

DETECTION DE CHLAMYDIA TRACOMATIS PAR PCR

par Mathieu Pied

étude réalisée en 1997

MATERIELS ET METHODES

L'étude repose sur l'examen en parallèle de patients potentiellement infectés par *Chlamydia trachomatis*, en utilisant deux techniques : Chlamyfast® et Amplicor™.

Prélèvements :

100 femmes et 4 hommes, âgés de 16 à 70 ans (pour une moyenne d'âge de 33 ans) sont entrés dans l'étude de Mars 1997 à Août 1997. Tous ces patients ont subi des prélèvements endocervicaux, urétraux, coelioscopiques ou des ponctions Douglas qui ont fait l'objet d'une recherche systématique de *Chlamydia trachomatis*.

Les milieux de transport ont été différents suivants les cas :

Les écouvillons destinés à l'ELISA ont directement ensemencé le milieu 2HC d'International Microbio, du groupe Stago. Il contient des antibiotiques (ampicilline, cholymicine, bactrine), de l'acide glutamique et du saccharose dans un tampon phosphate.

Mais parfois, l'écouvillon arrivait au laboratoire sans avoir été déchargé.

Les prélèvements destinés à la technique PCR ont voyagé dans la mesure du possible dans le milieu de transport fourni par Roche Diagnostic Systems, Inc. Il s'agit d'une solution de Tris-HCl contenant <1% de solubilisant.

Quand ce milieu n'était pas disponible, notamment pour les prélèvements réalisés chez le praticien, l'étude a été faite à partir des échantillons précédents.

ELISA:

Il a été réalisé par le kit Chlamyfast® (Références 11060, 11006) d'International Microbio, du groupe Stago.

Il s'agit d'une technique du type *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) comprenant trois phases :

1. Extraction enzymatique de l'antigène LPS (lipopolysaccharide) de *Chlamydia trachomatis* et son immobilisation sur une membrane filtrante.
1. Fixation de l'anticorps monoclonal de souris anti-LPS, couplé à la peroxydase.
1. Révélation de l'immun-complexe formé grâce à un substrat chromogène. (la positivité se voit par une coloration rouge du filtre qui est initialement blanc)

Test Amplicor™ de Roche Diagnostic Systems :

(Amplicor™ est une marque de Roche Molecular Systems Inc. (RMS), exploitée sous licence par Roche Diagnostic Systems, Inc. (RDS))

Il s'organise en trois phases : amplification (Mullis et Faloona, 1987), hybridation et détection colorimétrique. Il s'agit d'une alliance entre une technique PCR et d'une *enzyme oligoassay*.

① Préparation des prélèvements :

Si le milieu Roche a été ensemencé :

Le milieu de transport, d'un volume de 1 ml, est repris dans 1 ml de Diluant d'Echantillons (Amplicor,

RMS ; Solution Tris-HCl contenant 6mM de MgCl₂, >10% de détergent et 0.05% d'azide de sodium)

Le tout est vortexé et mit à incuber 10 minutes à température ambiante.

☐ Si le milieuensemencé est le milieu 2HC :

100 µl d'échantillon sont repris dans 900 µl de Milieu de Transport Roche. La procédure est ensuite la même que précédemment.

☐ Si le prélèvement a été transporté sur un écouvillon, sans milieu de transport :

L'écouvillon est déchargé le plus rapidement possible dans le Milieu de Transport Roche, et traité comme précédemment.

Amplification :

50 µl de l'échantillon traité sont placés dans un tube PCR contenant 50 µl du milieu réactionnel (Amplicor, RMS), contenant :

⇒ < 0.001 % de désoxyribonucléotides triphosphates (dATP, dCTP, dGTP et dUTP, à la place des dTTP).

⇒ < 0.001 % d'amorces biotinylées CP24 (5'-biotine-GGGATTTCCTGTAACAACAAGTCAGG) et CP27 (5'-biotine-CCTCTTCCCCAGAACAATAAGAACAC), qui s'hybrident à un plasmide cryptique de *Chlamydia trachomatis*. La séquence cible de ce couple d'amorces mesure 207 pb (Palmer et Falkow, 1986 ; Peterson et DelaMaza, 1988).

⇒ < 0.01 % d'AmpliTaq® (Taq polymérase)

(AmpliTaq® est une marque déposée de RMS, exploitée sous licence par RDS)

⇒ < 1 % d'EDTA, KCl

Tout ceci dans une solution Tris-HCl contenant 20 % de glycérol, dans lequel on a rajouté de l'Uracile-N-Glycosylase (UNG) (Longo *et al.*, 1990), à raison de 100 µl pour 1.5 ml.

L'amplification s'effectue dans un thermocycleur GenAmp® PCR System de Perkin-Elmer, Norwalk, Conn. Il s'agit d'une amplification utilisant des cycles de deux phases, dont le déroulement est le suivant :

- 2 minutes à 50°C
- 4 minutes 30 à 95°C
- 30 cycles de 30 secondes à 95°C puis 1 minute à 60°C
- un temps infini à 72°C

③ Hybridation :

A la fin de l'amplification, les amplicons sont immédiatement dénaturés par 100 µl de Solution de Dénaturation (Amplicor, RMS ; 1.6 % d'hydroxyde de sodium dans une solution d'EDTA).

25 µl du mélange sont transférés sur une microplaque (revêtue d'une sonde d'ADN complémentaire de la portion amplifiée, et de séquence 5'-Bovine Serum Albumin-

CATAGCACTATAGAAGCTCTGCAAGCC) auxquels on rajoute 100 µl de Tampon d'Hybridation (solution de phosphate de sodium contenant < 0.2 % de solubilisant et < 25 % de chaotrope)

Le tout est incubé 1 heure à 37°C.

④ Détection :

Après une série de cinq lavages, on incube 100 µl de Conjugué (Amplicor, RMS ; avidine-peroxidase de Raifort dans une solution Tris-HCl) pendant 15 minutes à 37°C.

Après une autre série de lavages, sont ajoutés 100 µl de Substrat (Amplicor, RMS ; H₂O₂ et tétraméthylbenzidine (TMB)).

Incubation 10 minutes à l'obscurité ; un complexe coloré se forme alors.

Puis ajout de 100 μ l de Réactif d'Arrêt (Amplicor, RMS ; contenant 4.9 % d'acide sulfurique) et lecture de la densité optique dans les 10 minutes à 450 nm.

⑤ Résultats :

\square $D.O._{450} > 0.5 \rightarrow$ L'échantillon est Positif en ce qui concerne la présence de l'ADN plasmidique de *Chlamydia trachomatis*

\square $D.O._{450} < 0.2 \rightarrow$ L'échantillon est " Présumé Négatif "

\square $0.2 < D.O._{450} < 0.5 \rightarrow$ L'échantillon est déclaré douteux et doit être réanalysé en double

Alors si au moins deux des trois analyses ont une $D.O._{450} < 0.25$, l'échantillon est Présumé Négatif.

Si deux des trois ont une $D.O._{450} > 0.25$, l'échantillon est déclaré comme Positif.

⑥ Cas des cœlioscopies et des ponctions Douglas:

Comme la méthode Amplicor™ pour ces échantillons n'est encore qu'au stade de la recherche, il est conseillé dans la méthode d'amplifier le mélange " milieu de transport ensemencé - Diluant d'échantillon " une fois comme tel et une seconde fois dilué au 1/10^e.

-

RESULTATS

Pendant cette étude, des échantillons provenant de 100 femmes et de 4 hommes ont été analysés par le kit Amplicor™ *C.trachomatis* de RDS et par Chlamyfast® d'I.M..

Sur ceux-ci, 71 échantillons endocervicaux ou urétraux ont été reçus sur le milieu de transport Amplicor. L'analyse en parallèle par les deux techniques a été pratiquée (tableau 1). Sur les 71 échantillons, aucun chlamydiae n'a été trouvé . Les résultats de la PCR et de la méthode *ELISA* sont donc équivalents.

	PCR -	PCR +
ELISA -	71	0
ELISA +	0	0

tableau 1 - Comparaison des résultats obtenus par la méthode *ELISA* avec la méthode PCR, pour les échantillons reçus sur le milieu de transport Amplicor.

Cependant, comme tous les échantillons reçus ne le sont pas systématiquement sur Amplicor, quelques PCR sur le milieu Amplicor ont été effectuées en parallèle avec d'autres moyens de transport, comme consigné dans le tableau 2. Le petit nombre de cas (6 patients testés) et surtout la non révélation de chlamydiae ne permet pas une conclusion quand à l'utilisation possible de ces échantillons pour la PCR. Le peu de PCR effectuées dans ce cas s'explique par le prix des réactifs : ceux-ci étant assez élevés, il a été vite décidé de privilégier de passer un grand nombre de patients plutôt que peu en parallèle sur plusieurs moyens de transport ; ce dernier cas n'étant analysé qu'après avoir obtenu un positif sur l'un ou l'autre de ces moyens de transport.

PCR	2HC -	2HC +	ECOUVILLON -	ECOUVILLON +
-----	-------	-------	--------------	--------------

AMPLICOR –	4	0	3	0
AMPLICOR +	0	0	0	0

tableau 2 - Comparaison des résultats de PCR réalisées sur Amplicor et sur d'autres préparations d'échantillons, pour un même malade

Quand les échantillons ne venaient pas des laboratoires DEFRANCE, ils parvenaient seulement sur le milieu 2HC ou des écouvillons. C'est le cas de 24 patients, sur lesquels des PCR ont été pratiquées ; les résultats sont retranscrits dans le tableau 3. Tous les examens étant négatifs, les résultats sont à rapprocher de ceux obtenus auparavant.

-

-

	PCR			
	2HC –	2HC +	ECOUVILLON –	ECOUVILLON +
ELISA –	22	0	2	0
ELISA +	0	0	0	0

tableau 3 - Résultats sur des échantillons reçus sur le milieu 2HC ou sur Ecouvillon

Donc, sous réserve de l'acceptation de tous les moyens de transport, les résultats globaux donnent une totale concordance des deux techniques testées, avec 95 tests négatifs et aucun de positif.

En parallèle de l'analyse de la sensibilité, celle de la spécificité a été entreprise (tableau 4). Chez 88 personnes, ont été trouvés 16 organismes parasitaires et/ou infectieux (dont *L.acidophilus* qui fait parti de la flore normale vaginale) dans les mêmes prélèvements que ceux analysés par PCR ou par la méthode *ELISA*. Les résultats montrent la haute spécificité des deux techniques vis à vis de *C.trachomatis* puisqu'aucun des germes révélés par d'autres techniques n'a entraîné de faux-positifs.

Organismes	Nombre de Patients	PCR –	PCR +	ELISA –	ELISA +
Candida albicans	22	22	0	22	0
Citrobacter spp ^a	1	1	0	1	0
Escherichia coli	14	14	0	14	0
Gardnerella vaginalis	20	20	0	20	0
Klebsiel pneumoniae	1	1	0	1	0
Lactobacillus acidophilus	64	64	0	64	0
Mycoplasma hominis	2	2	0	2	0
Proteus mirabilis	2	2	0	2	0
Staphylococcus aureus	2	2	0	2	0
Staphylococcus epidermidis	1	1	0	1	0
Staphylococcus saprophyticus	1	1	0	1	0
Streptococcus agalactiae	9	9	0	9	0

Streptococcus D	11	11	0	11	0
Torulopsis glabrata	1	1	0	1	0
Trichomonas vaginalis	2	2	0	2	0
Ureaplasma urealyticum	14	14	0	14	0

-

tableau 4 - Comparaison de l'insensibilité des deux méthodes à d'autres organismes que *C.trachomatis*, chez des patients infectés par ces mêmes organismes.

^a " spp " signifie que l'espèce n'a pas été déterminée

Numéro de Ponction	PCR sur milieu Roche	PCR sur milieu Roche 1/10 ^e
Liquide péritonéal N°1	Négatif (Abs=0.158)	Négatif (Abs=0.207)
Liquide péritonéal N°2	Négatif (Abs=0.199)	Négatif (Abs=0.176)
Liquide péritonéal N°3	Négatif (Abs=0.097)	Négatif (Abs=0.095)
Liquide péritonéal N°4	Négatif (Abs=0.138)	Négatif (Abs=0.137)
Liquide péritonéal N°5	Négatif (Abs=0.082)	Négatif (Abs=0.093)
Ponction Douglas N°1	Négatif (Abs=0.187)	Négatif (Abs=0.174)
Ponction Douglas N°2	Négatif (Abs=0.156)	Négatif (Abs=0.078)
Ponction Douglas N°3	Négatif (Abs=0.115)	Négatif (Abs=0.092)
Ponction Douglas N°4	Négatif (Abs=0.234)	Négatif (Abs=0.202)

tableau 5 - Résultats d'Amplificor™ sur les échantillons de cœlioscopies ou de ponctions

DISCUSSION

1. Les prélèvements

La moyenne d'âge des patients de l'étude est de 33 ans, soit un âge de maturité sexuelle où les risques de contracter des maladies sexuellement transmissibles sont importants (seules 8 personnes ont plus de cinquante ans). La majorité des personnes étudiées ayant apparemment un problème dans la région génitale, elles ont une probabilité certaine d'avoir une infection due aux chlamydiaes.

Seules 75 % des personnes prélevées en endocervical ou urétral l'ont été sur le milieu de transport Roche, conformément au déroulement normal de la technique de RDS.

Cependant, l'exploitation du milieu 2HC a été copiée sur celle préconisée par RDS pour les échantillons sur milieu 2SP (milieu de transport testé par Roche et qui donne des résultats corrects en PCR ; protocole vu lors de la formation dans les locaux de Roche) ; de plus, après renseignements pris auprès d'International Microbio, le milieu 2HC ne contient pas d'inhibiteurs de la PCR, et pourrait donc convenir à l'amplification des gènes (ceci à condition de le reprendre dans le milieu Roche qui va permettre l'accès à l'ADN, en lisant les cellules).

2. Les techniques

La méthode Roche testée est récente dans le monde du diagnostic en routine. Elle permet l'utilisation de la "Polymerase Chain Reaction" dans un simple laboratoire, sans installation particulière ni coûteuse comme c'est souvent le cas en PCR.

En effet la méthode d'amplification de Roche Diagnostic Systems utilise, dans le cas d'amplification d'ADN, trois bases universellement rencontrées dans les acides nucléiques (adénine, guanine, cytosine) plus l'uracile qui elle n'est retrouvée normalement que dans les ARN. Ainsi, dans l'ADN amplifié, les désoxythymidines triphosphates (dTTP) sont remplacées par des désoxyuridines triphosphates (dUTP).

L'utilisation de ces 4 bases, ainsi que celle de l'Uracyl-N-Glycosylase, permet de supprimer la plupart des faux-positifs dans les résultats (Longo *et al.*, 1990). En effet, l'UNG a la particularité de reconnaître spécifiquement l'ADN uracilé (provenant d'amplifications antérieures) et de le lyser, en laissant intact l'ADN natif qui seul sera amplifié.

Cela maîtrise en grande partie la dissémination des amplicons pouvant contaminer des échantillons sains, puisque l'UNG inactive jusqu'à 10^5 copies d'ADN amplifié de *Chlamydia trachomatis* (source : Manuel d'Utilisation du test Amplicor™ *C.trachomatis*).

Cette inactivation se déroule juste avant l'amplification, pendant 2 minutes à 50°C, température pour une action optimale de l'UNG. Le cycle d'amplification se termine à 72°C pendant un temps infini, pour que la température ne rechute pas à 50°C, et du coup pour que les produits de l'amplification ne soient pas détruits avant d'avoir été analysés. C'est pour résoudre ce problème que la soude est utilisée immédiatement après la sortie des tubes du thermocycleur : non seulement la soude deshybride les ADN bicaténares et les prépare donc à l'étape d'hybridation avec les sondes, mais en plus la soude neutralise l'UNG et la rend inactive.

L'amplification de R.D.S. cible non pas de l'ADN nucléaire mais de l'ADN plasmidique d'un plasmide cryptique de *C.trachomatis* d'environ 7500 pb, commun à tous les sérotypes. Les deux amorces CP24 et CP27 amplifient une séquence de 207 pb, localisée 195 pb en aval de l'unique site de restriction de l'enzyme BamH1 (Hatt *et al.*, 1988).

Le résultat obtenu dépend directement du nombre de plasmides dans l'échantillon. Celui-ci varie en fonction du moment où se situe le prélèvement dans l'infection (si le chlamydiae a commencé à se multiplier fortement, ou au contraire s'il a été éradiqué par des antibiotiques (d'où des Densités Optiques de positivité allant de 0.25 à >3)) et varie aussi en fonction de la qualité de ce prélèvement : en effet, les médecins qui font les prélèvements dans leurs cabinets ne le font pas systématiquement dans les règles. Ainsi, ils réalisent souvent des prélèvements vaginaux, et non endocervicaux (voire endocervicaux et urétraux, qui est le cas idéal); si cela est suffisant pour détecter bon nombre d'agents infectieux, ce ne l'est pas pour les chlamydiae.

La PCR amplifiant de l'ADN plasmidique, les rares souches de chlamydiae ayant perdu leurs plasmides ne sont pas décelables par cette méthode.

La technique de détection d'Amplicor™ est différente de celle utilisée par International Microbio. Dans cette dernière, ce sont des protéines que l'on recherche ; on applique alors une méthode ELISA, avec des anticorps monoclonaux. Mais ici l'astuce de Roche consiste à lier l'extrémité 5' des deux primer à de la biotine, qui a une extrême affinité avec l'avidine. Cette avidine, liée avec la peroxydase de Raifort constitue le conjugué qui donnera un substrat coloré par l'action coordonnée de la tétraméthylbenzidine et du peroxyde d'hydrogène.

Témoins

Le test Amplicor™ incorpore l'analyse de témoins positifs et négatifs, en parallèle avec l'exploitation des échantillons prélevés sur les malades.

Le témoin positif contient de l'ADN non infectieux du plasmide ciblé, et le témoin négatif est constitué d'ADN non spécifique.

Cela permet de vérifier que l'amplification et la détection se sont bien déroulées, puisque ces témoins ont des valeurs cibles d'absorbance. De plus, on peut visualiser en partie les contaminations, le témoin négatif donnant alors un résultat positif. Cependant, rien ne permet de dire si les échantillons ont été correctement prélevés et préparés.

Pour I.M., le contrôle positif se fait par ajout d'antigène LPS puis du conjugué (immunoglobuline G anti-LPS couplé à la peroxydase) puis du substrat .

Le contrôle négatif est pratiquement identique, seul l'immunoglobuline G ne reconnaissant pas l'antigène LPS.

3. Les résultats

Sensibilité

Toutes les analyses réalisées par le kit Chlamyfast® d'I.M. donnent des résultats négatifs ; l'exploitation des résultats est facile puisque soit le résultat est négatif (pas de coloration), soit le résultat est positif (coloration rouge franche).

Pour la méthode de RDS, c'est plus délicat. En effet, tout échantillon dont la densité optique est comprise entre 0.2 et 0.5 est déclaré douteux. Ceci étant arrivé par 4 fois, des tests en double ont été faits : tous les résultats sont devenus négatifs, passant très souvent sous la barrière de 0.2.

Donc pour la suite de l'étude, les repassages en double n'ont été effectués que sur des échantillons qui dépassaient la barre de 0.25 unité d'absorbance (il a été montré par ailleurs que la zone d'incertitude pouvait être estimée à une fourchette entre 0.5 et 0.8 A (Skulnick *et al.*, 1994)). Ceci est arrivé deux fois, mais par deux fois les échantillons se sont avérés négatifs. Ce semblant de positivité devait être dû à des contaminations ponctuelles.

Dans toute l'étude, aucun Chlamydiae n'a été décelé. Si cela corrobore bien avec les résultats obtenus avant le début du stage avec Chlamyfast, il y va autrement des résultats de la PCR par rapport aux résultats de beaucoup de publications.

Ainsi, sans aller jusqu'aux 25.44% de prévalence retrouvés dans une étude réalisée il y a 5 ans aux Etats-Unis (Loeffelholz *et al.*, 1992) où la maladie est très répandue, de nombreuses études récentes montrent un taux de prévalence qui varie de 3.5% (Khurana *et al.*, 1994) à 11% (Chout *et al.*, 1995), en passant par 6.7% (Veringa *et al.*, 1994) ou 8.2% (deBarbeyrac *et al.*, 1994).

A partir de cette constatation, plusieurs hypothèses peuvent être émises :

- La manipulation de la technique Amplicor est mal faite. Cependant, tous les témoins ayant donné des résultats corrects, le problème ne vient ni de l'amplification, ni de la détection. La partie concernant la préparation des échantillons consiste en une simple dilution de l'échantillon et ne présente aucune difficulté. De plus, cela n'expliquerait pas qu'on ne trouve pas de

positivité avec Chlamyfast.

-

- Les différents moyens de transports autres que celui de Roche ne conviennent pas. Ainsi, l'étude porterait simplement sur 71 tests et non plus sur 95.

L'hypothèse est intéressante, surtout que comme aucun échantillon positif n'a été trouvé, aucune véritable comparaison entre les milieux n'a été faite. Cependant, même si les chlamydiaes sont laissés trop longtemps sur un écouvillon stérile, la mort de ceux-ci ne devrait pas entraîner de problèmes à court terme.

Pour le milieu 2HC c'est encore plus simple, car dans ce milieu les chlamydiaes sont maintenus en vie pendant 24 heures, soit un temps largement nécessaire pour reprendre le tout dans le milieu de transport Roche.

Néanmoins, par soucis de rendre des résultats corrects quand la technique sera installée définitivement, il sera préférable de ne traiter que les échantillons reçus sur le milieu de transport Roche.

- Les prélèvements sont mal faits. Comme il a été dit plus haut, quelques médecins réalisent encore de simples prélèvements vaginaux pour la recherche de chlamydiaes. Mais la majorité des recueils ont été faits normalement, même si ils n'ont pas tous été endocervicaux et urétraux, l'infection pouvant être localisée plus ou moins profondément.
- Il y a présence d'inhibiteurs de la PCR dans les prélèvements. Ceux-ci donneraient inévitablement des faux-négatifs. Ce problème a été étudié récemment (deBarbeyrac et Bébéar, 1997) et il en ressort qu'un échantillon faussement négatif devient généralement positif après un simple cycle de congélation-décongélation ; un même résultat est obtenu en réalisant une dilution supplémentaire du milieu de transport Roche. Cependant, au laboratoire, de nombreux échantillons ont été congelés et décongelés avant traitement.

Parmi les inhibiteurs cités par Roche, outre le talc des gants ou les protéines, on trouve l'hémoglobine qui serait un quelateur. Un problème se pose alors pour l'exploitation des résultats obtenus sur des échantillons recueillis sur des femmes en période de menstruation (11 % des prélèvements contenaient du sang). Pourtant, il a été montré que ce type d'échantillons donne des résultats de densités optiques comparables aux autres échantillons, notamment en ce qui concerne les positifs (Loeffelholz *et al.*, 1992).

- Il n'y a pas de chlamydiaes dans la région dans laquelle se déroule l'étude. C'est le seul point contre lequel on ne puisse rien.

-

C'est cette dernière hypothèse qui semble la plus probable, ainsi que le démontre un rapport d'un réseau de laboratoires d'analyses de biologie médicale : le réseau RENACLA (Réseau national des chlamydiae) (Chauffert *et al.*, 1997). Ce réseau est constitué de 65 laboratoires privés et de 26 laboratoires hospitaliers.

Les résultats sont significatifs : entre 1990 et 1995, il est observé une diminution de 45% du nombre d'identifications de *C.trachomatis* ; dans le même temps, le nombre de recherches n'a baissé que de 9%.

En conclusion, le taux de recherches positives a chuté de 4.9 à 2.9% pendant ces 5 années. Cette baisse est constatée également dans toute l'Europe de l'ouest et les Etats-Unis, alors que les techniques de détection n'ont fait que progresser.

On peut expliquer ces résultats par une prise de conscience de la population dans l'utilisation des préservatifs et une meilleure prise en charge des malades.

De plus, les laboratoires hospitaliers identifient plus de cas en moyenne que les laboratoires privés (29 détections par an contre 15), et le taux de prélèvements positifs est plus élevé quand le prélèvement est effectué à l'hôpital (5.3%) que lorsqu'il est effectué en ville (2.2%) ; ceci rejoint la remarque du problème de la bonne exécution du prélèvement.

En outre, il ne faut pas oublier que la majorité des prélèvements viennent de patients vivant dans le Pays de Bray qui reste une région très rurale, et qui est donc moins confrontée globalement aux maladies sexuellement transmissibles.

Spécificité

En ce qui concerne la spécificité des deux techniques, les résultats semblent encourageants. En effet, sur les 95 personnes prélevées en région génitale de l'étude, 88 étaient infectées ou parasitées par un ou plusieurs des 16 germes répertoriés. Pourtant, ni la méthode PCR ni la méthode *ELISA* n'a détecté ceux-ci et donné des faux-positifs.

Ceci s'explique aisément par le choix des cibles recherchées : la méthode *ELISA* recherche l'antigène LPS spécifique du chlamydiae, tandis que la PCR cible une séquence d'ADN plasmidique exclusive à *Chlamydia trachomatis*.

BIBLIOGRAPHIE

deBarbeyrac B, Bébéar C 1997 Biologie moléculaire appliquée en bactériologie : Actualités et perspectives en biologie praticienne. Dans *Feuillets de biologie* Vol XXXVIII, N°214, pp.53-61

deBarbeyrac B, Pellet I, Dutilh B, Bébéar C, Dumon B, Géniaux M, Bébéar Ch 1994 Evaluation of the Amplicor *Chlamydia trachomatis* test versus culture in genital samples in various prevalence population. *Genitourin. Med.* 70 :162-166

Chauffert O, Laurent E, Sednaoui P, Gouëzel P, Goulet V et les biologistes de RENACLA 1997 Surveillance des infections à *C.trachomatis* par un réseau de laboratoires. http://www.b3e.jussieu.fr/msp/beh/index_97.html sélectionner BEH 15/97

Chout R, Vaton S, Quist D, Bucher R, Leguyader-Desprees P, Sayada C 1995 Improvement of Cervical Detection in Asymptomatic Family Planning Attendees by using Amplicor *Chlamydia trachomatis* Assay. *Cell. Mol. Biol.* 41 :731-736

Hatt C, Ward ME, Clarke IN 1988 Analysis of the entire nucleotide sequence of the cryptic plasmid of *Chlamydia trachomatis* serovar L1. Evidence for involvement in DNA replication. *Nucleic Acids Res.* 16 :4053-4067

Khurana CM, Wojack BR, Weldon-Linne CM, Nowak JA 1994 Comparison of Amplicor PCR and Chlamydiazyme EIA for Detection of *Chlamydia trachomatis* in Endocervical Specimens. *Abstract Présenté au congrès de l'ASM à Las Vegas en Mai 1994*

- Longo MC, Beringer MS, Hartley JL** 1990 Use of uracil DNA glycosylase to control carry-over contamination in polymerase chain reactions. *Gene* 93 :125-128
- Loeffelholz MJ, Lewinski CA, Silver SR, Purohit AP, Herman SA, Buonagurio DA, Dragon EA** 1992 Detection of Chlamydia trachomatis in endocervical specimens by Polymerase Chain Reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 :2847-2851
- Mullis KB, Faloona FA** 1987 Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155 :335-350
- Palmer L, Falkow S** 1986 A common plasmid of Chlamydia trachomatis. *Plasmid.* 16 :52-63
- Peterson EM, DelaMaza LM** 1988 Restriction endonuclease analysis of DNA from Chlamydia trachomatis biovars. *J. Clin. Microbiol.* 26 :625-629
- Quenin P** 1992 Chlamydia. Dans *Manuel de Bactériologie Clinique* (Edité par Freney J, Renaud F, Hansen W, Bollet C) Elsevier, Paris, Vol 2, pp. 1183-1203
- Ridgway GL, Taylor-Robinson D** 1991 Current problems in microbiology :1 chlamydial infections : which laboratory test ? *J. Clin. Pathol.* 44 :1-5
- Skulnick M, Chua R, Simor AE, Low DE, Khosid HE, Fraser S, Lyons E, Legere EA, Kitching DA** 1994 Use of the Polymerase Chain Reaction for the Detection of Chlamydia trachomatis from Endocervical and Urine Specimens in an Asymptomatic Low-Prevalence Population of Women. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 20 :195-201
- Thompson SE, Washington AE** 1983 Epidemiology of sexually transmitted Chlamydia trachomatis infections. *Epidiol. Rev.* 5 :96-123
- Veringa EM, Zuyderwijk MAM, Schellekens H** 1994 Detection of Chlamydia trachomatis in clinical specimens. Comparison of culture, direct antigen detection, DNA probe hybridisation and PCR. *J. Microbiol. Methods* 19 :117-125