

21 • Mycoplasmes

Plan du chapitre

- 1• Contextes
- 2• Objectifs
- 3• Prélèvements
- 4• Transport
- 5• Coloration
- 6• Culture
- 7• Techniques rapides
- 8• Sérologie
- 9• Sensibilité aux antibiotiques

1 • Contextes

↳ *Mycoplasma pneumoniae*

- Infections respiratoires : trachéobronchites, pneumonies atypiques
- Infections extra-respiratoires exceptionnellement : cutanées, articulaires, neurologiques, génitales, péricardiques

↳ Mycoplasmes génitaux (Tableau 1)

- Urétrites non gonococciques (UNG), épидидymites
- Infections gynécologiques : vaginoses, endométrites, salpingites

- Infections liées à la grossesse : chorioamniotites, bactériémies post-partum ou post-abortum
- Infections néonatales (nouveau-nés fortement hypotrophiques)
- Bilan avant fécondation *in vitro*
- Infections extra-génitales surtout chez l'immunodéprimé (arthrites chez l'hypogammaglobulinémique)

↳ Contaminations de cultures cellulaires

2 • Objectifs

↳ Les recherches de mycoplasmes ont pour objectif :

- la distinction de la présence en situation de pathogénicité d'une simple présence à l'état commensal (mycoplasmes génitaux)
- l'étude de la sensibilité aux antibiotiques (mycoplasmes génitaux)

↳ Les méthodes utilisées varient selon les espèces recherchées :

- Le diagnostic biologique d'une infection à *M. pneumoniae* est plus souvent réalisé par la

Tableau 1 : Rôle de *M. hominis* et *U. urealyticum* dans les infections génitales

	<i>M. hominis</i>	<i>U. urealyticum</i>
Infections masculines		
urétrites	-	+
épididymites	-	+
Infections féminines		
syndromes urétraux	-	±
vaginoses	±	-
cervicites	-	-
endométrites	+	+
salpingites	+	±
Troubles de la reproduction		
stérilités	±	
	séquelles de salpingites	?
chorioamniotites	+	+
poussées fébriles post-partum/abortum	+	+
Infections néonatales	+	+

+ : rôle prouvé

± : association mais rôle non prouvé

- : pas d'association

sérologie que par la culture ou la PCR. Ces dernières ont cependant l'avantage d'affirmer le caractère actuel de l'infection.

- Seule la culture est réalisée couramment pour les mycoplasmes génitaux, *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*.
- La recherche d'autres espèces potentiellement pathogènes pour l'homme est rarement réalisée. Seule la PCR est adaptée à la recherche de *Mycoplasma genitalium*, agent d'urétrite non gonococcique (UNG). La mise en évidence de *Mycoplasma fermentans* et *Mycoplasma penetrans* ne se conçoit que dans un objectif de recherche et non de diagnostic courant.
- La recherche de mycoplasmes contaminant des cultures cellulaires se fait en associant plusieurs techniques de détection.

3 • Prélèvements

Quelle que soit la méthode de prélèvement, elle doit ramener des cellules auxquelles les mycoplasmes adhèrent.

- ◆ Pour les infections respiratoires, la recherche des mycoplasmes dans les expectorations est à déconseiller en raison de leur contamination par de nombreuses bactéries. Des prélèvements de gorge ou, chez le jeune enfant, des aspirations nasopharyngées peuvent être utilisés en raison du caractère diffus de l'infection. Lavages bronchoalvéolaires ou brossages endobronchiques peuvent également être pratiqués.
- ◆ Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de prélèvements urétraux, 1^{er} jet d'urines, sperme, prélèvements cervico-vaginaux ou endométriaux, brossages tubaires, liquide amniotique, placenta, prélèvements endotrachéaux chez le nouveau-né.
- ◆ D'autres échantillons peuvent être étudiés : LCR, biopsies ou liquides synoviaux, prélèvements cutanéomuqueux. Les milieux classiques pour hémocultures contiennent des anticoagulants qui ont un effet inhibiteur sur les mycoplasmes. Il est donc recommandé d'ensemencer directement le sang sur des milieux pour mycoplasmes.

4 • Transport

- ◆ Les mycoplasmes étant très sensibles à la dessiccation, il faut utiliser des milieux de transport. Le milieu saccharose-phosphate (2 SP) enrichi de

5% de sérum de veau foetal, sans antibiotique, convient à la fois au transport des prélèvements pour recherche de mycoplasmes et *Chlamydia*. Ce milieu peut être utilisé pour la mise en culture et pour la PCR.

- ◆ La mise en culture doit se faire sans délai. Les échantillons peuvent être gardés à +4°C pendant 48 heures au plus, et au delà à -70°C.

5 • Coloration

Les mycoplasmes dépourvus de paroi, ne sont pas colorés par la méthode de Gram. La coloration d'ADN par un fluorochrome peut être utilisée pour la mise en évidence de mycoplasmes contaminant les cultures cellulaires.

6 • Culture

Elle est relativement simple pour *U. urealyticum* et *M. hominis*, plus délicate pour *M. pneumoniae*, très fastidieuse pour les autres espèces potentiellement pathogènes.

1- Les milieux de culture

Ils sont complexes, rendus sélectifs par addition d'une bêtalactamine ou parfois de polymyxine. Il n'y a pas de milieu standard convenant à toutes les espèces, en raison de leurs exigences différentes en substrat, pH.

- ◆ Pour *M. pneumoniae*, on peut utiliser le milieu de Hayflick modifié renfermant 20% de sérum de poulain ou le milieu SP-4 plus complexe, renfermant du sérum de veau foetal. Les milieux liquides, à pH 7,5, renferment du glucose et du rouge de phénol.
- ◆ *M. hominis* croit sur les mêmes milieux renfermant de l'arginine à la place du glucose, et à pH 7,2. Il peut occasionnellement croître sur gélose au sang, donnant de très petites colonies ainsi que sur les milieux utilisés pour *U. urealyticum*.
- ◆ *U. urealyticum* se développe sur milieu de Shepard à pH 6,0 renfermant de l'urée.

2- Détection de la croissance

- ◆ En milieux liquides, elle se fait d'après le virage d'indicateurs colorés (acidification en 6 à 20 jours pour *M. pneumoniae*, alcalinisation pour *M. hominis* et *U. urealyticum* en 18 à 48 h).
- ◆ Sur les milieux gélosés, l'apparition de colonies doit être recherchée à la loupe binoculaire. Leur

aspect est variable, granulaire pour *M. pneumo-niae*, en œuf sur le plat pour *M. hominis*, irrégulier et très petit pour *U. urealyticum*. Ces dernières sont colorées en brun sur milieux contenant du sulfate de manganèse ou du chlorure de calcium, ce qui permet de les distinguer de simples irrégularités dans la gélose.

3- Identification

- ◆ Elle se fait d'après les propriétés métaboliques (tableau 2) : fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine et de l'urée. *M. pneumoniae* est le seul mycoplasme respiratoire capable d'hémasorber ou d'héماغglutiner les hématies de cobaye.
- ◆ L'identification antigénique est rarement faite. L'amplification par PCR est une excellente méthode d'identification à partir d'une culture pour *M. pneumoniae*.
- ◆ La séparation de deux groupes chez *M. pneumoniae*, d'après la structure de l'adhésine, a un intérêt épidémiologique. Deux biovars sont décrits chez *U. urealyticum*, la signification de cette séparation n'est pas connue.
- ◆ Différents kits existent pour la détection et la quantification d'*U. urealyticum* et de *M. hominis* à partir des prélèvements génitaux. Ils donnent

des résultats satisfaisants à la condition de vérifier l'aspect des colonies sur gélose. Des milieux de transports adaptés sont fournis avec ces kits.

4- Interprétation

- ◆ L'isolement de *M. pneumoniae* chez un patient est un élément significatif car a priori il n'appartient pas à la flore commensale, à l'exception peut-être des périodes épidémiques.
- ◆ La mise en évidence d'*U. urealyticum* ou de *M. hominis* à partir de prélèvements normalement stériles est significative.
- ◆ Leur isolement à partir de prélèvements où ils peuvent être présents à l'état commensal (prélèvements urétraux, cervico-vaginaux, urines, prélèvements périphériques du nouveau-né) est difficile à interpréter. Une évaluation quantitative est réalisée. Elle s'exprime en unité de changement de couleur (ucc).
- ◆ Chez l'homme, *U. urealyticum* serait responsable de 15 à 20% des UNG. Les critères proposés sont : 10^4 ucc/ml pour un prélèvement urétral, 10^3 ucc/ml pour le 1^{er} jet d'urines.
- ◆ Chez la femme, la présence de *U. urealyticum* dans un prélèvement cervico-vaginal est difficile à interpréter en raison de sa fréquence naturelle (près de 50% des femmes). *M. hominis* est

Tableau 2 : Principales propriétés des mycoplasmes isolés chez l'homme

Site/espèces	Pouvoir pathogène	Fréquence d'isolement par culture	Métabolisme		
			Glucose	Arginine	Urée
Voies respiratoires					
<i>M. pneumoniae</i>	+	rare	+	-	-
<i>M. salivarium</i>	-	fréquent	-	+	-
<i>M. orale</i>	-	fréquent	-	+	-
<i>M. buccale</i>	-	rare	-	+	-
<i>M. faucium</i>	-	rare	-	+	-
<i>M. lipophilum</i>	-	rare	-	+	-
<i>A. laidlawii</i>	-	très rare	+	-	-
Voies génitales					
<i>U. urealyticum</i>	+	fréquent	-	-	+
<i>M. hominis</i>	+	fréquent	-	+	-
<i>M. genitalium</i>	+	très rare	+	-	-
<i>M. fermentans</i>	?	très rare	+	+	-
<i>M. penetrans</i>	?	très rare	+	+	-
<i>M. spermatophilum</i>	?	très rare	-	+	-
<i>M. primum</i>	-	rare	-	+	-
Autre site					
<i>M. pirum</i>	?	très rare	+	+	-

retrouvé plus rarement (10% des femmes) et en quantité moindre. Il peut être présent en grande quantité (10^4 ucc/ml) dans les vaginoses bactériennes. Sa présence en quantité élevée peut également évoquer une infection des voies génitales hautes.

- ◆ La présence de mycoplasmes dans des prélèvements périphériques du nouveau-né peut être due à une simple contamination. L'isolement à partir de prélèvements endotrachéaux, en quantité élevée, a plus de signification.

7 • Techniques rapides

- ◆ Des méthodes de détection antigénique ont été proposées pour *M. pneumoniae*. Elles manquent de sensibilité.
- ◆ La méthode la plus intéressante est l'amplification génique par PCR. Différents systèmes ont été proposés pour *M. pneumoniae* (gène de l'adhésine, gène codant l'ARN 16S). Ils permettent une détection très sensible (10 à 100 micro-organismes) et spécifique. Il n'existe malheureusement pas de kit prêt à l'emploi. La PCR est pratiquement la seule technique utilisable pour *M. genitalium*, et reste la meilleure méthode pour la détection de *M. fermentans* et de *M. penetrans*. Elle est potentiellement intéressante pour la détection d'*U. urealyticum* et de *M. hominis* à partir de prélèvements où ces organismes sont peu viables (liquide articulaire) ainsi que pour la détection des mycoplasmes contaminant les cultures cellulaires.

8 • Sérologie

- ◆ En raison de sa simplicité, c'est la méthode la plus souvent utilisée pour le diagnostic d'une infection à *M. pneumoniae*. Elle ne permet souvent qu'un diagnostic rétrospectif. La présence d'agglutinines froides (1/64) n'est ni constante ni spécifique. La réaction de fixation du complément détecte des anticorps dirigés contre un antigène glycolipidique. Une séroconversion, une élévation de 4 fois le titre ou un titre 1/64 sont généralement significatifs. Néanmoins elle n'est

pas très sensible et des réactions croisées sont décrites au cours d'atteintes neurologiques ou pancréatiques. D'autres techniques sont disponibles, agglutination de particules de latex sensibilisées, micro-immunofluorescence ou surtout ELISA permettant aussi la détection d'IgM. Ces techniques sont probablement plus sensibles que la fixation du complément. Néanmoins leur spécificité n'est pas toujours parfaite, sans oublier la possibilité de réactions croisées avec *M. genitalium*.

- ◆ Les sérologies ne sont pas recommandées pour le diagnostic des infections à mycoplasmes génitales.

9 • Sensibilité aux antibiotiques

- ◆ Les mycoplasmes ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques (bêtalactamines, rifampicine, polymyxine). Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés.
- ◆ La sensibilité naturelle aux macrolides et apparentés est dissociée dans certaines espèces. *M. hominis* résiste à l'érythromycine mais pas aux macrolides ayant un noyau à 16 atomes, *U. urealyticum* résiste à la lincomycine.
- ◆ La sensibilité aux antibiotiques de *M. pneumoniae* est exceptionnellement recherchée. De très rares cas de résistance aux macrolides ont été décrits.
- ◆ La sensibilité des mycoplasmes génitaux, *U. urealyticum* et *M. hominis* doit être étudiée lorsque l'on estime qu'ils sont en situation pathogène. Des résistances acquises ont été décrites pour les tétracyclines, dues à la présence du gène *tetM*, pour les macrolides et très récemment pour les fluoroquinolones. Des réactifs commercialisés permettent d'étudier simplement cette activité. Il est recommandé de les utiliser à partir de micro-organismes isolés et non directement à partir d'un prélèvement.

