

Pour les prélèvements réalisés par écouvillonnage, le choix des écouvillons utilisés est important : ils doivent être adap-

tés au recueil des cellules et ne doivent pas être toxiques pour la culture cellulaire. Des écouvillons en dacron, en alginate de calcium ou des écouvillons en plastique ayant une extrémité en forme d'olive striée "Bactopick" sont classiquement utilisés. Les écouvillons à tige en bois doivent être évités.

Lorsque plusieurs écouvillonnages sont réalisés chez un patient, l'ordre de prélèvement peut affecter le résultat.

Les prélèvements destinés à la culture sont impérativement et immédiatement placés à +4°C. Le temps de conservation doit être inférieur à 48 heures sinon, ils doivent être congelés à -70°C avant l'inoculation en sachant que la congélation entraîne une perte d'au moins 20% de la viabilité des bactéries [33].

Le milieu de transport traditionnel pour la recherche de *Chlamydia* en culture cellulaire est le milieu 2-sucrose phosphate (2SP) qui contient du sérum de veau fœtal et des antibiotiques sans action sur la viabilité des *Chlamydia*. Ce milieu présente en outre l'avantage de pouvoir être utilisé pour la recherche des *Chlamydia* par certaines méthodes d'amplification génique, ce qui permet à partir d'un même prélèvement, de réaliser à la fois la culture et l'amplification génique [22].

Pour les kits commercialisés permettant la mise en évidence des antigènes ou des acides nucléiques de *C. trachomatis*, il est impératif de suivre les indications des fabricants concernant les conditions de prélèvement et de conservation avant analyse.

La plus grande stabilité des antigènes et des acides nucléiques (ADN) comparée à la viabilité de *C. trachomatis* offre la possibilité pour l'ensemble de ces méthodes non basées sur l'isolement en culture cellulaire, d'allonger le temps de conservation des échantillons à +4°C au-delà de deux jours sans diminuer leur sensibilité.

### 3. Méthodes de détection de *C. trachomatis*

Le diagnostic direct des infections à *C. trachomatis* a connu une évolution en trois grandes périodes :

**a) Ere de la culture cellulaire** qui s'étend de 1975 à 1985. Elle n'a jamais été une technique de routine mais réservée aux laboratoires spécialisés en raison du coût, de la non standardisation et de l'équipement lourd. La culture cellulaire a été longtemps considérée comme le "Gold standard" en raison de sa grande spécificité (100%), mais sa sensibilité varie selon les laboratoires de 50 à 90%. Un traitement antibiotique, la cytotoxicité de certains prélèvements (sperme, urine), la mauvaise conservation des prélèvements entraînent des résultats faussement négatifs.

Cette sensibilité dépend, également, du nombre de bactéries présentes dans l'échantillon et de leur état répliatif, fonction du stade de la maladie aiguë ou chronique. La présence d'une forme persistante de *C. trachomatis* échappe complètement à l'isolement en culture cellulaire [4].

L'intérêt de la culture cellulaire est l'isolement des souches permettant une étude épidémiologique (sérotypage ou

génotypage) et éventuellement une étude de la sensibilité aux antibiotiques.

### b) Ere des tests de diagnostic rapides :

L'ère des techniques de diagnostic direct rapides constituées par l'immunofluorescence (IFD) et les tests immunoenzymatiques et apparentés s'étend de 1985 à 1995.

• **L'immunofluorescence directe (IFD)** permet la détection d'antigènes spécifiques du genre *Chlamydia* ou de l'espèce *C. trachomatis* par IF directe ou indirecte sur frottis.

L'utilisation des anticorps monoclonaux marqués à la fluorescéine révèlent des CE extra-cellulaires, exceptionnellement des inclusions, sur un tapis de cellules épithéliales, témoin de la qualité du prélèvement.

La spécificité est meilleure avec les anticorps monoclonaux anti-PMME qu'avec les anti-LPS spécifiques de genre [50, 51, 56]. La sensibilité est estimée à 80-90% et la spécificité à 98-99% par rapport à la culture, lorsque les deux méthodes sont réalisées de façon optimale [5].

L'avantage de cette technique est sa simplicité et sa rapidité (résultat en moins d'une heure). Elle est destinée à la recherche de *C. trachomatis* dans les prélèvements urétraux et conjonctivaux, mais peut être appliquée à des prélèvements divers (culot urinaire, sperme). Cette technique permet de détecter les *Chlamydia* viables ou non. L'inconvénient majeur est la subjectivité de la lecture qui est influencée par la qualité du microscope à fluorescence et nécessite un personnel très qualifié.

L'IFD est une méthode très sensible et constitue une bonne technique de diagnostic des infections aiguës et des infections asymptomatiques dans les populations à risque [12]. Cependant, elle est d'un intérêt moindre au cours des infections chroniques ou persistantes [16, 22].

Grâce à sa grande spécificité, elle est utilisée comme test de confirmation des techniques de diagnostic direct non basées sur la culture.

• **Les techniques immuno-enzymatiques (EIA)** ont été développées pour la détection d'antigènes de *Chlamydia* extraits de prélèvements uro-génitaux et fournissent une alternative à la culture.

Une dizaine de troupes EIA sont actuellement commercialisées en France et validées pour les prélèvements urétraux et l'urine du premier jet. La cible antigénique est généralement le LPS car il est plus soluble que la PMME.

L'avantage des méthodes EIA est leur réalisation rapide et simple avec possibilité d'automatisation ce qui permet de faire de grandes séries. Elles nécessitent une moins grande expérience du personnel et permettent la détection de *Chlamydia* viables ou non (moins de précaution à prendre au niveau du transport des prélèvements).

L'inconvénient majeur des tests EIA est leur faible sensibilité (50 à 75%) notamment lorsque le prélèvement contient peu de bactéries et lors d'infection persistante.

Ces tests sont encore utilisés dans certains laboratoires

lorsque le nombre d'analyses avec recherche de *C. trachomatis* est faible et incompatible avec la mise en place de techniques plus onéreuses.

Contrairement à l'IFD, les résultats ne sont pas subjectifs. Le "Cut-off" doit être calculé pour éviter les faux positifs c'est à dire que la spécificité doit être maximale ce qui se fait souvent aux dépens de la sensibilité.

### c) Ere des techniques de biologie moléculaire

Au début des années 1990, les techniques de biologie moléculaires ont été développées et utilisées dans la recherche.

La détection de *C. trachomatis* par des sondes ADN est réalisée par hybridation *in situ* ou en milieu liquide [11]. L'hybridation *in situ* avec des sondes nucléiques spécifiques a permis de détecter *C. trachomatis* chez 18 sur 78 patients présentant une prostatite chronique [19].

Au milieu des années 1990 débute l'ère des techniques d'amplifications géniques. Ce sont des méthodes très sensibles (86-96%) puisqu'elles amplifient un petit nombre d'acides nucléiques présents dans le prélèvement. La spécificité (supérieure à 99,5%) est assurée par le choix des amorces et par la méthode de révélation. Ces techniques d'amplification, en multipliant le nombre de copies de la séquence cible si elle est présente dans l'échantillon étudié, ont pour effet d'en améliorer considérablement le seuil de détection. Elles sont plus sensibles que les méthodes d'hybridation directe et peuvent détecter une molécule cible.

Les techniques de biologie moléculaire avec amplification génique pallient aux insuffisances de la culture en cas de mauvais transport, en cas d'antibiothérapie ou de prélèvements cytotoxiques (sperme, urine).

Ces méthodes amplifient soit un gène chromosomique, le gène *Omp1* codant la PMME, soit l'ARNr présent à raison de  $10^4$  copies par bactérie, soit une séquence du plasmide spécifique de *C. trachomatis*, présent chez 98% des souches à raison de 10 copies 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 Diagnostics, LCx-CT™ Abbott (LCR), Amplified CT™ 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 (COBAS AMPLICOR™, Roche Diagnostics et LCx™ Abbott) a permis à beaucoup de laboratoires d'introduire ces technologies en routine.

Elles 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 et non adaptés aux méthodes classiques [5, 8, 47, 51].

Bien qu'étant plus sensibles que la culture cellulaire et l'IFD, ces techniques sont tributaires des inhibiteurs qui peuvent être présents dans les prélèvements [52] et dont la nature n'est pas connue.

Un résultat négatif par amplification génique n'exclut cependant 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 la qualité du prélèvement, de la présence de la cible moléculaire et de l'absence d'inhibiteurs.

Les différentes méthodes de détection de *C. trachomatis* et de ses cibles sont rappelées dans le Tableau 2.

**Tableau 2 : Méthodes directes de détection de *Chlamydia trachomatis*.**

Cibles	Techniques
<b>Bactérie vivante</b> (CE infectieux)	Culture cellulaire
<b>Antigènes :</b> - LPS, PMME	- Immunofluorescence directe (IFD) - Techniques immuno-enzymatiques et apparentées
<b>Acides nucléiques :</b>	
- ARNr	- Hybridation moléculaire (PACE®2CT) - Amplification (TMA)
- ADN chromosomique (gène <i>omp1</i> )	- Amplification (PCR)
- ADN plasmidique	- Amplification (PCR, LCR, SDA)

TMA : Transcription Mediated Amplification ; PCR : Polymerase Chain Reaction ; LCR : Ligase Chain Reaction ; SDA : Strand Displacement Amplification.

#### 4. Stratégies diagnostiques de l'infection urogénitale

Les prélèvements, les méthodes de diagnostic et la meilleure stratégie diagnostique de l'infection uro-génitale masculine à *C. trachomatis* en fonction du site de prélèvement et du contexte clinique sont résumés dans le Tableau 3.

La recherche de *C. trachomatis* dans les urines du premier jet par les techniques d'amplification génique a une sensibilité et une spécificité équivalentes à celles obtenues sur un prélèvement endo-urétral [3, 7]. Les urines contiennent très peu d'inhibiteurs en raison de l'effet de dilution [53]. Ceci constitue une raison supplémentaire pour utiliser ces prélèvements dans les programmes de dépistage.

Avant l'ère des techniques d'amplification, toutes les recommandations sur le dépistage des infections à *Chlamydia* se sont focalisées sur la femme ; actuellement ces techniques permettent le dépistage dans les urines du premier jet du sujet masculin jeune [14]. Ce dernier constitue une meilleure stratégie préventive de l'infection aiguë et chronique chez la femme.

##### B) DIAGNOSTIC INDIRECT OU DIAGNOSTIC SÉROLOGIQUE

La recherche des anticorps anti-*Chlamydia* n'a pas la même valeur diagnostique que la mise en évidence du microorganisme. Elle se justifie dans le cadre de la recherche de l'étiologie d'une infection génitale haute ou encore de l'étiologie d'une infection systémique comme la LGV.

Chez les patients atteints de la lymphogranulomatose vénérienne, la clinique associée aux tests sérologiques permet le plus souvent de poser le diagnostic étiologique. Les tests sérologiques sont fortement positifs avec une ascension rapide du titre des anticorps [42, 44, 49, 50].

Les techniques de diagnostic actuellement utilisées sont la Micro-immunofluorescence (MIF) et les techniques immuno-enzymatiques.

Ces techniques apportent des arguments diagnostiques indirects mais sont d'interprétation délicate en raison d'une part, de la communauté antigénique qui existe entre les

trois espèces de *Chlamydia* (*C. trachomatis*, *C. psittaci*, *C. pneumoniae*) et d'autre part, de la persistance des anticorps des mois, voire des années après l'infection. Il peut être difficile de préciser l'espèce en cause et de distinguer une cicatrice sérologique d'une infection en évolution. Actuellement, des réactifs spécifiques de l'espèce *C. trachomatis* sont disponibles et améliorent l'interprétation.

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. Le dosage systématique des Ig G et des Ig A permet classiquement de distinguer les infections anciennes avec persistance des anticorps, des infections actives où les Ig G et les Ig A spécifiques ont des taux élevés.

#### V. CONCLUSION

**L'utilisation des techniques d'amplification génique a significativement amélioré le diagnostic des infections à *C. trachomatis* [5, 22]. Ces techniques ont permis de déceler 20% d'infections urogénitales supplémentaires et permettent le diagnostic chez des personnes faiblement contaminées.**

**Les techniques d'amplification génique 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 [55].**

**En France, le nombre de cas chez l'homme a augmenté de 17% entre 1996 et 1997. Cette augmentation est liée à l'utilisation de ces techniques [18]. 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 [48].**

**Au cours d'une infection génitale basse, il est préférable de procéder à un diagnostic direct sachant que la localisation restreinte aux muqueuses génitales n'entraîne pas la formation d'anticorps de manière constante et à un taux significatif.**

**Tableau 3 : Stratégies diagnostiques de l'infection uro-génitale à *C. trachomatis*.**

	Infection génitale basse / aiguë		Dépistage		Infection génitale haute/ persistante	
	Urètre	Urine 1 <sup>e</sup> jet	Urine 1 <sup>er</sup> jet	UMP	Sperme	
<b>Culture cellulaire</b>	+	-	-	-	-	-
<b>Détection des antigènes</b>						
• IFD	+	-	-	-	-	-
• EIA	+	-	-	-	-	-
<b>Détection des ac. nucléiques</b>						
• Hybridation moléculaire	+	-	-	-	-	-
• Amplification génique	+	+	+	+	+	+

**Devant une infection génitale s'accompagnant de signes d'infection haute, la recherche d'une étiologie à *Chlamydia* doit être faite par technique d'amplification génique sur des prélèvements de sperme ou d'urine après massage prostatique, associée éventuellement à une sérologie.**

**Des traitements antibiotiques efficaces et peu coûteux sont disponibles (six jours de doxycycline ou 1 g d'azithromycine en une prise unique) mais la difficulté diagnostique fait que ces infections très souvent asymptomatiques restent non traitées.**

## REFERENCES

1. BARBEYRAC DE B., BEBEAR CH. : *Chlamydia*. In : Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C. eds. Précis de Bactériologie Clinique. Paris : Editions ESKA, 2000 : 1663-1674.
2. BARBEYRAC DE B., BEBEAR CH. : *Chlamydia*. In : Freney J., Renaud F., Hansen W., Bollet C., Leclercq R. eds. Actualités permanentes en bactériologie clinique. Paris, Editions ESKA, 2002 : 1-16.
3. BAUWENS J.E., CLARCK A.M., LOEFFELBOLZ M.J. et al. : Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* urethritis in men by polymerase chain reaction assay of first- catch urine. J. Clin. Microbiol., 1993, 31 : 3013-3016.
4. BEATTY W.L., MORRISON R.P., BYRNE G.I. : Persistent chlamydiae : from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis. Microbiol. Rev., 1994, 58 : 686-699.
5. BLACK C.M. : Current methods of laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. Clin. Microbiol. Rev., 1997, 10 : 160-184.
6. Center for Disease Control and Prevention, Recommendations for the prevention and management of *Chlamydia trachomatis* infections. Morbid. Mortal. Weekly Rep., 1993, 42 : 1-39.
7. CHERNESKY M.A., LEE H., SCHACHTER J. et al. : Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* urethral infection in symptomatic and asymptomatic men by testing first- void urine in a ligase chain reaction assay. J. Infect. Dis., 1994, 170 : 1308-1311.
8. CHERNESKY M.A., CHONG S., JANG D., LUINSTRAK., SELLORS J., MAHONY J. : Ability of commercial ligase chain reaction and PCR assays to diagnose *Chlamydia trachomatis* infections in men by testing first-void urine. J. Clin. Microbiol., 1997, 35 : 982-984.
9. 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.
10. DALE A., WILSON J., FORSTER G. et al. : Management of chronic prostatitis in Genitourinary Medicine clinics in the United Kingdom's North Thames Region 2000. Intern. J. STD and AIDS, 2001, 12 : 256-259.
11. DAOUDI F., EB F., ORFILA J. : Diagnostic d'une infection génitale à *Chlamydia trachomatis*. Etude de la sensibilité du système PACE 2CT versus culture. OPTION/ BIO, 1995, 127, 7.
12. DAOUDI-HAMDAD F., ORFILA J., LEFEBVRE J.F. et al. : Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* genitourinary infection. Proceedings Third Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Sary A. ed. Bologna, Esculapio, 1996 : 306.
13. EB F. : Physiopathologie des infections à *Chlamydia trachomatis*. In : Bébéar Ch. ed. Mycoplasmes et *Chlamydia*. Guides Médi/ Bio. Paris, Elsevier, 2002 : 69 -87.
14. FRENTON K.A. : Screening men for *Chlamydia trachomatis* infection : have we fully explored the possibilities. Common. Dis. Public. Health, 2000, 3 : 86-89.
15. FRIBERG J., CONFINO E., SVAREZ M., GLEICHER N. : *Chlamydia trachomatis* attached to spermatozoa recovered from the peritoneal cavity of patients with salpingitis. J. Reprod. Med., 1987, 32 : 120-122.
16. GDOURA R., DAOUDI F., BOUZID F. et al. : Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen and urethral specimens from male members of infertile couples in Tunisia. Eur. J. Contracept. Reprod. Health Care, 2001, 6 : 14-20.
17. GRAYSTON J.T., WANG S.P., YEH L.J., KUO C.C. : Importance of reinfection in the pathogenesis of trachoma. Rev. Infect. Dis., 1985, 7 : 717-725.
18. GOULET V., LAURENT E., BIANCHI A. : Les Chlamydioses uro-génitales en France en 1997. Réseau RENACLA. Bull. Epidémiol. Hebdo., 1999, 16 : 61-63.
19. GUMUS B., SENGILE A.Z., SOLAK M. et al. : Evaluation of non-invasive clinical samples in chronic chlamydial prostatitis by using in situ hybridization. Scand. J. Urol. Nephro., 1997, 31 : 449-451.
20. HAKAMI F., BISSAC E., SCHMIT J.L., EB F. : Experimental genital infection due to *Chlamydia trachomatis* in male mice. Proceedings Third Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Sary A. ed. Bologna, Esculapio, 1996 : 111.
21. HAKAMI F., BISSAC E., JACQUET J.C. et al. : Impact on male fertility in a mouse experimental acute epididymitis model due to *Chlamydia trachomatis*. Proceedings Fourth meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Saikku P. ed. Bologna, Esculapio, 2000 : 363.
22. HAMDAD-DAOUDI F. : Diagnostic d'une infection à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique. [Thèse de Science]. Université de Picardie Jules Verne, Faculté de Médecine d'Amiens, 2003 : 1-232.
23. HAMDAD-DAOUDI F., ORFILA J., EB F. : Detection of *Chlamydia trachomatis* in men with infertility. Proceedings Fourth Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Saikku P. ed. Bologna, Esculapio, 2000 : 249.
24. HOOSEN A.A., O'FARELL N., VAN DEN ENDE J. : Microbiology of acute epididymitis in a developing community. Genitourin. Med., 1993, 69 : 361-363.
25. 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 : 402-407.
26. HOSSEINZADEH S., BREWIS I.A., PACEY A.A. et al. : Co-incubation of human spermatozoa with *C. trachomatis* in vitro causes increased sperm protein tyrosine phosphorylation and decreased sperm motility and viability. Proceedings Fourth meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Saikku P. ed. Bologna, Esculapio, 2000 : 254.
27. JANIER M., LASSAU F., CASIN I. et al. : Male urethritis with and without discharge : a clinical and microbiological study. Sex. Transm. Dis., 1995, 22 : 244-252.
28. JANTOS C., BAUMGARTNER W., DURCHFELD B., SCHIEFER H.G. : Experimental epididymitis due to *Chlamydia trachomatis* in rats. Infect. Immun., 1992, 60 : 2324-2328.

29. JOLY-GUILLOU M.L., LASRY S. : Practical recommendations for the drug treatment of bacterial infections of the male genital tract including urethritis, epididymitis and prostatitis. *Drugs*, 1999, 57 : 43-50.
30. KEAT A., THOMAS B., DIXEY J. et al. : *Chlamydia trachomatis* and reactive arthritis : the missing link. *Lancet*, 1987, 1 (8524) : 72-74.
31. 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.
32. KUON W., HOLZHUTTER H.G., APPEL H. et al. : Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J. Immunol.*, 2001, 167 : 4738-4746.
33. MAHONY J.B., CHERNESKY M.A. : Effect of swab type and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* for clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1985, 22 : 865-867.
34. MOLIJN G.J., BOGDANOWICZ J.F. : Chlamydial epididymitis presenting as a solid asymptomatic scrotal mass. *Br. J. Urol.*, 1997, 80 : 354.
35. MORRISON R.P. : Differential sensitivities of *Chlamydia trachomatis* strains to inhibitory effects of g-interferon. *Infect. Immunol.*, 2000, 6 : 6038-6040.
36. MUNOZ M.G., WITKIN S.S. : Autoimmunity 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.
37. MUTLU N., MUTLU B., CULHA M. et al. : The role of *Chlamydia trachomatis* in patients with non-bacterial prostatitis. *Int. J. Clin. Pract.*, 1998, 52 : 540-541.
38. OCHSENDORF F.R., OZDEMIR K., RABENAU H. et al. : *Chlamydia trachomatis* and male infertility : *Chlamydia*-IgA antibodies in seminal plasma are *Chlamydia trachomatis* specific and associated with an inflammatory response ? *J. Europ. Acad. Dermatol. Venereol.*, 1999, 12 : 143-152.
39. ORIEL J.D., RIDGWAY G.L. : Genital infection in men. *Br. Med. Bull.*, 1983, 39 : 133-137.
40. OSTASZEWSKA I., ZDRODOWSKA-STEFANOW B., BADA J. et al. : *Chlamydia trachomatis* : probable cause of prostatitis. *Intern. J. STD and AIDS*, 1998, 9 : 350-353.
41. PAAVONEN J., WOLNER-HANSSON P. : *Chlamydia trachomatis* : a major threat to reproduction. *Hum. Reprod.*, 1989, 4 : 111-124.
42. PEARLMAN M.D., McNEELY S.G. : A review of the microbiology, immunology and clinical implications of *Chlamydia trachomatis* infections. *Obstet. Gynecol. Surv.*, 1992, 47 : 448-461.
43. PURVIS K., CHRISTIANSEN E. : Infection in the male reproductive tract. Impact, diagnosis and treatment in relation to male infertility. *Int. J. Androl.*, 1993, 16 : 1-13.
44. RIDGWAY G.L., TAYLOR-ROBINSON D. : Current problems in microbiology : 1- Chlamydial infections : Which laboratory test? *J. Clin. Pathol.*, 1991, 44 : 1-5.
45. SCHACHTER J. : Infection and disease epidemiology. In : Stephens R.S. ed. *Chlamydia* intracellular biology, pathogenesis and immunity. Washington DC, American Society of Microbiology Press. 1999 : 139-169.
46. STAMM W.E., KOUTSKY L.A., BEDEBETTI J.K. et al. : *Chlamydia trachomatis* urethral infections in men. Prevalence, risk factors and clinical manifestations. *Ann. Intern. Med.*, 1984, 100 : 47-51.
47. STAMM W.E. : Expanding efforts to prevent chlamydial infection. *N. Engl. J. Med.*, 1998, 339 : 768-770.
48. STAMM W.E. : *Chlamydia trachomatis* - The persistent Pathogen. Thomas Parran Award Lecture. *Sex. Trans. Dis.*, 2001, 28 : 684-689.
49. TAYLOR-ROBINSON D., THOMAS B.J. : Laboratory techniques for the diagnosis of chlamydial infections. *Genitourin. Med.*, 1991, 64 : 256-266.
50. TAYLOR-ROBINSON D. : Genital chlamydial infections : Clinical aspects, diagnosis, treatment and prevention. In : Harris J.R.W., Forster S.M. ed. *Recent Advances in Sexually Transmitted Diseases and AIDS*. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1991 : 219-262.
51. TOYE B., PEELING R.W., JESSAMINE P. et al. : Diagnosis of *Chlamydia trachomatis* infections in asymptomatic men and women by PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34 : 1396-1400.
52. TOYE B., WOODS W., BOBROWSKA M., RAMOTAR K. : Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36 : 2356-2358.
53. WARD A.M., ROGERS J.H., ESTCOURT C.S. : *Chlamydia trachomatis* infection mimicking testicular malignancy in young man. *Sex. Transm. Infect.*, 1999, 75 : 270.
54. World Health Organization : Global prevalence and incidence of selected curable sexually transmitted infections : overview and estimates. Geneva, WHO, 2001 : 10-14.
55. WHITTINTON W.L.M., KENT C., KISSINGER P. et al. : Determinants of persistent and recurrent *Chlamydia trachomatis* infection in young women : results of a multicenter cohort study. *Sex. Transm. Dis.*, 2001, 28 : 117-123.
56. WOOD G.L., BRYAN J.A. : Detection of *Chlamydia trachomatis* by direct fluorescent antibody staining. Results of the College of American Pathologists proficiency testing program, 1986-1992. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 1994, 118 : 483-488.
57. ZDRODOWSKA-STEFANOW B., OSTASZEWSKA I., DAREWICZ B. et al. : Role of *Chlamydia trachomatis* in epididymitis. Part I : direct and serologic diagnosis. *Med. Sci. Monit.*, 2000, 6 : 1113-1118.

---

Manuscrit reçu : février 2004 ; accepté : avril 2004.

## ABSTRACT

*Chlamydia trachomatis* infection in men. Towards a better diagnostic approach.

Farida HAMDAD- DAOUDI, Jeanne ORFILA, François EB

*Chlamydia trachomatis* is the most frequently sexually transmitted pathogen in humans, with an estimated 92 million new cases occurring worldwide each year. However, this number is probably underestimated, particularly for men who are less likely to be screened than women.

*C. trachomatis* serovar D-K causes a variety of clinical syndromes in men and women.

*C. trachomatis* may cause urethritis, epididymitis and prostatitis in young sexually active men, less than 35 years of age. 50% of infected men remain asymptomatic. Sexually active males with asymptomatic urethritis constitute a significant reservoir of potential infection for women, in whom the consequences of lower genital tract infection are likely to be more severe.

Chlamydial infections have never been easy to diagnose.

Because Chlamydiae are obligate intracellular pathogens, the objective of specimen collection should usually be to include the host cells that harbour the organisms. The sensitivity and specificity of diagnostic tests for *C. trachomatis* have been shown to be directly related to the adequacy of the specimen.

Infection may be symptomatic or asymptomatic with a small number of elementary bodies present at the site of infection.

The conventional approach to laboratory diagnostic testing for *C. trachomatis* infections consisted of cell culture of inocula prepared from urogenital specimens. Cell culture requires appropriate collection of cell scrapings from the urethra, and optimal transport and storage conditions of specimens to preserve viable organisms.

Antigen and nucleic acid detection technologies were developed during the 1980s and have been extensively applied to diagnosis due to their lower cost, a lower level of expertise, preservation of infectivity during transport, and a shorter time to obtain the results. Unfortunately, most of these tests are less sensitive than *in vitro* cell culture, and may miss a large number of *Chlamydia* infected individuals.

Nucleic acid amplification technologies have therefore been developed, and application of these tests has shown that culture is not as sensitive as previously believed and that the prevalence of *C. trachomatis* infection is higher in most populations. These assays can use non-invasive specimens such as first void urine and semen, and do not require special storage conditions.

Advantages of nucleic acid amplification tests are their ability to detect even a small amount of organisms. This enables a high detection rate for *C. trachomatis* in symptomatic persons, diagnosis of chlamydial infections in asymptomatic individuals with a small number of elementary bodies, and diagnosis of persistent infections.

**Key words:** *Chlamydia trachomatis*, urogenital infections, non-invasive samples, nucleic acid amplification tests