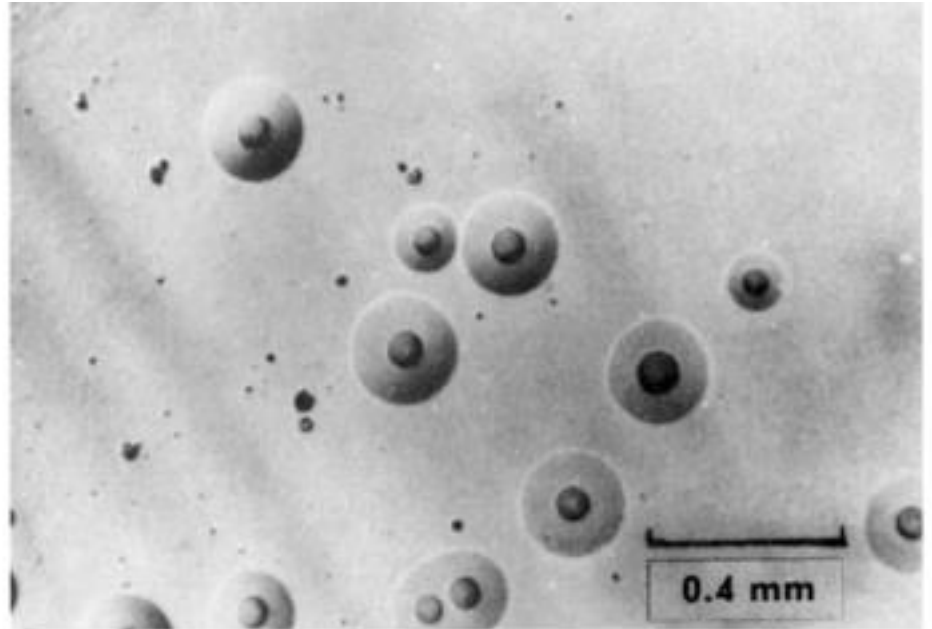


Mycoplasmas



© Elsevier. Murray: Medical Microbiology 5e - www.studentconsult.com

GHAROUT A.

Bactériologie

- Bactéries sans paroi (classe des Mollicutes; de mollis cutis :peau molle).
- Les mycoplasmes seraient sur le plan phylogénétique des formes très évoluées, dérivées de bactéries à Gram positif à faible teneur en GC, ayant des ancêtres communs avec certains *Clostridia* (*Clostridium innocuum* et *C. ramosum*) et ayant perdu la capacité de synthétiser une paroi.
 - fragiles, pléiomorphes,
 - non colorés par le Gram
 - insensibles aux β -lactamines
 - croissance sur milieux spéciaux

Écologie

- Bactéries ubiquitaires :
 - plantes, animal
 - homme : muqueuses respiratoires et génitales
 - nombreuses espèces commensales
 - 4 espèces ont un pouvoir pathogène :
 - *Mycoplasma pneumoniae*
 - *Mycoplasma hominis*
 - *Mycoplasma genitalium*
 - *Ureoplasma urealyticum*

Manifestations cliniques

- Affections respiratoires :

M. pneumoniae

- trachéo-bronchite bénigne
- pneumopathie

- Affections uro-génitales :

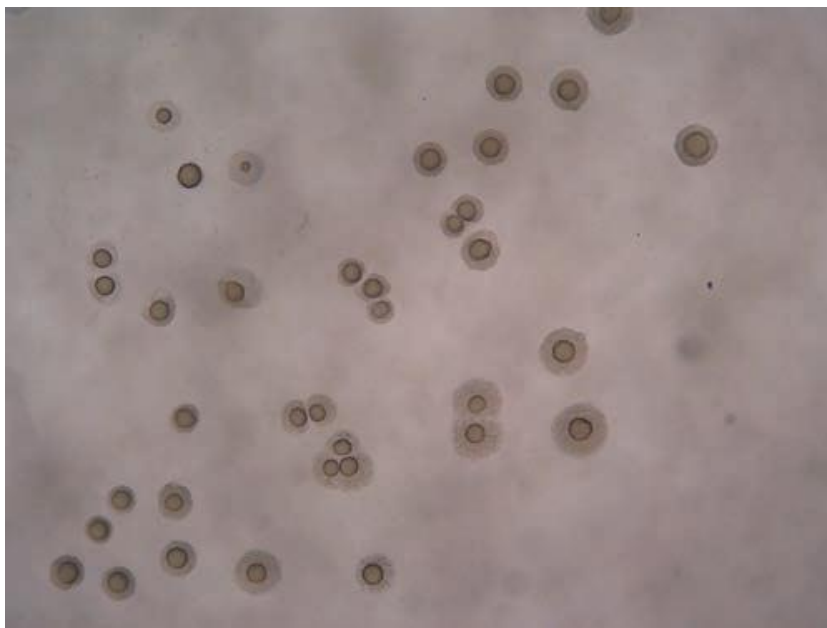
Ureaplasma urealyticum, *M. hominis* et *M. genitalium*,

- urétrites,
- vaginites, salpingites
- fièvres du post-partum

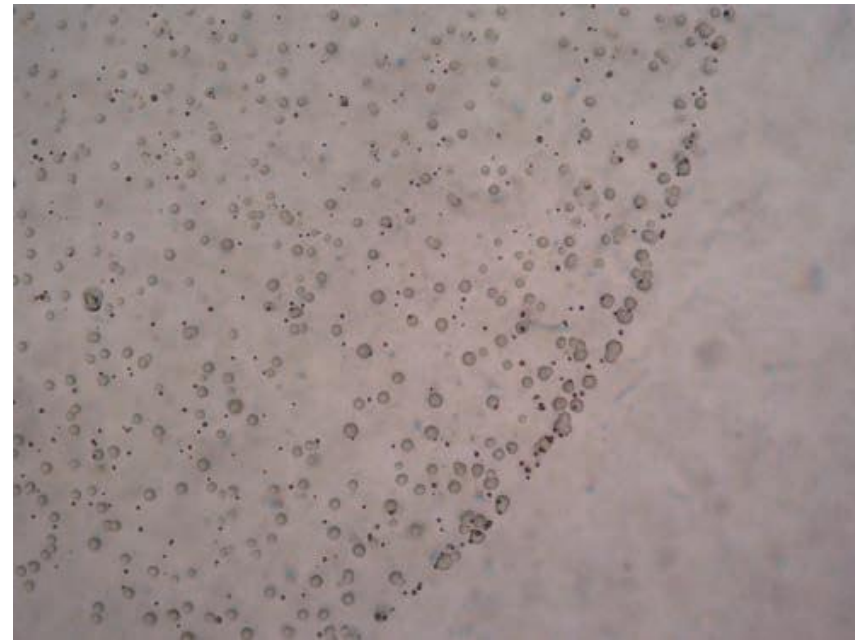
Caractères généraux

- De très petite taille, **300–850 nm**, les mycoplasmes rencontrés chez l'homme sont polymorphes, coccoïdes ou filamenteux et ne sont pas colorables par le Gram.
- Anaérobies facultatifs, ils exigent des milieux complexes, renfermant des **stéroïdes**. Ils utilisent comme source principale d'énergie le métabolisme du **glucose ou de l'arginine** (genre *Mycoplasma*) ou de l'**urée** (genre *Ureaplasma*).
- Leur croissance, aisée pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis* (environ **48 H**), est difficile et lente pour *M. pneumoniae* (**6 à 20 jours**) et encore davantage pour *M. genitalium*.

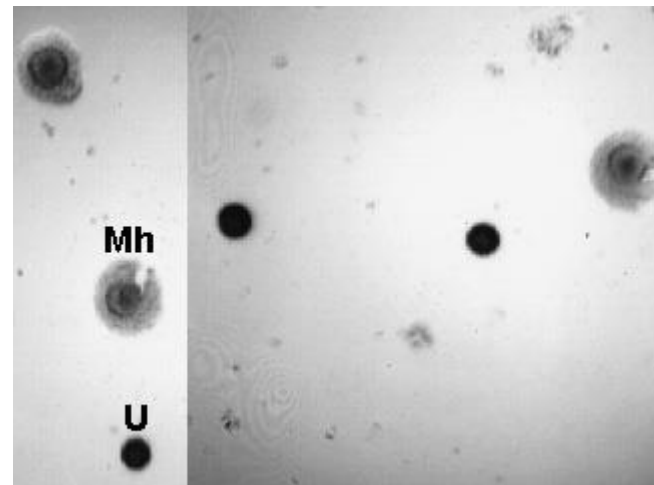
- Sur gélose, ils donnent de petites colonies (**50 à 300 μm**) visibles à la loupe binoculaire, prenant pour certains **un aspect en oeuf sur le plat**, en raison de la pénétration des mycoplasmes dans la gélose.
- ***M. genitalium*** a le plus petit génome bactérien connu (**580 kpb**).



Colonies de *M. hominis*.



Colonies d'*Ureaplasma* spp.



Mélange *M. hominis* et *Ureaplasma* spp.

Diagnostic bactériologique direct

- **Prélèvements**

A. Infections respiratoires

- Prélèvements de gorge et aspirations nasopharyngées chez le jeune enfant sont à préférer pour la recherche de *M. pneumoniae* en raison du caractère diffus de l'infection.
- Brossage bronchique et lavage bronchoalvéolaire sont également adaptés, contrairement aux expectorations, trop contaminées.
- 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 foetal, 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**. Les milieux peuvent être conservés à + 4 °C pendant 48 heures et au-delà à -80 °C.

- **B. Infections génitales et néonatales**
- Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de : prélèvements urétraux, premier jet d'urine, plus rarement sperme et sécrétions prostatiques, prélèvements vaginaux, cervicovaginaux, endométriaux, biopsies, liquide amniotique, placenta, prélèvements endotrachéaux chez le nouveau-né. Ces prélèvements sont placés dans les milieux de transport et conservés à + 4 °C ou à –80 °C.

Culture

- **Mycoplasmes respiratoires**

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

- **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.

- ***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 plus complexe, renfermant du sérum de veau foetal.
- Les milieux liquides, à **pH 7,0-7,2**, renferment de l'**arginine** et du **rouge de phénol**.
- Sa croissance se traduit par **une alcalinisation** des milieux **liquides** à l'**arginine** en **48 heures**.
- *M. hominis* donne en **48 à 96 heures** des colonies en **oeuf sur le plat**.
- *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**.

- Sa croissance sur milieu liquide renfermant de l'**urée** se traduit par une **alcalinisation en 18 à 24 heures**.
- Sur milieu gélosé, les colonies d'*Ureaplasma spp.* sont irrégulières, très petites, brunes en présence de sulfate de manganèse, et apparaissent en **48 à 96 heures**.

- ❖ Pour *M. pneumoniae*, espèce fastidieuse, le milieu SP-4 enrichi en **glucose** est le plus adapté. Les milieux liquides renferment **glucose et rouge de phénol**.
- La croissance se traduit par une **acidification** du milieu après **6 à 20 jours**.
- Sur **milieu gélosé**, les colonies sont **petites, granulaires**.
- ❖ Pour les espèces très fastidieuses, *M. genitalium* et *M. amphoriforme*, le milieu SP-4 enrichi en glucose est le plus adapté.

Milieu sP-4

- Base
 - Base bouillon *Mycoplasma* : 3,5 g
 - Tryptone: 10 g
 - Peptone : 5,3 g
 - Glucose : 5 g
- Suppléments stériles
 - Milieu CMRL 1066 sans (10 ×) sans glutamine sans NaHCO_3 : 50 ml
 - Glutamine (100 ×) : 5 ml
 - NaHCO_3 : 2,2 g
 - Extrait de levure : 5 g
 - Extrait aqueux de levure (solution 2 %) : 100 ml
 - Sérum de veau fœtal : 170 ml
 - Ampicilline : 0,5 g
 - Colimycine : 250 000 UI
 - Amphotéricine B : 5 mg
 - Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
 - Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
 - pH : 7,6

Milieu de Hayflick modifié

- Bouillon d'infusion de cœur : 17,5 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Arginine ou glucose : 5 g
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 7,4 pour milieux glucosés, 7,0 pour milieux avec arginine.

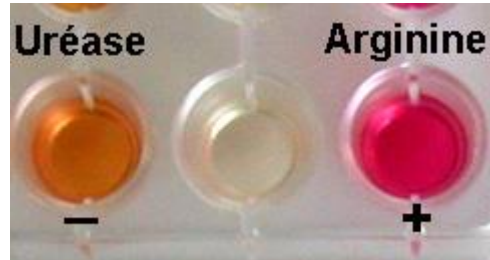
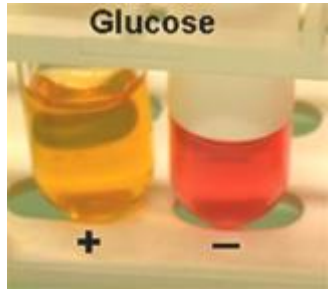
La composition du milieu gélosé est la même, sauf : absence d'arginine, glucose, rouge de phénol et présence d'agar purifié (10 g).

Milieu de Shepard

- Trypticase soja : 24 g
- Extrait de levure : 5 g
- Sérum de poulain : 200 ml
- Cystéine : 100 mg
- Urée : 600 mg
- Rouge de phénol (1 mg/ml) : 20 ml
- Ampicilline : 0,5 g
- Colimycine : 250 000 UI
- Amphotéricine B : 5 mg
- Eau distillée q.s.p. : 1000 ml
- pH : 6

La composition du milieu gélosé est la même sauf : absence de rouge de phénol, présence de sulfate de manganèse (150 mg), de putrescine (1,5 g) et d'agar purifié (10 g).

- **Identification d'espèce**
- Selon les cas, l'identification d'espèce se fait sur les propriétés métaboliques, l'aspect des colonies ou l'amplification d'acides nucléiques.



Espèce	Isolement	Glucose	Arginine	Urée
<i>M. pneumoniae</i>	respiratoire	+	-	-
<i>M. genitalium</i>	génital	+	-	-
<i>M. hominis</i>	génital	-	+	-
<i>Ureaplasma</i> spp.*	génital	-	-	+

Kits

Différents kits destinés à la détection et à l'appréciation quantitative d'*Ureaplasma* spp. et de *M. hominis* à partir de **prélèvements urogénitaux** sont disponibles.



Identification des mycoplasmes génitaux sur la base de leur résistance naturelle aux antibiotiques.

	Triméthoprimé-sulfaméthoxazole	Lincomycine	Érythromycine
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	R	R	S
<i>Mycoplasma hominis</i>	R	S	R

- **PCR:**
- Ces tests remplacent la culture pour *M. pneumoniae*.
Plusieurs protocoles de PCR ciblant le gène de l'adhésine P1, de l'ARNr 16S sont disponibles.
- La PCR est la seule méthode permettant en pratique la détection de *M. genitalium*.
- Pour *Ureaplasma* spp. et *M. hominis*, des troussees commercialisées sont aussi disponibles.

Interprétation

- *M. pneumoniae* n'appartenant **pas à la flore commensale**, sa présence dans un échantillon respiratoire ou une autre localisation est un élément **significatif**.
- La mise en évidence dans les voies **génitales basses** d'*Ureaplasma* spp. surtout et, à un moindre degré, de *M. hominis* est plus difficile à interpréter en raison de leur existence possible à l'état **commensal**.
- **Une appréciation quantitative est proposée.**

- Pour *Ureaplasma* spp. au cours d'une urétrite non gonococcique (UNG), une valeur $\geq 10^4$ UCC/ml dans un prélèvement urétral et $\geq 10^3$ UCC/ml pour un premier jet d'urines est significative.
- La présence d'*Ureaplasma* spp. dans un prélèvement cervicovaginal est très difficile à interpréter.
- Celle de *M. hominis* en quantité $\geq 10^4$ UCC/ml est plus significative et peut évoquer un tableau de vaginose bactérienne ou une infection génitale haute.

- Chez le nouveau-né, la présence dans un prélèvement endotrachéal à un taux $\geq 10^4$ **UCC/ml** est significative.
- La mise en évidence de *M. genitalium* dans les UNG, cervicites ou prélèvements des voies génitales hautes doit le faire considérer comme pathogène et amener à le traiter.
- La recherche de mycoplasmes ne doit pas être faite de façon isolée, mais être associée à la recherche d'autres pathogènes tels que *C. trachomatis* et *Neisseria gonorrhoeae* pour les infections génitales.

Sérologie

- Ce sont les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae*.
- Compte tenu de leur présence à l'état commensal, aucun test sérologique n'a pu montrer, en pratique courante, de résultat satisfaisant dans le diagnostic des infections génitales à *Ureaplasma* spp. ou *M. hominis*.
- Aucun test n'est commercialisé pour *M. genitalium*.

MYCOPLASMA DUO permet :

- La culture, l'identification et le titrage différentiel des mycoplasmes urogénitaux (Uu et Mh).
- La préparation d'un inoculum standardisé pour la réalisation de l'antibiogramme.

2- PRINCIPE

La sélectivité de la cupule X est basée sur la présence d'un antifongique et d'un mélange d'antibiotiques.

Identification / titrage des mycoplasmes urogénitaux reposent sur l'utilisation de leurs propriétés métaboliques : hydrolyse de :

- L'urée par *Ureaplasma urealyticum* (UU).
- L'arginine par *Mycoplasma hominis* (MH). avec libération d'ammoniaque et alcalinisation du milieu (sans trouble du milieu).

La réaction est visualisée par le virage du jaune au rouge de l'indicateur de pH (rouge de phénol) :

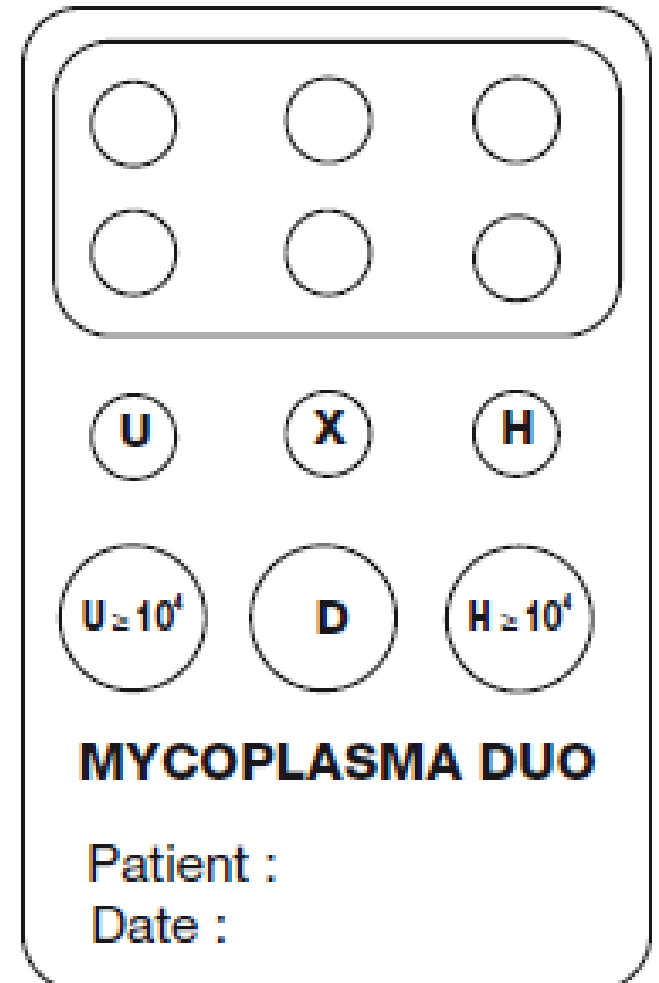
- Cupule jaune : absence de mycoplasmes.
- Cupule rouge : présence de mycoplasmes.

Titrage repose sur le principe des dilutions en milieu liquide : les dilutions successives opérées dans le milieu de suspension, puis dans la cupule D (dilution 10^{-1}) et dans les cupules $U \geq 10^4$ et $H \geq 10^4$ (dilutions 10^{-2}) permettent de déterminer le titre de la souche présente dans le prélèvement.

Ce titre est fonction du nombre de cupules ayant viré au rouge en 24 à 48 Heures.

- **La préparation de l'antibiogramme**
- La cupule X par un enrichissement sélectif du prélèvement en mycoplasmes permet de réaliser un inoculum standardisé pour l'antibiogramme : 10^3 à 10^5 UCC/ml (Unités Changeant Couleur), à la 24ème heure d'incubation.

- Chaque microplaque comprend 6 cupules contenant :
 - Des substrats déshydratés pour l'identification.
 - Des facteurs de croissance des mycoplasmes.
 - Des inhibiteurs de croissance de la flore polymorphe associée.
- U et $U \geq 10^4$: Identification et titrage d'UU (contiennent de l'urée).
- H et $H \geq 10^4$: Identification et titrage de MH (contiennent de l'arginine).
- D : Cupule de dilution.
- X : Enrichissement sélectif en mycoplasmes : inoculum pour l'antibiogramme.



PROCEDURE

Ensemencement de la microplaque

1) Diluant

Avec le flacon compte-gouttes, distribuer **4 gouttes (200 µl)** de diluant dans les 3 cupules de la rangée inférieure de la microplaque : $U \geq 10^4$, D, $H \geq 10^4$.

2) Prélèvements

A l'aide d'une micropipette, distribuer le milieu de suspensionensemencé contenant le prélèvement :

- 4 gouttes (100 µl) dans les 3 cupules de la rangée supérieure de la microplaque : U, X, H.
- 1 goutte (25 µl) dans la cupule D.

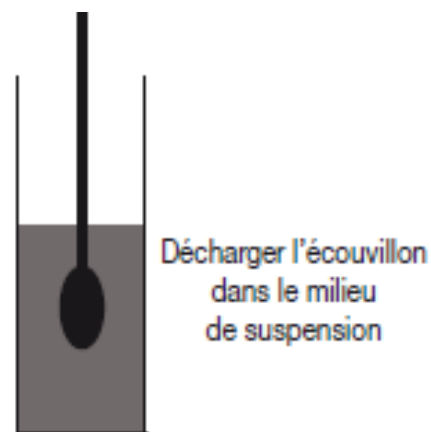
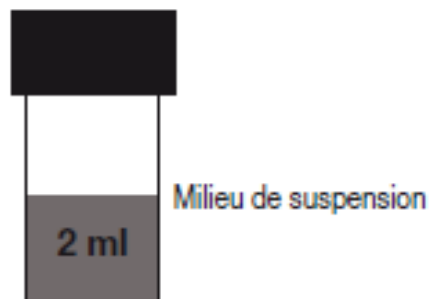
3) Dilution

Avec une autre micropipette, bien homogénéiser le contenu de la cupule D (3 aspirations et refoulements successifs). Puis aspirer cette suspension et en distribuer respectivement 1 goutte (25 µl) dans la cupule $U \geq 10^4$ et 1goutte (25 µl) dans la cupule $H \geq 10^4$.

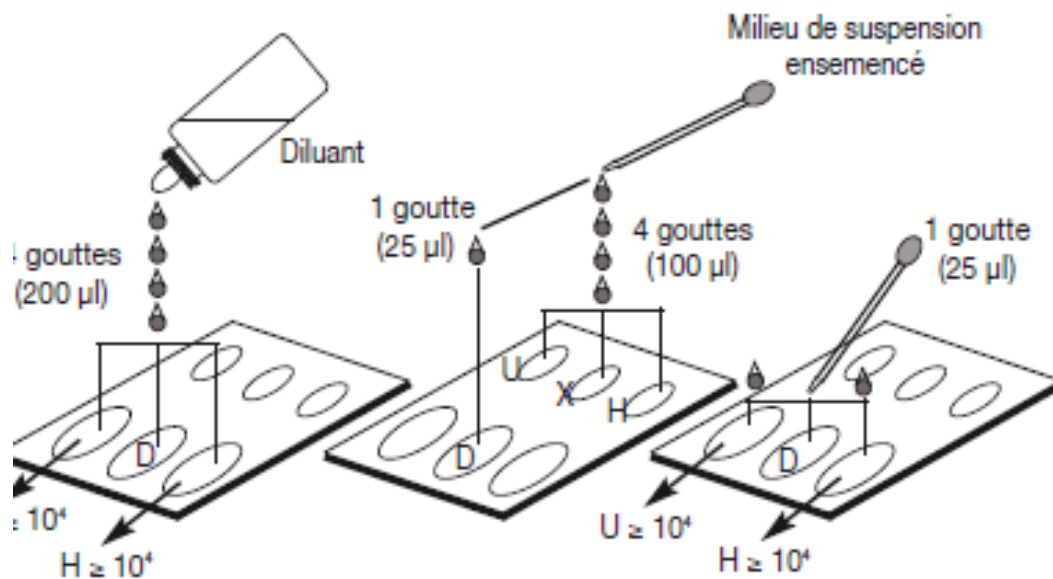
Incubation

- Recouvrir la microplaque avec un film adhésif.
- Incuber 24 heures à l'étuve à 37°C, et si nécessaire, prolonger cette incubation de 24 heures supplémentaires.

PRELEVEMENT



ENSEMENCEMENT



INCUBATION

Mettre à l'étuve à 37°C
24 h à 48 h



LECTURE - INTERPRÉTATION DES RESULTATS

1) Lecture

- 1ère lecture après 24 h d'incubation permet d'obtenir un résultat définitif dans le cas général des titres forts ($\geq 10^4$ UCC/ml).
- 2ème lecture, réalisée après 48 h d'incubation, nécessaire pour :
 - Confirmer les négatifs
 - Révéler les souches à titre faible ($\leq 10^3$ UCC/ml)
 - Révéler les souches à titre fort ($\geq 10^4$ UCC/ml), présentant un métabolisme lent.

2) Interprétation

Un virage du jaune au rouge des cupules urée et/ou arginine, sans trouble du milieu, traduit la présence de mycoplasmes.

Le schéma de lecture et d'interprétation est identique pour les 2 espèces de mycoplasmes : lire les résultats obtenus dans les DUO respectifs de cupules U et $U \geq 10^4$ pour UU, H et $H \geq 10^4$ pour MH.

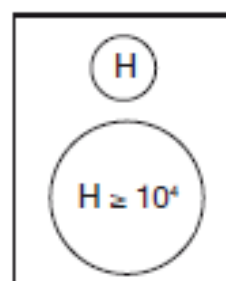
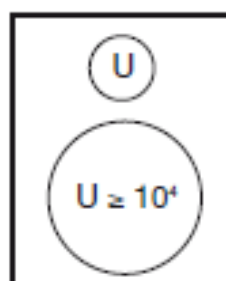
MYCOPLASMA DUO permet un titrage différentiel des 2 espèces de mycoplasmes uro-génitaux éventuellement présentes dans le même prélèvement :

Un prélèvement peut apparaître, soit :

- **Négatif** : absence de changement de couleur (milieu jaune)
- **Positif à UU** : virage de(s) cupule(s) U, uniquement
- **Positif à MH** : virage de(s) cupule(s) H, uniquement
- **Positif à UU et à MH** : le virage simultané des cupules U et H indique l'association des 2 espèces dans le même prélèvement : lire le titre correspondant à **chaque** espèce.

DUO UU

DUO MH



Lecture à 24 heures

Cupules U et U $\geq 10^4$ rouges**INTERPRETATION
IMMEDIATE**

Prélèvement POSITIF

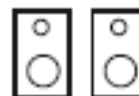
Présence d'UU à

Cupules H et H $\geq 10^4$ rouges**INTERPRETATION
IMMEDIATE**

Prélèvement POSITIF

Présence d'MH à

titre FORT

 $\geq 10^4$ UCC/ml
de prélèvement $\geq 10^4$ UCC/ml
de prélèvementCupule U rouge, U $\geq 10^4$ jaune**INTERPRETATION :**
différée à 48 hCupule H rouge, H $\geq 10^4$ jaune**INTERPRETATION :**
différée à 48 hCupules U et U $\geq 10^4$ jaunes**INTERPRETATION :**
différée à 48 hCupules H et H $\geq 10^4$ jaunes**INTERPRETATION :**
différée à 48 h**RE-INCUBER 24 H SUPPLEMENTAIRES
LIRE ET INTERPRETER A 48 H**

Lecture à 48 heures

Cupules U et U $\geq 10^4$ rouges

INTERPRETATION

Prélèvement POSITIF

Présence d'UU à **titre FORT**

$\geq 10^4$ UCC/ml prélèvement

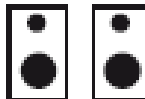
Cupules H et H $\geq 10^4$ rouges

INTERPRETATION

Prélèvement POSITIF

Présence d'MH à **titre FORT**

$\geq 10^4$ UCC/ml prélèvement



Cupule U rouge, U $\geq 10^3$ jaune

INTERPRETATION

Prélèvement POSITIF

Présence d'UU à **titre FAIBLE**

$\leq 10^3$ UCC/ml prélèvement

interpréter en fonction du contexte clinique

Cupule H rouge H $\geq 10^3$ jaune

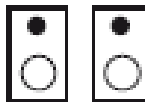
INTERPRETATION

Prélèvement POSITIF

Présence d'MH à **titre FAIBLE**

$\leq 10^3$ UCC/ml prélèvement

interpréter en fonction du contexte clinique



Cupules U et U $\geq 10^3$ jaunes

INTERPRETATION

Prélèvement NEGATIF

ABSENCE d'UU

Cupules H et H $\geq 10^3$ jaunes

INTERPRETATION

Prélèvement NEGATIF

ABSENCE de MH

