

Mycoplasma spp.

Cécile Bébéar*, Sabine Pereyre*
Roland Quentin

1. CONTEXTE

Les mycoplasmes peuvent être responsables d'infections respiratoires et génitales. Des complications obstétricales, néonatales et extra-génitales ont été décrites.

1.1. *Mycoplasma pneumoniae*

M. pneumoniae est responsable :

- principalement d'infections respiratoires, trachéo-bronchites le plus souvent et pneumonies atypiques ;
- de manifestations extra-respiratoires plus rarement : cutanées, neurologiques, ORL, articulaires, hématologiques, génitales, péricardiques, pancréatiques, digestives ou rénales.

1.2. Mycoplasmes génitaux

Mycoplasma genitalium, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma* spp. (regroupant les espèces *U. urealyticum* et *U. parvum*) sont associés à plusieurs pathologies (Tableau I).

- Infections masculines : urétrite non gonococcique (UNG) essentiellement, épидidymite, prostatite beaucoup plus rarement ;
- Infections gynécologiques : vaginose bactérienne (*M. hominis*), cervicite, endométrite, salpingite ;
- Troubles de la reproduction : chorio-amnionite, bactériémie du *post-partum* ou du *post abortum*, prématurité ;
- Infections néonatales surtout chez les nouveau-nés hypotrophes ;
- Infections extra-génitales, surtout chez le patient immunodéprimé (arthrites chez le patient hypo-gamma-globulinémique).

2. OBJECTIFS

Les recherches de mycoplasmes ont pour objectif :

- leur mise en évidence dans un contexte pathologique en tenant compte de la présence possible de certaines espèces à l'état commensal (*Ureaplasma* spp. et *M. hominis*) ;
- l'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour les mycoplasmes génitaux (*Ureaplasma* spp. et *M. hominis*).

3. PRELEVEMENTS - TRANSPORT

3.1. Prélèvements

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

3.1.1. Infections respiratoires

3.1.1.1. Prélèvements pour diagnostic direct

- Des écouvillonnages de gorge ou, chez le jeune enfant, des aspirations nasopharyngées peuvent être utilisés en raison du caractère diffus de l'infection. Les lavages broncho-alvéolaires peuvent également être pratiqués.
- La recherche des mycoplasmes dans les expectorations ou les sécrétions trachéales est à déconseiller en raison de leur contamination par de nombreuses bactéries et de la présence potentielle d'inhibiteurs de PCR.

3.1.1.2. Prélèvements pour diagnostic indirect

Un premier sérum est prélevé sur tube sans anticoagulant dès l'apparition des signes cliniques ou au moment du diagnostic, suivi d'un deuxième prélèvement 2 à 3 semaines plus tard pour mettre en évidence une séroconversion ou une augmentation significative des titres d'anticorps.

Tableau I. Importance du rôle des mycoplasmes génitaux selon le tableau clinique.

Pathologies	<i>M. genitalium</i>	<i>Ureaplasma</i> spp. ^a	<i>M. hominis</i>
<i>Infections génitales masculines</i>			
UNG ^b	+	+	-
Epididymites, prostatites	±	±	-
<i>Infections gynécologiques</i>			
Vaginose bactérienne	±	-	+
Cervicites	+	-	-
Endométrites	+	-	+
Salpingites	+	-	+
<i>Troubles de la reproduction</i>			
Chorioamniotites	?	+	±
Fièvres, endométrites post-partum	?	+	+
Avortement spontané	?	±	±
Prématurité	?	+	-
Retard de croissance intra-utérin	?	±	-
<i>Atteintes néonatales</i>			
Hypotrophie	?	+	-
Infections respiratoires, neurologiques, bactériémies, abcès	?	+	+
Dysplasie broncho-pulmonaire	?	±	-
<i>Infections extra-génitales</i>			
Arthrites septiques	+	+	+
Arthrites réactionnelles	+	+	-
Autres localisations (surinfection de plaies sternales, septicémies, abcès rétro-péritonéaux, abcès du cerveau)	?	+	+

+ : association certaine ou rôle causal démontré

± : association incertaine

- : pas d'association connue

? : rôle inconnu, non déterminé

^a comprend 2 espèces, *U. urealyticum* et *U. parvum*.

^b UNG, urétrite non gonococcique

3.1.2. Infections génitales et néonatales

3.1.2.1. Prélèvements pour diagnostic direct

- Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de prélèvements urétraux, 1^{er} jet d'urine, sperme, sécrétions prostatiques, prélèvements vaginaux, cervico-vaginaux ou endométriaux, brossages tubaires, liquide de Douglas, liquide amniotique, placenta et prélèvements endo-trachéaux, aspirations naso-pharyngées, écouvillonnages naso-pharyngés ou liquide gastrique chez le nouveau-né.

- Exceptionnellement, d'autres échantillons peuvent être étudiés : LCR ou tout autre liquide de ponction, biopsies ou liquides synoviaux, prélèvements cutanéomuqueux, par exemple. 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 adaptés à la culture des mycoplasmes.

3.1.2.2. Sérodiagnostic

Il ne doit jamais être réalisé pour les infections génitales.

3.2. Transport

- Les mycoplasmes étant très sensibles à la dessiccation, il faut utiliser des milieux de transport adaptés. Le milieu saccharose-phosphate (2 SP) enrichi de 5% de sérum de veau fœtal, sans antibiotique ou le milieu UTM (milieu de transport universel), conviennent au transport des échantillons pour la recherche à la fois de mycoplasmes et de *Chlamydia*. Ces milieux peuvent être utilisés pour la mise en culture et pour la PCR.
- La mise en culture doit se faire sans délai. Les échantillons peuvent cependant être gardés à une température comprise entre + 2°C et + 8°C pendant 48 h au plus et, au-delà, à – 80°C environ.

4. METHODES

4.1. Culture

4.1.1. Mycoplasmes respiratoires

La culture est fastidieuse pour *M. pneumoniae* et n'est pas réalisée en pratique courante.

4.1.2. Mycoplasmes génitaux

La culture est relativement simple pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*. Pour *M. genitalium*, elle est exceptionnelle et non réalisée en pratique courante.

4.1.2.1. Les milieux de culture

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

- *M. hominis* croît sur le milieu de Hayflick modifié renfermant 20% de sérum de poulain ou le milieu SP-4 (commercialisé) plus complexe, renfermant du sérum de veau fœtal. Les milieux liquides, à pH 7,0-7,2, renferment de l'arginine et du rouge de phénol.

- *M. hominis* peut occasionnellement croître sur gélose au sang, donnant de très petites colonies ainsi que sur les milieux utilisés pour *Ureaplasma* spp.
- *Ureaplasma* spp. se développe sur milieu de Shepard à pH 6,0 renfermant de l'urée.
- Pour *M. pneumoniae*, espèce fastidieuse, le milieu SP-4 enrichi en glucose est le plus adapté. Un passage prolongé en culture de cellules est indispensable à l'isolement de *M. genitalium*.

4.1.2.2. Détection de la croissance

- En milieu liquide, elle se fait d'après le virage d'indicateurs colorés (alcalinisation pour *M. hominis* et *Ureaplasma* spp. en 18 h à 48 h). Elle s'exprime en unité de changement de couleur (UCC) par ml.
- Sur milieu gélosé, l'apparition de colonies doit être recherchée à la loupe binoculaire. Leur aspect est variable, en œuf sur le plat pour *M. hominis*, irrégulier et très petit pour *Ureaplasma* spp. 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.

4.1.2.3. Identification

- Elle se fait d'après les propriétés métaboliques et l'aspect des colonies : fermentation du glucose, hydrolyse de l'arginine et de l'urée.
- Différentes trousse commerciales existent pour la détection et la quantification de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* à partir des prélèvements génitaux. Des milieux de transports adaptés sont fournis avec ces trousse. Elles donnent globalement des résultats comparables aux méthodes standard de culture en milieu liquide ou gélosé, les rendant très utiles pour les laboratoires qui ne réalisent qu'occasionnellement le diagnostic des mycoplasmes urogénitaux. Des faux positifs sont décrits en cas de contamination du prélèvement par d'autres bactéries, conduisant à recom-

mander, en cas de doute, la vérification du résultat par culture en milieu gélosé.

4.2. Amplification génique

4.2.1. *Mycoplasma pneumoniae*

- Différentes cibles ont été proposées pour l'amplification génique par PCR conventionnelle ou en temps réel pour *M. pneumoniae* (gènes de l'adhésine P1, de l'ARNr 16S, de la toxine CARDS). Il existe plusieurs trousse commercialisées, de PCR monoplex ou multiplex détectant, par exemple, *M. pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, *Legionella pneumophila* et des virus respiratoires.

4.2.2. Mycoplasmes génitaux

- *M. genitalium* ne peut être détecté que par amplification génique. Il existe des trousse commercialisées de PCR monoplex ou multiplex pouvant détecter aussi par exemple *Chlamydia trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae*.
- Des PCR dites « maison » ont été développées pour détecter et différencier les deux espèces de *Ureaplasma* et *M. hominis*. Des trousse commercialisées monoplex ou multiplex sont aussi disponibles et d'intérêt, en particulier pour l'examen des prélèvements utéro-annexiels effectués lors des infections génitales hautes ou pour des prélèvements extra-génitaux.

4.3. Autres techniques

Des méthodes de détection antigénique par différentes techniques ont été proposées pour *M. pneumoniae*. Elles manquent de sensibilité et ne sont pas recommandées.

4.4. Diagnostic sérologique des infections à *M. pneumoniae*

Deux techniques sont essentiellement utilisées, la réaction de fixation du complément et les techniques immuno-enzymatiques.

4.4.1. Fixation du complément

Ce test utilise un extrait glyco-lipidique de *M. pneumoniae* ou l'organisme entier. Cette

technique détecte sans distinction les IgM et les IgG. Des réactions croisées sont observées avec d'autres micro-organismes, notamment *M. genitalium* et des réactions non spécifiques sont observées au cours d'atteintes neurologiques ou pancréatiques, à des titres habituellement plus faibles.

4.4.2. Techniques immuno-enzymatiques (ELISA)

Ces tests détectent les IgM et les IgG séparément. L'ELISA est généralement plus sensible et plus spécifique que les autres techniques. Cependant le titre-seuil est variable selon les trousse et toutes les trousse ne sont pas équivalentes en termes de sensibilité et de spécificité.

Il existe des tests ELISA rapides détectant sur membrane les IgM seules, d'autres détectant simultanément les IgM et IgG. Ces trousse ont une sensibilité et une spécificité similaires aux autres trousse ELISA et offrent une grande rapidité d'exécution. Ils peuvent présenter un intérêt pour la détection des IgM chez l'enfant lorsque seul un sérum précoce est disponible.

5. INTERPRETATION

5.1. Infections respiratoires

Le diagnostic peut être affirmé :

- soit par la mise en évidence de *M. pneumoniae* par PCR chez un patient : *M. pneumoniae* n'appartient pas à la flore commensale et sa présence est pathologique, à l'exception des périodes épidémiques où une colonisation par *M. pneumoniae* a été décrite. La PCR présente l'avantage de se positiver dès la première semaine de l'infection. Elle peut ensuite rester positive quelques semaines malgré un traitement antibiotique efficace.
- Soit par sérodiagnostic :

Après la primo-infection, les anticorps apparaissent après 7 à 10 jours, atteignent un pic à 3 à 6 semaines, puis leurs taux diminuent en quelques mois, voire un an. L'infection aiguë est confirmée par la présence d'IgM ou en leur absence par une augmentation significative du titre des IgG entre les deux prélèvements. Les

IgM ne sont habituellement pas présentes lors des réinfections. Elles peuvent persister pendant plusieurs mois après l'infection aiguë, en particulier chez l'enfant. L'analyse de deux sérums consécutifs a démontré une bien meilleure sensibilité que celle d'un seul sérum.

5.2. Infections génitales

- Prélèvements normalement stériles : la présence de *Ureaplasma* spp., de *M. hominis* ou de *M. genitalium* confirme l'infection.
- Prélèvements en contact avec une flore commensale (prélèvements urétraux, cervico-vaginaux, urines, prélèvements périphériques du nouveau-né) : une évaluation quantitative est nécessaire sauf pour *M. genitalium*. Pour ce dernier, une PCR positive doit être prise en compte selon le contexte clinique, que ce soit chez l'homme ou chez la femme.
 - Chez l'homme, les critères de pathogénicité pour *Ureaplasma* spp. sont les suivants : $\geq 10^4$ UCC/ml pour un prélèvement urétral, $\geq 10^3$ UCC/ml pour le 1^{er} jet d'urine. *M. genitalium* est responsable d'UNG aiguës et chroniques et représente la 2^{ème} cause d'UNG derrière *C. trachomatis*. *Ureaplasma* spp. peut être mis en cause dans les UNG subaiguës ou chroniques tandis que *M. hominis* n'entraîne pas de pathologie chez l'homme.
 - Chez la femme, la présence de *Ureaplasma* spp. dans un prélèvement cervico-vaginal est difficile à interpréter en raison de sa fréquence à l'état normal (jusqu'à 30% des femmes). *M. hominis* est retrouvé plus rarement ($\leq 10\%$ des femmes) et en quantité moindre. Il peut être présent en grande quantité ($\geq 10^4$ UCC/ml) dans les vaginoses bactériennes. La présence en quantité élevée de *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* dans la flore vaginale peut également évoquer une infection des voies génitales hautes ; ce

qui pourra être confirmé par leur recherche sur un prélèvement endométrial réalisé après désinfection de l'exocol. *M. genitalium* est le seul mycoplasme responsable de cervicite.

- Chez le nouveau-né, la présence de mycoplasmes dans des prélèvements périphériques peut être due à une simple contamination. L'isolement à partir d'un prélèvement endo-trachéal, d'une aspiration nasopharyngée ou d'un liquide gastrique en quantité élevée ($\geq 10^4$ UCC/ml) revêt une signification plus grande confronté à un tableau clinique évocateur.

6. SENSIBILITE AUX ANTIBIOTIQUES

- Les mycoplasmes sont naturellement résistants à certaines familles d'antibiotiques : β -lactamines, glycopeptides, fosfomycine, rifampicine, polymyxines, acide nalidixique, sulfamides, triméthoprime. Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés (Tableau II). Des concentrations critiques pour les principaux membres de ces trois familles ont récemment été définies en Amérique du Nord par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).
- *M. pneumoniae*
La sensibilité de cette espèce aux antibiotiques n'est pas étudiée en routine. Seule la résistance aux macrolides est décrite *in vivo* et entraîne des échecs thérapeutiques. Elle touche de 8% à 10% des souches en France et peut être détectée par des méthodes moléculaires directement à partir d'échantillons cliniques respiratoires.
- La résistance des mycoplasmes génitaux (*Ureaplasma* spp. et *M. hominis*) est à rechercher chaque fois que l'on estime qu'ils sont en situation pathogène. Cette résistance est à craindre particulièrement lorsqu'ils sont isolés de

Tableau II. Sensibilité naturelle aux antibiotiques (Clinical Laboratory Standards Institute).

	Erythromycine ^a	Clindamycine	Pristinamycine ^b	Tétracycline ^c	Lévofloxacine Moxifloxacine ^d
<i>M. pneumoniae</i> , <i>M. genitalium</i>	S	S	S	S	S
<i>M. hominis</i>	R	S	S	S	S
<i>Ureaplasma</i> spp.	S	R	S	S	S

^aLa sensibilité à l'érythromycine répond pour celle à l'azithromycine.

^bLa pristinamycine n'a pas été évaluée dans les recommandations du CLSI.

^cLa sensibilité à la tétracycline répond pour celle à la doxycycline.

^dLes autres fluoroquinolones n'ont pas été évaluées par le CLSI.

sites extra-génitaux chez des immuno-déprimés soumis à des pressions thérapeutiques multiples. Des résistances acquises ont été décrites pour les tétracyclines, pour les macrolides et pour les fluoroquinolones. Seule la résistance aux tétracyclines, due à la présence du gène *tet(M)*, pose un réel problème en raison de sa prévalence. Une étude réalisée en France a montré une fréquence de cette résistance chez *M. hominis* de 19%, tandis que celle de *Ureaplasma* spp. ne dépassait pas 3%.

- Des trousse adaptées à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* sont commercialisées, seules ou au sein de trousse réalisant en parallèle l'identification et la numération à partir du prélèvement. Les résultats sont comparables à ceux obtenus par les méthodes de dilution en milieu liquide. Ces trousse peuvent également être employées en seconde intention après culture primaire de l'échantillon, ce qui permet une meilleure standardisation de l'inoculum.
- *M. genitalium* : comme pour *M. pneumoniae*, l'étude de la sensibilité aux antibiotiques ne peut être réalisée en pratique courante. L'utilisation des tétracyclines conduit à de très nombreux échecs cliniques malgré une apparente activité *in vitro*. La résistance acquise à l'azithromycine, macrolide recommandé en 1^{ère} intention dans le traitement des infections sexuellement transmissibles,

touche 10% à 15% des souches en France. La moxifloxacine est active en cas de résistance aux macrolides bien que quelques cas d'échecs thérapeutiques à cette fluoroquinolone aient été décrits récemment dans la littérature.

Points forts

- Les mycoplasmes sont responsables d'infections respiratoires et génitales.
- La culture des *Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* est aisée tandis que *M. genitalium* et *M. pneumoniae* doivent être recherchés par PCR.
- Un diagnostic sérologique est disponible uniquement pour *M. pneumoniae*.
- Pour les échantillons uro-génitaux en contact avec la flore commensale, une évaluation semi-quantitative des *Ureaplasma* et de *M. hominis* est nécessaire.
- Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les macrolides et apparentés et les fluoroquinolones. La résistance aux tétracyclines concerne *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* tandis que celle aux macrolides touche *M. pneumoniae* et *M. genitalium*.

Point en suspens

- La responsabilité clinique des mycoplasmes uro-génitaux reste discutée dans les infections urogénitales

basses, sauf celle de *M. genitalium* dans les infections sexuellement transmissibles et celle de *Ureaplasma* spp. dans les urétrites subaiguës chez l'homme.

BIBLIOGRAPHIE

- Dégrange S, Renaudin H, Charron A, Bébéar C, Bébéar CM. Tetracycline resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* : prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and description of two *tet(M)*-positive isolates of *M. hominis* susceptible to tetracyclines. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008. **52** : 742-744.
- Férandon C, Peuchant O, Janis C, Bernard A, Renaudin H, Pereyre S, *et al.* Development of a real-time PCR targeting the *yidC* gene for the detection of *Mycoplasma hominis* and comparison with quantitative culture. *Clin Microbiol Infect* 2011. **17** : 155-159.
- Jensen JS, Bjornelius E, Dohn B, Lidbrink P. Use of TaqMan 5' nuclease real-time PCR for quantitative detection of *Mycoplasma genitalium* DNA in males with and without urethritis who were attendees at a sexually transmitted disease clinic. *J Clin Microbiol* 2004. **42** : 683-692.
- Pereyre S, Charron A, Hidalgo-Grass C, Touati A, Moses AE, Nir-Paz R, *et al.* The spread of *Mycoplasma pneumoniae* is polyclonal in both an endemic setting in France and in an epidemic setting in Israel. *PLoS One* 2012. **7** : e38585.
- Touati A, Bénard A, Ben Hassen A, Bébéar CM, Pereyre S. Evaluation of five commercial real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract specimens. *J Clin Microbiol* 2009. **47** : 2269-2271.
- Touati A, Peuchant O, Jensen JS, Bébéar C, Pereyre S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* 2014. **52** : 1549-1555.
- Waites KB, Bébéar CM, Roberston JA, Talkington DF, Kenny GE, editors. *Cumitech 34, Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections.* Washington D. C. American Society for Microbiology ; 2001.
- Waites K, Talkington D. New developments in human diseases due to mycoplasmas. *In* : Blanchard A, Browning GF, editors. *Mycoplasmas molecular biology pathogenicity and strategies for control.* Norfolk : Horizon Bioscience ; 2005. p. 289-354.
- Waites KB, Bade DJ, Bébéar C, S.D. B, Davidson M, Duffy LB, *et al.* *Methods for antimicrobial susceptibility testing for human mycoplasmas : Approved guideline.* Wayne (PA) : Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011 Document M43-P.
- Yi J, Yoon BH, Kim EC. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR. *Mol Cell Probes.* 2005. **19** : 255-260.

