

BACTÉRIOLOGIE

Étude par culture cellulaire de l'infection active due à *Chlamydia trachomatis* dans une population de femmes symptomatiques à Abidjan.

H. Bankolé (1), H. Faye-Ketté (1), G. Laruche (3), F. Dabis (4), C. Welffens-Ekra (2) & M. Dosso (1)

(1) Laboratoire de bactériologie-virologie, Institut Pasteur, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(2) Service de gynécologie, CHU de Yopougon, Abidjan, Côte d'Ivoire.

(3) PNLS/MST/TUB, Côte d'Ivoire.

(4) Université Bordeaux II, France.

Correspondance : Mme H. Faye-Ketté, 01 BP 1953 Abidjan 01, Côte-d'Ivoire. Tél. (225) 07094224. Fax : (225) 22487405. Email : fayeket@ci.refer.org

Manuscrit n° 2207. "Bactériologie". Reçu le 25 mai 2000. Accepté le 24 avril 2001.

Summary: Active *Chlamydia trachomatis* infection on symptomatic women in Abidjan using cell culture.

The object of our study has been to assess *Chlamydia trachomatis* prevalence among symptomatic women in Abidjan and to identify issues related to the use of cell culture methods in a tropical laboratory. 1522 women with vaginal discharge were enrolled in a cross sectional study. One endo cervical swab was taken per woman and inoculated into cycloheximide treated Mac Coy cells. Elementary bodies were detected by direct fluorescent antibody (DFA).

The isolate rate of *Chlamydia trachomatis* by cell culture was estimated to 86%. The prevalence of chlamydial infection among symptomatic women was 10.8%. Culture was influenced by presence of blood or cervical mucus in the sample. 206 samples gave no results because of blood or cervical mucus. During this study repeated contaminations of cells with facultative bacteria were noted and disposing of a sufficient number of cells was not easy.

Résumé :

Chlamydia trachomatis a été recherchée par culture cellulaire dans les prélèvements endocervicaux de 1522 femmes ayant un écoulement vaginal incluses dans une étude transversale à Abidjan, afin de déterminer la prévalence de l'infection ainsi que les difficultés liées à l'utilisation d'une telle méthode dans un laboratoire en zone tropicale. Les prélèvements endocervicaux ont été inoculés sur des cellules Mac Coy traitées au cycloheximide. Les inclusions cytoplasmiques signant l'infection par *Chlamydia trachomatis* ont été révélées par immunofluorescence directe. Le taux de succès de la culture cellulaire dans cette étude était de 86,5 % (1316/1522). Ce taux était de 80 % lorsque les prélèvements étaient conformes et de 50,4 % lorsque ceux-ci étaient non conformes. La prévalence de l'infection chlamydienne, obtenue par cette méthode, était de 10,8 % (IC95: 9,3 -12,3). De nombreuses contaminations par les bactéries aéro-anaérobies facultatives ont été observées.

Introduction

Les maladies sexuellement transmissibles (MST) constituent, de par le monde, un problème majeur de santé publique. Nombre de ces MST sont provoquées par des agents capables d'engendrer au niveau des organes génitaux des lésions pouvant compromettre à jamais la fécondité. C'est le cas de *C. trachomatis*, dont l'infection, souvent discrète et sournoise chez la femme, évolue à bas bruit et peut conduire à la stérilité tubaire. De nombreux travaux (5, 9) révèlent que les infections dues à *C. trachomatis* occupent une place importante dans l'étiologie des MST. Parmi les différentes techniques de détection utilisées, la culture sur cellules permissives est la méthode de référence (1), car elle seule permet de diagnostiquer une chlamydiae génitale évolutive.

En Côte d'Ivoire, quelques études sur la prévalence de *C. trachomatis* dans les infections génitales ont été menées par

SANON et coll. en 1992 (12), par FAYE-KETTE et coll. en 1994 (6), puis en 1996 (5, 7). Toutes ces études ont montré un taux de prévalence élevé de *C. trachomatis* dans les infections génitales chez les femmes à Abidjan. Mais, ces travaux ont utilisé soit la détection des corps élémentaires par immunofluorescence directe (IFD), soit la recherche des anticorps anti-*C. trachomatis* par immunofluorescence indirecte (IFI). Aucune de ces méthodes ne permet d'affirmer avec certitude le caractère évolutif de l'infection due à *Chlamydia*. Il apparaissait alors opportun que ces études antérieures soient complétées par d'autres basées sur l'isolement de *C. trachomatis* par culture cellulaire.

Le présent travail se propose d'appliquer la technique de culture cellulaire au dépistage de l'infection par *C. trachomatis* chez des femmes consultant dans une clinique de gynécologie à Abidjan en vue d'identifier les difficultés liées à l'utilisation de cette technique dans un laboratoire de zone tropicale.

prevalence
Chlamydia trachomatis
cell culture
laboratory
Abidjan
Côte d'Ivoire
(Ivory Coast)
Sub-Saharan Africa

prévalence
Chlamydia trachomatis
culture cellulaire
laboratoire
Abidjan
Côte d'Ivoire
Afrique intertropicale

Matériel et méthodes

Patientes

Nous avons enrôlé dans une étude transversale 1 522 femmes consultant dans la clinique gynécologique du centre de santé de Yopougon (commune d'Abidjan) pour un écoulement génital, associé ou non à des douleurs pelviennes et à une dysurie. Les prélèvements endocervicaux ont été réalisés sous spéculum non lubrifié à l'aide d'un écouvillon abrasif de type "bactopick", après mouchage du col avec un tampon stérile. Les prélèvements ont été par la suite déchargés dans 2 ml de 2 sucrose-phosphate (2SP), enrichi en sérum de veau foetal et rendu sélectif par l'adjonction de gentamicine et de fungizone, puis conservés à - 70 °C jusqu'à l'inoculation.

Détection de *C. trachomatis* par culture cellulaire

Les cellules MAC COY ont été entretenues et inoculées selon la technique classique de culture cellulaire. Le milieu de EAGLE utilisé à cette fin contenait 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Les différentes incubations ont été réalisées à 37° C sous 6,5 % de CO². Cette étape de l'étude a permis de disposer d'une quantité suffisante de cellules et d'en conserver dans du milieu de Eagle additionné de 10% de diméthyl sulfoxyde. Le tapis cellulaire, destiné à l'inoculation des prélèvements a été obtenu dans des plaques de 24 puits après 24 heures d'incubation d'une suspension à 10⁵ cellules/ml distribuée à raison de 1 ml par puits.

Avant inoculation des lignées cellulaires, l'aspect macroscopique des prélèvements a été noté. Selon que ceux-ci contenaient de la glaire ou du sang ou n'avaient aucune caractéristique particulière, ils ont été classés pour les premiers en prélèvements non conformes et pour les autres en prélèvements conformes pour la culture. Ensuite, un traitement visant à libérer les corps élémentaires des cellules génitales a été réalisé. Les prélèvements ainsi traités ont été utilisés pour inoculer les cellules MAC COY, à raison de 2 ml de suspension de produit biologique par puits.

Après inoculation, les plaques ont été centrifugées à 2 500 tours par minute pendant 1 heure à 37 °C, puis maintenues en incubation pendant 2heures sous 6,5% de CO². L'inoculum a été par la suite retiré et remplacé par du milieu de Eagle enrichi en vitamines, en acides aminés, en glucose et en cycloheximide.

Les inclusions cytoplasmiques signant l'infection par *C. trachomatis* ont été recherchées après 48 heures d'incubation par immunofluorescence directe, à l'aide d'un anticorps monoclonal anti-*C. trachomatis*. Le nombre d'inclusions cytoplasmiques par lame a été noté.

Analyse statistique

Au plan statistique, les variables obtenues ont été comparées deux à deux à l'aide du test de ² de MANTEL HAENSZEL avec correction de YATES.

Résultats

Selon l'aspect macroscopique, deux types de prélèvements ont été notifiés. Ce sont les prélèvements jugés conformes pour la culture cellulaire (prélèvements ayant un aspect macroscopique sans particularité) et les prélèvements non conformes (prélèvements contenant du sang et/ou de la glaire). Les prélèvements conformes représentaient 78,3 % (1 191/1 522) des cas et les prélèvements non conformes 21,7 % (331/1 522).

Tableau I.

Répartition des prélèvements selon leur conformité pour la culture cellulaire.
Distribution of tests according to conformity by cell culture.

	cultures (nb = 1522)			
	interprétables nb = 1316 (%)		ininterprétables nb = 206 (%)	
prélèvements conformes (nb =1191)	1149	(87,3)	42	(20,4)
prélèvements non conformes (nb =331)	167	(12,7)	164	(79,6)
- avec du sang (nb =294)	148		146	
- avec de la glaire (nb =37)	19		18	

Parmi ceux-ci, 19,3 % (294/1 522) contenaient du sang et 2,4 % (37/1 522) de la glaire. Bien qu'ils fussent non conformes, ces prélèvements ont été ensemencés dans le but de déterminer l'influence du sang et de la glaire sur les cellules.

Après culture, 1 316 prélèvements ont pu être interprétés dont 87,3 % (1 149/1 316) de prélèvements conformes et 12,7 % (167/1 316) de prélèvements non conformes. Ceci situe le taux de succès de la culture cellulaire dans cette étude à 86,5 % (1316/1 522). 206 prélèvements sur 1 522 (13,5 %) n'ont pu être interprétés, dont 42 prélèvements conformes soit 20,3 % (42/206) et 164 prélèvements non conformes, soit 79,6 % (164/206). Les prélèvements n'ont pu être interprétés, soit du fait de l'absence de tapis cellulaire, soit du fait de la non viabilité des cellules. Ainsi, les prélèvements conformes n'ont pu être interprétés dans 54,8 % par absence de tapis cellulaire et dans 45,2 % des cas par absence de cellules viables. La plupart des prélèvements non conformes, 67,1 % des cas, n'ont pu être interprétés à cause de la non viabilité des cellules.

Parmi les 1 316 prélèvements interprétés, 143 ont présenté des inclusions, ce qui situe la prévalence de l'infection par *C. trachomatis* à 10,8% (IC₉₅: 9,3 – 12,3) et 1173, soit 89,2%, ont été négatifs. On notait une prévalence de l'infection chlamydienne de 10,9 % (126/1 149) lorsque les prélèvements étaient conformes, de 8,1 % (12/148) lorsque les prélèvements contenaient du sang et de 26,3 % (5/19) lorsque les prélèvements contenaient de la glaire (tableau II). Au plan statistique, il n'existait pas de différence entre le taux de positivité des prélèvements conformes et celui des prélèvements contenant du sang (p = 0,12). Cependant la prévalence était significativement élevée lorsque le prélèvement contenait de la glaire.

Tableau II.

Répartition des prélèvements selon leur positivité à la culture.
Distribution of tests according to culture positivity.

	cultures interprétables (nb = 1316)			
	positives nb = 143 (%)		négatives nb = 1173 (%)	
prélèvements conformes (nb =1149)	126	(88,1)	1023	(87,3)
prélèvements non conformes (nb =167)	17	(11,9)	150	(12,7)
- avec du sang (nb =148)	12		136	
- avec de la glaire (nb =19)	5		12	

Après 48 heures d'incubation, les petites inclusions cytoplasmiques étaient plus fréquemment rencontrées que les grosses et moyennes inclusions: 49,7 % contre 22,4 % et 27,9 %, respectivement. De plus, la plupart des prélèvements analysés étaient peu chargés en antigène de *Chlamydia*; ainsi 60 % des prélèvements analysés comportaient moins de 100 unités formant inclusion par millilitre (UFI/ml).

Discussion

Cette étude, dont l'objectif essentiel était de valider la technique d'isolement de *C. trachomatis* par culture cellulaire dans un laboratoire de zone tropicale, n'a pas permis d'obtenir les performances de la culture cellulaire en terme de

sensibilité et de spécificité, puisque cette méthode de détection a été utilisée seule. Cependant, la culture a été effectuée avec un taux de succès de 86,5 %, taux représentant l'ensemble des cultures qui ont pu être interprétées. Ce taux observé est supérieur à celui indiqué par RIDGWAY et coll. (11) qui ont obtenu entre 75 % et 80 %, en 1990, en Angleterre, et à ceux de Van DYCK et coll. (14) qui étaient de 62 % chez les prostituées et de 76 % chez les femmes enceintes au Sénégal, en 1992.

Dans cette étude, seul un prélèvement endocervical a été analysé. BARNES et coll. (2), en 1990 aux États-Unis, ont montré que la sensibilité de la culture est améliorée de 70 à 80 % lorsque plusieurs prélèvements endocervicaux par patiente sont utilisés. Certains prélèvements n'ont pu être interprétés, soit par absence de cellules viables, soit par absence de tapis cellulaire. La plupart des prélèvements pour lesquels cette situation a été observée contenaient du sang. Ce résultat démontre le caractère cytotoxique et peut-être cytolytique du sang sur les cellules MAC COY. Toutefois, un phénomène analogue a été observé avec quelques prélèvements qualifiés d'adaptés à la culture cellulaire. Cela pourrait s'expliquer, comme l'a proposé DAVID (4) en 1990, par la présence dans ces prélèvements de sécrétions vaginales contenant une forte concentration de bactéries dont les produits du métabolisme sont toxiques pour les lignées cellulaires. Enfin, des facteurs non déterminés peuvent aussi avoir été à l'origine de la mort des cellules MAC COY. L'absence de tapis cellulaire peut être la conséquence d'un décollement du tapis cellulaire au cours des étapes de lavages et de coloration. Ce phénomène est bien connu lorsque l'immunofluorescence directe est utilisée.

Dans cette étude réalisée chez des femmes symptomatiques, la prévalence de 10,8 % est inférieure à celle de 13,7 % obtenue par SANON et coll. (12) dans une étude effectuée en 1992, à Abidjan, dans une population identique. Au Sénégal, une étude menée par VAN DYCK et coll. (14), en 1992, chez des femmes enceintes et des prostituées, et utilisant la culture cellulaire, a montré respectivement des prévalences de 14,6 % et de 14,3 %. De même, en 1989, BARNES et coll. (2) ont estimé par la même technique dans une population féminine à risque aux États-Unis, cette prévalence à 24,6 %.

L'importance de l'infection chlamydienne a déjà été montrée à Abidjan. En effet, une enquête sérologique, réalisée en 1996 à Abidjan (5) dans cette même population, a montré que 70 % des femmes analysées avaient des anticorps anti *Chlamydia* à un titre supérieur ou égal à 64. Une prévalence relativement élevée de l'ordre de 30% a été également retrouvée chez des femmes ayant une cervicite (7). Les différences observées entre ces taux et celui de cette étude sont probablement liées aux méthodes utilisées. En effet, SANON et coll. ont utilisé l'immunofluorescence directe comme méthode de détection, alors que cette étude a utilisé la culture cellulaire qui, bien que lourde et chère, demeure la méthode de référence avant le développement des techniques de biologie moléculaire qui tendent à la remplacer à l'heure actuelle.

La plupart des prélèvements analysés ont montré de petites et moyennes inclusions. Ce résultat pourrait être lié, soit à la durée de conservation des prélèvements à - 70 °C, soit à la durée d'incubation des cellules après leur inoculation, soit au fait que seul un passage a été effectué par prélèvement. En ce qui concerne la conservation prolongée des prélèvements à - 70 °C, son influence sur la culture cellulaire est bien connue. En effet, des auteurs comme MAHONY et coll. (8) ont décrit le

rôle du délai de conservation sur la viabilité des *Chlamydia*. Dans cette étude, pour des raisons d'ordre technique, les prélèvements ont été ensemencés pour la plupart après douze mois de conservation à - 70 °C. Ce délai de conservation pourrait expliquer la taille des inclusions observées. Quant à la durée d'incubation des cellules après inoculation, celle-ci était de 48 heures. La durée classique du cycle de multiplication de *C. trachomatis* étant de 48 à 72 heures, certaines souches de notre série qui étaient de croissance lente n'ont pu atteindre leur maturité. Un prolongement de l'incubation aurait permis une meilleure expression des souches car, comme le souligne BARNES (1), la probabilité d'obtenir de grosses inclusions au premier passage est moins élevée que lors des autres passages, d'où la nécessité d'effectuer plusieurs passages. Ces trois alternatives peuvent être envisagées.

Au cours de cette étude, les difficultés rencontrées ont essentiellement concerné l'entretien des cellules. En effet, au cours de leur entretien, les cellules, bien que viables, ont perdu leur pouvoir d'adhérence. Ceci était la conséquence d'une altération du milieu d'entretien des cellules par appauvrissement en facteurs de croissance, ainsi que d'une rupture de la chaîne de froid. Dans le premier cas, l'enrichissement du milieu en sérum de veau fœtal à une concentration de 10 % a permis aux cellules de recouvrer leur pouvoir d'adhérence. Dans le deuxième cas, un nouvel approvisionnement en cellules MAC COY a été nécessaire. Pendant une période de deux mois, les cellules ont été contaminées par une souche de *Staphylococcus aureus* méticillino-résistante et résistante aux aminoglycosides. Cette souche, probablement d'origine nosocomiale, a pu contaminer les cellules par l'intermédiaire de la verrerie utilisée. En effet, cette verrerie était recyclée et conditionnée au même endroit que la verrerie utilisée pour réaliser le diagnostic des infections hospitalières. Une contamination du matériel de culture cellulaire a pu survenir à ce moment-là. La contamination a été enrayerée par l'adjonction de vancomycine au milieu de culture cellulaire et par la récupération séparée de la verrerie utilisée. L'approvisionnement en lignées cellulaires n'a pas été aisé. La plupart du temps, plusieurs envois ont été nécessaires, les cellules étant souvent affectées par les conditions défectueuses de conservation au cours du transport.

Conclusion

Au terme de cette étude, le taux de succès de la culture cellulaire était de 86,5 %; la prévalence de la chlamydie génitale active dans la population féminine à Abidjan a été estimée à 10,8 %. Les problèmes identifiés ici sont connus des laboratoires de culture cellulaire. Ce sont la contamination et la perte de pouvoir d'adhérence des cellules. Par ailleurs, l'approvisionnement en lignées cellulaires a constitué un problème spécifique à notre étude. Malgré les difficultés sus-citées, l'isolement de *Chlamydia trachomatis* par culture cellulaire est possible dans un laboratoire de zone tropicale, en attendant l'utilisation des techniques d'amplification génique qui sont beaucoup plus sensibles.

Remerciements

Les fonds ayant servi à cette étude nous ont été fournis par l'ANRS (Projet Dyser-CI). Nos sincères remerciements vont au Professeur SALAMON (Université Bordeaux II) et au Professeur ORFILA (CHU Nord Amiens).

Références bibliographiques

1. BARNES RC - Laboratory diagnosis of human chlamydial infections. *Clin Microbiol Rev*, 1989, **2**, 119-136.
2. BARNES RC, KATZ BP, ROLFS RT, BATTEIGER B, CAINE V & JONES RB - Quantitative culture of endocervical *Chlamydia trachomatis*. *J Clin Microbiol*, 1990, **28**, 774-780.
3. BEZIAN MC, PELLETIER JR, LABROUSSE P, DIALLO B & BEZIAN JH - Enquête séro-épidémiologique sur les MST à *Chlamydia trachomatis* à Casablanca (Maroc). *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 125-129.
4. DAVID HM - *Chlamydia* infections/ Sexually Transmitted Diseases. *Medical clinics of North America*, 1990, **74**, 1367-1387.
5. FAYE-KETTE H, N'DOBO P, DOSSO M & WELFFENS-EKRA C - Prévalence des anticorps anti-*Chlamydia trachomatis* chez des femmes infertiles au CHU de Yopougon (Abidjan) : étude préliminaire. Communication orale, 1er congrès scientifique Société africaine de microbiologie, février 1996, Bamako.
6. FAYE-KETTE H, SYLLA-KOKO FD, N'DOUBA-KACOU A, BOUZID S, ANOMA C et al. - Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* dans les urétrites chez l'homme à Abidjan.
7. FAYE-KETTE H, YEBARTH S, DOSSO M & WELFFENS-EKRA C - Prévalence de *Neisseria gonorrhoeae* et de *Chlamydia trachomatis* dans les cervicites à Abidjan : étude préliminaire. Communication orale, 1er congrès Société africaine de microbiologie, février 1996, Bamako.
8. MAHONY JB & CHERNESKY MA - Effect of swab and storage temperature on the isolation of *Chlamydia trachomatis* from clinical specimens. *J Clin Microbiol*, 1985, **22**, 865-867
9. ORFILA J - Diagnostic d'une infection à *Chlamydia*. *LABORAMA*, 1991, **32**, 12-17.
10. PERRIN R, MASSOUGBODJI A, OFFRIN G, DE SOUZA J, ANAGOU S et al. - Infections génitales basses à *Chlamydia trachomatis* chez la femme à Cotonou. *Publications Médicales Africaines*, 1992, **121**, 19-20.
11. RIDGWAY GL & TAYLOR-ROBINSON D - Current problems in Microbiology: *Chlamydia* infections: which laboratory test? *J Clin Pathol*, 1991, **44**, 1-5.
12. SANON S, GERSHY-DAMET GM, M'BOUP S, KOFFI K, SORO BN et al. - Prévalence de *Chlamydia trachomatis* dans des prélèvements génitaux à Abidjan. *Bull Soc Pathol Exot*, 1992, **85**, 209-211
13. TAYLOR-ROBINSON - The value of the non-culture techniques for detection of *Chlamydia trachomatis* infections: making the best of a bad job. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, **11**, 499-503.
14. VAN DYCK E, SAMB N, DIENG SARR A, VAN DE VELDEN L, MORAN J et al. - Accuracy of two enzyme immuno assays and cell culture in the detection of *Chlamydia trachomatis* in low and high risk populations in Sénégal. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 1992, **11**, 527-534.