

Ac = Anticorps

ADN = Acide Désoxyribonucléique

AF = Aides Familiales

Ag = Antigène

ANAES = Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en Santé

ARN = Acide ribonucléique

ATB = Antibiotiques

ATP = Adénosine Triphosphate

ATPase = Adénosine Triphosphatase

BM = Biologie Moléculaire

CD = Cycle Delta

CDC = Center for Disease Control

CE = Corps Elémentaires

CMI = Concentration Minimale Inhibitrice

CO = Cycle de décision seuil

CQ = Contrôle de Qualité

C.Q.I. = Contrôle Qualité Interne

CR = Corps Réticulés

CT = *Chlamydia trachomatis*

CT/NG = *Chlamydia trachomatis / Neisseria gonorrhoeae*

DMDIV = Dispositifs Médicaux de Diagnostic *in Vitro*

DO = Densité Optique

ECBP = Eucaryotic Cell-Binding Protein

E.E.Q. = Evaluation Externe de la Qualité

ELISA = Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

FN = Faux Négatifs

FP = Faux Positifs

GMP = Guanosine Triphosphate

HALD = Hôpital Aristide Le Dantec

Hsp = Heat shock protein

IC = Internal Control

IFD = Immunofluorescence Directe

Ig = Immunoglobulines

INRSP = Institut National de Recherche en Sante Publique

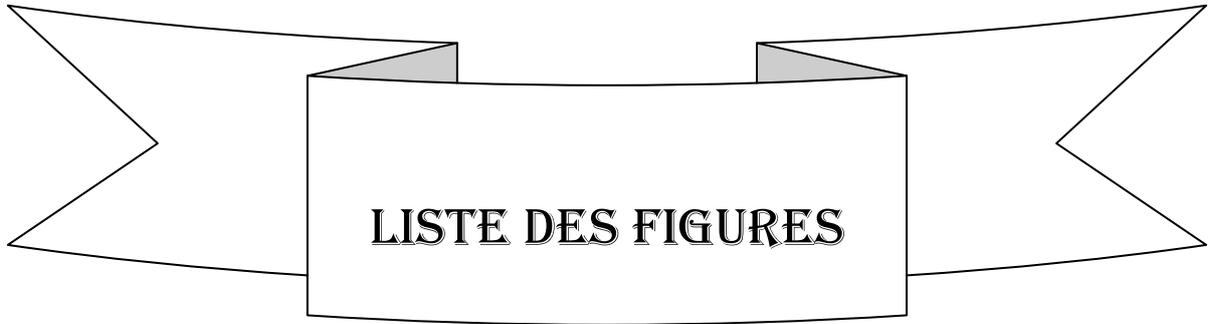
IST = Infections Sexuellement Transmissibles

K = Coefficient Kappa

LBV = Laboratoire Bactériologie Virologie

LCR = Ligase Chain Reaction

LGV = Lymphogranulomatose vénérienne
LPS = Lipopolysaccharidique
m2000rt = m2000 real time
m2000sp = m2000 sample preparation
MOMP = Major Outer Membrane Protein
NC = Nombre de Cycle
NG = *Neisseria gonorrhoeae*
OMS = Organisation Mondiale de la Santé
ONUSIDA = Organisation des Nations Unies pour le SIDA
P = Protéine
P_a = Concordance attendue
P_o = Proportion d'accord observée
PCA = Probe Competition Assay
PCR = Polymerase Chain Reaction
PG = Population Générale
PMME = Protéine Majeure de la Membrane Externe
PS = Professionnelles du Sexe
Se = Sensibilité
SIDA = Syndrome de l'immunodéficience acquise
Sp = Spécificité
SPSS=
TMA = Transcription Mediated Amplification
TS = Travailleuses du Sexe
VA = Vendeuses Ambulantes
VCN = Vancomycine- Colistine-Nystatine
VIH = Virus de l'Immunodéficience Acquise
VN = Vrais Négatifs
VP = Vrais Négatifs
VPN = Valeur Prédictive Négative
VPP = Valeur Prédictive Positive



LISTE DES FIGURES

Figure 1 : cycle de développement de *Chlamydia trachomatis*

Figure 2: *Neisseria gonorrhoeae*, diplocoque

Figure 3: Action de *N. gonorrhoeae* sur les sucres

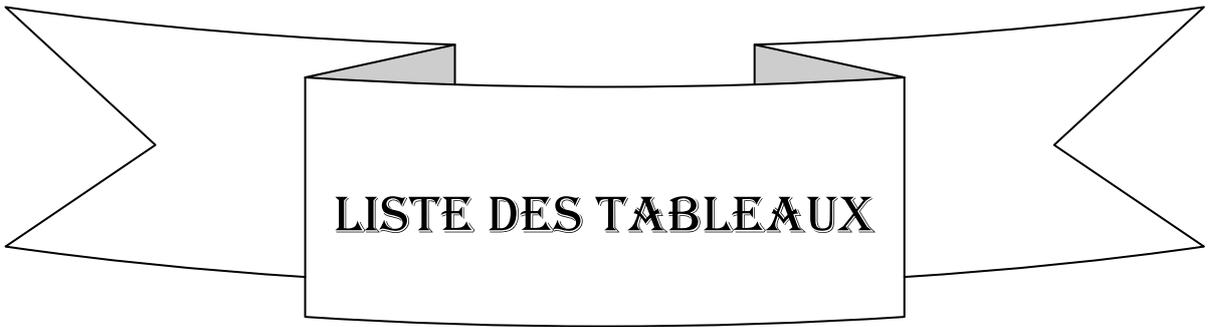
Figure 4: Répartition géographique des sites d'études du Mali

Figure 5: Institut National de Recherche en Sante Publique (INRSP) Bamako

Figure 6: Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec (LBVHALD)

Figure 7: nombres de prélèvements selon les sites

Figure 8: Nombre de prélèvements selon les populations cibles



LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Tableau de contingence.

Tableau II - Degré d'accord et valeur de Kappa

Tableau III : Formules de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives

Tableau IV - Tableau de contingence de *Chlamydia trachomatis*

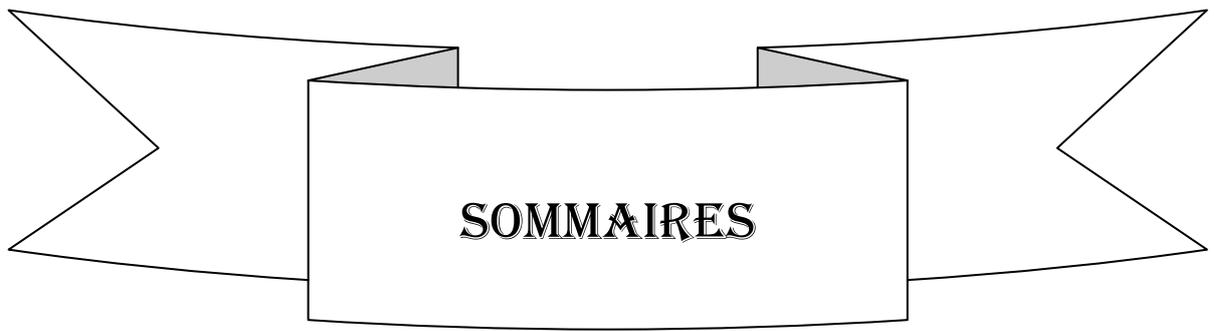
Tableau V: Résultats de la sensibilité, de la spécificité, des valeurs prédictives positive et négative et du coefficient kappa pour *C. trachomatis*.

Tableau VI - Tableau de contingence de *Neisseria gonorrhoeae*

Tableau VII: Résultats de la sensibilité, de la spécificité, des valeurs prédictives positive et négative et du coefficient kappa pour *Neisseria gonorrhoeae*.

Tableau VIII : Tableau récapitulatif des différences de positivité selon les cibles

Tableau IX: tableau récapitulatif des différences de positivité selon les sites



INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE: REVUE DE LA LITERATURE	4
Chapitre I : GENERALITE SUR LES CONTROLE DE QUALITE	4
1. Quelques définitions	4
1.1. La qualité	4
1.2. L'assurance qualité	4
1.3. Évaluation Externe de la Qualité (E.E.Q.)	5
1.4. Contrôle Qualité Interne (C.Q.I.)	5
2. Objectif des systèmes d'EEQ pour les laboratoires	5
3. Buts d'un contrôle de qualité	6
4. Outils statistiques d'évaluation de la qualité d'un test	6
CHAPITRE II: GENERALITES SUR L'INFECTION A CHLAMYDIA TRACHOMATIS	10
1. Généralités.....	10
1.1. Historique.....	10
1.2. Taxonomie.....	11
1.3. Caractères bactériologiques.....	11
1.3.1. Morphologie.....	11
1.3.2. Habitat et cycle de multiplication.....	12
1.3.3. Phase de pénétration et internalisation du corps élémentaire.....	13
1.3.4. Phase de multiplication.....	14
1.3.5. Phase de libération.....	14
1.4. Structures antigéniques.....	15
1.4.1. Antigène de genre ou LPS.....	15

1.4.2. Antigène spécifique d'espèces.....	16
1.4.3. Antigènes spécifiques de types.....	16
1.4.4. Les immunotypes.....	16
1.4.5. Pouvoir pathogène.....	16
2. Manifestations cliniques.....	17
2.1. Le trachome.....	17
2.1.1. Epidémiologie du trachome.....	17
2.1.2. Symptomatologie du trachome.....	18
2.2. Les infections uro-génitales.....	18
2.2.1. Transmission et la prévalence de <i>Chlamydia trachomatis</i>	18
2.2.2. Manifestations cliniques.....	19
2.2.3. Evolution et complications.....	19
2.2.4. Les infections néonatales.....	20
2.3. La lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas Favre.....	21
2.3.1. Epidémiologie.....	21
2.3.2. Symptomatologie.....	21
2.4. Réponse immune à <i>Chlamydia</i>	21
3. Diagnostic biologique des infections à <i>Chlamydia trachomatis</i>.....	22
3.1. Le prélèvement, transport des prélèvements et conservation.....	22
3.2. Examen microscopique direct.....	23
3.3. Isolement de <i>Chlamydia trachomatis</i> en culture cellulaire.....	24
3.4. Méthodes rapides et directes de détection d'Ag de <i>C. trachomatis</i>	24
3.5. Détection d'anticorps sériques.....	25
3.6. Diagnostic moléculaire.....	25
4. Traitement et prévention.....	25
4.1. Sensibilité de <i>Chlamydia trachomatis</i>	25
4.2. Traitement.....	26
4.3. Prévention.....	26

Chapitre III: INFECTION A NEISSERIA GONORRHOEAE	27
1. Généralités	27
1.1. Définition.....	27
1.2. Historique.....	27
1.3. Classification.....	27
1.4. Caractères bactériologiques.....	28
1.4.1. Morphologie.....	28
1.4.2. Caractères cultureux.....	28
1.4.3. Caractères biochimiques.....	29
1.4.4. Structures antigéniques.....	29
2. Epidémiologie	30
2.1. Transmission.....	30
2.2. Prévalence.....	30
3. Manifestations cliniques	30
3.1. La blennorragie.....	30
3.1.1. Chez l'homme.....	31
3.1.2. Chez la femme.....	31
3.2. Les complications et les formes extra-génitales.....	31
3.2.1. Evolution et complications.....	31
3.2.2. Autres complications susceptibles de survenir après une gonococcie.....	32
3.2.3. Cas particuliers :.....	32
3.3. Immunité et réponses immunitaires.....	33
4. Diagnostic biologique de la gonococcie	33
4.1. Les prélèvements.....	33
4.1.1. Chez l'homme.....	33
4.1.2. Chez la femme.....	33
4.1.3. Les prélèvements dans les deux sexes.....	34
4.2. Examen microscopique direct.....	34
4.3. La culture.....	34

4.4. Diagnostic moléculaire.....	35
5. Traitement et Prévention.....	35
5.1. Traitement	35
5.1.1. Etude de la sensibilité de la bactérie.....	35
5.1.2. Schémas thérapeutiques.....	35
5.2. Prévention.....	36
Chapitre IV: DIAGNOSTIC MOLECULAIRE DES INFECTION A CHLAMYDIA TRACHOMATIS ET A NEISSERIA GONORRHOEAE.....	37
1. Les types de prélèvement.....	37
2. Avantages et contraintes des techniques de biologie moléculaire.....	37
3. Les différentes techniques.....	38
3.1. Hybridation moléculaire.....	38
3.1.1. Détection des ARN de <i>C. trachomatis</i>	38
3.1.2. Détection de l'ARN de <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	38
3.2. Techniques utilisant l'amplification des acides nucléiques.....	38
3.2.1. La ligase Chain Reaction (LCR).....	39
3.2.2. La Transcription Mediated Amplification (TMA).....	39
3.2.3. La polymérase Chain Reaction (PCR)	39
DEUXIEME PARTIE : NOTRE ETUDE.....	40
CHAPITRE I : JUSTIFICATIFS, OBJECTIFS ET CADRE DE L'ETUDE	
1. Justificatifs de l'étude	40
2. Objectifs de l'étude.....	40
3. Cadre d'étude.....	41
3.1. Prélèvements :.....	41
3.2. Les sites de collecte et d'analyse	41
3.3. Laboratoire de référence pour le contrôle de qualité	42
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	44
1. Matériel	44
1.1. Appareillage : Analyseur m2000rt.....	44

1.2. Description.....	44
1.3. Matériel et réactifs d'usage général.....	44
1.4. Matériel spécifique à la <i>m2000</i> Abbott real time.....	44
2. Méthodes.....	44
2.1. Mode opératoire.....	44
2.2. Recherche de CT/NG par PCR en temps réel : technologie par <i>m2000[®]rt</i>	44
2.3. Analyse statistique.....	47
CHAPITRE III : RESULTATS.....	49
1. Echantillonnage.....	49
2. Répartition des prélèvements.....	49
3. Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de CT/NG.....	50
4. Analyse des résultats de <i>m2000[®]</i> automatique par population cible.....	52
5. Résultats comparés <i>m2000[®]</i> automatique / <i>m2000[®]</i> manuelle selon les cibles.....	53
6. Analyse des résultats de <i>m2000[®]</i> automatique selon les sites.....	54
7. Résultats comparés <i>m2000[®]</i> automatique / <i>m2000[®]</i> manuelle selon les sites.....	55
CHAPITRE IV : DISCUSSION.....	57
1. Etude de la positivité.....	57
2. Performance de la technique manuelle de <i>m2000rt</i>	59
CONCLUSION.....	62
REFERENCES.....	65
ANNEXE.....	76



INTRODUCTION

INTRODUCTION

Les infections sexuellement transmissibles (IST) sont des maladies provoquées par des microbes (virus, bactéries, parasites) qui passent d'une personne à l'autre au cours des relations sexuelles. Selon les estimations de l'OMS, on enregistre chaque année dans le monde 448 millions de nouveaux cas d'IST guérissables (syphilis, gonorrhée, chlamydie et trichomonase) chez des adultes âgés de 15 à 49 ans. Ces IST posent un problème majeur de santé avec l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine [89].

La méconnaissance du diagnostic et l'absence de traitement des IST dès le début de la maladie peuvent être à l'origine de complications et de séquelles graves, notamment infécondité, perte du fœtus, grossesse extra-utérine, cancer ano-génital et décès prématuré, ainsi que des infections du nouveau-né et du nourrisson.

Pour mieux prendre en charge ses IST, il est souhaitable de développer des stratégies de diagnostic rapides et fiables qui couvriront à la fois la contrainte du grand nombre et le besoin de sûreté des résultats.

L'évolution des outils de biologie moléculaire a permis des progrès sans précédents dans les cas de diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* et à *Chlamydia trachomatis*, durant les enquêtes à grande échelle, [25]. Il est désormais possible de diagnostiquer ces infections rien qu'à partir des urines des patients, rendant ainsi les prélèvements moins contraignants par rapport aux méthodes classiques. La mise en évidence des bactéries peut se faire en quelques heures seulement par la détection de l'ADN.

Les techniques moléculaires manuelles requièrent du temps et peuvent livrer des résultats faussement positifs ou négatifs [73]. Il existe en effet un important risque de contamination croisée ou de dégradation des acides nucléiques lors des manipulations au cours de la réaction de polymérisation en chaîne communément appelée PCR.

Les techniques moléculaires automatiques s'affranchissent de toutes ces contraintes. Plusieurs études ont montré qu'elles sont les meilleures dans le diagnostic surtout précoce des infections à *C. trachomatis* et à *N. gonorrhoeae* [59]. Les plus utilisées sont basées sur la PCR qui a l'avantage d'avoir une grande sensibilité, une grande spécificité ainsi qu'une bonne fiabilité et reproductibilité des résultats [81].

Cependant, depuis leur mise en œuvre, ces techniques moléculaires ont beaucoup évolué jusqu'à l'avènement des techniques de PCR en temps réel comme le nouveau système *m2000* Abbott de diagnostic des infections à *Neisseria gonorrhoeae* et à *Chlamydia trachomatis* qui a été récemment introduit dans les laboratoires.

En outre en matière de santé, les erreurs de diagnostic qui souvent ne manquent pas, peuvent être fatales et irréversibles vis-à-vis des conséquences médicales et psychosociales qu'elles engendrent. En effet, au laboratoire, chaque étape comporte un risque d'erreur, depuis la collecte du prélèvement jusqu'au rendu du résultat.

Les erreurs résultent souvent de l'association de plusieurs facteurs, l'erreur initiale étant aggravée par l'absence de vérification au laboratoire. Cette vérification passe par les programmes de contrôle de qualité qui jouent un rôle indispensable dans ce processus de vérification de la fiabilité d'un résultat d'analyse et d'évaluation des performances.

La création d'un système de contrôle de la qualité des résultats d'analyse diminue de ce fait les erreurs.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre travail qui a pour objectif de contrôler la qualité des tests de diagnostic moléculaire à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* réalisés à l'Institut National de Recherche en Santé Publique au Mali.

Nous allons déterminer dans notre laboratoire de biologie moléculaire la sensibilité, la spécificité et la concordance qui nous permet de comparer la technique manuelle utilisée au Mali et la technique automatique utilisée au Sénégal. Pour atteindre ces objectifs notre travail s'articulera en deux grandes parties :

- Une première partie consacrée à la revue de la littérature.
- Une seconde partie dans laquelle nous exposerons notre méthodologie, les principaux résultats et les commentaires.



**PREMIÈRE PARTIE : REVUE
DE LA LITTÉRATURE**

PREMIERE PARTIE :

CHAPITRE I : GENERALITES SUR LES CONTROLES DE QUALITE

Les laboratoires d'analyses sont au service du clinicien et donc du malade. De plus en plus, et pour de nombreuses raisons, médicales ou non médicales, le clinicien a recours à l'analyse biologique. Il le fait le plus souvent pour obtenir un ou des élément(s) complémentaires de son diagnostic. Le médecin exigera donc du biologiste des mesures fiables, imposant une qualité constante, vérifiée en permanence par la mise en œuvre d'un contrôle de qualité interne et externe [57].

Ainsi ce contrôle de qualité est maintenant devenu une notion bien ancrée dans la pratique des laboratoires d'analyses de biologie médicale.

C'est un outil de travail pour tous les laboratoires et un élément essentiel de toute démarche d'assurance qualité [80, 86].

Les laboratoires d'analyses de biologie médicale doivent avoir une parfaite maîtrise des « dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro* » afin d'assurer la qualité de leurs résultats analytiques [4]. C'est l'ensemble du système analytique qui comprend l'instrument, la méthode, les réactifs, les matériaux d'étalonnage (étalons ou calibrateurs) que la directive européenne 98/79/CE regroupe sous le vocable de dispositifs médicaux de diagnostic *in Vitro* [26].

1. Quelques définitions

1.1. La qualité

La qualité est l'aptitude d'un produit à satisfaire les besoins exprimés ou implicites de l'utilisateur. Dans le domaine de la biologie médicale, c'est l'adéquation entre les moyens mis en œuvre et les informations attendues par le médecin prescripteur, ainsi que les attentes du patient [57].

1.2. L'assurance qualité:

C'est l'ensemble des actions préétablies et systématiques nécessaires pour qu'un produit ou un service satisfasse aux exigences de qualité. Dans le domaine de la biologie médicale, l'assurance qualité permet de maîtriser l'organisation des tâches

conduisant à la qualité. Elle couvre les étapes pré-analytiques, analytiques et post-analytiques [57].

1.3. Évaluation Externe de la Qualité (E.E.Q.) :

Elle correspond au contrôle par un organisme extérieur, de la qualité des résultats fournis par un laboratoire. Ce contrôle rétrospectif permet une confrontation inter-laboratoires en vue d'améliorer la qualité du travail de l'ensemble des participants. L'organisme extérieur envoie les mêmes échantillons aux différents laboratoires, collecte les résultats obtenus, en fait une analyse puis transmet les commentaires aux laboratoires participants [7].

1.4. Contrôle de Qualité Interne

Il s'agit de l'ensemble des procédures mises en œuvre dans un laboratoire en vue de permettre un contrôle de qualité des résultats des analyses au fur et à mesure de leur exécution [7].

2. Objectif des systèmes d'EEQ pour les laboratoires

L'objectif des systèmes d'EEQ est de donner la confiance aux clients (patients et prescripteurs) autant qu'aux personnels du laboratoire. Le véritable sens du contrôle de qualité est d'assurer la fiabilité des résultats d'analyses biologiques afin de permettre aux cliniciens d'établir un bon diagnostic et d'assurer des traitements adéquats aux patients.

Les systèmes d'EEQ ont également pour objectif de :

- Déterminer la performance des laboratoires et surveiller la continuité de leurs performances ;
- Effectuer des comparaisons entre de nouveaux et d'anciens dispositifs médicaux de diagnostic *in Vitro* [42, 67] ;
- Démontrer la faisabilité du transfert des procédures analytiques entre laboratoires ;
- Mettre en évidence les difficultés et déficiences dans leur fonctionnement ;

- Assurer l'éducation des fournisseurs et utilisateurs quant aux avantages et limites des différents méthodes, instruments et automates [42, 67] ;
- Identifier la Non-Qualité et y remédier [29] ;
- Garantir que les performances des méthodes soient en adéquation avec les besoins cliniques [29] ;

3. Buts d'un contrôle de qualité : [29]

Le contrôle de qualité a pour buts de :

- Réduire les coûts dus aux faux rejets (valeurs attendues mal définies), aux répétitions inutiles (patients, contrôles) et aux retards du diagnostic suite à une défaillance du système ;
- Donner la garantie au patient d'obtenir des résultats parfaitement comparables indépendamment du choix du laboratoire ;
- Exploiter au maximum les résultats obtenus aux contrôles internes et externes grâce à une bonne analyse statistique et permettre des recoupements entre laboratoires et méthodes ;
- Donner une image de marque et de marketing.

4. Outils statistiques d'évaluation de la qualité d'un test qualitatif

➤ Le coefficient Kappa

L'accord observé entre des jugements qualitatifs ou non, résulte de la somme d'une composante «aléatoire» et d'une composante d'accord «véritable».

Le coefficient Kappa K propose de chiffrer l'intensité ou la qualité de l'accord réel entre des jugements qualitatifs appariés.

Il exprime une différence relative entre la proportion d'accord observée (P_o) et la proportion d'accord aléatoire ou concordance attendue (P_a) qui est la valeur espérée sous l'hypothèse nulle d'indépendance des jugements, divisée par la quantité disponible au-delà de l'accord aléatoire [41].

$$K = (P_o - P_a) / (1 - P_a)$$

Le tableau I présente la notation utilisée lorsque les données sont présentées dans un tableau de contingence. Le test A concerne le test de référence et le test B celui qu'on doit évaluer.

Tableau I : Tableau de contingence [41]

		Test A		
		+	-	
Test B	+	a	b	N1=a+b
	-	c	d	N2=c+d
		N' = a+c	N'' = b+d	N = a+b+c+d

a=vrais positifs(VP)

b=faux positifs(FP)

c=faux négatifs(FN)

d=vrais négatifs(VN)

Pourcentage d'accord observé $P_o = (a+d)/N$

Concordance attendu $P_a = (a'+d')/N$

$a' = (a+b) \times (a+c)/N$;

$$d' = (c+d) \times (b+d) / N.$$

Landis et Koch ont proposé un classement de l'accord en fonction de la valeur de Kappa présenté dans le tableau II.

Tableau II : Degré d'accord et valeur de Kappa [56].

Accord	Kappa
Excellent	$\geq 0,81$
Bon	0,80 - 0,61
Modéré	0,60 - 0,41
Médiocre	0,40 - 0,21
Mauvais	0,20 - 0,0
Très mauvais	$< 0,0$

➤ Sensibilité et spécificité

Elles permettent de mesurer la validité intrinsèque. Pour cela on utilise un tableau de contingence (Tableau I).

- **Sensibilité du test**

$$Se = [a / (a+c)]$$

C'est la proportion de tests positifs (VP) chez les sujets malades [37,76].

Moins les faux négatifs sont nombreux, plus le test est sensible.

- **Spécificité du test**

$$Sp = [d / (b+d)]$$

C'est la proportion de tests négatifs (VN) chez les sujets non malades [37,76].

Moins les faux positifs sont nombreux, plus le test est spécifique.

L'état réel des sujets (malade ou non) est connu à partir d'un test de référence.

➤ **Les valeurs prédictives**

• **Valeur prédictive de test positif :**

$$VPP = [a / (a+b)]$$

La Valeur prédictive positive est la probabilité que la maladie soit présente lorsque le test est positif [37,76].

• **Valeur prédictive de test négatif :**

$$VPN = [d / (c+d)]$$

La Valeur prédictive négative est la probabilité que la maladie ne soit pas présente lorsque le test est négatif [37,76].

CHAPITRE II : GENERALITES SUR LES INFECTIONS A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

1. GENERALITES

1.1. Historique

Les *Chlamydiae* ont été découvertes en 1907 dans des frottis conjonctivaux de patients atteints de trachome par Halberstadt et Von Prowazek. Elles ont longtemps été considérées comme des parasites puis des virus [13].

En 1910, Linder individualisa des inclusions intra-cytoplasmiques dans les cellules épithéliales de l'urètre. Ces inclusions étaient identiques à celles observées par Halberstadt et Von Prowazek. Elles furent aussi retrouvées dans les conjonctivites des nouveau-nés et dans le col de l'utérus de leur mère. Linder émit l'hypothèse que le trachome, les conjonctivites, les cervicites et les urétrites à inclusion pourraient être causés par le même agent infectieux [16].

En 1930, lors de la grande épidémie qui sévissait en Europe, principalement en Allemagne, Bedson mit en évidence, dans les macrophages de souris inoculées par voie intra-péritonéale avec des crachats de sujets atteints de pneumopathie grave, des inclusions semblables à celles du trachome.

En 1940, Rake et Jones décrivirent ces mêmes inclusions dans certaines cellules obtenues par ponction de ganglions hypertrophiés d'un malade atteint de lymphogranulomatose vénérienne.

La culture sur milieux bactériologiques acellulaires étant impossible et la coloration étant violette après Giemsa, l'agent pathologique fut désigné sous le nom de ``virus basophile`` ou de ``bedsonia``.

Les *chlamydiae* furent identifiées à la suite des travaux de Moulder, comme des bactéries [66].

1.2. Taxonomie

Les *chlamydiae* appartiennent à l'ordre des *Chlamydiales*, qui ne comprend qu'une famille, les *Chlamydiaceae* avec deux genres :

✚ Genre *Chlamydia*, avec l'espèce *Chlamydia trachomatis* qui est spécifique de l'homme. C'est le premier agent bactérien responsable d'infections sexuellement transmissibles et d'environ 70% des stérilités tubaires [21, 31]. Il est divisé en deux biovars chacun comprenant différents sérovars responsables d'infections spécifiques :

- ✓ Le **biovar trachoma** qui comprend 11 sérovars désignés par des lettres de A à K regroupées en deux pathotypes: les souches du trachome endémique non génital (sérovars A, B, C) et les souches du trachome endémique génital et oculaire (sérovars D à K).
- ✓ Le **biovar LGV** avec comme sérovars, les sérovars L1, L2, L2a, L3, responsable de la lymphogranulomatose vénérienne [35, 40].

✚ Genre *Chlamydothya* avec trois espèces: *Chlamydia psittaci* agent de la psittacose et de l'ornithose chez les oiseaux et occasionnellement chez l'homme par inhalation, *Chlamydia pneumoniae* agent de pneumonies sévères chez l'homme et *Chlamydia pecorum* agent de pneumonies animales [21].

1.3. Caractères bactériologiques

1.3.1. Morphologie

L'espèce *Chlamydia trachomatis* est une bactérie de petite taille, de forme coccoïde de 0.35 à 1 µm de diamètre, intracellulaire, immobile [47].

C'est une bactérie à Gram négatif intracellulaire stricte. A ce titre, elle ne peut se multiplier qu'à l'intérieur d'une cellule eucaryote envahie que l'on appellera cellule hôte. De plus, cette bactérie peut, au cours de son cycle de multiplication, coexister sous deux formes distinctes : les corps élémentaires (CE) et les corps réticulés (CR) [48, 67].

Les corps élémentaires sont des particules sphériques de 0.3 à 0.4 μm de diamètre. Ce sont les formes matures, infectieuses et résistantes. Ils existent en situation extra et intracellulaire. Un CE est caractérisé par une inertie métabolique, et est constitué d'ADN condensé en nucléoïde [47]. Ce nucléoïde contient le matériel génétique de la bactérie, composé d'un chromosome circulaire fait d'ADN double brin et d'un plasmide multicopie. Les CE sont délimités par une enveloppe composée d'une membrane externe, d'une couche périplasmique et d'une membrane interne. La membrane externe est essentiellement constituée d'une protéine représentant près de 60% des protéines membranaires externes, appelée Major Outer Membrane Protein (MOMP) [97].

Les corps réticulés (0,8 à 1 μm de diamètre), de taille plus importante que les CE, constituent quant à eux la forme proliférative de la bactérie. Ils ont un aspect réticulé homogène et sont également limités par deux membranes : une membrane cytoplasmique et une membrane externe plus souple que celle retrouvée dans les CE. Des études en microscopie électronique révèlent en leur centre une région peu dense aux électrons correspondant à un riche réseau de filaments d'ADN, entourés de nombreux ribosomes. Les CR sont la forme métaboliquement active de *Chlamydia* et possèdent une quantité d'ARN trois fois supérieure à celle des CE. La synthèse de cet ARN, ainsi que celle d'ADN, de protéines et de phospholipides est assurée par les propres enzymes et ribosomes de *Chlamydia* [48].

La rigidité de la membrane interne et de la membrane externe est due au pont disulfure (S-S).

1.3.2. Habitat et cycle de multiplication

Chlamydia trachomatis est une bactérie pathogène strictement humaine, à multiplication intracellulaire obligatoire, de répartition mondiale [94].

Son affinité pour les cellules cylindriques explique son tropisme pour les muqueuses oculaires, génitales, respiratoires et digestives.

Ce sont des bactéries qui utilisent l'ATP de la cellule hôte par défaut de synthèse propre et montrent un cycle de multiplication intracellulaire particulier [86].

1.3.3. Phase de pénétration et internalisation du corps élémentaire

Préférentiellement, les *Chlamydiae* envahissent les cellules épithéliales des muqueuses ainsi que les macrophages, les cellules endothéliales et certaines cellules musculaires. Ces bactéries possèdent un cycle de développement intracellulaire unique et complexe avec notamment passage d'une forme à l'autre (CE et CR) selon un processus finement régulé.

Classiquement une infection à *Chlamydia* débute par une phase d'adhésion des CE à leur cellule cible selon des mécanismes qui peuvent varier en fonction des espèces, du sérovar et de la cellule hôte. Cette adhésion serait initialement basée sur des interactions électrostatiques non spécifiques, puis sur une ou plusieurs interactions de haute affinité, faisant intervenir notamment :

- la MOMP qui se comporterait comme une adhésine grâce à des interactions spécifiques avec les cellules.
- des Eucaryotic Cell-Binding Protein (ECBP) présentes sur les CE. L'inactivation de ces protéines empêcherait la fixation de *Chlamydia* sur la cellule hôte.
- la protéine de stress Heat Shock Protein (Hsp) qui pourrait interagir directement avec le ligand de la surface cellulaire ou présenter un ligand bactérien dans un processus énergétiquement dépendant.
- le LPS, impliqué dans une adhésion de manière non spécifique en altérant les propriétés physiques de la surface cellulaire.

A la suite de cette liaison, les bactéries sont internalisées par un mécanisme qui reste encore mal caractérisé [43, 98].

Deux facteurs interviendraient cependant dans cette internalisation: l'activation d'une lysolécithine qui favoriserait l'entrée des CE par accroissement de la fluidité membranaire, et la GMP cyclique qui accroîtrait l'aptitude de la membrane cellulaire à fusionner avec la membrane du CE pour former une vacuole cytoplasmique ou phagosome [30].

1.3.4. Phase de multiplication

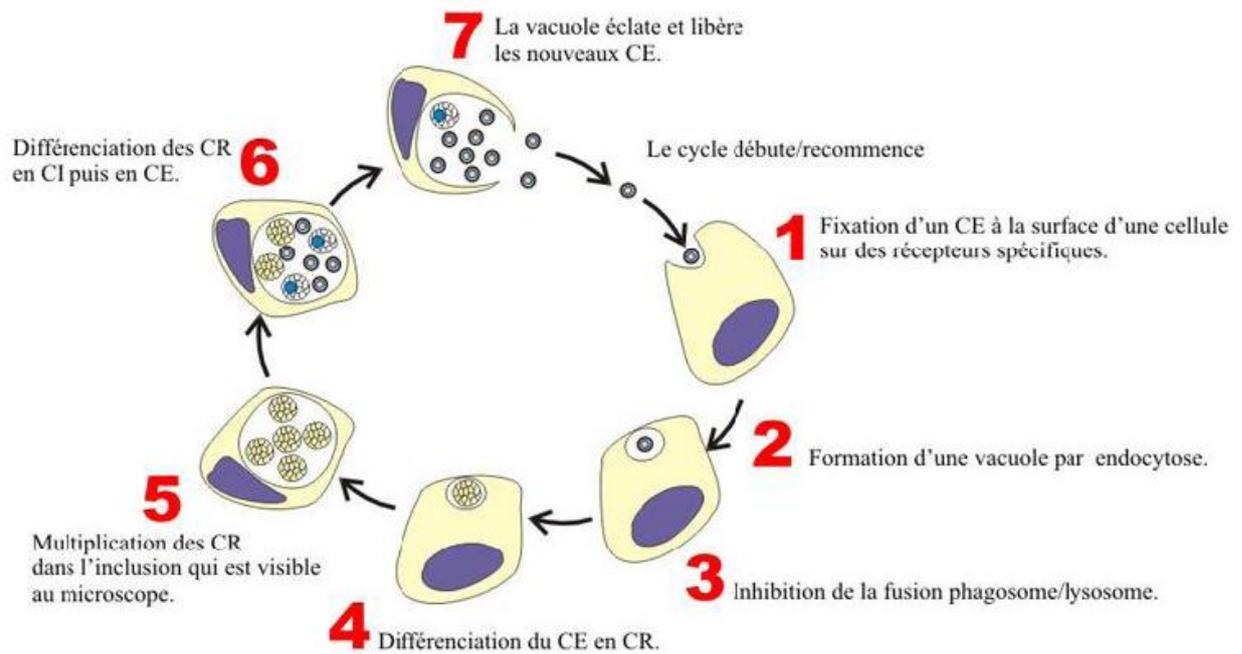
Environ deux heures après internalisation, les CE se différencient en CR. Ce processus fait intervenir la synthèse de protéines par *Chlamydia*, la réduction et le clivage de ponts disulfures à la surface des bactéries, la mise en place de systèmes de transport afin d'acquérir les nutriments et les métabolites depuis la cellule hôte et l'activation d'une adénosine triphosphatase (ATPase). Ces CR se divisent alors par scission binaire.

Au bout de 24 à 30 heures d'infection, quelques CR commencent à nouveau à se différencier. Leur chromatine se condense pour former le nucléoïde des CE, l'activité transcriptionnelle des bactéries diminue et les protéines de la membrane externe se lient entre elles pour former des ponts disulfures. La différenciation des CR en CE est asynchrone et les deux formes de la bactérie peuvent être observées au sein de l'inclusion.

Après 4 ou 5 divisions, on observe l'apparition des formes intermédiaires au cours de laquelle la maturation en corps élémentaires s'effectue. Il y a progressivement une augmentation du titre infectieux pour *Chlamydia trachomatis*. Cependant au bout de 40 heures, l'ensemble des corps présents dans cette vacuole sont essentiellement des CE néoformés. L'inclusion contient alors des CE, des CR et des corps intermédiaires avec un noyau central. Cette vacuole peut alors contenir près d'un millier de formes bactériennes infectieuses et son volume occupe la quasi-totalité du cytoplasme de la cellule hôte, repoussant le noyau à la périphérie de la cellule infectée [84].

1.3.5. Phase de libération

En fonction des espèces et du sérovars, la libération des CE a lieu 48 à 72 heures, voire entre 4 et 5 jours dans le cas de *C. pneumoniae*, après le début de l'infection, entraînant la mort de la cellule hôte et permettant une propagation de l'infection aux tissus environnants.



⊙ Corps élémentaires = CE (0,3 μm de diamètre)

⊙ Corps réticulés = CR (1 μm de diamètre)

⊙ Corps Intermédiaire = CI (1 μm de diamètre)

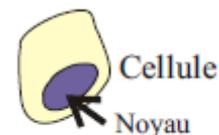


Figure 1 : cycle de développement de *Chlamydia trachomatis* [49].

1.4. Structure antigénique

Les antigènes présentent un grand intérêt pour la classification et le diagnostic des Chlamydioses.

1.4.1. Antigène de genre ou LPS

Il est thermostable, de structure lipopolysaccharidique (LPS) très proche de celle du LPS des bacilles à Gram négatif. Appelé encore antigène de groupe, il est présent à tous les stades du cycle de développement et est commun à toutes les souches. Il est lié à la paroi bactérienne, extractible et utilisable en réaction de fixation du complément pour le diagnostic de la lymphogranulomatose vénérienne, de l'ornithose et de la psittacose qui sont des affections provoquant une forte réponse anticorps.

1.4.2. Antigène spécifique d'espèces

De nature protéique, il correspond à la protéine majeure de la membrane externe (PMME). Il est thermolabile, présent à tous les stades du cycle de développement et diffère selon les espèces. On note également la présence des protéines de choc thermique (Hsp) ou protéines de stress.

1.4.3. Antigènes spécifiques de types

Ils sont de nature protéique et caractérisent les différents sérotypes : 15 pour *C. trachomatis*, 13 pour *C. psittaci*, un seul pour *C. pneumoniae*. L'antigène dit PMME ou MOMP qui est l'antigène prédominant, porte aussi bien les déterminants antigéniques spécifiques d'espèce que de sérovars. Les anticorps dirigés contre ces différents antigènes sont décelables par réaction d'immunofluorescence indirecte, par technique ELISA ou par Western blot. Ils n'ont guère de pouvoir protecteur.

1.4.4. Les immunotypes

Wang et Grayston ont pu différencier pour l'espèce *Chlamydia trachomatis* 15 immunotypes répartis en groupes responsables d'un type particulier de pathologie :

- Les sérotypes A, B, Ba, C sont liés au trachome,
- Les sérotypes D, E, F, G, H, I, J, K sont responsables des infections sexuellement transmissibles, oculaires et néonatales,
- Les sérotypes L1, L2, L3 sont responsables de la lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre.

1.5. Pouvoir pathogène

- Les sérovars A, B, Ba et C du biovar « Trachoma » sont responsables d'une infection oculaire endémique, le trop célèbre trachome. Ce trachome se manifeste généralement par une conjonctivite aiguë, suivie d'une kératoconjonctivite chronique. La gravité de l'infection est variable suivant les individus. Les réinfections successives et la persistance de l'infection oculaire peuvent à long terme provoquer la formation de lésions cicatricielles conduisant à la cécité.

- Les sérovars D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, K (ainsi que le sérovars B) sont responsables d'infections urogénitales (parfois ces sérovars peuvent provoquer un trachome) [20, 31]. Ils sont la cause de très nombreuses IST, peuvent conduire à la stérilité féminine par altération des fonctions de l'endomètre et des trompes de Fallope, consécutivement à une maladie pelvienne inflammatoire, ainsi qu'à de nombreuses grossesses extra-utérine. Chez l'homme, *Chlamydia* est responsable de 40 à 50% des cas d'urétrites [23]. Ces IST sont également à l'origine d'infections oculaires, de conjonctivites et de pneumonies chez les nouveau-nés, transmises de la mère à l'enfant à partir du foyer génital, notamment lors de l'accouchement [78].
- Enfin, les sérovars L1, L2, L2a, L3 sont responsables de la lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas-Favre qui débute par un chancre indolore (génital ou anal) pouvant évoluer vers une lymphadénite avec parfois fistulisation [31].

2. Manifestations cliniques

2.1. Le trachome

2.1.1. Epidémiologie du trachome

Le trachome est une infection oculaire bactérienne non spécifique et contagieuse causée par *Chlamydia trachomatis*. Touchant au départ la paupière, il évolue en l'absence de traitement vers des lésions cornéennes irréversibles pouvant mener à la cécité. Avec 84 millions de personnes touchées (la quasi totalité étant dans les régions les plus pauvres du globe) dont 8 millions avec une déficience visuelle, cette maladie très ancienne était en 2007 la première cause évitable de cécité dans le monde et fait l'objet d'un programme d'éradication par l'organisation mondiale de la santé (OMS) [70].

2.1.2. Symptomatologie du trachome

Le trachome se manifeste généralement par une conjonctivite aiguë, suivie d'une kératoconjonctivite chronique. La gravité de l'infection est variable suivant les individus. Les réinfections successives et la persistance de l'infection oculaire peuvent à long terme provoquer la formation de lésions cicatricielles conduisant à la cécité [23].

Le trachome évolue en quatre phases : [20].

- ✚ le trachome folliculaire, qui constitue la primo infection.
- ✚ le trachome inflammatoire, qui correspond à une infection devenant chronique.
- ✚ le trachome cicatriciel, qui fait suite à une hyperactivité du système immunitaire.
- ✚ le trachiasis, qui survient en l'absence de traitement, correspond à une opacification de la cornée pouvant aller jusqu'à une cécité complète

2.2. Les infections uro-génitales

2.2.1. Transmission et prévalence de *Chlamydia trachomatis*

L'infection à *Chlamydia trachomatis* est devenue 50 à 80 fois plus fréquente que celle à *Neisseria gonorrhoeae* (gonococcie) et représente la première maladie bactérienne sexuellement transmissible dans les pays industrialisés [13].

- En France, début 2006, la prévalence de *Chlamydia trachomatis* était estimée chez les 18-44 ans à environ 1,5%, et chez les 18-24 ans à 2,5% chez les hommes et 3,2% chez les femmes [39].
- Dans les pays d'Afrique, les pathologies causées par les diverses espèces de *Chlamydia* sont encore plus nombreuses, faute de prévention et de traitements satisfaisants. Ces statistiques mondiales sont en outre sous évaluées, les données étant extraites d'études réalisées uniquement dans les pays industrialisés [69].
- Au Sénégal, la prévalence des infections à *Chlamydia trachomatis* était de 5,4% chez les homosexuels en 2004 [91]. En 2011, une étude faite sur une

population constituée de professionnelles du sexe officielles et clandestines a donné une prévalence de *Chlamydiae trachomatis* de 4,9% [18].

2.2.2. Manifestations cliniques

Les infections uro-génitales sont asymptomatiques chez 75 % des femmes et 50 % des hommes [24]. Cette particularité favorise le retard de diagnostic, la propagation de la bactérie, le passage à la chronicité et la survenue des complications.

- **Chez la femme :**

C. trachomatis peut atteindre tous les niveaux de l'appareil génital.

-**Les endocervicites** représentent la localisation la plus fréquente des infections à *C. trachomatis* mais sont le plus souvent pauci ou asymptomatiques et donc méconnues. La bactérie se développe au niveau de l'épithélium cylindrique endocervical.

-**Les urétrites** qui se présentent chez les femmes par une dysurie et une pollakiurie avec un examen cyto bactériologique des urines montrant une leucocyturie associée à des urines stériles, *C. trachomatis* est impliqué dans 25% des cas. *C. trachomatis* est responsable d'endométrite, notamment en post partum.

- **Chez l'homme:**

C. trachomatis est responsable d'urétrites qui peuvent se compliquer en épидидymites et avoir des conséquences sur la fertilité [33]. L'épididyme est un organe cylindrique situé derrière chaque testicule et s'étalant en embrassant- celui-ci, faisant suite aux canaux déférents qui sont des sortes de petits tubes sortant du testicule [32, 6]. Histologiquement cette épидидymite se caractérise par une destruction minimale et une réaction inflammatoire prédominante au niveau péri-canaulaire et intra-épithélial pouvant être la cause d'hypofertilité [47].

2.2.3. Evolution et complications

L'évolution spontanée des formes asymptomatiques se fait souvent vers la guérison (attestée par la disparition de toute trace bactérienne à la PCR) au bout de quelques années [64].

Chez la femme, la principale complication est la survenue d'une salpingite (infection des trompes), pouvant entraîner une stérilité et des douleurs pelviennes chroniques [55, 9, 5].

Un certain nombre de complications par l'infection à *C. trachomatis* existe:

- Le syndrome de Fitz-Hugh-Curtis ou péri-hépatite à *Chlamydia*.
- Le syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter ou syndrome oculo-urétro-synovial: il associe une conjonctivite bilatérale, des signes articulaires et des signes cutanéomuqueux [28].

Les signes apparaissent 1 à 4 semaines après le début de l'urétrite. A long terme, en l'absence de traitement antibiotique, il existe des risques d'infertilité féminine. Une infection à *Chlamydia* chez un homme pourrait aussi diminuer sa fertilité [51, 11].

2.2.4. Infections néonatales

Chez les femmes infectées par *C. trachomatis*, il y a un risque de transmission de la bactérie pendant la grossesse ou l'accouchement avec la survenue de kératoconjonctivite chez le nouveau-né. L'atteinte du nouveau-né se complique dans certains cas de pneumopathie atypique du nourrisson [28].

La conjonctivite à *C. trachomatis* atteint 20% des enfants exposés. Elle survient entre 5 et 14 jours après la naissance, la pneumopathie apparaît au delà de la deuxième semaine de vie [33].

Une pneumonie chez le nouveau-né peut apparaître quatre à dix semaines après le contact avec la mère (généralement lors de l'accouchement). La clinique se caractérise par des râles bronchiques diffus. La radiographie des poumons montre une infiltration interstitielle bilatérale. Le diagnostic est confirmé par les prélèvements pharyngés et recherche d'inclusions cytoplasmiques de *chlamydia* [43].

2.3. Lymphogranulomatose vénérienne ou maladie de Nicolas Favre

2.3.1. Epidémiologie

C'est une infection sexuellement transmissible très répandue dans les régions tropicales et subtropicales ou elle représente 10% des ulcérations génitales. Dans les grandes villes américaines et européennes, elle atteint les hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes [96].

Plusieurs cas de LGV ont également été signalés en Australie et une recrudescence notée en Europe, aux USA, au Canada [85, 90].

2.3.2. Symptomatologie

La durée d'incubation de la LGV est très variable, de deux à soixante jours. C'est une maladie qui évolue classiquement en trois phases. Tout d'abord il s'agit généralement d'une micro-ulcération génitale ou anale passant souvent inaperçue car indolore, transitoire et volontiers profonde (col, urètre, rectum). S'ensuit généralement une adénopathie inflammatoire avec des écoulements mucopurulents plus ou moins hémorragiques. Enfin, en l'absence de traitement, la pathologie peut alors aboutir à l'apparition de rétrécissement urétral et de fistules.

2.4. Réponse immunitaire

Faisant suite à une infection primaire à CT, les réponses immunes, cellulaires et humorales ne confèrent qu'une immunité partielle contre les réinfections. L'efficacité des anticorps est limitée en raison de la localisation intracellulaire de la bactérie. Les anticorps produits lors de l'infection persistent pendant des années après l'éradication de la bactérie. Ceci complique l'interprétation des dosages d'anticorps.

L'inflammation observée lors d'une nouvelle infection est plus prononcée que celle observée lors d'une infection primaire. Des infections uro-génitales répétées contribueraient à l'établissement de l'inflammation chronique qui conduit à la stérilité tubaire. Au sein de la structure antigénique de la paroi de CT, deux éléments structuraux seraient à la base de cette réponse immunitaire et inflammatoire du tractus : la heat shock protéine (Hsp) et le lipopolysaccharide (LPS). La Hsp

induirait des médiateurs de l'inflammation et une réaction cellulaire et humorale responsable de phénomènes d'hypersensibilité retardée et d'auto-immunité. Le LPS bactérien induirait une réponse inflammatoire médiée par le complément et une réaction immunitaire médiée par les lymphokines et les lymphocytes CD4 [20].

3. Diagnostic biologique des infections à *C. trachomatis*

La complexité de la physiologie de ces infections rend le diagnostic biologique difficile. Celui-ci repose 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.

La fréquence de détection de *C. trachomatis* au niveau des voies génitales varie beaucoup selon les méthodes de diagnostic biologique [36, 45, 46].

3.1. Prélèvements, transport et conservation

La qualité du prélèvement conditionne la fiabilité des résultats. Le recueil des cellules, lors des prélèvements, est un pré-requis indispensable en raison du caractère intracellulaire des *Chlamydia*. Il doit être réalisé en dehors de toute antibiothérapie.

- Chez la **femme** : le prélèvement cervical associé à un prélèvement urétral, est le meilleur choix dans les infections génitales basses. Les urines du premier jet sont réservées au dépistage.
- Chez l'**homme** le prélèvement urétral peut être remplacé par les urines du premier jet si une technique d'amplification génomique avec contrôle interne est employée. Les sécrétions prostatiques et spermes peuvent être aussi utilisés.
- Chez le **nouveau-né**, on recueille les cellules épithéliales en frottant un écouvillon sur la conjonctive enflammée. En cas de pneumonie, l'aspiration naso-pharyngée ou trachéo-bronchique est le prélèvement de choix.

Les urines du premier jet sont conservés à +4°C si les prélèvements doivent être traités immédiatement ou à -80°C pour de longues périodes. En cas de recherche d'antigènes bactériens par immunofluorescence directe, des frottis seront confectionnés, séchés à l'air puis fixés à l'acétone ou au méthanol [15, 47].

D'autres sites de prélèvement peuvent être dictés par les circonstances cliniques : biopsie de l'endomètre ou de la trompe, écouvillonnage conjonctival, pharyngé ou rectal, ponction au niveau de l'épididyme, les muqueuses respiratoires, les aspirations d'oreille moyenne, les liquides articulaires et biopsies synoviales et les plaques d'athérome.

On a recours à un milieu de transport sélectif ; milieu de saccharose phosphate contenant un sérum et des antibiotiques ou milieu 2SP contenant 5 % de sérum de veau fœtal. La conservation se fait à 4°C si les prélèvements doivent être traités immédiatement ou à -80°C pour de longues périodes [77].

3.2. Examen microscopique direct

La prévalence élevée des infections à *Chlamydia* reflète la longue persistance de ces micro-organismes chez leur hôte. Les infections sont très souvent asymptomatiques et constituent un risque important de complications et de transmission. Le diagnostic direct d'une infection aiguë à *Chlamydia trachomatis* est réalisé soit 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.

L'examen de frottis colorés au Giemsa ou au lugol permet la mise en évidence dans les cellules, des inclusions cytoplasmiques contenant des granulations punctiformes caractéristiques des *Chlamydia*. L'examen du frottis peut se faire également en immunofluorescence en présence d'anticorps antichlamydien monoclonal. Au microscope à fluorescence les *Chlamydia* apparaissent sous forme de corps élémentaires extracellulaires punctiformes émettant une fluorescence vert pomme tranchant sur le fond orangé de la préparation.

Au cours d'une infection chronique ou persistante, la charge bactérienne est faible ce qui implique l'utilisation des techniques sensibles comme celle de la détection des acides nucléiques avec amplification [47].

3.3. Isolement de *Chlamydia trachomatis* en culture cellulaire

La culture cellulaire est restée longtemps la méthode de référence. Elle nécessite un prélèvement riche en cellule (écouvillon en plastique) et une technique parfaite de prélèvement et de transport [88].

Les *Chlamydiae* sont incapables de croître sur milieux synthétiques mais se développent bien dans la membrane vitelline de l'œuf embryonné et sur des lignées de culture cellulaire. Ainsi la culture peut se faire sur œuf embryonné ou sur des lignées de cultures.

Sur œuf embryonné où le produit pathologique broyé est inoculé par voie intra vitelline. Les œufs sont incubés à 35°C en atmosphère humide pour *Chlamydia trachomatis*. La mort de l'embryon survient dans un délai qui est fonction de la quantité de *chlamydia* incubée.

Sur des lignées de cultures cellulaires, les cellules les plus couramment utilisées sont les cellules Mac COY issues d'une synoviale humaine mais ayant perdu toute trace de cette origine, et HeLa 229 (lignée issue d'un carcinome du col utérin) [22].

Le prélèvement est inoculé sur cellule Mac COY ou HeLa puis une étape de centrifugation permet l'absorption des bactéries sur les cellules. Après 48 heures d'incubation à 37°C sous CO₂, la révélation des inclusions est réalisée par des anticorps monoclonaux spécifiques d'espèces. Un seul corps élémentaire viable suffit à positiver la culture [15].

3.4. Méthodes rapides et directes de détection d'antigènes de *Chlamydia trachomatis*

Les examens directs rapides (immunofluorescence sur lame ou techniques immunoenzymatiques) ont une bonne spécificité mais manquent de sensibilité, ils sont disponibles en routine dans tous les laboratoires [19].

On peut détecter des antigènes (Ag) de *Chlamydia trachomatis* dans un frottis de prélèvement génital par immunofluorescence directe (IFD) à l'anticorps monoclonal ou par méthode immunoenzymatique rapide à partir du prélèvement endocervical ou endo-utérin.

3.5. Détection d'anticorps sériques

La sérologie ne contribue pas au diagnostic des infections basses à *Chlamydia trachomatis* et est rarement utile dans le diagnostic des infections pelviennes chez la femme [88]. Cette 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 ou les Ig G et les Ig A ont des taux élevés. Les Ig A ont une demi-vie courte et leur détection serait en faveur d'une infection en évolution [46].

3.6. Diagnostic moléculaire

Il existe différentes techniques de biologie moléculaire pour la détection de *Chlamydia trachomatis*, concernant les détails voir chapitre IV.

4. Traitement et prévention

4.1. Sensibilité de *Chlamydia trachomatis*

L'efficacité des antibiotiques (ATB) sur *C. trachomatis* dépend de la sensibilité naturelle de la bactérie à différentes molécules et dépend des paramètres pharmacocinétiques, notamment la diffusion tissulaire et la pénétration intracellulaire indispensables à l'activité de la molécule [33].

In vitro, les ATB qui possèdent une forte activité anti-chlamydienne sont les tétracyclines, les macrolides. L'amoxicilline a une activité moyenne [22].

4.2. Traitement

Chlamydia trachomatis peut être traitée et guérie avec des antibiotiques qui ont une forte pénétration intracellulaire.

Le traitement des infections uro-génitales non compliquées à *C. trachomatis* repose sur l'azithromycine ou la doxycycline et l'ofloxacine [2, 93]. Ces deux antibiotiques ont une bonne diffusion cellulaire. Les infections génitales compliquées se traitent plus longtemps et font appel à des associations d'antibiotiques [12, 58].

La guérison bactériologique ne permet pas de garantir une guérison clinique, car des adhérences et des lésions tubaires peuvent perdurer après la disparition de la bactérie. Des échecs thérapeutiques ont été décrits, attribués à la réinfection, à un traitement mal suivi ou à la persistance du germe.

4.3. Prévention

Elle doit s'appuyer sur :

- ✓ la sensibilisation et l'éducation sanitaire de la population sur les IST de manière générale,
- ✓ la recherche et le traitement des partenaires sexuels,
- ✓ la protection des rapports sexuels jusqu'à la fin du traitement,
- ✓ le contrôle de la guérison en fin de traitement.

CHAPITRE III : GENERALITES SUR LES INFECTIONS A *NEISSERIA GONORRHOEAE*

1. GENERALITE

1.1. Définition

Neisseria gonorrhoeae est l'espèce responsable d'une IST qui est la gonococcie. C'est une maladie à déclaration obligatoire, touchant les deux sexes mais préférentiellement l'homme chez qui elle est symptomatique le plus souvent, autrement dit s'accompagne de symptômes et plus particulièrement d'un écoulement purulent par l'urètre. C'est une maladie transmise par contact sexuel due à l'infection de l'organisme par le gonocoque et se caractérisant par des atteintes des muqueuses de l'appareil urinaire et génital et d'autres organes. La gonococcie est quelquefois à l'origine d'une gonococcémie correspondant à la présence du gonocoque dans le sang [32, 6].

1.2. Historique

Le mot gonorrhée est d'origine grecque. Il est de Galien et signifie écoulement de semence. Rabelais lui donna le nom de « chaude pisse ». Swadiaur lui donna le nom de blennorragie en 1784. Longtemps, gonorrhée et syphilis ont été considérées comme deux manifestations d'une même maladie. Benjamin Bell, en 1773, montra la différence entre les deux maladies ; Hernandez, en 1812, apporta la preuve définitive de cette différence, qui sera confirmée en 1838 par Philipe Ricord. Ce n'est qu'en 1879 qu'Albert Neisser a découvert le gonocoque dans les pus urétral et oculaires à 30 – 34° C et lui donna le nom de *Neisseria gonorrhoeae* [83].

1.3. Classification

Le genre *Neisseria* appartient à la famille des *Neisseriaceae*. Seules deux espèces de *Neisseria* sont considérées comme habituellement pathogènes chez l'homme : *Neisseria gonorrhoeae* et *Neisseria meningitidis*.

1.4. Caractères bactériologiques

1.4.1. Morphologie

Les gonocoques sont des diplocoques à Gram négatif se regardant par la face concave, en forme de « grain de café » et dont chaque élément mesure environ 0,7 micron à 1 micron. Ils peuvent être intra ou extracellulaire [10].



Figure 2: *Neisseria gonorrhoeae*, diplocoque [50].

1.4.2. Caractères cultureux

Les gonocoques sont des germes fragiles (très sensibles à la dessiccation) et exigeants. Au sortir de l'organisme, on les cultive à 36°C -37°C sur gélose au sang cuit ou chocolat, enrichie de supplément vitaminique (polyvitex, supplément G) et additionnée d'un mélange d'antibiotiques (vancomycine, colistine et nystatine ou V.C.N.) pour inhiber la croissance des bactéries commensales. Une certaine proportion des souches est cependant sensible à la vancomycine, d'où l'utilité d'ensemencer aussi sur milieu sans inhibiteurs en parallèle.

N. gonorrhoeae est aérobic stricte mais une atmosphère humide, enrichie de CO₂ (5-10 %) est indispensable pour la croissance, avec une température optimum de 37°C et un pH optimum de 7 [63].

1.4.3. Caractères biochimiques

Neisseria gonorrhoeae possède un cytochrome oxydase et une catalase comme toutes les autres *Neisseria*. Il acidifie les milieux contenant du glucose mais est sans action sur les milieux contenant les autres sucres étudiés (maltose, saccharose et fructose).



Figure 3: Action de *N. gonorrhoeae* sur les sucres [50].

Il ne possède pas de beta-galactosidase, ni de gammaglutamyl transférase et ne réduit pas les nitrates en nitrites.

1.4.4. Structures antigéniques

Les gonocoques possèdent dans leur paroi, des lipopolysaccharides antigéniques et toxiques (endotoxines). Les protéines de la membrane externe (PI, PII, PIII) sont antigéniques. La protéine PI permet de distinguer de nombreux sérovars. Les structures antigéniques sont les pili, les protéines I, II, III et le LPS.

- ✚ les pili permettent aux germes qui en sont pourvus, l'adhésion aux cellules épithéliales et interfèrent avec la phagocytose des neutrophiles ;
- ✚ les protéines I, II, et III (antigéniques) et les lipopolysaccharides ou LPS (antigénique et toxique) qui sont situés sur la membrane externe trilamellaire :
 - la protéine I est importante pour déclencher l'endocytose ;
 - La protéine II est identifiée comme une protéine de la membrane externe associée à une opacité et pourrait servir de ligand permettant une adhésion du gonocoque sur différents types de cellules humaines ;
 - la protéine III et LPS: la protéine I interagit avec la protéine III et les LPS pour former les structures complexes de la membrane externe [53, 74].

2. Epidémiologie

2.1. Transmission

Le gonocoque est un pathogène obligatoire uniquement rencontré chez l'homme. Il est retrouvé au niveau des muqueuses et des sous-muqueuses. Le principal site du gonocoque chez la femme est l'endocol. Il ne résiste pas dans la nature car il est très fragile et sensible aux variations de température et de pH.

C'est un diplocoque encapsulé, Gram négatif, intra ou extra cellulaire dont la transmission est favorisée par le contact vaginal, anal ou pharyngé non protégé car la bactérie responsable trouve, dans les régions chaudes et humides, un environnement favorable à sa multiplication [15, 11, 53].

2.2. Prévalence

Après un pic dans les années 70, l'incidence de la gonococcie a considérablement chuté dans les pays de l'Europe de l'Ouest et les nouveaux cas sont le plus souvent importés [11].

Au Canada on assiste à une augmentation, la prévalence est passée de 15 à 28 pour 100.000 habitant entre 1997 et 2005 [1].

En Guinée Bissau en 2001, une étude portant sur 200 femmes, a montré que 17 % étaient infectées par le *Neisseria gonorrhoeae* et sur 31 hommes, que 38.7 % étaient infectés par *Neisseria gonorrhoeae* [38].

Au Sénégal, en 2004 la prévalence des infections à *Neisseria gonorrhoeae* était de 5,4% chez les homosexuels [91]. En 2007 elle a diminué, avec un taux de 2,6% [92].

En 2011, une étude faite sur une population constituée de professionnelles du sexe officielles et clandestines a donné une prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* de 7,8% [18].

3. Manifestations cliniques

3.1. Blennorragie

L'incubation (période comprise entre la contamination et l'apparition des premiers symptômes de l'infection) dure en principe moins de cinq jours mais peut dépasser quinze jours surtout quand il a été prescrit des antibiotiques au préalable.

3.1.1. Chez l'homme

Chez l'homme, en ce qui concerne la première forme c'est-à-dire la forme bruyante, les symptômes sont : un écoulement purulent, de coloration jaunâtre s'accompagnant de brûlures à la miction, intenses qualifiées de chaude-pisse ou blennorragie. Il existe chez certains patients une balanite (inflammation du gland).

Pour la forme non compliquée il n'y a pas de ganglions anormalement développés ou douloureux, de température et le reste de l'examen effectué par le médecin est normal. Quelquefois l'écoulement qui apparaît au bout de l'urètre n'est pas trouble et plus rarement on ne constate aucun écoulement. Du reste environ 5% des personnes réellement porteuses du gonocoque ne présentent pas de signes cliniques. [32, 6].

3.1.2. Chez la femme

Chez la femme le plus souvent il s'agit d'une forme asymptomatique. Dans ce cas, la gonococcie débute par une phase aigue se caractérisant par une uréthro-cervicite avec des symptômes discrets à type de pollakiurie, de brûlures, de pertes contenant du pus [32, 6]. La cervicite est la manifestation la plus fréquente et elle se traduit par des leucorrhées, jaunes ou blanches, parfois peu différentes en quantité des pertes physiologiques. Elle est dans 50 à 90% des cas totalement asymptomatique. L'examen au spéculum montre une fragilité du col de l'utérus, des sécrétions mucopurulentes, c'est le plus souvent une découverte d'examen gynécologique systématique ou motivé par l'urétrite du partenaire. Une urétrite est souvent associée à une cervicite [19].

3.2. Les complications et les formes extra génitales

3.2.1. Evolution et complications

Quand une infection par le gonocoque n'est pas diagnostiquée à temps et donc non traitée, elle est susceptible de se compliquer et d'entraîner une orchio-épididymite.

L'inflammation de l'épididyme, appelée également épiddymite, est presque toujours associée avec une inflammation du testicule dans le cadre d'une orchio-épiddymite. Parfois les deux épiddymes sont atteints, ce qui provoque une obstruction des canaux évacuateurs et donc une hypofertilité. L'évolution peut se faire vers l'inflammation de la prostate, ou des vésicules séminales qui sont alors affectées par la suite. Chez certains patients, on remarque la survenue d'une conjonctivite dite gonococcique, qui est due a par la transmission du germe par l'intermédiaire des mains. Enfin une septicémie gonococcique se traduit par le passage du gonocoque dans le sang [32, 6].

Chez la femme, les complications de l'infection gonococcique ou traitée inadéquatement peuvent être particulièrement sévères. En effet, il peut s'en suivre des maladies pelviennes inflammatoires, avec comme conséquences, des séquelles à long terme telles que douleurs pelviennes, grossesses ectopique et infertilité [75].

3.2.2. Autres complications susceptibles de survenir après une gonococcie

Les complications possibles de survenir après une gonococcie sont : l'arthrite gonococcique, la ténosynovite, la conjonctivite gonococcique, la gonococcie cutanée, la péri hépatite, la kératodermie gonococcique, l'endocardite infectieuse, la méningite gonococcique, la polychondrite gonococcique, la myéline gonococcique [32, 6].

3.2.3. Cas particuliers :

- **La vulvo-vaginite de la fillette** se caractérise par la présence de rougeur, d'œdème de la vulve, de pertes vaginales contenant du pus. L'infection se transmet par contact direct soit par des objets souillés soit par des sécrétions provenant d'adultes.
- **La gonococcie du nouveau-né** et plus particulièrement l'ophtalmie à gonocoque : cette conjonctivite purulente va se manifester dès la première semaine de la vie et se compliquer quelquefois d'ulcérations susceptibles d'aboutir à une cécité visuelle. Cette pathologie est quelquefois confondue avec une conjonctivite à *Chlamydia* [32, 6].

3.3. Immunité et réponses immunitaires

La gonococcie est une maladie non immunisante et un sujet guéri est encore vulnérable [32, 6]. La réponse immunitaire en cas d'infection est d'une grande complexité et, concerne aussi bien l'immunité à médiation cellulaire que l'immunité à médiation humorale. De nombreux essais de mise au point de réactions sérologiques, permettant de détecter les personnes infectées, ont été tentés sans succès [54]. *In Vivo*, la souche infectante de *Neisseria gonorrhoeae* essaie d'échapper aux défenses anti-infectieuses de l'hôte en modifiant régulièrement la structure de ses déterminants de virulence (pili et protéine PII). Ces constituants sont immunogènes et l'hôte développe par exemple, vis-à-vis d'une protéine PII de structure définie, une réaction immunitaire à la fois humorale et cellulaire. Les gonocoques élaborent alors une nouvelle protéine PII jusque là inconnue du système immunitaire, et le phénomène peut se répéter plusieurs fois. Cette hétérogénéité antigénique de *Neisseria gonorrhoeae* est un obstacle majeur à l'élaboration d'un vaccin anti-gonococcique et explique les récurrences.

4. Diagnostic biologique de la gonococcie

4.1. Les prélèvements

4.1.1. Chez l'homme

On effectue un prélèvement urétral par écouvillonnage ou à l'aide d'une curette ophtalmologique. Dans les formes subaiguës ou n'ayant pas fait leur preuve étiologique, il est souvent fort utile de prélever la sécrétion uréthro-prostatique après massage très prudent de la prostate.

4.1.2. Chez la femme

Après expression du col avec les valves du spéculum, un écouvillon est introduit dans le canal endocervical en lui imprimant un mouvement de rotation pendant 5 à 10 secondes pour lui permettre de s'imprégner des sécrétions. Au niveau de l'urètre: s'il n'y a pas d'écoulement visible, l'urètre est pressé vers l'orifice externe pour faire apparaître l'exsudat ; si aucune sécrétion n'est obtenue il faut alors introduire

un écouvillon dans le canal urétral et le tourner pendant 5 secondes en prenant le soin de masser d'abord l'urètre contre la symphyse pubienne.

4.1.3. Les prélèvements dans les deux sexes

On peut effectuer des prélèvements:

- ✚ Au niveau du pharynx à l'aide d'un abaisse-langue et d'une bonne source de lumière, un écouvillonnage est effectué en insistant sur les cryptes amygdaliennes.
- ✚ Au niveau du rectum à l'aide d'un anoscope ou d'un rectoscope lubrifié à la vaseline.
- ✚ Par le recueil des urines du 1er jet.

Le milieu de transport comme le milieu de Young et Stuart peut être utilisé.

4.2. Examen microscopique direct

Il n'a de valeur diagnostique que pour une forme aiguë récente (quel que soit le sexe). Dans tous les cas, cet examen est souvent insuffisant. Les sécrétions sont étalées en couche mince sur les lames. Le frottis est séché à l'air, fixé puis coloré au Gram ou au bleu de méthylène. L'observation au microscope en immersion permet la détection des diplocoques à Gram négatif intra ou extracellulaire en « grain de café ». On détecte également la présence des leucocytes et des polynucléaires [15].

4.3. La mise en culture

La culture doit être faite immédiatement après le prélèvement, sur milieu riche et sélectif : gélose chocolat + supplément vitaminique + V.C.N. à 36°C + 5-10 % CO₂ + humidité. Les colonies apparaissent sous forme de petite taille surélevées, grisâtres, brillantes, opaques ou translucides [53].

Il est recommandé que la culture soit utilisée pour évaluer l'efficacité du traitement d'une infection gonococcique dans les situations suivantes :

- le traitement a déjà échoué ;
- une résistance aux antimicrobiens s'est avérée ;
- l'adhésion au traitement n'est pas assurée ;
- le patient a eu de nouveaux contacts avec une personne infectée non traitée;

- le patient est un enfant...

Toutefois, cette technique exige le respect des conditions de conservation et de transport pour assurer la vitalité du gonocoque, ce qui est parfois difficile compte tenu des conditions et contraintes locales [1].

4.4. Diagnostic moléculaire

Il existe différentes techniques de biologie moléculaire pour la détection de *Neisseria gonorrhoeae*, concernant les détails voir chapitre IV.

5. Traitement et prévention

5.1. Traitement

5.1.1. Etude de la sensibilité de la bactérie

Les souches de *Neisseria gonorrhoeae* sont devenues relativement moins sensibles à la pénicilline et à la tétracycline. L'étude de la sensibilité aux antibiotiques repose sur la détermination de la CMI par la diffusion sur disque. La sensibilité ou la résistance est évaluée en fonction du diamètre de la zone d'inhibition.

5.1.2. Schémas thérapeutique

Les schémas thérapeutiques conseillés des urétrites et cervico-vaginites utilisent : les aminosides (spectinomycine), les quinolones de deuxième génération (péfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacine) et surtout les céphalosporines de troisième génération avec la céfoxitine et la céfotaxime qui ont donné d'excellents résultats. Les gonococcies oro-pharyngées ou rectales doivent bénéficier des mêmes molécules.

Les gonococcémies sont traitées par la ceftriaxone : 1g/j en IM ou IV pendant 15 jours [8].

Il faut arrêter les rapports sexuels jusqu'à la guérison et diagnostiquer le ou les partenaire(s) sexuel(s) avant la reprise des rapports.

Dans tous les cas, le traitement doit être accompagné d'un traitement empirique contre les infections non gonococciques, à moins que les résultats du test pour la recherche de *Chlamydia trachomatis* soient disponibles et négatifs [1].

5.2. Prévention

En l'absence de vaccin efficace, la seule prévention est l'éducation sexuelle :

- hygiène sexuelle et responsabilité à l'égard des partenaires,
- prévention mécanique (préservatifs),
- emploi de contraceptifs chimiques,
- éducation sexuelle permettant le traitement précoce des malades et de leurs partenaires, etc.

L'ophtalmie purulente du nouveau-né est prévenue par l'instillation d'un collyre à l'érythromycine à 0,5% ou à la tétracycline à 1% [53].

CHAPITRE IV : APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE DANS LES INFECTIONS URO-GENITALES A *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* ET A *NEISSERIA GONORRHOEAE*

La biologie moléculaire est apparue dans les années [1930](#), le terme n'ayant cependant été inventé qu'en [1938](#) par [Warren Weaver](#).

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%) [47].

1. Les types de prélèvement

Les techniques de BM rendent possibles la détection de *C. trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* dans presque tous les types de prélèvements (sperme, urines, prélèvements vulvaire ou vaginal), en particulier ceux qui sont inadaptés à la culture cellulaire en plus des prélèvements classiques endocervicaux et urétraux.

2. Avantages et contraintes des techniques de biologie moléculaire

L'utilisation des techniques d'amplification des acides nucléiques pour la détection de l'infection gonococcique et de l'infection à *Chlamydia trachomatis* comporte les avantages suivants :

- Leur sensibilité est habituellement très élevée, à condition que les laboratoires tiennent compte de la présence possible d'inhibiteur d'amplification qui peuvent entraîner des résultats faussement négatifs ;
- Contrairement à la mise en culture la viabilité du pathogène n'influe pas sur le résultat, ce qui rend le transport et l'entreposage des prélèvements plus simples,
- Elles permettent la détection de *N. gonorrhoeae* et de *C. trachomatis* dans les prélèvements urétraux, endocervicaux, vaginaux et urinaires [61].

Les contraintes de la biologie moléculaire concernent les règles de bonnes pratiques de laboratoire spécifiques à cette technique, qui vont nécessiter un agencement particulier des laboratoires et une formation spécifique du personnel [4, 79, 83,52].

Une technique d'amplification des acides nucléiques n'est pas recommandée pour une analyse de contrôle de l'efficacité du traitement. Si elle est la seule option offerte, elle doit être effectuée trois semaines ou beaucoup plus tard après le

traitement pour éviter les résultats faussement positifs dus à la présence résiduelle de micro-organismes non viables.

3. Les différentes techniques

Les techniques moléculaires permettent de diagnostiquer les infections *C. trachomatis* et à *N. gonorrhoeae* à partir de prélèvements d'urines rendant le prélèvement moins contraignant par rapport aux méthodes classiques.

Différentes techniques de détection des acides nucléiques ont été développées : hybridation moléculaire et techniques d'amplification génique *in vitro* [4].

3.1. Hybridation moléculaire

3.1.1. Détection des ARN de *Chlamydia trachomatis*

C'est la première technique de biologie moléculaire appliquée à la détection de *C. trachomatis*. Le système commercialisé par Gen Probe utilise le principe de l'hybridation en milieu liquide pour le diagnostic direct de *C. trachomatis*. Il s'agit de la sonde Pace 2 *trachomatis*, Direct Probe Assay®. 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 *Chlamydia*, en formant un hybride stable qui peut être séparé des sondes libres par des billes magnétiques. Les sondes libres sont séparées 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 [16].

3.1.2. Détection de l'ARN de *Neisseria gonorrhoeae*

C'est une technique d'hybridation moléculaire qui peut être réalisée à partir d'urines ou d'écouillons urétraux et endocervicaux. L'ARNr est détecté par l'utilisation d'une sonde ADN spécifique.

3.2. Techniques utilisant l'amplification des acides nucléiques

C'est la méthode de choix des techniques de biologie moléculaire. Elle peut être pratiquée sur un simple jet d'[urine](#) chez l'homme ou chez la femme, prélèvement au niveau du vagin ou de l'[endocol](#) chez la femme ou de l'urètre chez l'homme [88].

Les méthodes d'amplification des acides nucléiques sont couramment utilisées : LCR, TMA, PCR et les techniques de PCR en temps réel.

3.2.1. La ligase Chain Reaction (LCR) [14]

C'est une technique qui amplifie les séquences nucléotidiques dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Elle amplifie aussi les séquences nucléotidiques de l'ADN génomique de *N. gonorrhoeae*

3.2.2. La Transcription Mediated Amplification (TMA) [62]

Elle utilise la sous unité 16S de l'ARN ribosomal pour la détection de *C. trachomatis*

3.2.3. La polymérase Chain Reaction (PCR)

Une PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles d'amplification permettant d'obtenir plusieurs millions de copies de la séquence cible. Cette technique permet de détecter des germes même morts et sa sensibilité permet l'utilisation de milieux pauci-microbiens comme les urines.

Cette technique amplifie les séquences nucléotidiques dans le plasmide cryptique de *C. trachomatis*. Elle amplifie également des séquences nucléotidiques du génome de *N. gonorrhoeae* [47].

Il y'a une évolution de la PCR classique en PCR en temps réel dont le principe de base est le même. Cependant pour la PCR classique, l'amplification est mesurée en fin de la réaction alors que pour le temps réel, la détection se fait en même temps que l'amplification.



**DEUXIÈME PARTIE :
NOTRE ÉTUDE**

DEUXIEME PARTIE

CHAPITRE I : JUSTIFICATIFS, OBJECTIFS ET CADRE DE L'ETUDE

1. Justificatifs de l'étude

Les IST sont nombreuses et diverses. *Neisseria gonorrhoeae* et *Chlamydia trachomatis*, isolément ou en association, sont la cause de la majorité des infections uro-génitales sexuellement transmissibles chez l'homme, et d'une bonne partie des cervico-vaginites de la femme.

L'augmentation observée de leur incidence pose la question de l'opportunité d'un dépistage systématique, ce qui porterait un point favorable pour combattre la chaîne de transmission.

Les pratiques d'analyses de routine sont parfois sujets d'erreurs du fait d'un défaut d'application stricte des bonnes pratiques de laboratoire, surtout en Afrique. Il est de ce fait nécessaire que les laboratoires émergents acquièrent une compétence soutenue et régulièrement évaluée pour s'assumer redevables de résultats d'analyses adéquats.

2. Objectifs de l'étude

L'objectif de l'étude porte sur un contrôle de qualité (CQ) effectué au laboratoire de biologie moléculaire de l'hôpital Aristide Le Dantec (HALD) afin d'estimer la qualité des tests moléculaires pour la détection et l'identification de *Chlamydia trachomatis* et de *Neisseria gonorrhoeae* à partir d'échantillons d'urine testés provenant du Mali.

Cette étude vise à comparer les différents résultats obtenus entre le laboratoire malien (INRSP) et celui sénégalais (LBVHALD). Il s'agissait donc de re-tester à l'aveugle des échantillons d'urines. De cette comparaison découlera l'évaluation de la compétence du laboratoire malien dans le diagnostic moléculaire de ces infections.

3. Cadre d'étude

3. 1. Prélèvements :

Les prélèvements ont été effectués au Mali et étaient constitués d'urines du premier jet.

3.2. Les sites de collecte et d'analyses

L'étude s'est effectuée sur 626 échantillons d'urine provenant de 7 sites géographiques du mali à savoir : Bamako, Kayes, Ségou, Sikasso, Koutiala, Mopti et Gao.



d'études du Mali <http://fr.wikipedia.org/wiki/Mali> consulté le 28/01/2012

L'INRSP est le laboratoire de recherche malien où les échantillons d'urine ont été testés par la technique manuelle avant d'être envoyés au Sénégal pour être testés à nouveau par une technologie automatisée.



Figure 5: Institut National de Recherche en Santé Publique (INRSP) Bamako
http://www.gfmer.ch/Activites_internationales_Fr/INSRP.htm consulté le 28/01/2012

3.3. Laboratoire de référence pour le contrôle de qualité :

Le laboratoire de Bactériologie et de Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec

Le laboratoire de bactériologie-virologie (LBV) de l'HALD est le centre national de référence pour le diagnostic du SIDA et des IST. Il est également le laboratoire de référence OMS pour le VIH-2 et centre collaborateur ONUSIDA. Il assure le contrôle de qualité des laboratoires de la sous région pour la sérologie VIH et constitue un centre de formation, de perfectionnement et d'expertise pour les autres laboratoires du Sénégal ainsi que ceux des pays limitrophes. Il assure également un nouveau programme, Afriqualab en partenariat avec le CDC et l'OMS, dans la perspective d'accréditation des laboratoires de santé en Afrique. Afriqualab permet de mettre à la disposition des laboratoires un système de Contrôle de Qualité avec des panels pour la biochimie, l'hématologie, l'hémostase, l'immunologie, la sérologie, la microscopie clinique, la bactériologie, la mycobactériologie, la mycologie, la parasitologie et la virologie.

Il comprend : une unité de Bactériologie, une unité de Virologie, une unité d'immunologie et une unité de biologie moléculaire. C'est dans cette dernière unité que les tests moléculaires de diagnostic de NG et CT ont été réalisés pour le contrôle de qualité.



Figure 6: Laboratoire de Bactériologie et de Virologie de l'hôpital Aristide le Dantec (LBVHALD)

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Matériel

1.1. Appareillage : Analyseur *m2000sp/rt*

L'automate *m2000sp/rt* comprend deux appareils l'Abbott *m2000sp* qui est un extracteur automatique d'acides nucléiques et l'Abbott *m2000rt* qui réalise la PCR en temps réel. (Voir annexe 1)

Il permet de traiter plusieurs types d'échantillons : sang total, plasma/sérum, urines, écouvillon, sperme, leucocyte, biopsie, lait, moelle, liquide de sécrétion, liquide de ponction, sécrétions bronchiales, fécès, expectorations...

1.2. / Description (Voir annexe 2)

1.3. / Matériel et réactifs d'usage général (voir annexe 3)

1.4. / Matériel spécifique à la *m2000* Abbott real time (voir annexe 4)

2. / Méthodes

2.1. / Mode opératoire

Pour les tests nous avons utilisé le Kit *m2000* Abbott Real Time des laboratoires Abbott. Concernant les détails des manipulations (voir annexe 5).

2.2. / Recherche de CT/NG par PCR en temps réel : technologie par *m2000*[®]rt

➤ Principe de la PCR en réel temps

La PCR en temps réel, amplification avec détection en temps réel utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à une sonde fluorescente dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale [3, 71]. La collecte des données à la phase exponentielle, la plus reproductible de la

réaction, rend la méthode plus sensible et réduit les risques de contamination car il n'y a pas de manipulation post-PCR.

➤ **Les régions cibles [63]**

- **Pour *Chlamydia trachomatis* :**

Cette technique cible une séquence de 102 paires de bases localisées dans le plasmide cryptique de *Chlamydia trachomatis*. Ce plasmide est hautement conservé dans tous les sérovars de *C. trachomatis* mais ne se trouvent pas dans d'autres espèces.

- **Pour *Neisseria gonorrhoeae* :**

Les deux amorces ciblent une région des gènes Opa. La séquence comprenant 122 paires de bases a été sélectionnée comme ADN cible car elle est conservée dans toutes les souches de *Neisseria gonorrhoeae* étudiées et n'est pas présente chez les *Neisseria* qui causent des maladies non sexuellement transmissibles

- **Pour le contrôle interne :**

Une séquence de 136 paires de bases localisée dans le gène de citrouille sert de contrôle interne.

➤ **Les étapes du déroulement du test avec *m2000*[®]**

La préparation automatisée des échantillons

Elle a pour objectif d'extraire et d'isoler les molécules d'ADN cible afin de les rendre accessible pour l'amplification et d'éliminer tout inhibiteur potentiel de l'amplification. Le système m2000sp utilise de la silice magnétique renforcée par l'alcool pour capturer les acides nucléiques des CT/NG présents dans l'échantillon. Après des étapes de lavage permettant une purification des acides nucléiques liés qui sont ensuite élués et transférés vers une plaque de 96 puits profonds et sont prêts pour l'amplification.

La préparation automatisée des réactifs et mise en plaque de la réaction PCR (pré-amplification)

L'appareil *m2000sp* prépare également le mélange réactionnel d'amplification puis transfère les fractions aliquotées dans la plaque de réaction à 96 puits Abbott. Les échantillons provenant de la plaque à 96 puits profonds Abbott sont ensuite transférés dans la plaque de réaction optique à 96 puits Abbott contenant le mélange réactionnel.

L'amplification des cibles

L'amplification par PCR CT/NG utilise deux amorces pour *Chlamydia trachomatis* (CT), deux amorces pour *Neisseria gonorrhoeae* (NG) et deux amorces pour le contrôle interne (IC). Dans le milieu réactionnel se trouve également des sondes fluorescentes. Une température élevée permet la séparation des brins d'ADN. Une température à laquelle l'hybridation de l'ADN est possible permet les amorces oligonucléiques spécifiques de se lier aux cibles. Ces amorces s'étendent sous l'activité de la polymérase ADN de l'enzyme AmpliTaqGold générant ainsi une copie de la cible. Le système répète cette opération pendant un nombre de cycles définis. La concentration de la séquence cible double à chaque cycle.

La détection

Pendant chaque cycle de l'amplification par PCR, les sondes fluorescentes s'hybrident avec l'ADN cible, si celui-ci est présent. Chaque sonde est marquée par une molécule fluorescente différente permettant de distinguer CT de NG et du IC. Ces molécules fluorescentes sont le 6-carboxyfluorescéine 5' pour *C. trachomatis*, VIC 5' pour *N. gonorrhoeae* et NED 5' pour le contrôle interne. Les sondes sont des oligonucléotides ADN linéaire simple brin modifié. Une fraction fluorescente (fluorophore) étant liée de manière covalente à l'extrémité de la sonde et une fraction désactivée (Quencher) à l'autre extrémité. En l'absence de séquence cible, les sondes adoptent une conformation telle que le « quencher » se retrouve assez près du fluorophore excité pour pouvoir absorber son énergie avant qu'une émission

ne soit possible. Lorsque la sonde se lie à sa séquence complémentaire dans la cible, le fluorophore et le quencher sont séparés afin de permettre l'émission fluorescente et la détection par fluorescence. Cette fluorescence survenant au cours de chaque cycle, la réaction PCR peut être lue en temps réel.

➤ **Contrôle de qualité interne**

Un contrôle interne, un contrôle négatif et deux contrôles positifs sont introduits dans chaque série PCR et subissent l'intégralité de la procédure.

➤ **Interprétation des résultats**

Pour chaque gène analysé (CT ou NG), le logiciel calcule le nombre de cycles (NC) moyen des deux contrôles seuils, puis ajoute à cette moyenne le nombre prédéterminé de cycles de façon à générer le cycle de décision seuil (CO); si l'échantillon testé génère un NC inférieur ou égal au CO, une interprétation positive et un résultat numérique supérieur ou égal à zéro sont rapportés. Le résultat numérique (cycle delta ou CD) correspond à la différence en nombre de cycle entre le CO et le NC. Les échantillons négatifs ne génèrent aucune amplification et la valeur de CD qui est égal à -1 est affichée par défaut par l'appareil. Les échantillons qui génèrent un NC strictement supérieur au CO sont accompagnés de code d'erreur et doivent être re-testés.

2.3. Analyse statistique

Le logiciel Excel Version 2007 a permis la saisie des données et le tracés des graphiques. L'exploitation des données a utilisé le logiciel SPSS Version 16.0.

Calcul de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives positive et négative de *C. trachomatis* et de *N. gonorrhoeae*

Les analyses statistiques ont été réalisées par le calcul de la sensibilité, de spécificité et des valeurs prédictives positive et négative pour CT et NG. Les formules sont inscrites dans le tableau III.

Tableau III : Formules de la sensibilité, de la spécificité et des valeurs prédictives

Paramètres	Formules
Sensibilité	$Se = (VP / (VP+FN)) \times 100$
Spécificité	$Se = (VN / (FP+VN)) \times 100$
Valeur prédictive positive	$VPP = (VP / (VP+FP)) \times 100$
Valeur prédictive négative	$VPN = (VN / (FN+VN)) \times 100$

La concordance entre les deux techniques a été également estimée par la détermination du coefficient kappa.

$$K = (P_o - P_a) / (1 - P_a)$$

CHAPITRE III : RESULTATS

1. Echantillonnage

L'étude a porté sur 626 échantillons d'urines recueillis en 2010 auprès de 5 groupes cibles à risque de la population malienne à savoir : les professionnelles du sexe (PS), les coxeurs, les routiers, les vendeuses ambulantes (VA) et les aides familiales (AF).

2. Répartition des prélèvements

➤ Selon les sites

La répartition des prélèvements selon les sites montre qu'un peu plus du tiers (36%) provient de la ville de Bamako alors que dans les autres sites le nombre de pourcentage varie de 8% (Koutiala) à 14% (Kayes).

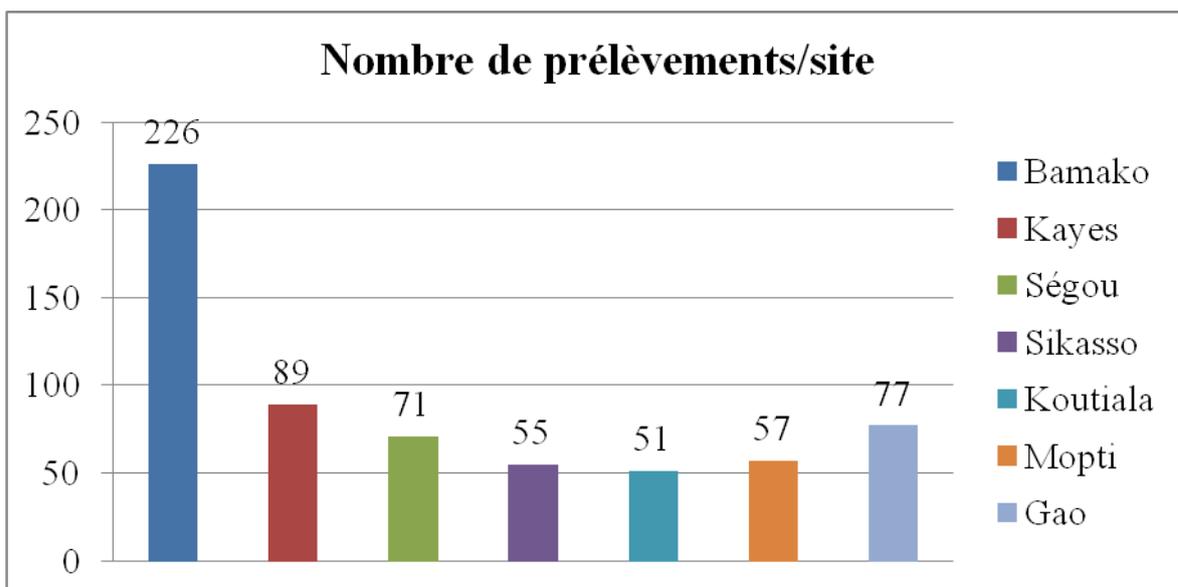


Figure 8: Nombres de prélèvements selon les sites

➤ Selon les cibles

La distribution des prélèvements selon les cibles montre que le nombre de professionnelles du sexe représente un pourcentage de 33% (212/626) de la population alors que chez les autres le pourcentage varie de 12% (77/626) pour les aides familiales à 21% (134/626) pour les vendeuses ambulantes.

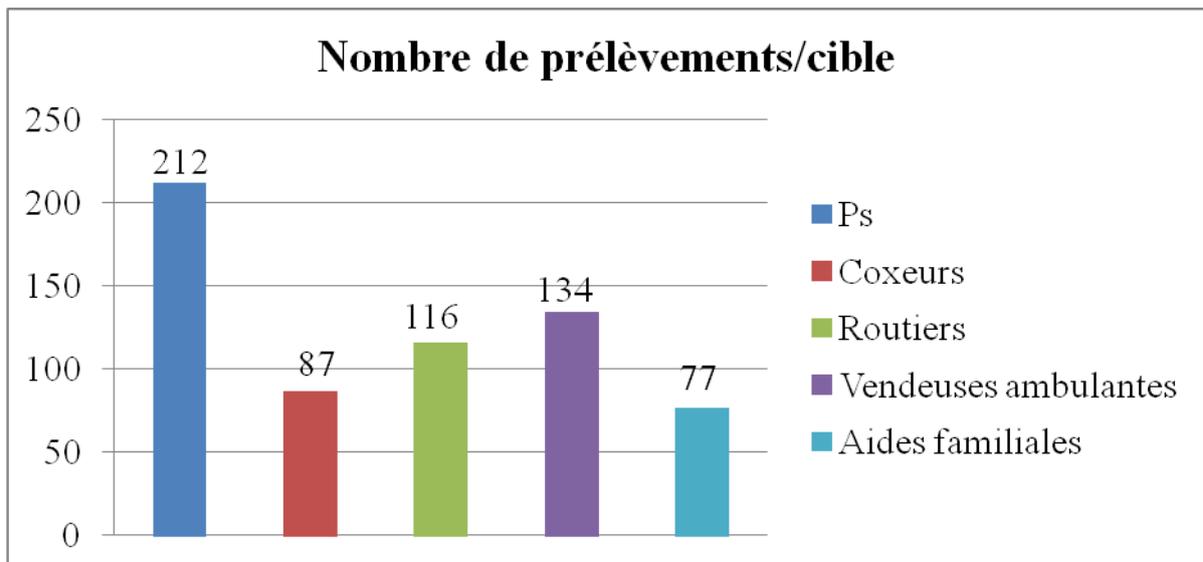


Figure 8: Nombre de prélèvements selon les populations cibles

3. Résultats globaux comparés des deux techniques dans la détection de CT/NG

❖ Pour *Chlamydia trachomatis*

Sur les 626 échantillons testés, les deux techniques concordent sur les 580 pour *C. trachomatis* avec 176 vrais positifs et 404 vrais négatifs (voir tableau IV) soit un taux de concordance de 92,65%. Elles discordent sur les 46 échantillons avec 41 faux positifs et 5 faux négatifs.

Tableau IV: Tableau de contingence de *Chlamydia trachomatis*

Référence Test		<i>m2000</i> automatique		Totaux
		Positif	Négatif	
M2000 manuelle	Positif	176	41	217
	Négatif	5	404	409
	Totaux	181	445	626

En se basant sur les formules du chapitre outils statistiques d'évaluation de la qualité d'un test (1er chapitre de la 1ere partie) les résultats de la sensibilité (Se), de la spécificité (Sp), des valeurs prédictives positive (VPP) et négative (VPN) ainsi que du coefficient kappa de *C. trachomatis* obtenus à partir du tableau IV sont inscrits dans le tableau V.

Tableau V: résultats de la sensibilité, de la spécificité, des valeurs prédictives positive et négative et du coefficient kappa pour *C. trachomatis*.

Paramètres	Résultats CT
Sensibilité (Se)	97.23%
Spécificité (Sp)	90.78%
Valeur prédictive positive (VPP)	81.10 %
Valeur prédictive négative (VPN)	98.77 %
Kappa	0,83

❖ **Pour *Neisseria gonorrhoeae***

Sur les 626 échantillons testés les deux techniques concordent sur les 608 pour *N. gonorrhoeae* avec 114 vrais positifs et 494 vrais négatifs (voir tableau VII) soit un taux de concordance de 97,12%. Elles discordent sur les 18 échantillons avec 14 faux positifs et 4 faux négatifs.

Tableau VI: Tableau de contingence de *Neisseria gonorrhoeae*

Référence Test		<i>m2000</i> automatique		Totaux
		Positif	Négatif	
M2000 manuelle	Positif	114	14	128
	Négatif	4	494	498
	Totaux	118	508	626

Comme pour *Chlamydia trachomatis*, les résultats de la sensibilité, de la spécificité, des valeurs prédictives positive et négative et du coefficient kappa de *Neisseria gonorrhoeae* calculé à partir du tableau VI sont inscrits dans le tableau VII.

Tableau VII: Résultats de la sensibilité, de la spécificité, des valeurs prédictives positive et négative et du coefficient kappa pour *Neisseria gonorrhoeae*.

Paramètres	Résultats NG
Sensibilité (Se)	96,6%
Spécificité (Sp)	97,24%
Valeur prédictive positive (VPP)	89,06 %
Valeur prédictive négative (VPN)	99,19 %
Kappa	0,91

4. Analyse des résultats de m2000[®] automatique par population cible

La positivité de *C. trachomatis* la plus importante est notée chez les aides familiales avec un pourcentage de 28% (22 sur 77). Les autres populations ont des taux de positivité allant de 18%(39 sur 212) chez les PS à 26%(31 sur 116) chez les routiers. *Neisseria gonorrhoeae* a une positivité de 25%(55 sur 212) chez les professionnelles du sexe et les autres populations présentent des pourcentages allant de 2%(2 sur 77) chez les aides familiales à 6% chez les coxeurs (6 sur 87) et les routiers (8 sur 116). Les cas de co-infection les plus importants sont retrouvés chez les professionnelles du sexe 14 % (30 sur 212) et à moindre taux chez les aides familiales et les vendeuses ambulantes (2 à 4%). On note l'absence de co-infection chez les coxeurs et les routiers.

5. Résultats Comparés m2000[®] automatique/m2000[®] manuelle selon les cibles

Chez les PS, on note 10 échantillons faussement positifs pour *Chlamydia trachomatis* et 7 échantillons faussement positifs pour *Neisseria gonorrhoeae* alors que il n'y a que des vrais positifs pour la double infection.

Il n'y a presque pas de différence entre les deux techniques automatique et manuelle chez les coxeurs et les aides familiales.

Pour les routiers 13 échantillons faussement positifs ont été notés pour *Chlamydia trachomatis*, 1 seul pour *Neisseria gonorrhoeae* alors qu'il n'y en a pas pour la double infection.

Quant aux vendeuses ambulantes 9 échantillons faussement positifs ont été notés pour *Chlamydia trachomatis*, 1 seul pour *Neisseria gonorrhoeae* et 3 pour la double infection.

Tableau VIII: tableau récapitulatif des différences de positivité selon les cibles

Population	Techniques	Positives CT	Positives NG	Positives CT/NG	Négatives	Total
Ps	m2000 automatique	39 (18,39%)	55 (25,94%)	30(14,15%)	88(41,50%)	212(100%)
	m2000 manuelle	49 (23,11%)	62 (29,24%)	30(14,15%)	71(33,49%)	212(100%)
Coxeurs	m2000 automatique	23 (26,4%)	6 (6,89%)	0	58(66,66%)	87 (100%)
	m2000 manuelle	22 (25,28%)	6 (6,89%)	0	59(67,81%)	87 (100%)
Routiers	m2000 automatique	31 (26,72%)	8 (6,89%)	0	77(66,37%)	116(100%)
	m2000 manuelle	44 (37,93%)	9 (7,75%)	0	63(54,31%)	116(100%)
VA	m2000 automatique	28 (20,89%)	9 (6,71%)	6(4,47%)	91(67,91%)	134(100%)
	m2000 manuelle	37 (27,61%)	8 (5,97%)	9(6,71%)	80(59,70%)	134(100%)
AF	m2000 automatique	22 (28,57%)	2 (2,59%)	2(2,59%)	51(66,23%)	77(100%)
	m2000 manuelle	24(31,16%)	2(2,59%)	2(2,59%)	49(63,63%)	77(100%)

6. Analyse des résultats de m2000[®] automatique selon les sites

Dans cette analyse les positifs ont été envoyés à Dakar avec une partie des négatifs.

La positivité de *C. trachomatis* la plus élevée est notée à Sikasso avec un pourcentage de 36% (20 sur 55). Dans les autres sites on a des taux de positivités allant de 14% (10 sur 71) à Ségou à 25% (20 sur 77) à Gao.

Gao est la ville la plus touchée par l'infection à *Neisseria gonorrhoeae* avec un taux de positivité de 24% (19 sur 77). Il s'en suit les villes de Bamako, Mopti et Kayes avec des taux respectifs d'environ 16% (38 sur 226), 12% (7 sur 57) et 10% (9 sur 89). Les autres villes sont moins atteintes avec des taux allant de 3 à 4%.

Des cas de co-infections sont présents dans toutes les villes. Les taux les plus importants sont notés à Bamako, Kayes et Gao avec des pourcentages respectifs d'environ 8%, 6,74% et 7%.

7. Analyse comparés des résultats m2000[®] automatique/ m2000[®] manuelle selon les sites

A Bamako on note 5 échantillons faussement positifs pour CT et 3 échantillons pour la double infection.

Dix huit échantillons faussement positifs pour CT ont été notés contre deux pour NG chez la population de Kayes.

On a note dans la ville de Ségou 8 échantillons faussement positifs pour CT, 2 pour NG et 1 seul pour la double infection.

Les deux techniques manuelle et automatique concordent chez la population de Sikasso, de Koutiala et de Gao.

A Mopti eux échantillons faussement positifs sont notes pour CT et pour NG alors qu'il n'y a un seul pour la double infection.

Tableau IX: tableau récapitulatif des différences de positivité selon les sites

Sites	Techniques	Positives CT	Positives NG	Positives CT/NG	Négatives	Total
Bamako	m2000 automatique	55=24,34%	38=16,81%	18=7,96%	115=50,88%	226
	m2000 manuelle	60=26,55%	38=16,81%	21=9,29%	107=47,35%	226
Kayes	m2000 automatique	14=15,73%	9=10,11%	6=6,74%	60=67,42%	89
	m2000 manuelle	32=35,96%	11=12,36%	6=6,74%	40=44,94%	89
Ségou	m2000 automatique	10=14,08%	3=4,23%	2=2,82%	56=78,87%	71
	m2000 manuelle	18=25,35%	5=7,04%	3=4,23%	45=63,38%	71
Sikasso	m2000 automatique	20=36,36%	2=3,64%	3=5,45%	30=54,55%	55
	m2000 manuelle	20=36,36%	2=3,64%	3=5,45%	30=54,55%	55
Koutiala	m2000 automatique	11=21,57%	2=3,92%	1=1,96%	37=72,55%	51
	m2000 manuelle	11=21,57%	2=3,92%	1=1,96%	37=72,55%	51
Mopti	m2000 automatique	13=22,81%	7=12,28%	3=5,26%	34=59,65%	57
	m2000 manuelle	15=26,32%	9=15,79%	2=3,51%	31=54,39%	57
Gao	m2000 automatique	20=25,97%	19=24,68%	5=6,49%	33=42,86%	77
	m2000 manuelle	19=24,68%	19=24,68%	6=7,79%	33=42,86%	77

CHAPITRE IV : DISCUSSION

La recherche de la qualité doit être la préoccupation constante de tout laboratoire de biologie. Elle passe par la mise en place des bonnes pratiques de laboratoire. Le contrôle de qualité interne et externe constitue un pilier dans l'exécution des analyses pour la fiabilité des résultats. Notre travail rentre dans ce contexte de re-tests ou « re-contrôle » ou contrôle externe de la qualité et avait comme objectif de re-tester 626 échantillons d'urines obtenus dans le cadre d'une enquête de surveillance épidémiologique des infections sexuellement au Mali. Une recherche de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* avait été réalisée à l'INRSP avec la trousse CT/NG Abbott Real Time sur *m2000rt* des laboratoires Abbott après une extraction manuelle des acides nucléiques. Dans le but d'évaluer la qualité des résultats obtenus, tous les positifs obtenus au Mali et une partie des négatifs ont été envoyés de façon anonyme pour être ré-analysés au laboratoire de Bactériologie-Virologie du CHU Aristide le Dantec pris comme laboratoire de référence pour effectuer cette évaluation externe de la qualité. Le laboratoire de Dakar a utilisé la plateforme automatisée *m2000sp /m2000rt*.

La confrontation des résultats a été faite à la fin des analyses pour évaluer les performances en terme de positivité selon les sites, les catégories, l'agent causal mais aussi en terme de sensibilité, de spécificité et de coefficient de concordance entre les deux structures.

1. Etude de la positivité

• Positivité selon le site

Dans notre étude les villes de Bamako et de Gao sont les villes les plus touchées par les infections à CT/NG avec des taux de positivité respectifs de 49,12% et de 57,14%. Le taux le plus faible obtenu est noté dans la ville de Ségou. Ce taux élevé dans la ville de Bamako d'infection à CT et NG avait déjà été remarqué dans le cadre d'un contrôle de qualité précédant réalisé avec la trousse Amplicor de Roche et comparant l'automate Cobas Amplicor à la technique manuelle sur des échantillons d'urine avec un taux égal à 44,73% [72]. On peut dire que Bamako

étant la capitale, le flux de migration des populations est un facteur important dans la dissémination de ces infections.

- **Positivité selon les catégories**

Le taux de positivité le plus élevé pour les infections à CT/NG a été retrouvé chez les professionnelles du sexe avec un pourcentage d'environ égal à 58,10%. Les autres catégories de l'étude ont eu des taux plus faibles avoisinant 30%. L'étude de Pomabia A. N. [72] a montré également un taux de positivité élevé chez les PS soit environ 46,91%.

Ce taux de positivité élevée chez les PS pourrait être expliqué par le fait qu'ils entretiennent des relations sexuelles, très souvent non protégées avec des partenaires multiples et s'exposent de cette façon aux risques d'infection et exposent de même leurs clients.

- **Positivité selon l'agent causal**

Les taux de positivité sont de 24% pour *Chlamydia trachomatis*, 9% pour *Neisseria gonorrhoeae* et 4,4% pour les co-infections. Ces résultats sont similaires avec ceux de Pomabia A. N. [72] avec un taux de positivité de 22,7% pour *Chlamydia trachomatis*, 8,76% pour *Neisseria gonorrhoeae* et 3,8% pour les co-infections.

Les techniques moléculaires depuis leur validation sur des prélèvements non invasifs comme les premières urines ou l'auto prélèvement vaginal ont amélioré le diagnostic et ont permis de réaliser de grandes séries comme les enquêtes de surveillance. Ils ont également amélioré les diagnostics de routine des IST et leur prise en charge. Ainsi, l'étude de Levet et coll en 2008 aux USA [57] a montré une augmentation des demandes de tests moléculaires sur des prélèvements urinaires depuis leur mise en place en 2000. Le nombre annuel de demande peut atteindre 50 000 par année avec un taux annuel moyen de positivité de 8,7% pour *Chlamydia trachomatis* de 2,1% pour *Neisseria gonorrhoeae* [57].

2. Performance de la technique manuelle de *m2000rt*

• Sensibilité et spécificité

Le contrôle de qualité a révélé la détection de 18 cas de discordance dont 4 faux positifs pour NG et 14 faux négatifs. Pour CT 46 cas ont été répertoriés avec 5 faux positifs et 41 faux négatifs.

Notre étude réalisée sur 626 échantillons d'urines a donné des valeurs de sensibilité et de spécificité qui sont satisfaisantes avec Se=96.6% et Sp=97,24% pour NG et Se=97,23% et Sp=90,78% pour CT.

Auteurs	Année	Pays	Type de prélèvements	Agents	Sensibilité	Spécificité	Techniques
Levett	2008	USA	Urines	CT	96,94	100	.BD Probetec
				NG	100	100	.Abbott rt .Gen-probe Aptima
Moller	2010	USA	Urines	CT	95,5	99,9	Abbott rt Taqman Gen-Probe
Cheng	2011	USA	Urines, prélèvements génitaux	CT	100	99,7	Cobas Amplior
				NG	99,6	97,7	Abbott rt
Notre étude	2010	Mali / Sénégal	Urines	CT	97,23	90,78	Abbott rt
				NG	96,6	97,24	

En comparant les performances d'évaluation *m2000rt* provenant d'autres études on observe des sensibilités et spécificités élevées.

Levett P. N. et coll aux USA en 2008 [60] ont fait une étude comparative de Abbott *m2000*, de BD Probe Tec et de Gen-Probe Aptima Combo 2 en utilisant 500 échantillons d'urines pour la détection de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* et ont trouvé les sensibilités et spécificités suivantes :

Pour *m2000* Abbott : NG (Se=100% et Sp=100%) CT (Se=96,94% et Sp=100%)
Pour BD Probe Tec : NG (Se=95,8% et Sp=100%) CT (Se=97,94% et Sp=99,5%)
Pour Gen-Probe Aptima Combo 2: NG (Se=100% et Sp=100%) CT (98,98% et Sp=100%).

Pour cette étude les résultats de la sensibilité et de la spécificité obtenus sont supérieurs aux nôtres. Ceci peut être expliqué par le fait que toutes les techniques utilisées par Levett P. N. et coll étaient automatisées.

Møller J. K. et coll aux USA en 2010 [65] ont comparé le test Abbott Real Time, avec la version 2 du test de Roche Cobas TaqMan et avec le Combo Gen-Probe Aptima 2 test (AC2) pour la détection de *Chlamydia trachomatis* sur des prélèvements urinaires ont donné les sensibilités et les spécificités suivantes :

Pour Abbott *m2000*[®] : sensibilité 95,3% et spécificité 99,9%.

Pour Roche TaqMan : sensibilité 82,4% et spécificité 100,0%.

Pour AC2 Gen-Probe : sensibilité 99,3% et spécificité 99,9%.

Les résultats d'Abbott *m2000rt* qu'ils ont obtenu ont une spécificité supérieure à ceux de notre étude.

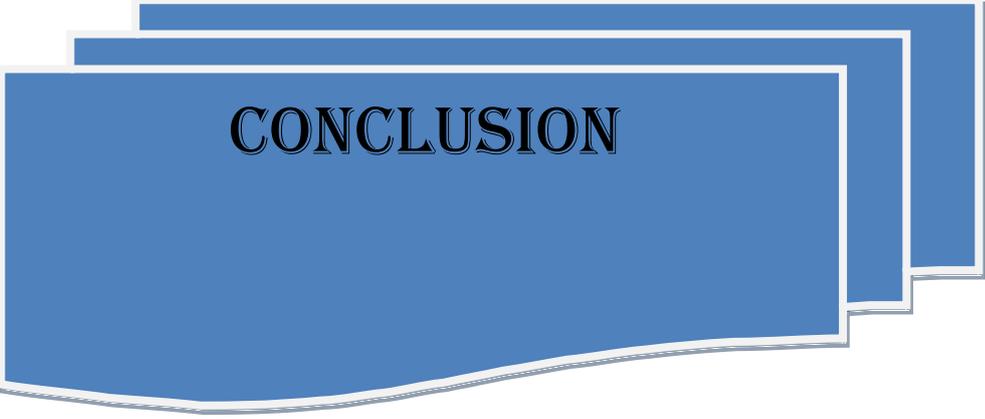
Cheng A. et coll aux USA en 2011 [17] comparant *m2000* Abbott Real Time avec Roche Cobas Amplicor sur des prélèvements urinaires et génitaux ont trouvé avec le *m2000rt* des résultats similaires pour *Neisseria gonorrhoeae* et pour *Chlamydia trachomatis* une spécificité qui est supérieure à ceux de notre étude.

D'après ces deux dernières études *Chlamydia trachomatis* a une spécificité supérieure à celle de notre étude, ceci pourrait s'expliquer par le fait que nous avons beaucoup de faux positifs.

Ces faux positifs trouvés ne peuvent être réellement étayé car il ya des limites de notre comparaison. Nous n'avons pas pu avoir accès aux sorties de machine de Bamako pour étudier plus en détail les cas de discordance ce qui permettrait de mieux apprécier les cycles delta (CD), les cycles de décision seuil (CO) et les nombres de cycles (NC) entre les deux structures.

- **Concordance**

Les deux tests réalisés après une extraction manuelle à Bamako et automatisée au Sénégal ont une concordance de 0,83 pour CT et de 0,91 pour NG. On peut donc parler d'un excellent accord entre les tests réalisés dans les deux laboratoires. La technique *m2000rt* automatique est connu pour donner d'excellentes concordances avec les autres techniques moléculaires de détection de CT et NG et ceci sur différents types de prélèvements.



CONCLUSION

CONCLUSION

Les progrès technologiques en matière de diagnostic offrent de nouvelles possibilités pour prévenir, soigner et surveiller beaucoup de pathologies particulièrement les IST. Les tests d'amplification génomique peuvent être utilisés pour surveiller les tendances des infections et adopter des interventions de dépistage. Une stratégie de lutte efficace doit pouvoir s'appuyer sur des laboratoires fiables participant à des programmes d'évaluation externe de la qualité en plus de la mise en place d'un système de contrôle de qualité interne.

Les techniques de diagnostic moléculaires ont pour but non pas d'isoler l'agent causal de l'infection mais de le détecter par la mise en évidence de son information génétique (c'est-à-dire les acides nucléiques).

Elles permettent ainsi de manipuler des échantillons ayant perdu toute leur vitalité, et offrent des outils exceptionnels de diagnostic rapide et à large spectre des infections sexuellement transmissibles. Elles ont prouvé leur efficacité et leur performance diagnostique, et sont actuellement utilisées dans les campagnes de la stratégie mondiale sur la lutte contre les IST.

Notre travail a été entrepris dans le contexte de la lutte contre les IST et concernait l'évaluation externe de la qualité du laboratoire malien. L'objectif a été de re-tester les 626 échantillons d'urines provenant de différents cibles et sites de Mali pour évaluer comparativement la qualité des résultats fournis par l'INRSP de Bamako avec ceux de LBV de l'hôpital Aristide Le Dantec.

Les techniques de diagnostic des IST utilisées sont basées de plus en plus sur la PCR en temps réel qui utilise le principe de base de la PCR avec pour différence une amplification détectée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel. A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits.

Au final les 626 échantillons testés ont donné respectivement pour *Neisseria gonorrhoeae* et pour *Chlamydia trachomatis* les résultats suivant : sensibilité 96.6% et 97.23%, spécificité 97.24% et 90.78%, valeur prédictive positive 89.06% et 81.10%, valeur prédictive négative 99.19% et 98.77% et coefficient kappa 0,91 et 0,83, ce qui prouve à suffisance la compétence du laboratoire malien pour ce genre d'analyses.

Le contrôle de qualité externe est un moyen efficace pour repérer les problèmes et pour fournir au laboratoire une vue objective de sa performance. Sa mise en œuvre permet de mettre en place les mesures préventives et correctives nécessaires. Les résultats du contrôle externe de la qualité peuvent aider à identifier le besoin de normes, de règles, d'éducation et de formation, ainsi que les ressources nécessaires pour assurer les performances optimales. L'information obtenue grâce au contrôle externe de qualité permet ainsi d'améliorer la qualité globale des activités du laboratoire.

Ce contrôle de qualité a pu au sortir de ces résultats confirmer l'habilitation du laboratoire malien, dans la réalisation des tests de diagnostic moléculaire des infections sexuellement transmissibles à *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* à partir d'échantillons d'urine.

Au vu de ces résultats il en ressort les recommandations suivantes :

➤ A l'endroit des Autorités sanitaires pour la qualité des tests de laboratoires

Ils doivent assurer la vulgarisation des programmes de contrôle de qualité comme Afriqualab en vue de renforcer le système qualité dans les laboratoires des pays Africains. Afriqualab est un nouveau programme piloté par le laboratoire de Bactériologie-Virologie en partenariat avec le CDC et l'OMS, dans la perspective d'accréditation des laboratoires de santé en Afrique. Afriqualab permet de mettre à la disposition des laboratoires un système de Contrôle de Qualité avec des panels pour la biologie médicale allant de la biochimie, l'hématologie, l'hémostase,

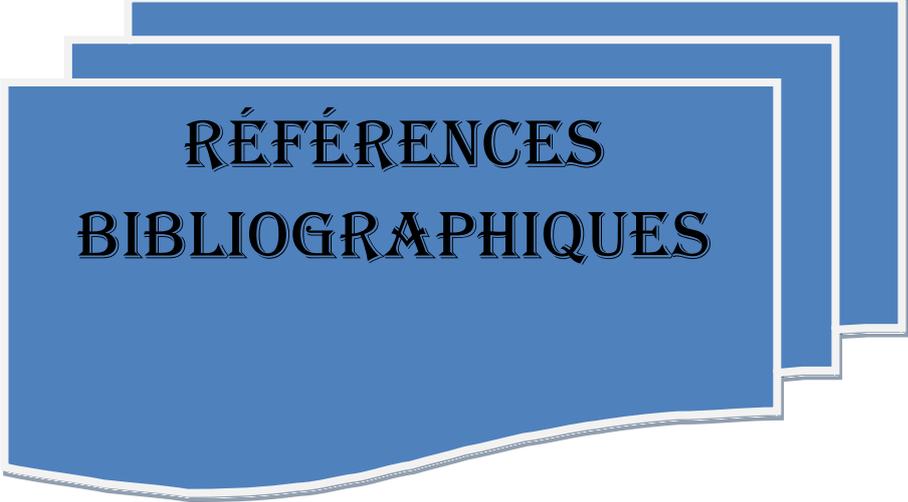
l'immunologie, la sérologie, la microscopie clinique, la bactériologie, la mycobactériologie, la mycologie, la parasitologie à la virologie.

➤ Aux laboratoires nationaux

Ils doivent participer au programme d'évaluation externe de la qualité et mettre en place le processus d'accréditation pour garantir leur amélioration continue.

➤ A l'endroit des Autorités sanitaires dans la stratégie globale de lutte contre les IST

Mettre en place de façon continue la surveillance combinée alliant les deux volets comportemental et biologique pour mieux orienter les interventions.



**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. **Agence de la santé publique du Canada, Lignes directrices canadiennes sur les IST (Ottawa).** Augmentation du nombre de souches de *Neisseria gonorrhoeae* résistantes aux fluoroquinolones au Québec. Ed 2006; 426p.
2. **Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé.** Mise au point. Traitement antibiotique probabiliste des urétrites et cervicites non compliquées. Saint-Denis: AFSSAPS. 2008.
3. **Ameziane N., Bogard M., Lamoril J.** Principes de biologie moléculaire en biologie clinique. Elsevier. France, 2006 ; 705p.
4. **ANAES/Service évaluation des technologies - Service évaluation économique.** Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections uro-génitales basses à *C. trachomatis*. Saint Denis, 2003; 104p.
5. [Andersen B., Østergaard L., Puho E., Skriver M.V. and Schønheyder H.C. Ectopic pregnancies and reproductive capacity after *Chlamydia trachomatis* positive and negative test results: a historical follow-up study](#) , *Sex Transm Dis.* 2005; 32 (6): 377-81.
6. **Appit :** Maladies sexuellement transmissibles. Ed. Pilly, Montmorency, 2000 ; 190-197.
7. **Arrêté du 26 Novembre 1999 relatif à la bonne exécution des analyses de biologie médicale.** France. J.O. Numéro 287 du 11 Décembre 1999 ; p18441.
8. **Avril J. L., Dabernat H., Denis F. et Monteil H.** Bactériologie clinique. Ellipses Edition Makerting S.A. Paris, 2000 ; 355-361.
9. **Bakken I. J., Skjeldestad F. E., Lydersen S. and Nordbø S. A.,** [Births and ectopic pregnancies in a large cohort of women tested for *Chlamydia trachomatis*](#). *Sex Transm Dis.* 2007 ; 34(10): 739-43.
10. **Barnes R. C. and Holmes K. K.** Epidemiology of *gonorrhoeae*: current perspective. *Epidemiol Rev.* 1984; 6: 1-30.
11. **Beani J. C.** Infections urogénitales à gonocoque et à *Chlamydia trachomatis* (en dehors de la maladie de Nicolas Favre). 2004 (Mise à jour mai 2005).

12. **Bebear C. M., de Barbeyrac B. et Pereyre S.** *Mycoplasmes et Chlamydiae* : sensibilité et résistance aux antibiotiques. *Rev Fr Lab.* 2007 ; 391: 77-85.
13. **Budai I.** "Chlamydia trachomatis; milestones in clinical and microbiological diagnostics in the last hundred years: a review". *Acta microbiol and immunologica Hungarica.* 2007 ; 54 (1): 5-22.
14. **Carroll K. C., W. Aldeen , Morrison M., Anderson R., Lee D. and Mottice S.** Evaluation of the Abbott LCx Ligase Chain Reaction Assay for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in Urine and Genital Swab Specimens from a Sexually Transmitted Disease Clinic Population. *J. Clin Microbiol.* 1998 ; 1630-1633.
15. **Catalan F., Milovanovic M., Minz M. et Petavy-Maynier M. F.** Cahier de formation biologie médicale : vaginites et vaginoses. Paris, 2000 ; 19 : 118p.
16. **Catalan F., Milovanovic A.** *Cahier de formation bactériologie.* Paris, 1996 ; 153 p.
17. **Cheng A., Qian Q. and Kirby J.E.** Evaluation of the Abbott Real Time CT/NG assay in comparison to the Roche Cobas Amplicor CT/NG assay. *J Clin Microbiol.* 2011 ; 49(4): 1294-300.
18. **Cisse C.** Thèse de doctorat en pharmacie. Prévalence des infections sexuellement transmissibles (VIH, *human papilloma virus*, *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*) chez les professionnelles du sexe au Sénégal (enquête nationale et surveillance combinée) N° 146, 2011.
19. **Collège des enseignants de dermatologie.** Dermatologie Abrégés connaissance et pratique. Ed Masson, Paris, 2003 ; 339-353.
20. **Corsaro D. et Le Faou A.** Monographie de microbiologie : *Chlamydia.* Edition médicales internationale Cachan, Paris. 2002 ; 126p.
21. **Corsaro D., Valassina M. and Venditti D.** Increasing diversity within *Chlamydiae.* *Crit Rev Microbiol.* 2003 ; 29(1): 37-78.

- 22. De Barbeyrac B., Clerc M. et Idrissi Y.** Typage et étude de la sensibilité des souches de *Chlamydia trachomatis* isolées en France, 1999-2001. 2004 ; (40-41): 196-197.
- 23. De Schryver A. and Meheus A.** Epidemiology of transmitted diseases: the global picture, [*Bull World Health Organ.*](#) 1990 ; 68 (5) : 639-54.
- 24. Dean D.** *Chlamydia trachomatis* today: treatment, detection, immunogenetics and the need for a greater global understanding of *Chlamydial* disease pathogenesis. *Drugs Today.* 2009 ; 45: 25-31.
- 25. Delaveyne R., Xerri B., Vtry A., Preaubort N. et Rumeau-Pichon C.** Place des techniques de biologie moléculaire dans l'identification des infections urogénitales basses à *C. trachomatis*. 2003 ; 1 : 1-7.
- 26. Directive 98/79/CE du parlement européen et du conseil du 27 octobre 1998, relative aux «dispositifs médicaux de diagnostic *in vitro*».** Journal Officiel des Communautés Européennes. 1998 ; L 331-1 à L 331-37.
- 27. Dumontet M., Fuss-Ohlen I., Beaudoux J.-L., Perrin A., Vassault A., Giroud C., Le Moel G., Guitel F., Ziani S., Zerah S., Robineau S. and Braconnier F.** Présentation, à l'usage des laboratoires d'analyses de biologie médicale, des normes de métrologie (Document A). *Ann Biol Clin.* 2004; 62 : 121-5.
- 28. Dupin N., Janier M., Bouscarat F., Milpied B., Vexiau-Robert D., Dupuis F.** Infection à *Chlamydia trachomatis*. *Ann Dermatol Venereol.* 2006 ; 133: 13-14.
- 29. Durniat N.** Contrôle qualité : Concept contrôle qualité externe et interne. 2008.
- 30. Eissenberg L. G., and Wyrick P.B.** Inhibition of phagolysosome fusion is located to *Chlamydia psittaci*-laden vacuoles. *Infection and Immunity.* 1981; 32(2): 889-96.
- 31. Everett K., Bush P. and Andersen A.** Emended description of the order *Chlamydiales*, proposal of the *Parachlamydiaceae* fam, nov. and *Simkaniaceae*, including new genus and five new species, and standards for the identification of organism. *Int J. Syst. Bacteriol.* 1999 ; 49: 415-440.

- 32.Fattoruso V.et Ritter O.** Vade-mecum clinique du diagnostic au traitement. Edition 2001 ; 373-375.
- 33.Formaux S., Leng J.J. et Bébéar C.** Douzièmes journée Aquitaines de Perfectionnement en Reproduction humaine. Infections à *Chlamydiae*. Bordeaux, 1993 (mise à jour 15 février 2011).
- 34.Francoual C., Huraux- Rendu C. and Bouille J.** *Medecine Science Flammarion. 2eme Ed, Paris, 1999 ; 292 -294.*
- 35.Fredlund H., Falk L., Jurstrand M. and Unemo M.** "Molecular genetics methods for diagnosis and characterisation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: impact on epidemiological surveillance and interventions". *APMIS : acta pathologica, microbiologica, and immunologica Scandinavica*. 2004 ; 112 (11-12): 771–84.
- 36.Gdoura R., Daoudi F., Ben Salah F., Chaigneaux C., Sueur J.M., EB F., Rekik S., Hammami A. and Orfila J.** Detection of *Chlamydia trachomatis* in semen urethral specimens from male members of infertile couples in Tunisia. *Eur. J. Contracept Reprod Healht*. 2001; 6(1): 14-20.
- 37.Gentilini M., Caumes E., Danis M., Mouchet J., Duflo B., Lagardère B., Lenoble D. et Brucker G.** "Médecine tropicale" "Epidémiologie analytique". *Médecine-Sciences Flammarion*. 1993 ; 785-804.
- 38.Gomes J. P., Tavira L., Exposto F., Prieto E. and Catry M.** *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia trachomatis* infections in patients attending STD and family planning clinics in Bissau, Guinea-Bissau. *Acta tropica*. 2001; 80 (3): 261-264.
- 39.Goulet V., De Barbeyrac B. and Raherison S.** Prevalence of *Chlamydia trachomatis*: results from the first national population-based survey in France, *Sex Transm Infect*. 2010 ; 86(4): 263-270.

40. **Goulet V., Warszawski J., De Barbeyrac B., Raheison S., Beltzer N., Bozon, M., CSF Group.** Prevalence of genital *Chlamydia trachomatis* infection in France in the national population based survey CSF. In: Sixth Meeting of the European Society for *Chlamydia* Research. Aarhus, Denmark, 2008.
41. **Grenier.** Décision médicale. Ed Masson. 1993 ; 2598-2601.
42. **Guide ISO/CEI 43 :** Essais d'aptitude des laboratoires par inter comparaison. 1997.
43. **Hackstadt. T.** Cell Biology, In: *Chlamydia*. Intracellular Biology, Pathogenesis and Immunity, edited by Stephens, R.S. 1999 ; 101-38.
44. **Hamdad F. and Orfila J.** Diagnostic d'une infection urogénitale à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique. *J. Urol.* 2005 ; 15: 598-601.
45. **Hamdad F.** Diagnostic d'une infection à *Chlamydia trachomatis*. Apport des techniques d'amplification génique. Amiens Université de Picardie. Faculté de Médecine. 2003 ; 1-232.
46. **Hamdad-Daoudi F., Orfila J. and EB F.** Infections uro-génitales masculine à *Chlamydia trachomatis* : Vers une meilleure approche diagnostique. *Andrologie.* 2004 ; 14 : 206-15.
47. **Hamdad-Daoudi F., Petit J. and EB F.** Assessment of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic male partners of infertile couple. *J. Med Microbiol.* 2004; 53(10): 985-90.
48. **Hatch T.P.** Developmental Biology. *Chlamydia*; Intracellular Biology, Pathogenesis, and Immunity. In RS Stephens (ed), Washington DC. *American Society Microbiol.* 1999 ; 29-36.
49. http://pedagogie.acmontpellier.fr/Disciplines/sti/biotechn/pages/microbio_systematique.html consulté le 22/12/2011.
50. <http://www.microbeedu.org/etudiant/neisseria.html> consulté le 21/12/2011.
51. **Idahl A., Boman J., Kumlin U. and Olofsson J. I.,** *Demonstration of Chlamydia trachomatis IgG antibodies in the male partner of the infertile couple*

is correlated with a reduced likelihood of achieving pregnancy. *Hum Reprod.* 2004 ; 19(5): 1121-6.

- 52. Knox J., Tabrizi S.N., Miller P., Petoumenos K., Law M., Chen S., Garland S.M.** Evaluation of self collected samples in contrast to practitioner-collected samples for detection of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and *Trichomonas vaginalis* by polymerase chain reaction among women living in remote areas. *Sex Trans Dis.* 2002 ; 29(11): 647-654.
- 53. Laga M., Plummer F. A., Piot P., Datta P., Namaara W., Ndinga-Achola J.O., Nzange H., Maitha G., Ronald A. R., Pamba H.O. and Brunham R.C.** Prophylaxis of gonococcal and chlamydial ophtalmia neonatorum: a comparison of silver nitrate and tetracycline. *N Engl J Med.* 1988 ; 318(11): 653-7.
- 54. Lammel C.J., Sweet R.L., Rice P.A., Knapp J.S., Schoolnik G. K., Heilbron D. C. and Brooks G. F.** Antibody-Antigen specificity in the immune response to infection with *Neisseria gonococcus*. *J. Infect. Dis.* 1985 ; 152(5): 990-1001.
- 55. Land J.A., Van Bergen J., Morre S.A. and Postma M.J.** [Epidemiology of *Chlamydia trachomatis* infection and the cost effectiveness of screening](#) *Hum Reprod Update.* 2010 ; 16(2): 189-204.
- 56. Landis J.R. and Koch G.G.** The Measurement of Observer Agreement for Data. *Biometry.* 1977 ; 33(1): 159-174.
- 57. Laurent M. et Laurent B.** La réglementation des laboratoires d'analyses biologiques et le rôle de l'ingénieur biomédical au sein de ces laboratoires. Projet de fin de formation DESS "TBH", UTC. 1998 ; p30.
- 58. Leber A.L., Hall G.S. and LeBar W.D.** Nucleic Acid Amplification Tests for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. In: Sharp SE, ed. Cumitech 44. Washington, DC: ASM Press ; 2006 ; 1-38.
- 59. Lenderman C. J., Dxon P. B. and Ewhook III.** Time-Motion Comparaison of the IU Abbott real time CT/NG Assay, Gen-prob Aptima combo 2, BD Probetec et System and Cobas Amplicor assays for *Chlamydial* and *Gonorrhea* diagnosis. University of Alabama at Birmingham. AL, USA. 2007 ; p155.

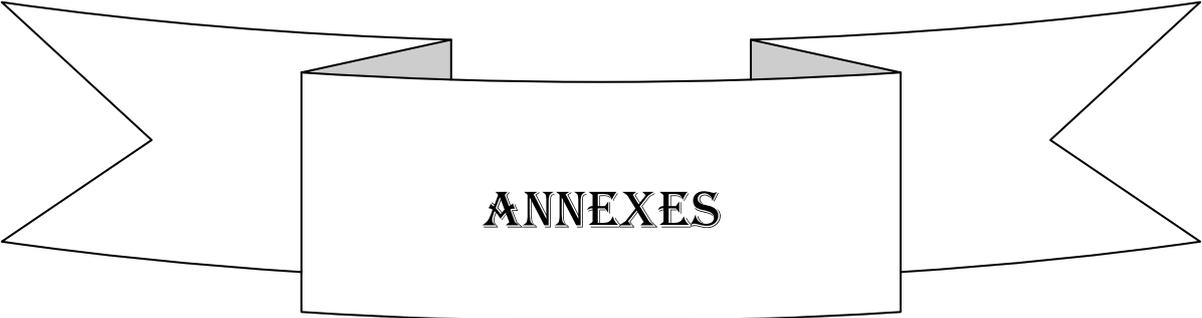
- 60. Levett P. N., Brandt K., Olenius K., Brown C., Montgomery K., and Horsman G. B.** Evaluation of Three Automated Nucleic Acid Amplification Systems for Detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in First-Void Urine Specimens, *J. Clin. Microbiol.* 2008 ; 46(6): 2109-11.
- 61. Luijt D.S., Bos P.A., van Zwet A.A., van Voorst Vader P.C. and Schirm J.** Comparision of COBAS AMPLICOR NG PCR, including confirmation with *N gonorrhoeae*-specifie 16 S RNA PCR, with traditional culture, *J. Clin. Microbiol.* 2005 ; 43(3): 1445-7.
- 62. Mahony J., Chong S., Jang D., Luinstra K., Faught M., Dalby D., Sellors J. and Chernesky M.** Urine Specimens from Pregnant and Nonpregnant Women Inhibitory to Amplification of *Chlamydia trachomatis* Nucleic Acid by PCR, Ligase Chain Reaction, and Transcription-Mediated Amplification: Identification of Urinary Substances Associated with Inhibition and Removal of Inhibitory Activity. *J Clin Microbiol.* 1998 ; 36(11): 3122–3126.
- 63. Marshall R., Chernesky M., Jang D., Hook E. W., Cartwright C. P., Howell-Adams B., Ho S., Welk J., Lai-Zhang J., Brashear J., Diedrich B., Otis K., Webb E., Robinson J. and Yu H.** Characteristics of the *m2000* automated sample preparation and multiplex real-time PCR system for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Clin. Microbiol.* 2007 ; 45(3): 747-51.
- 64. Molano M., Meijer C. J., Weiderpass E., [Arslan A.](#), [Posso H.](#), [Franceschi S.](#), [Ronderos M.](#), [Muñoz N.](#), and [van den Brule A. J.](#)** [The natural course of *Chlamydia trachomatis* infection in asymptomatic Columbian women: a 5-year follow up](#) study. *J. Infect. Dis.* 2005 ; 191(6): 907-16.
- 65. Møller J.K., Pedersen L. N. and Persson K.** Comparison of the Abbott Real Time CT New Formulation Assay with Two Other Commercial Assays for Detection of Wild-Type and New Variant Strains of *Chlamydia trachomatis*. *J clin microbiol.* 2010 ; 48(2): 440–443.

- 66. Moulder J. W.** The relation of the psittacosis group (*Chlamydiae*) to bacteria and virus, *Ann. Rev. Microbiol.* 1966 ; 20: 107-30.
- 67. Moulder J.W.** Interaction of *Chlamydia* and host cells in vitro, *Microbiol. Rev.* 1991 ; 55(1): 143-90.
- 68. NF EN 14136** : Utilisation des programmes d'évaluation externe de la qualité dans l'évaluation de la performance des procédures de diagnostic *in vitro*. 2004.
- 69. Ojcius D.M., Darville T., Bavoil P.M.** Can *Chlamydia* be stopped? *Scientific American.* 2005 ; 292(5): 72-9.
- 70. Organisation Mondiale de la Santé.** Accélération de l'élimination de la cécité évitable : une stratégie pour la région Africaine de l'OMS. Bureau régional de l'Afrique Cinquante-septième session Brazzaville, République du Congo. 2007 ; 27-31.
- 71. Poitras E. et Houde A.** La PCR en temps réel : principe et applications. *Rev Biol and Biotech.* 2002 ; 2(2) : 2-11.
- 72. Pomabia N. A.** Contrôle de qualité externe d'un test de diagnostic moléculaire : Recherche de *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* par la technique Cobas Amplicor® à partir de prélèvements urinaires. Mémoire d'Ingénieur Technologie d'ESP. Dakar ; 2007.
- 73. Puollakkainen M., Heltuen-Back E., Reunala T., Suhonen S., Lahteenmaki P., Lehtinen M., and Paavonen J.** Comparaison of performance of two commercially available tests, a PCR assay as Roche Cobas Amplicor CT/NG test and Ligase Chain Reaction test of urogenital *Chlamydia trachomatis* infection. *J. clin. microbiol.* 1998 ; 36(6) : 1489-93.
- 74. Robertson J. N., Heckels J. E. and Ward M. E.** Tubal infertility in Gambia: Chlamydial and Gonococcal serology, in women with tubal occlusion, compared with pregnant controls. *Bull. World health Organ.* 1985 ; 63(6): 1107-1113.
- 75. Roy K., Wang S.A. and Meltzer M.** Optimizing treatment of antimicrobial-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Emerg Infect Dis.* 2005 ; 11(8): 1265-73.

- 76. Rumeau-Rouquette C., Blondel B., Kaminski M. and Bréart G.** Epidémiologie: Méthodes et pratique. Médecine-Sciences Flammarion 1995.
- 77. Saikku P.** *Chlamydia pneumoniae* and atherosclerosis- An Update. *Scand J. Infect. Dis.* 1997 ; 104: 53-56.
- 78. Sarlangue J.** Infections bactériennes chez le nouveau-né. Diagnostics, traitements et prévention, *Revue Pratique.* 2001; 51(12): 1361-8.
- 79. Schachter J., Chernesky M.A., Willis D.E., Fine P.M., Martin D.H., Fuller D., Jordan J.A., Janda W. and Hook E.W. 3rd.** Vaginal swabs are the specimens of choice when screening for *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae*: result from a multicenter evaluation of the APTIMA assays for both infections, *Sex Trans Dis.* 2005 ; 32(12): 725-728.
- 80. Scherrer F., Boisson R.C., Cartier R., Cohen R., Eynard J.C., Poggi B. et Grafmeyer D.** Réflexion sur le choix des limites acceptable dans les programmes d'évaluation externe de la qualité. *Ann biolo med.* 2007 ; 677-84.
- 81. Serre J. L. et coll.,** Les diagnostics génétiques. Dunod, Paris. 2002 ; p-308.
- 82. Shafer M.A., Moncada J., Boyer C.B., Betsinger K., Flinn S.D., Schachter J.** Comparing first-void urine specimens, self-collected vaginal swabs, and endocervical specimens to detect CT and NG by a nucleic acid amplification test, *J. Clin. Microbiol.* 2003 ; 41 (9): 4395-9.
- 83. Siboulet A., Coulaud J.P. ; Catalan F. ; Basset A. et Bohbot J.M.** Blennorragie gonococcique. Maladies sexuellement transmissibles. Masson, Paris ; 1991.
- 84. Springer W.** Biomedical and life Sciences. 2005; 35(2-3): 161-171.
- 85. Stark D., van Hal S., Hillman R., Harkness J. and Marriott D.** Lymphogranuloma venereum in Australia: Anorectal *Chlamydia trachomatis* serovar L2b in men who have sex with men. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(3):1029-31.
- 86. Subtil A. and Dautry-Varsat A.** *Chlamydia*: Five years A. G. (After Genome). *Curr. Op. Microbio.* 2004; 7(1): 85-92.

- 87. Szymanowicz A., Bourgne M.O., Denis I. et Neyron M.J.** Optimisation de la gestion du contrôle de qualité. Partie I, l'approche méthodologique. *Spectra Biologie*. 2005 ; 147 : 40-48.
- 88. Tobin J. M., Harinda V., Mani R.** [Which treatment for genital tract *Chlamydia trachomatis* infection?](#) *Int J STD AIDS*. 2004 ; 15(11): 737-9.
- 89. UNAIDS United Nations Programs on HIV/AIDS.** A global view of HIV infection living with VIH, estimated adult (15-49) HIV prevalence for countries in 2007.
- 90. Van Hal S.J., Hillman R., Stark D.J., Harkness J.L., Marriott D.** Lymphogranuloma venereum: An emerging anorectal disease in Australia. *Med J Aust*. 2007 ; 187(5): 309-310.
- 91. Wade A. S., Kane C.T., Diallo P.A., Diop A.K, Gueye K., Mboup S., Ndoye I., Lagarde E.** HIV infection and sexually transmitted infections among men who have with men in Senegal. *AIDS*. 2005; 19(18): 2133-40.
- 92. Wade A.S., Larmarange J., Diop A.K., Diop O., Gueye K., Marra A., Sene A., Enel C., Niang Diallo P., Toure Kane N.C., Mboup S. and Desgrees-du-Lou A.** Reduction in risk-taking behaviors among MSM in Senegal between 2004 and 2007 and prevalence of HIV and other STIs. ELIHoS Project, ANRS 12139. *AIDS Care*. 2010 ; 22(4): 409-14.
- 93. Warford A., Chernesky M. and Peterson E.M.** Laboratory diagnosis of *Chlamydia trachomatis* Infections. In: Gleaves CA, ed. Cumitech 19A. Washington, D.C.: ASM Press. 1999.
- 94. Warszawski J.** Dépistage systématique des infections à *Chlamydia trachomatis*: il est temps d'agir. *Bull. Epidémiol. Hebd*. 2006 ; 37-38: 275-276.
- 95. Weisburg W.G., Hatch T.P. and Woese C.R.** Eubacterial origin of *Chlamydia*, *J. Bacteriol*. 1986 ; 167(2): 570-74.
- 96. White J.A.** Manifestations and management of lymphogranuloma venereum. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 ; 22(1): 57-66.

- 97. Wyllie S., Ashley R.H., Longbottom D., and Herring A.J.** The major outer membrane protein of *Chlamydia psittaci* functions as a porin-like ion channel. *Infection and Immunity*. 1998 ; 66(11): 5202-07.
- 98. Wyrick P.B.** Intracellular survival by *Chlamydia*. *Cell Microbiol*. 2000 ; 2(4): 275-82.



ANNEXES

Annexe 1:
Appareillage

L'automate *m2000sp/rt* comprend deux appareils :

- l'Abbott *m2000sp* qui assure la préparation des échantillons avec pour objectif d'extraire et d'isoler les molécules cibles, afin de les rendre accessibles pour l'amplification, et d'éliminer tout inhibiteur potentiel de l'amplification de l'extrait,
- l'Abbott *m2000rt* qui réalise l'amplification et la détection à l'issue desquelles les résultats sont recueillis sur un ordinateur relié à l'appareil.



Figure : Appareil *m2000sp/rt*

Annexe 2:
Description

La figure ci-dessous représente les principaux composants de l'appareil *m2000sp*.

Le bras manipulateur (RoMa) est équipé de pinces destinées à placer le portoir de l'unité de traitement 1 ml ainsi que les portoirs DiTi aux différentes positions du plan de travail. La plate-forme de déchargement comporte le système de refroidissement, les coffrets-réactifs du dosage, les tubes de master mix, les plaques PCR et les plaques à puits profonds utilisés pendant le fonctionnement de l'appareil

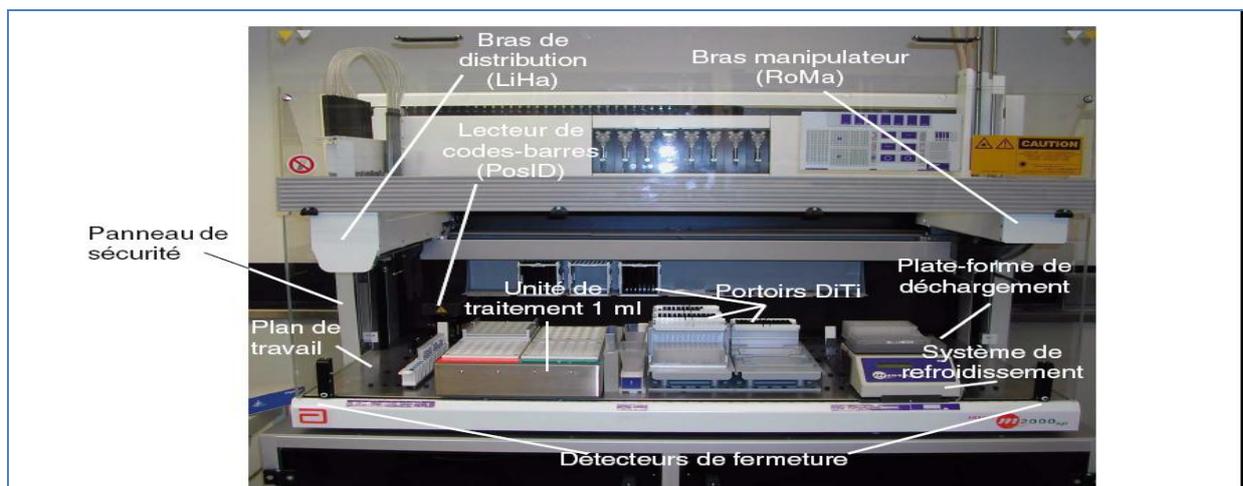


Figure : vue d'ensemble de l'appareil *m2000sp*

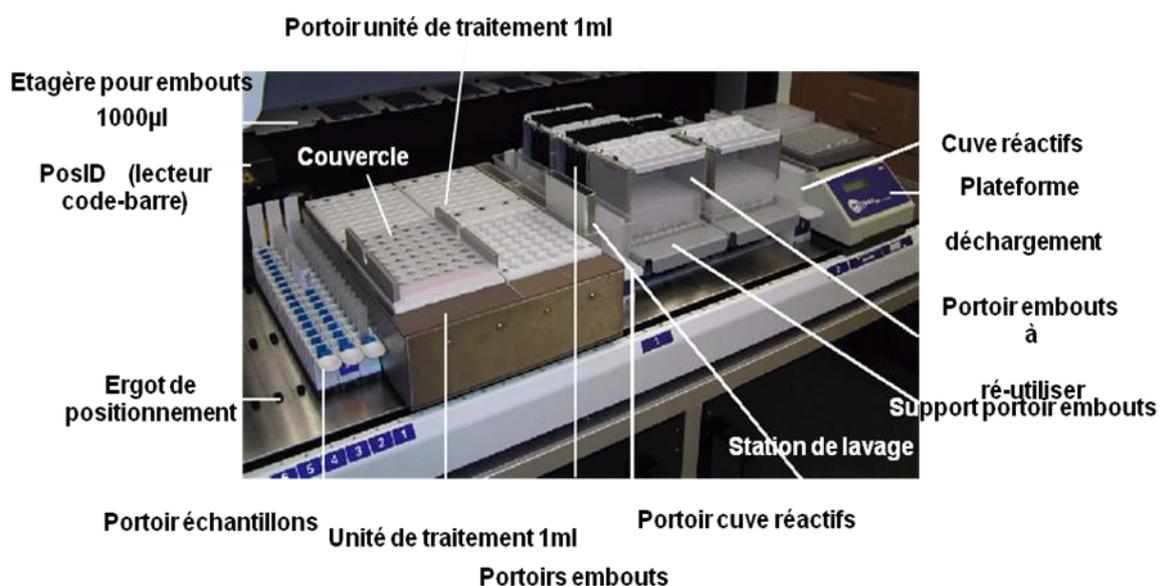


Figure : Vue d'ensemble du plan de travail

Annexe 3:

Matériel et réactifs d'usage général

➤ Matériel

- Hotte à flux lumineux
- Blouse blanche jetable
- Micropipettes 1000, 200, 20
- Embouts stériles jetables a filtre de 1000, 200, 20
- Pipettes stériles de 10ml
- Micro-tubes stériles de 1,5 et de 2ml
- Bain marie sec
- Agitateur de type vortex
- Micro-centrifugeuse
- Gants en latex sans talc
- Becher
- Etuve à 37°c
- Marqueur indélébiles
- Chronomètre de laboratoire
- Papier essuie-tout
- Portoirs de tubes d'échantillons
- Congélateurs

➤ Désinfectants

- Ethanol absolu
- Eau distillée
- Hypochlorite de sodium
- Ethanol 70°

Annexe 4:

Matériel et réactifs spécifiques à la technologie de m2000

➤ **Matériel**

- Un extracteur automatique d'acide nucléique *m2000sp*
- Un analyseur *m2000rt*
- Kit d'extraction Abbott *mSample Preparation System*
- Kit d'amplification Abbott Real Time Amplification Reagent Kit
- Embouts de 1000µl et 200µl sur rack
- Un coffret Coffret-réactifs pour amplification
- Cupules réactionnelles de 5 ml
- Tubes échantillons de 13mm à 16 mm
- Couvercles adhésifs optiques Abbott
- Plaque de réaction optique à 96 puits
- Applicateurs pour couvercles adhésifs Abbott
- Base de support anti-éclaboussures Abbott

➤ **Kits et Réactifs**

Kit d'extraction Abbott *msample preparation system*

- Tampon de lyse CT/NG
- Solution de microparticules (silice magnétique)
- Tampon de lavage 1
- Tampon de lavage 2
- Tampon d'élution

Kit d'amplification Abbott real time

- Mélange réactionnel
- Contrôle interne

Kit de contrôle

- Contrôle négatif
- Contrôle seuil 1 et 2

Annexe 5

Mode opératoire

Les échantillons sont décongelés à température ambiante puis chaque échantillon est mis dans une cupule réactionnelle.

Les cupules et les tubes de contrôle seuil numérotés par ordre sont placés dans des portoirs d'échantillons. En respectant cet ordre, les numéros sont entrés par l'utilisateur dans le centre de contrôle.

Les solutions de lyse, de microparticules, de lavages et d'éluion utilisables une seule fois, sont mises dans des cuvettes de réactifs placées dans leurs portoirs.

Le contrôle interne est ajouté dans la solution de lyse et l'alcool dans la solution de lavage 2.

Le portoir de l'unité de traitement 1ml est chargé de cupules réactionnelles vides.

Les portoirs d'échantillons, de cuves de réactifs et l'unité de traitement 1ml sont chargés dans le système *m2000sp*.

Une plaque à 96 puits profonds est placée sur la plate-forme de déchargement. Des embouts stériles à filtre de 1000 et de 200 sont chargés sur leurs portoirs dans le système.

Le *m2000sp* automatise entièrement l'extraction de l'ADN. Il utilise la technologie des particules magnétiques pour capter les acides nucléiques et lave les particules afin d'éliminer tout composant non lié de l'échantillon. Les acides nucléiques liées sont élués et transférés vers la plaque à 96 puits profonds.

Le mélange réactionnel, un tube de mélange réactionnel et une plaque de réaction optique sont ensuite chargés dans le système. Le système procède à une pré-amplification en mélangeant les constituants du mélange réactionnel dans le tube réactionnel puis transférer ce mélange et les échantillons extraits dans la plaque de réaction optique.

Après extraction et pré-amplification cette plaque est scellée et transférée dans le *m2000rt* où se déroule la PCR.