

Pipette



Juillet 2009

Les laboratoires du groupe Biolyss: 16 biologistes, 150 collaborateurs

Biolyss

Limoges

- * Nouveau laboratoire: St Lazare* (Clinique Chénieux)
- * Garibaldi
- * Roussillon
- * Carnot-Centre
- * Louis Blanc

Bellac

Guéret

La Souterraine

* Le laboratoire St Lazare est ouvert à tout public (7h30 à 19h). Il assure les urgences 24h/24

Sommaire :

- La coqueluche, quel diagnostic ?
- *Chlamydia trachomatis*, quel diagnostic ?
- Le test de Hühner
- L'importance de la phase préanalytique

L'immunité naturelle ou vaccinale est de durée limitée



La coqueluche: comment faire le diagnostic ?

La coqueluche est une infection respiratoire bactérienne, qui peut être gravissime pour les nouveau-nés et parfois pour les personnes âgées.

Les bactéries responsables sont *Bordetella pertussis* et, dans une moindre mesure *Bordetella parapertussis*. Ce sont les toxines et adhésines qu'elles sécrètent qui sont à l'origine des effets locaux et systémiques observés lors de la maladie tels la destruction de l'épithélium respiratoire cilié et l'hyperlymphocytose.

La vaccination intensive des enfants a permis la diminution de la mortalité et de la morbidité dans la plupart des pays développés. Cependant, on a également constaté que l'immunité (naturelle ou vaccinale) est de durée limitée. On observe à l'heure actuelle dans les populations vaccinées un changement de transmission de la maladie, les adultes contaminant les nourrissons non vaccinés pour qui la maladie peut être mortelle. C'est pourquoi plusieurs pays, dont la France, ont ajouté des rappels vaccinaux pour l'adolescent et l'adulte.

L'expression clinique est variable :

1) chez les sujets non vaccinés : après une incubation de 6 à 20 jours, on assiste à une phase catarrhale (rhinorrhée, éternuements, injection conjonctivale et toux modérée, éventuellement fébricule) de 5 à 10 jours pendant lesquels le sujet est contagieux. La phase paroxystique des quintes y fait suite : la toux se transforme et devient insistante, émétiqante, cyanosante, à prédominance nocturne. Les quintes sont sonores, ressemblent au chant du coq et s'accompagnent souvent d'un vomissement. Elles durent en moyenne 4 à 5 semaines. Elles régressent pendant la phase de convalescence, puis disparaissent. Mais la toux peut durer 2 à 3 mois.

Chez le nourrisson, l'infection est sévère. Les quintes (sans « chant du coq ») sont mal tolérées (cyanose, possibles apnées et bradycardies). Les vomissements peuvent compromettre l'alimentation et provoquer une déshydratation ou une dénutrition.

Des complications peuvent survenir, comme des surinfections bronchopulmonaires chez les nourrissons surtout dans les pays en voie de développement, ou des complications neurologiques (convulsions, rares encéphalopathies, en relation avec l'hypoxie et les poussées hypertensives dues aux accès de toux). Du fait des lésions épithéliales induites, la coqueluche pourrait aussi faire le lit d'une sensibilisation aux allergènes, et induire une maladie asthmatique.

2) Chez les adolescents et adultes anciennement vaccinés ou infectés : puisque la maladie confère une immunité pour une durée de 12 à 15 ans, et la vaccination pour une durée de plus de 6 ans, on observe maintenant des coqueluches chez des sujets dont l'immunité est résiduelle. Les tableaux cliniques sont atténués et variables, de la forme clinique sus-décrite à une courte toux banale, ou plus prolongée, sans la typicité coquelucheuse.



Il faudra évoquer cette étiologie en cas de toux chronique, d'asthme, de RGO, d'enrouement ...

L'hémogramme à la phase paroxystique peut montrer une hyperleucocytose : Celle-ci qui peut atteindre 30 000 / mm³ avec une forte hyperlymphocytose, oriente le diagnostic. Elle peut être absente chez les jeunes enfants.

Le diagnostic direct de l'infection est malaisé : la culture est difficile et peu sensible (milieu de Bordet-Gengou). Des techniques de PCR sont décrites et peuvent être utilisées jusqu'à trois semaines après le début des quintes, mais ne sont pour l'instant pas remboursées, ce qui limite leur emploi.

C'est donc la sérologie, qui permettra fréquemment de faire le diagnostic. Elle nécessite de comparer deux sérums à 3 semaines d'intervalle. La technique utilisée au laboratoire BioLyss est un immunoblot, qui détecte les anticorps contre deux toxines : PT (pertussis toxin) et ACT (adényl cyclase) et la FHA (hémagglutinine filamenteuse). L'infection est confirmée lorsqu'il y a augmentation du taux d'anticorps anti-toxines et FHA entre les deux sérums, ou si des anticorps anti-PT sont détectés chez un sujet non vacciné. Ces anticorps sont synthétisés environ trois semaines après le début de la toux et disparaissent en quelques mois. Par contre, ils persistent jusqu'à 3 ans après une

vaccination, et pourront donc rendre l'interprétation difficile dans ce cas.

Chez le nourrisson de moins de six mois, la présence d'anticorps maternels transmis durant la grossesse et les anticorps vaccinaux imposent souvent la réalisation d'une sérologie maternelle comparative avec éventuellement l'examen des sérums de pré- et post-partum.

Le laboratoire BioLyss réalise cette sérologie chaque jour, le résultat est disponible le surlendemain. Elle est prise en charge par les caisses d'assurance maladie, sa cotation est B 150 soit 40.50 €.

(Référence : Coqueluche, EMC, Maladies infectieuses, N. Guiso et L. Bassinet, 2005)



Chlamydiae et MST: quelles méthodes de diagnostic efficaces ?

Chlamydia : l'épidémie silencieuse.

Les *Chlamydiae* sont des bactéries immobiles, intracellulaires obligatoires.

Elles se présentent sous deux aspects morphologiques :

- Le corps élémentaire (CE) : de petite taille, responsable de l'infectivité.

- Le corps réticulé (CR) : non infectieux mais capable de se multiplier, responsable de la persistance de la bactérie dans l'organisme et ainsi de l'évolution vers des infections chroniques.

Il y a quatre espèces de *Chlamydia* : *Chlamydia trachomatis* (19 sérovars) et *pneumoniae* pathogènes principalement pour l'homme; *Chlamydia pecorum* et *psitacci* pathogènes plus particulièrement pour l'animal.

L'infection à *Chlamydia trachomatis* est considérée comme la pathologie bactérienne sexuellement transmise ayant la prévalence la plus élevée au monde (sérovars de D à K).

Chez l'homme, l'infection à *Chlamydia trachomatis* est la

principale étiologie des urétrites non gonococciques, et une cause majeure d'épididymite aigue.

Chez la femme elle peut être à l'origine de pathologies telles que les cervicites mucopurulentes, les algies pelviennes chroniques, les salpingites aiguës. Si ces infections ne sont pas diagnostiquées, elles peuvent être à l'origine de grossesses extra utérines et de stérilités.

La maladie de Nicolas-Favre ou lymphogranulomatose vénérienne (LGV) est très répandue dans les régions tropicales et sporadique dans les pays industrialisées (sérovars L1, L2, L3).

Chez le nouveau né, *Chlamydia trachomatis* peut être transmise lors du passage dans la filière génitale infectée entraînant alors une conjonctivite à inclusions ou une pneumopathie.

Chez l'adulte, des conjonctivites à inclusions sont dues à des souches génitales de *Chlamydia*. Le trachome est la

forme la plus répandue dans les pays en voie de développement. Il s'agit d'une kérato-conjonctivite chronique d'origine immunitaire aboutissant à une cécité à terme (sérovars A, B, C).

L'une des raisons de l'importante prévalence des infections à *Chlamydia* est qu'il s'agit d'une pathologie occulte : 50 à 60% des formes cliniques sont asymptomatiques (rapport ANAES août 2006).

D'autre part, le diagnostic biologique est délicat: un examen faussement positif peut conduire à des décisions inappropriées. A l'inverse, un résultat faussement négatif peut être à l'origine d'atteintes irréversibles en particulier chez la femme (stérilité) et chroniques (manifestations articulaires).

Ainsi le meilleur moyen de maîtriser l'épidémie de *Chlamydia* et ses conséquences est de pouvoir diagnostiquer l'infection au moment opportun, par un examen le plus sensible et le plus spécifique possible.

De nombreuses formes sont asymptomatiques

Comment diagnostiquer une infection à *Chlamydia trachomatis* ?

La recherche des anticorps : le diagnostic indirect :

Le diagnostic indirect repose sur des méthodes sérologiques qui permettent la mise en évidence des anticorps circulants.

L'immunofluorescence, technique de référence, permet la détection et le titrage des anticorps de la classe des IgG, IgM, IgA (signes d'une infection récente active) dirigés contre les antigènes de *Chlamydia trachomatis*.

L'intérêt du sérodiagnostic est limité par la variabilité des réponses d'un individu à l'autre, la faible réponse anticorps dans les infections génitales basses, l'existence de réactions croisées inter espèces et la persistance parfois très longue des anticorps après une infection. Cependant, l'ascension d'un titre d'anticorps d'au moins deux dilutions entre deux prélèvements peut s'observer et est dans ce cas fortement évocatrice d'une infection profonde active. (Acte remboursé: Cotation B60 ou B90 si reprise du sérum antérieur)

Le diagnostic direct :

Le diagnostic direct des infections urogénitales à *Chlamydia trachomatis* repose :

- soit sur la recherche des corps bactériens (inclusions cellulaires) après culture cellulaire. C'est la technique de référence ; de grande spécificité (quasi 100%) elle est de mise en œuvre lourde et est inadaptée à certains prélèvements en particulier le sperme, et les urines.

- soit sur la détection des antigènes bactériens par immunofluorescence directe ou par immunoenzymologie: de réalisation pratique simple au détriment de la spécificité, voire de la sensibilité.

- soit enfin sur la détection du génome bactérien par les méthodes de biologie moléculaire. Parmi celles-ci : la technique

de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est standardisée, de mise en œuvre simple, d'une spécificité élevée, et d'une sensibilité supérieure à la culture cellulaire .

La PCR est une méthode d'amplification génique. Inspirée de la réplication naturelle du matériel génétique, elle est capable d'identifier et d'amplifier une séquence d'ADN spécifique. Cette technique permet ainsi un diagnostic direct, d'une grande sensibilité d'agents infectieux tel que les *Chlamydia* : c'est la technique que le groupe Biolys a choisie .

Comment prescrire la recherche Directe de *Chlamydia* ?

La recherche de *Chlamydia* doit être explicitement prescrite dans le cas des conjonctivites, des urétrites, des prélèvements coelioscopiques, des spermés ou stérilets : la mention « recherche de *Chlamydia* » doit être indiquée, afin qu'elle soit effectuée par le laboratoire (acte remboursé : Cotation B 100). Pour les prélèvements chez la femme, la recherche de *Chlamydia* peut être effectuée à l'initiative du biologiste (acte remboursé: Cotation B 60).

Quels prélèvements pour rechercher les *Chlamydia* ?

Chez l'homme :

- Urétral,
- Sperme
- Urine (premier jet urinaire)

Chez la femme :

- Endocervical, et urétral, l'association des deux augmentant la sensibilité de 25%.
- Stérilet,
- Urine (premier jet urinaire).

La qualité du prélèvement est capitale ; il devra être riche en cellules pour sensibiliser la recherche.

Les échantillons sont prélevés par écouvillonnage , à l'aide d'un kit de prélèvement spécifique (Micro Test M4RT) , qui comprend un tube conique fermé et stérile contenant 3

ml de milieu de transport avec des billes de verre, un écouvillon tige plastique (femme) et un écouvillon tige inox (homme).

Les modalités de prélèvement sont à respecter. D'une façon générale, les prélèvements devront être effectués à distance de tout traitement antibiotique (au moins quinze jours) ; pour les prélèvements urétraux et urinaires : le patient ne doit pas uriner dans les deux heures précédant l'analyse ; dans tous les cas le prélèvement doit être acheminé le plus rapidement possible au laboratoire.

La recherche de *Chlamydia* même chez les patients asymptomatiques, permet un diagnostic et un traitement précoce avant que des complications sévères ne puissent se développer.

Les protocoles d'antibiothérapie sont adaptés en fonction des germes associés, de l'importance des lésions. Le traitement de première intention du patient et de son (sa) partenaire est l'azithromycine monodose (efficace dans 95% des cas) ou les cyclines pendant une semaine.

La recherche de *Chlamydia* par biologie moléculaire est effectuée au sein du Groupe Biolys: le délai maximum de rendu du résultat est de 72 heures.

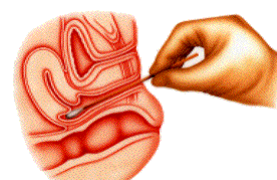
Les dispositifs de prélèvement et de transport sont disponibles ; toutefois il est préférable que les prélèvements endocervicaux et urétraux, ainsi que le recueil de sperme soient effectués au laboratoire.

Les sérologies *Chlamydiae* sont réalisées sur sérum 3 fois par semaine; il n'est pas utile que le patient soit à jeun.

De plus, le laboratoire Biolys participe au réseau RENACHLA : celui-ci a pour objectif d'estimer les tendances évolutives des chlamydioses urogénitales en France et d'en recenser les caractéristiques épidémiologiques.



La PCR est une des meilleures techniques pour le diagnostic direct



**BULLETIN
D'INFORMATION
BIOLOGIQUE DES
LABORATOIRES DU
GROUPE BIOLYSS**

Comité de rédaction:

Corinne Aupetit
(c.aupetit@biolyss.fr)

Jean-Michel Filloux
(jm.filloux@biolyss.fr)

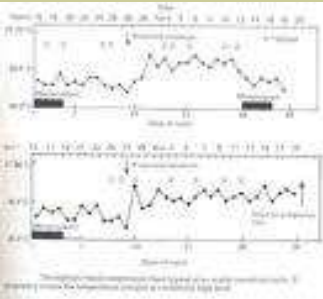
Sylvie Maach-Barbarie
(s.maach@biolyss.fr)

Lionel Morelet
(l.morelet@biolyss.fr)

Thierry Ménard
(t.menard@biolyss.fr)

Eric Sevin
(e.sevin@biolyss.fr)

Et les autres biologistes de Biolyss



Le test de Hühner

Après deux ans d'infertilité, le test de Hühner (ou test post-coïtal) est un des premiers tests d'exploration mis en œuvre : rapide et non invasif, il renseigne le clinicien sur la qualité de la glaire cervicale et la présence de spermatozoïdes au lendemain d'un rapport.

Ce test se pratique 24 à 48 heures avant la période supposée d'ovulation, le matin sur rendez-vous auprès d'un biologiste du groupe Biolyss. La date est évaluée grâce à une courbe de température : ovulation au dernier point bas (nadir) avant l'élévation thermique.

Le rapport sexuel a lieu la veille au soir, 9 à 12 heures avant le test, après 48h d'abstinence.

Les patientes sont soit en cycle « spontané », soit sous stimulation (Citrates de clomifène, Gonadotrophines), voire déclenchées la veille ou avant-veille (HCG, LH recombinante).

La patiente est placée en posi-

tion gynécologique. Après pose d'un spéculum, le col est mouché pour ôter toute contamination par des sécrétions acides vaginales. La glaire endo-cervicale est recueillie grâce à une pipette spéciale (de type « Aspiglaire »).

La bécane du col est quantifiée (de 1 à 3), tout comme la quantité de glaire recueillie, sa filance. Ces trois critères, ainsi que de l'étude de la cristallisation (idéalement en « fougère »), définissent le score d'Insler (/12). Une glaire de bonne qualité est limpide et transparente, elle ne doit pas être cellulaire ; la présence de leucocytes évoquerait une infection. Le pH de la glaire doit être alcalin, l'acidité étant nocive pour les spermatozoïdes.

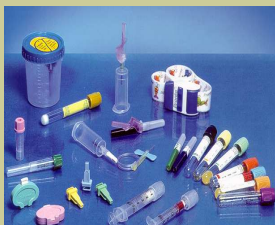
Enfin, l'observation de la glaire au grossissement x400 permet de déceler la présence de spermatozoïdes.

Un test est « positif » si au moins 6 spermatozoïdes féconds « a » sont observés par champ. La glaire a alors rempli

son rôle d'activation et de « capacitation » des spermatozoïdes.

Attention, un test n'est fiable que si la glaire est correctement sécrétée, ce qui implique de le réitérer si nécessaire, ou d'optimiser la glaire par traitement hormonal. Ce test ne dispense aucunement du spermogramme, porteur d'informations précieuses, notamment sur la morphologie des spermatozoïdes.

Devant une négativité persistante de ce test, malgré une glaire bien sécrétée et un spermogramme normal, un test de pénétration croisée peut préciser la responsabilité respective de la glaire et du sperme. Enfin, une infertilité d'origine « cervicale » est l'indication idéale pour réaliser des Inséminations Intra-Utérine. Le test est coté B45 (18.72 euros), réitéré à chaque venue si nécessaire. Il est remboursé par la sécurité sociale



La phase préanalytique: une étape primordiale !

La réalisation d'analyses médicales n'est fiable que si l'étape pré-analytique est correctement accomplie. Elle nécessite un partenariat étroit entre préleveurs et biologistes, pour une Qualité optimale des résultats. C'est pourquoi une communication constante entre les deux équipes est indispensable, quotidiennement par écrit (fiche de suivi présente dans les boîtes), ou par oral dès que cela s'avère nécessaire.

Certains prélèvements doivent être effectués à jeun (glycémie, bilan lipidique...) ou en début de cycle (FSH, prolactine...). Les dosages de médicament se font le matin avant la prise habituelle du traitement, les surveillances AVK (INR) indiquent nom du médicament, posologie et indication du traitement...Les

dosage de B-HCG sont accompagnés de la date des dernières règles...Tous ces renseignements précieux aident à l'interprétation des résultats.

Les tubes, choisis de manière adaptée, sont totalement remplis (surtout pour la coagulation). Ils sont parfaitement identifiés. Ceci relève de la responsabilité du préleveur : soit en utilisant les planches d'étiquettes (en vérifiant systématiquement les identités !!...surtout chez les couples !) soit en écrivant manuellement toute l'identité (ATTENTION pour les analyses d'immuno-hématologie : groupes, RAI, cross-match, anti-D restants...). l'identité du patient doit être MANUSCRITE directement sur les tubes (nom + prénom + date de naissance + nom de jeune

filie.); ainsi la carte de groupe sanguin sera vérifiée directement avec le prélèvement, avant d'être délivrée.

Bien sûr, tous les prélèvements sont conservés à température adéquate (dans une glacière) et transmis le jour même. Enfin, il est indispensable de nous signaler la date et l'heure du prélèvement, ainsi que les coordonnées du préleveur, ce qui permet au laboratoire de le contacter rapidement si nécessaire.

Les huit Laboratoires du Groupe Biolyss restent à votre entière écoute pour vous renseigner sur un prélèvement, un délai de rendu, un résultat : ensemble notre mission est d'aider nos patients, de manière rapide et fiable, en toute transparence.

