

UNIVERSITÉ CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR



FACULTÉ DE MÉDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE

Année : 2018

Mémoire N° : 94

MICRO-METHODES : EVALUATION POUR LA VALIDATION DE LA METHODE D'ETUDE DE LA SENSIBILITE DES MYCOPLASMES UROGENITAUX

Mémoire du Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu le 27 juin 2018 par :

M^{lle} Adénikè Bernice Eloise ADEOYE

MEMBRES DU JURY

Président	M.	Cheikh Saad Bouh	BOYE	Professeur titulaire
Membres	Mme	Ndèye Coumba	KANE-TOURE	Professeur titulaire
	M.	Babacar	MBENGUE	Maître Conférence agrégé
	M.	Abdoulaye	SECK	Maître Assistant
Directeur de mémoire	M.	Abdoulaye	SECK	Maître Assistant

À Dieu

*Éternel et tout puissant, dispensateur de toute grâce qui a fait
de moi ce que je suis à travers mes parents et pour toutes les
merveilles qu'il accomplit chaque jour de ma vie.*

DEDICACE

Nous dédions ce travail :

A notre bien aimé père Félix ADEOYE,

A notre adorable mère ADEOYE Françoise née DOSSA,

Pour votre amour, la confiance que vous avez placé en moi depuis mon très jeune âge, votre soutien de tout ordre et pour vos encouragements.

REMERCIEMENTS

A mes frères et sœurs : **Marlène, Rodolpho, Inès et Dieudonné**, votre soutien et vos prières ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui.

A tous les membres des familles **ADEOYE** et **DOSSA**, je vous suis reconnaissante pour tout le soutien que vous n'avez jamais cessé de m'apporter tout au long de ces années.

A mon très cher **Claude KIKI**, merci pour tes prières et ton soutien inexprimable.

Aux couples **KPANGON** et **AHOUANDJINO** et leurs enfants, je manque de mots pour vous témoigner ma gratitude. Soyez bénis.

A **Michel ATCHIKPA** et **Beaudoin AMOUSSOU** pour votre soutien, que Dieu nous garde toujours unis dans son amour.

Islamiath KISSIRA, Gervais TOKPOHOZIN, Boris ZINSOU, Stéphanie DJIKOUNON, Laetitia KANGA, Josline LAOUROU, Fidélia LAOUROU, Hervé MISSIKPODE, Ornela AGOSSOU, Bénédicte BOKOU et Mayssone MOHAMED SOUNDI en souvenir des nombreux moments passés ensemble, je vous souhaite une réussite sociale et une vie épanouie.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude au Professeur **Cheikh Saad-Bouh BOYE** Directeur de mémoire. Merci pour ce thème de recherche pertinent que vous m'avez proposé, merci pour le soutien financier de cette recherche, pour votre encadrement exceptionnel, vos précieux conseils, vos encouragements et votre disponibilité malgré vos multiples fonctions.

Je remercie le docteur **Abdoulaye SECK**, pour avoir accepté lire, critiquer et instruire ce mémoire. Merci pour votre contribution à l'amélioration de ce document. Trouvez ici l'expression de toute ma reconnaissance.

A tout le personnel de l'équipe de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de HALD en particulier **Dr Assane DIENG, Amadou DIOP, Abdoulaye DIOP, Dior DIENG** et **Oumar** pour votre disponibilité, vos soutiens

technique et scientifique, vos conseils et encouragements et aides. J'ai eu plaisir à travailler avec vous.

Merci à tous mes amis et camarades de promotion en occurrence **Aminata DIOP, Yves VIGBEDOR, Ibrahima SENE, Awa DIOP, Rama BARRY, Aïda NDOUME, Korika DIAKITE, Edward SIAWAYA, Ousmane NIABALY**. Nous avons cheminé pendant ces années et j'espère vous avoir apporté un peu de ce que vous m'avez donné : votre amitié.

A tous ceux, qui, d'une manière ou d'une autre, ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

A nos maîtres et juges

A notre Maître et Président du jury

Monsieur Cheikh Saad Bouh BOYE, Professeur titulaire

Merci cher Professeur pour le temps que vous nous accordez en acceptant de présider ce jury.

Votre esprit d'ouverture et votre disponibilité vis-à-vis de vos étudiants font de vous une personnalité exceptionnelle. La pertinence de vos analyses scientifiques ainsi que votre réputation fera sans doute de ce travail un document fiable.

Votre rôle de directeur et de grand homme nous a permis d'en apprendre de par votre savoir. Nous vous remercions pour votre temps que vous nous avez consacré tout au long du travail. Nous vous remercions aussi pour ce plus que vous nous avez apporté.

Puisse Dieu vous guider dans tous vos projets.

A notre Maître et juge

Madame Ndèye Coumba KANE-TOURE, Professeur titulaire

Vous nous faites un grand honneur de juger ce travail malgré vos multiples occupations. Nous vous sommes très reconnaissants pour vos conseils tout au long de cette formation.

Soyez rassurez cher maître, d notre haute considération et de notre vive reconnaissance.

A notre Maitre et Juge

Monsieur Babacar MBENGUE, Maître de Conférences Agrégé

Nous vous sommes très reconnaissants pour l'honneur que vous nous faites en acceptant de juger notre modeste travail en dépit de vos multiples occupations. Merci de votre grande disponibilité.

Votre générosité, rigueur et sympathie font de vous une personne que nous admirons. Les qualités qui font de vous un enseignant émérite, admiré et aimé de tous, nous serviront de modèle.

Puisse Dieu vous accorder une carrière fructueuse.

A notre Maitre et Juge

Monsieur Abdoulaye SECK, Maître Assistant

Nous sommes touchés par l'honneur que vous nous faites en acceptant de siéger dans le Jury.

Vos remarques et suggestions contribueront à l'amélioration de la qualité scientifique de ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profonde gratitude et de nos sincères considérations.

Que Dieu vous bénisse ainsi que vos familles respectives.

TABLE DES MATIERES

DEDICACE.....	i
REMERCIEMENTS.....	ii
TABLE DES MATIERES	vi
LISTE DES ABREVIATIONS	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xi
LISTE DES FIGURES.....	xii
INTRODUCTION.....	1
PREMIERE PARTIE : REVUE DE LA LITTERATURE.....	3
I. Généralités sur les mycoplasmes	4
I.1. Taxonomie	4
I.2. Marqueurs épidémiologiques	5
I.3. Caractères bactériologiques des mycoplasmes	7
I.3.1. Caractères morphologiques et structuraux	7
I.3.2. Caractères biochimiques	7
I.3.3. Caractères cultureux.....	8
I.4. Facteur de virulence	9
II. Généralités sur la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques	10
II.1. Antibiotiques actifs.....	10
II.2. Résistance naturelle	10
II.2.1. Résistances liées à la classe	10
II.2.2. Résistances liées à l'espèce	11
II.3. Résistance acquise	11
III. Validation d'une méthode qualitative et évaluation des incertitudes de mesure	11
III.1. Validation de la méthode.....	11
III.1.1. Spécificité.....	12
III.1.2. Sensibilité	13

III.1.3. Exactitude relative	13
III.2. Evaluation des incertitudes de mesure	13
III.2.1. Valeur prédictive positive	13
III.2.2. Valeur prédictive négative	14
DEUXIEME PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE	15
I.Objectifs	16
II. Cadre de l'étude	16
III. Matériel	16
III.1. Souches bactériennes.....	16
III.2. Matériels de préparation des milieux	16
III.3. Matériels de transfert et de conservation des souches.....	17
III.4. Matériels de préparation des antibiotiques.....	17
III.5. Réactifs et Antibiotiques	17
IV. Méthodologie	18
IV.1. Principe	18
IV.2. Préparation des milieux.....	18
IV.3. Préparation des solutions des antibiotiques	18
IV.4. Contrôle de qualité des milieux et des antibiotiques.....	20
IV.5. Mode opératoire de la réalisation de la microplaque pour l'étude de la sensibilité des souches	21
IV.5.1. Distribution et déshydrations des solutions d'antibiotiques	21
IV.5.2. Contrôles de qualité des plaques déshydratées	21
IV.5.3. Lecture et interprétation	22
IV.5.4. Validation de la méthode	23
IV.5.4.1. Spécificité.....	23
IV.5.4.2. Sensibilité.....	23
IV.5.4.3. Exactitude relative.....	23
IV.5.4.4. Précision.....	23
IV.5.4.5. Concordance statistique	24
V. Résultats	25

VI. Discussion	30
RECOMMANDATIONS	32
CONCLUSION.....	33
REFRENECES BIBLIOGRAPHIQUES.....	34
ANNEXES.....	37

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
ARN	: Acide Ribonucléique
ATB	: Antibiotique
CCI	: Concentration Critique Inférieure
CCS	: Concentration Critique Supérieure
CLSI	: Chirurgical and Laboratory Standards Institutes
CSB	: Conscience Scientifique pour le Bien-être
CSM	: Concentration de la Solution Mère
CST	: Concentration de la Solution de Travail
E	: Exactitude
HALD	: Hôpital Aristide LeDantec
I	: Inoculum
IST	: Infection Sexuellement Transmissible
ml	: Millilitre
µm	: Micromètre
MLSK	: Macrolides Lincosamides Streptogramines Ketolides
PPLO	: Pleuro Pneumonia Like Organism
PVS	: Polyvitex
R	: Résistant
S	: Sensible
Se	: Sensibilité
SM	: Solution Mère

Sp	: Spécificité
ST	: Solution de Travail
STCCI	: Concentration Critique Inférieure de la Solution Travail
STCCS	: Concentration Critique Supérieure de la Solution Travail
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
UCC	: Unité de Changement de Couleur
UNG	: Urétrite Non Gonococcique
VCN	: Vancomycine Colistine Nystatine
VPN	: Valeur Prédictive Négative
VPP	: Valeur Prédictive Positive

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	: Mycoplasmes isolés chez l'Homme	5
Tableau II	: <i>Profil métabolique des mycoplasmes</i>	8
Tableau III	: Tableau de l'évaluation de la performance du test	12
Tableau IV	: Préparation des solutions d'antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux.....	19
Tableau V	: Souches de contrôle	20
Tableau VI	: Tableau : Dilution des antibiotiques.....	21
Tableau VII	: Inoculation des plaques	22
Tableau VIII	: Résultats de l'évaluation de MicroCSB System®.....	27
Tableau IX	: Résultats de l'analyse de la performance de la Microméthode MicroCSB System® par rapport à la Galerie Mycoplasma IST2 (Biomérieux®)	28
Tableau X	: Récapitulatif du test répétabilité de la microméthode System®	29

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Résultat de l'étude de la sensibilité des souches de <i>U.urealyticum</i> par microméthode (N=13)	25
Figure 2 : Résultat de l'étude de la sensibilité des souches de <i>M.hominis</i> par Microméthode (N=6).....	26

INTRODUCTION

Les mycoplasmes sont des agents bactériens, qualifiés de bactéries atypiques, retrouvées à l'état commensal chez l'homme. Cependant, certaines d'entre elles sont associées à des infections des voies respiratoires et génitales pouvant être graves et qui suscitent un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique (1).

L'étude des mycoplasmes a été freinée par des contraintes liées à leur culture en laboratoire depuis leur première isolement en 1898 (2). Quatre espèces sont pathogènes pour l'homme avec certaines résistances bien établies : *Mycoplasma pneumoniae*, agent de pneumopathies atypiques mais aussi d'infections bénignes des voies respiratoires, *Mycoplasma genitalium* (*M.genitium*), *Mycoplasma hominis* (*M.hominis*) et *Ureaplasma urealyticum* (*U.urealyticum*) retrouvés dans les infections urogénitales.

La caractéristique particulière que présente ces microorganismes est l'absence de paroi d'où l'aspect polymorphe, l'impossibilité de les mettre en évidence par la coloration de Gram, et surtout leur insensibilité totale aux bêta-lactamines (3).

La gravité des infections dues à des mycoplasmes s'explique par les difficultés liées à leur identification mais aussi à l'absence d'étude de la sensibilité aux antibiotiques. Les mycoplasmes s'éloignent cependant des conditions standardisées de l'étude de la sensibilité aux antibiotiques pour la plupart des espèces bactériennes, car leurs mises en évidence par isolements sur milieux de culture sont difficiles. Cet état de chose est dû soit au fait qu'ils se développent obligatoirement à l'intérieur des cellules, soit qu'ils se multiplient seulement dans des milieux complexes, nécessitant de longs délais pour leur croissance. Ils sont identifiés exceptionnellement dans des études ponctuelles et avec un nombre de souches peu élevé mais pas en routine du fait de la lourdeur de la technique (3).

Le rôle des mycoplasmes est plus perceptible dans certaines infections urogénitales chez l'Homme ainsi que leur implication dans les infections néonatales. Face à cela et à l'inaccessibilité financière de la majorité des laboratoires de pays à ressources limitées aux méthodes de diagnostic, des microméthodes d'identification ont été mis au point par l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du Laboratoire de Bactériologie et Virologie de

l'Hôpital Aristide LeDantec. Ces microméthodes permettent aux laboratoires à ressources limitées de disposer des moyens simples, fiables et peu onéreux d'identifications et d'étude de sensibilité aux antibiotiques des mycoplasmes urogénitaux.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer la méthode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques en vue d'une validation. De façon spécifique, c'est d'apprécier de la méthode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux MicroCSB System® et replacer la microméthode parmi les méthodes de sensibilité existantes.

**PREMIERE PARTIE :
REVUE DE LA LITTERATURE**

I. Généralités sur les mycoplasmes

I.1. Taxonomie

Les mycoplasmes sont les plus petits procaryotes connus depuis les travaux de Roux et Nocard en 1898, capables de multiplication autonome en milieu acellulaire contenant du sérum, en donnant des structures très polymorphes (3,4).

D'abord dénommés « Pleuro Pneumonia Like Organisms » (PPLO) et rattachés aux shizomycètes, ces microorganismes sont dotés d'un faible matériel génétique et sont classés parmi les Mollicutes (de mollis cutis : peau molle) Ténéricutes.

Cette classe comporte quatre ordres à savoir :

- les Mycoplasmatales ;
- les Entomoplasmatales ;
- les Acholeplasmatales ;
- les Amieroplasmatales.

L'ordre des mycoplasmatales est constitué d'une seule famille : les *Mycoplasmatacae*. Cette famille est caractérisée par son exigence en stérols et constituée de deux genres :

- *Mycoplasma* constitué de 100 espèces dont 18 espèces humaines (Tableau 1)
- *Ureaplasma* constitué de 6 espèces dont une seule est pathogène pour l'homme : *U.urealyticum* de localisation principalement urogénitale.

Tableau I : Mycoplasmes isolés chez l'Homme (5)

Espèces	Sites d'isolement	
	Oropharynx	Génital
Espèces pathogènes		
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-	+
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+
<i>Ureaplasma spp</i>	-	+
Espèces potentiellement pathogènes		
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+
<i>Mycoplasma penetrans</i>	-	+
<i>Mycoplasma amphoriforme</i>	+	-
Espèces commensales		
<i>Mycoplasma salivarium</i>	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	+	-
<i>Mycoplasma buccale</i>	+	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	+	-
<i>Mycoplasma primatum</i>	-	+
<i>Mycoplasma spermatophilum</i>	-	+
<i>Mycoplasma pirum</i>	?	?

I.2. Marqueurs épidémiologiques

Largement répandus dans la nature, la présence des mycoplasmes dans les voies génitales varie selon de nombreux paramètres. Au moins cinq espèces ont été mis en évidence dans le tracte urogénital humain ; parmi elles on a *M.hominis* et *U.urealyticum* qui sont très fréquentes et responsables entre autres de stérilité chez l'homme et la femme, d'avortement, de faible poids du nouveau-né à la naissance, etc... La difficulté de leur culture et le fait qu'ils peuvent être des commensaux chez la femme et chez l'homme rendent leur diagnostic délicat (6-7).

Chez l'homme

Le seuil de pathogénicité des mycoplasmes est de plus de **10⁴ UFC/ml** (unité formatrice de colonie). Ils ne sont pas recherchés systématiquement dans les examens biologiques sauf si c'est le prescripteur qui le demande **(8)**.

U.urealyticum est l'espèce la plus souvent mise en cause dans les infections masculines. Il est impliqué dans 15 à 20 % des cas d'urétrites non gonococciques (UNG) aiguës ou chroniques. Quant à *M.hominis*, il est retrouvé à l'état saprophyte dans le tractus génital chez 38 % des hommes, et serait responsable d'environ 5% des cas de pyélonéphrite aiguë **(7)**.

Ces bactéries pourraient être à la base des désordres de pH, de mortalité et de concentration du sperme et donc jouer un rôle important dans la stérilité de l'homme **(9)**.

Chez la femme

M.hominis et *U.urealyticum* appartiennent à la flore commensale des voies génitales. Leur présence, intermittente, varie avec de nombreux paramètres. La fréquence d'isolement chez la femme varie selon les études. Elle est cependant plus élevée pour *U.urealyticum* que pour *M.hominis*.

M.hominis est souvent isolé à partir de vaginites non spécifiques. Il intervient probablement avec d'autres agents pathogènes ; l'élévation du pH résultant de l'infection favorise sa multiplication. Il provoquerait 5 à 10% de poussées fébriles post-partum ou post-abortum. *U.urealyticum* serait responsable d'un certain nombre de cas de chorioamniotites et d'avortements **(10)**.

Chez le nouveau-né

Les germes sont isolés des voies urogénitales chez 10-20 % des fillettes et 3-5 % des garçons. Les nouveau-nés s'infectent à la naissance, au moment du passage à travers les voies génitales de la mère. L'infection est en effet moins fréquente après la naissance par césarienne qu'après un accouchement par les voies naturelles. Cette colonisation intéresse aussi bien *U.urealyticum* que *M.hominis* **(10)**.

U.urealyticum est responsable de détresses respiratoires chez les nouveau-nés prématurés fortement hypotrophiques. Les deux espèces de mycoplasmes peuvent provoquer des méningites, en particulier chez des prématurés atteints d'infections respiratoires ou hydrocéphales et des états septicémiques. La présence de ces germes chez la mère peut également augmenter les risques de mortalité et de morbidité des nouveau-nés en passant par une diminution de la durée de la grossesse et un faible poids à la naissance (10).

I.3. Caractères bactériologiques des mycoplasmes

I.3.1. Caractères morphologiques et structuraux

La caractéristique commune des mycoplasmes est l'absence de paroi d'où un aspect polymorphe et l'impossibilité de les mettre en évidence par la coloration de Gram. Cependant ils peuvent être faiblement colorés par le Giemsa, la faible taille du génome particulièrement riche en base adénine-thymine et surtout leur insensibilité totale aux β -lactamines. La microscopie électronique est d'un très grand intérêt car elle montre que ces microorganismes sont des cellules simples, de la forme d'un coccus.

De très petite taille, 300-850 nm, il existe des formes allongées, fusiformes ou filamenteuses longues de 1 μ m et des formes arrondies de 90nm de diamètre. Le diamètre de petits cocci capables de se répliquer est de 300 nm environ. Cette taille leur permet de passer à travers des filtres de porosité 450 nm.

Les mycoplasmes sont en outre entourés d'une membrane plasmique à trois feuilletts. Cette membrane est constituée de lipides, de protéines, de polysaccharides et de lipopolysaccharides. Ils possèdent également de nombreux ribosomes et parfois des corps dont on ne connaît pas la nature exacte (3,4,7,11,12).

I.3.2. Caractères biochimiques

Les mycoplasmes possèdent des caractères biochimiques communs dont des enzymes nécessaires à leur propre synthèse. Ils peuvent donc se multiplier en l'absence de cellules vivantes. Leur système de transport d'électrons est relativement simple.

Ils sont le plus souvent exigeants et nécessitent des milieux complexes et enrichis. Selon leur espèce, certains fermentent le glucose, d'autres hydrolysent l'urée et d'autres l'arginine. Ces propriétés sont utilisées dans le diagnostic biologique et permettent de les différencier (7,11).

Tableau II : Profil métabolique des mycoplasmes

ESPECES	CARACTERES BIOCHIMIQUES		
	GLUCOSE	ARGININE	UREE
<i>Mycoplasma buccale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma faucium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma lipophilum</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma pirum</i>	+	+	-
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	-
<i>Mycoplasma pimatium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma orale</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma salivarium</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma spermophilum</i>	-	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	+

I.3.3. Caractères cultureux

Les exigences nutritionnelles et les conditions de culture des mycoplasmes nécessitent des milieux sélectifs spécifiques préparés à partir d'un milieu de base constitué d'extraits de bœuf, de peptone, du chlorure de sodium et des suppléments minéraux. Il peut être rendu solide par addition d'agar. A ce milieu de base on ajoute :

- du sérum de cheval apportant des protéines naturelles, des lipides non toxiques, du cholestérol non estérifié. Ce cholestérol s'incorpore dans la membrane et leur confère la solidité dans l'environnement.

- de l'extrait de levure qui apporte des vitamines et des ions minéraux.
- de l'arginine pour la croissance de *M.hominis*
- de l'urée pour la croissance de *U.urealyticum*
- des antibiotiques tels la vancomycine et la colistine pour inhiber des contaminants comme des levures.

Il présente un pH ajusté de 7,6 à 8 et contient du rouge de phénol permettant d'apprécier à tout instant de la culture les modifications du pH. Pour favoriser l'identification et l'isolement de mycoplasmes, il est conseillé en outre l'adjonction de cystéine et des cofacteurs (polyvitex) pour améliorer le rendement, la qualité de la culture :

- Le facteur température : les mycoplasmes humains croient entre 36 et 37°C
- La durée d'incubation est de 24 et 48 heures respectivement pour *U.urealyticum* et *M.hominis*

Sur milieu gélosé, après incubation sous atmosphère anaérobie, les mycoplasmes donnent des colonies de 100-300 µm de diamètre ; en forme d'œuf sur plat pour *M.hominis* et 10-50 µm en forme d'oursin pour *U.urealyticum*, visibles au microscope optique (4,6,7,13).

I.4. Facteur de virulence

Les mycoplasmes possèdent différents mécanismes leur permettant d'exercer leur pouvoir pathogène. Ces mécanismes sont plus connus dans le cas de *U.urealyticum*. Parmi les facteurs de virulence on retrouve l'adhérence aux surfaces cellulaires où les mycoplasmes sont rarement présents à l'état libre dans l'organisme ; ils « s'attachent » aux cellules du siège de l'infection (cellules HeLa, spermatozoïdes...). Ces micro-organismes sont étroitement associés aux surfaces muqueuses et une adhérence aux surfaces épithéliales conditionnent leur implantation chez un hôte neuf.

L'adhérence des mycoplasmes aux récepteurs neuraminiques est liée à la température. Ces bactéries instillent leurs déchets toxiques : peroxyde d'hydrogène, ammoniac et enzymes dans la cellule hôte à travers la membrane cellulaire et récupèrent le cholestérol et autres nutriments de la cellule à leur profit créant ainsi une déplétion vitale de la cellule hôte.

U.urealyticum possède des activités enzymatiques variées mais aussi une uréase très puissante, une IgA protéase et une phospholipase toutes intervenant dans un pouvoir pathogène (14, 15)

II. Généralités sur la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques

II.1. Antibiotiques actifs

Les exigences nutritionnelles des mycoplasmes nécessitent des méthodes de sensibilité différentes des méthodes standards recommandées pour la plupart des bactéries.

Les antibiotiques potentiellement actifs sur mycoplasmes et habituellement utilisés en thérapie sont les tétracyclines, les fluoroquinolones et les macrolides. Seules les fluoroquinolones ont un effet bactéricide potentiel. Des concentrations critiques pour les principaux membres de ces trois familles ont récemment été définies par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (16,17).

Cependant la sensibilité des mycoplasmes génitaux (*U.urealyticum* et *M.hominis*) à ces antibiotiques est variable. 5 à 10% des souches de *U.urealyticum* ainsi qu'un pourcentage non défini de souches de *M.hominis* hébergent le gène de résistance "tet M" et résistent aux tétracyclines. Cette résistance est susceptible d'être à l'origine d'échecs thérapeutiques (13).

La résistance des mycoplasmes urogénitaux (*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 sites extra-génitaux chez des immunodéprimés soumis à des pressions thérapeutiques multiples.

II.2. Résistance naturelle

Deux sortes de résistance naturelle sont observées chez les mycoplasmes, l'une commune à toutes les espèces appartenant à la classe des Mollicutes et l'autre spécifique à certaines espèces.

II.2.1. Résistances liées à la classe

Tous les organismes de la classe des Mollicutes résistent aux antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne (β -lactamine, glycopeptides, fosfomycine), structure bactérienne dont ils sont dépourvus. Ils résistent en outre aux polymyxines, aux sulfamides, aux triméthoprime, à l'acide

nalidixique et à la rifampicine. La résistance à cette dernière, étudiée chez un mollicute des plantes, *Spiroplasma citri*, est liée à une mutation naturelle du gène 526 de **rpoB** codant pour la sous-unité β de l'ARN polymérase ADN dépendante, qui empêche la fixation de l'antibiotique cible. *M. hominis* et *Ureaplasma spp.* résistent au linézolide, de la classe des oxazolidinones.

II.2.2. Résistances liées à l'espèce

Cette résistance naturelle concerne essentiellement le groupe macrolides-lincosamides-streptogramines et ketolides (MLSK). Parmi les mycoplasmes humains, *M.genitalium* est naturellement sensible à tous les MLSK, à l'exception de la lincomycine qui présente une activité modeste sur ces deux espèces. *Ureaplasma spp.* est sensible aux macrolides, ketolides, streptogramines mais résistant aux lincosamides. A l'inverse, *M. hominis* résiste aux macrolides ayant un cycle à 14 et 15 chaînons ainsi qu'à l'érythromycine, de la famille des ketolides. Il est sensible à certains macrolides à 16 chaînons (josamycine et midécamycine) et aux lincosamides mais non à la spiramycine, autre macrolide à 16 chaînons (6,16).

II.3. Résistance acquise

Parmi les mécanismes de résistance acquise décrits chez les bactéries, seules des altérations ou protections des cibles de l'antibiotique et mécanismes d'efflux ont été décrits chez les mycoplasmes. Le support génétique de la résistance chez les mycoplasmes peut correspondre à des mutations ou à un transfert de gènes par transposon. Les mycoplasmes se caractérisent par des fréquences de mutation élevées. L'étude de plusieurs génomes de mycoplasmes séquencés a montré la faible quantité d'information génétique dédiée au système de réparation de l'ADN. Ce mécanisme de résistance concerne toutes les classes d'antibiotiques utilisées pour le traitement des infections à mycoplasmes (16).

III. Validation d'une méthode qualitative et évaluation des incertitudes de mesure

III.1. Validation de la méthode

Toute mesure obtenue expérimentalement comporte une incertitude qui fixe les limites de la validité de chaque méthode. La validation analyse et caractérise les méthodes d'essai par rapport à ces limites de

performance. En tenant compte des incertitudes, elle démontre par une traçabilité suffisante et des preuves tangibles qu'une méthode d'essai est appropriée pour remplir les conditions d'une tâche fixée. En général, la validation d'une méthode qualitative et l'évaluation de son incertitude de mesure par comparaison à une méthode de référence, doit comporter les paramètres suivants : la spécificité, la sensibilité, l'exactitude relative, la précision, la conformité statistique, les valeurs prédictives positives et négatives. Pour la comparaison des méthodes qualitatives, on procède selon le tableau suivant (17) :

Tableau III : Tableau de l'évaluation de la performance du test

		Méthode à valider		
		Sensible	Résistant	Total
Méthode de référence	Sensible	a	b	a+b
	Résistant	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	a+b+c+d=n

a : représente le nombre de vraies souches sensibles

b : représente le nombre de fausses souches résistantes

c : représente le nombre de fausses souches sensibles

d : représente le nombre de vraies souches résistantes

n représente le nombre total de résultats d'analyses

III.1.1. Spécificité

La spécificité d'une méthode qualitative décrit la mesure des influences sur la méthode par d'autres microorganismes (micro-organismes non cibles) présents dans un échantillon. Elle se mesure par la formule :

$$Sp = \left[\frac{d}{c + d} \right] 100$$

III.1.2. Sensibilité

La sensibilité désigne la faculté d'une méthode à détecter, dans une même matrice, de faibles variations dans le nombre de micro-organismes présents. Elle se calcule par :

$$Se = [a/(a + b)]100$$

III.1.3. Exactitude relative

L'exactitude est la mesure de l'écart entre la valeur obtenue et la « valeur vraie », et prend en compte l'erreur systématique. Elle est calculée par la formule suivante :

$$E = [(a+d)/(n)100]$$

III.2. Evaluation des incertitudes de mesure

III.2.1. Valeur prédictive positive

La valeur prédictive positive (VPP) d'un test est la probabilité que la personne soit réellement malade si son test est positif. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs chez des personnes atteintes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est positif ($a/a+c$). La formule de Bayes permet de calculer la VPP d'un test en fonction de sa sensibilité (SE), de sa spécificité (SP) et de la prévalence de la maladie (P).

$$VPP = \frac{Se \times P}{Se \times P + (1 - P)(1 - Sp)}$$

III.2.2. Valeur prédictive négative

La **valeur prédictive négative (VPN)** d'un test est la probabilité que la personne n'ait pas la maladie si son test est négatif. C'est le nombre de vrais négatifs (tests négatifs chez des personnes indemnes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes dont le test est négatif ($d / b+d$) **(18)**.

$$VPN = \frac{Sp \times P}{Sp \times P + (1 - P)(1 - Se)}$$

**DEUXIEME PARTIE :
ETUDE EXPERIMENTALE**

I. Objectifs

- Objectif général

L'objectif de notre étude est d'évaluer la méthode d'étude de la recherche de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux aux antibiotiques en vue d'une validation.

- Objectifs spécifiques
 - Apprécier la méthode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux MicroCSB System®.
 - Replacer la microméthode parmi les méthodes de sensibilité existantes

II. Cadre de l'étude

Ce travail a été effectué au niveau de l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide LeDantec (HALD) et au niveau du Laboratoire de Bactériologie-Virologie fondamentale et appliquée de l'UCAD II.

Matériel

III.1. Souches bactériennes

Elle a porté sur 6 souches de *M.hominis* et 13 *U.urealyticum* toutes identifiées à partir des prélèvements urétraux et vaginaux de patients reçus à l'HALD et l'Institut Pasteur de Dakar (IPD).

III.2. Matériels de préparation des milieux

- balance de précision
- agitateur magnétique
- pH-mètre
- flacons en verre avec bouchon à vis de 2, 50 et 100 ml
- seringues
- filtres de 0,2 µm de diamètre
- erlenmeyer

- embouts stériles
- micro pipettes
- autoclave
- hotte à flux laminaire
- papier emballage
- appareil de scellage
- bec bunsen

III.3. Matériels de transfert et de conservation des souches

- cryotubes à billes
- tubes à visse
- tubes nunc
- écouvillons
- portoir

III.4. Matériels de préparation des antibiotiques

- micro plaques
- micro pipettes de 10 μ l, 1000 μ l
- embouts
- four à micro-onde
- hotte à flux laminaire
- tubes à essai pour les dilutions
- eau distillée stérile
- filtres
- seringues
- bec bunsen

III.5. Réactifs et Antibiotiques

- **Bouillon A3 pour ATB** : milieu de conservation et de transport des mycoplasmes.
- Milieu de base PPLO

- Extrait de levure 10
- Sérum de cheval
- Isovitalex ou PVS
- VCN
- Eau distillée
- Urée
- Rouge de phénol
- Arginine
- PPLO Agar base Mycoplasma
- Chlorhydrate de cystéine
- Pénicilline (500.000 U/ml)
- Tétracyclines, Erythromycine, Lincomycine, Ciprofloxacine et Lévofloxacine

III. Méthodologie

IV.1. Principe

L'étude de la sensibilité aux antibiotiques a consisté à ajouter et préparer des solutions d'ATB de deux concentrations critiques : concentration critique supérieure (C.C.S) et inférieure (C.C.I) permettant d'étudier la sensibilité des souches de mycoplasmes urogénitaux identifiées et isolées. Après une incubation de 18 à 24 heures voir 48h à 37°C, la croissance bactérienne a été décelée grâce au virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

IV.2. Préparation des milieux

Deux types de bouillons A₃ ont été préparés : l'un sans indicateur pour la conservation et le transport des souches et l'autre pour l'antibiogramme contenant de l'indicateur coloré puis conservés à 4°C. (Voir annexes)

IV.3. Préparation des solutions des antibiotiques

Il est basé sur la préparation d'une solution mère 100 fois plus concentrée que la concentration critique supérieure initiale (STCCS) de l'antibiotique dans le solvant considéré. Les masses d'antibiotiques à peser dépendent de leur activité et elles étaient dissoutes dans le volume de

solvant stérile exigé pour obtenir la concentration de la solution mère qui était conditionnée en cryotubes puis conservée à -70°C .

L'activité d'un antibiotique est le principe actif (en μl) contenu dans 1 mg de produit et nous avons utilisé la formule suivante pour la préparation :

$$\text{Masse à peser (mg)} = \frac{V(\text{ml}) \times C(\text{mg/ml})}{\text{Activité } (\mu\text{g/mg})}$$

Tableau IV : Préparation des solutions d'antibiotiques pour l'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux

Antibiotiques	CCI $\mu\text{g/ml}$ (1)	CCS $\mu\text{g/ml}$ (2)	CSM g/l (3)	Vol SM (ml)	Assay potency (mg/g) (4)	Masse à peser (mg)	Solvants diluants	CST (CCI) g/l (5)	CST (CCS) g/l (5)	Dilution CCS/CCI (6)
Erythromycine	1	4	8	2	952	16,8	Eau distillée	0,02	0,08	1/4
Lincomycine	2	8	16	1	999	16	Eau distillée	0,04	0,16	1/2
Ciprofloxacine	1	4	8	2	931,6	17,2	Eau distillée	0,02	0,08	1/4
Lévofloxacine	1	4	8	1	999	8	Eau distillée	0,02	0,08	1/4
Tétracycline	4	8	16	1	1000	16	Eau distillée	0,08	0,16	1/2

C.C.S: Elle a été obtenue par une dilution au 1/100 de la solution mère contenant la quantité requise d'ATB avec le diluant approprié et une dilution ultérieure au $\frac{1}{2}$ par le bouillon **A₃ ATB** utilisé dans la cupule

C.C.I : Elle a été obtenue pour chaque antibiotique en faisant une dilution de la C.C.S. Cette dilution a été fonction de la C.C.S. et de la C.C.I de l'antibiotique.

- l'assay potency a été vérifié pour chaque lot de produit pour en déduire la masse à peser
- faire en sorte que les volumes de STCCS et STCCI soient égaux ou très proches pour minimiser les pertes.

IV.4. Contrôle de qualité des milieux et des antibiotiques

Des contrôles de stérilité et d'efficacité ont été effectués sur chaque milieu préparé.

- **Contrôle de stérilité**

Avant son utilisation, deux millilitres (2ml) du milieu d'étude de la sensibilité ont été prélevés et déposés dans un tube à hémolyse stérile puis incubé sans inoculum pendant 24 heures à 37°C. Le milieu est considéré comme stérile s'il y a absence de virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol).

- **Contrôle d'efficacité**

Deux millilitres (2ml) du milieu A₃ ATB ont été prélevés et déposé dans deux tubes à hémolyse stériles puis ensemencés avec des souches de contrôle (tableau 5) et enfin incubés à 37°C à l'étuve pendant 24 heures. Les milieux étaient considérés efficaces en présence ou non de virage de l'indicateur coloré selon la souche de contrôle.

Tableau V : Souches de contrôle (17)

Substrats	Témoins positifs	Témoins négatifs
UREE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Escherichia coli</i>
ARGININE	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Escherichia coli</i>

IV.5. Mode opératoire de la réalisation de la microplaque pour l'étude de la sensibilité des souches

IV.5.1. Distribution et déshydrations des solutions d'antibiotiques

Pour chaque ATB, un volume de **100µl** de la solution mère (SM) a été distribué dans les cupules et différents volumes du bouillon A₃ ATB ont été ajoutés afin d'obtenir les CCS et CCI recommandées tout en laissant **100µl** de la dilution dans les cupules. (Voir tableau 5)

Tableau VI : Dilution des antibiotiques

	Erythromycine	Lincomycine	Ciprofloxacine	Tétracycline	Lévofloxacine
CCI	100µl _{ATB}				
	+	+	+	+	+
	100µl _{A3}				
CCS	100µl _{ATB}				
	+	+	+	+	+
	300µl _{A3}	300µl _{A3}	300µl _{A3}	100µl _{A3}	300µl _{A3}

Après répartition dans les cupules, les milieux liquides ont été déshydratés à l'étuve pendant 48 heures à une température de 37°C en présence de dessiccateur afin de permettre une déshydratation totale.

IV.5.2. Contrôles de qualité des plaques déshydratées

- **Contrôle de stérilité**

Ce test a consisté à mettre en évidence l'absence de contamination des milieux. Les cupules ont été inoculées avec de l'eau physiologique, puis recouvertes d'huile de paraffine avant d'être incubées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

- **Contrôle d'efficacité**

Ce test a été réalisé afin de s'assurer que les milieux n'ont pas été dénaturés lors de la déshydratation. Ainsi nous avonsensemencé les milieux déshydratés à partir des souches de *M.hominis* et *U.urealyticum* déjà identifiées.

100 µl de chaque inoculum ont été distribués dans les cupules contenant les antibiotiques déshydratés et dans deux cupules servant de témoin de croissance, c'est-à-dire exempt d'antibiotiques. (Voir tableau 8) Les cupules ont été ensuite recouvertes d'huile de paraffine afin de créer les conditions d'anaérobiose et incubées à 37°C pendant 24 à 48 H.

Tableau VII : Inoculation des plaques

	Témoin de croissance	Erythromycine	Lincomycine	Ciprofloxacine	Tétracycline	Lévofloxacine
CCI	200µl I	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}
		+	+	+	+	+
		100µl I	100µl I	100µl I	100µl I	100µl I
CCS	200µl I	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}	100µl _{ATB}
		+	+	+	+	+
		100µl I	µ100µl I	100µl I	100µl I	100µl I

I : inoculum

IV.5.3. Lecture et interprétation

La lecture a été faite à l'œil nue au bout de 24 à 48 h d'incubation à 37°C. Il s'agissait de vérifier s'il y avait croissance ou non dans les cupules. En fonction de cela, nous avons pu catégoriser les souches sensibles, intermédiaires ou résistantes. Selon le changement de coloration du milieu initial, les souches étaient considérées comme :

- **Sensible** : milieu rose framboise dans les cupules supérieure (CCS) et inférieure (CCI)
- **Intermédiaire** : cupule supérieure (CCS) : jaune et cupule inférieure (CCI) : rose framboise.
- **Résistante** : couleur jaune dans les cupules supérieure et inférieure

IV.5.4. Validation de la méthode

Pour la validation de notre méthode, nous avons mesuré des paramètres tels que la spécificité, la sensibilité, l'exactitude relative, la précision, la conformité statistique, les taux de faux-positifs et faux-négatifs. Afin d'y parvenir nous avons effectué une comparaison avec une méthode de référence qui nous permet de savoir si les souches sont vraiment sensibles ou résistantes aux molécules.

IV.5.4.1. Spécificité

Dans le cadre de cette étude, la spécificité mesurée donne le pourcentage de toutes les vraies souches résistantes; les souches intermédiaires ont été considérées comme résistantes. Cette spécificité désigne la faculté de la microméthode de ne pas identifier de souches sensibles lorsqu'elles ne sont pas identifiées par la méthode de référence (Mycoplasma IST2).

IV.5.4.2. Sensibilité

Pour notre étude la sensibilité calculée donne le pourcentage de toutes les souches sensibles qui sont reconnues comme sensibles. Cette sensibilité désigne la faculté de la microméthode, en comparaison avec la méthode Mycoplasma IST2, d'identifier les souches sensibles lorsqu'elles sont aussi identifiées par la méthode de référence (Mycoplasma IST2).

IV.5.4.3. Exactitude relative

Pour la validation de notre méthode, l'exactitude relative exprime le degré de concordance des résultats obtenus entre la microméthode et la méthode de référence Mycoplasma IST2. Elle donne la probabilité que les deux méthodes de comparaison donnent les mêmes résultats.

IV.5.4.4. Précision

La précision décrit les écarts aléatoires des valeurs autour d'une moyenne. La précision de répétabilité (r) correspond à la comparaison de résultats provenant de mesures répétées du même échantillon homogénéisé dans les mêmes conditions (mêmes personnes, laboratoires, équipements, réactifs, conditions d'environnement). Lors de l'évaluation de la répétabilité, le

même échantillon contenant une quantité de souches dans le domaine de mesure a été analysé 5 fois dans les mêmes conditions et cela pour chaque souche. Elle se calcule par :

$$r = x / n$$

x = nombre de résultats concordants dans des conditions de répétabilité

n = nombre de mesures ; la limite de détection est fixée à $r = 0,5$

IV.5.4.5. Concordance statistique

Pour l'évaluation statistique de notre méthode nous avons procédé à la détermination de l'indice de concordance kappa. L'index de concordance kappa mesure la concordance entre la microméthode et Mycoplasma IST2. Elle se calcule de la manière suivante :

$$\text{Kappa} = 2 (ad - bc) / [(a + c)(c + d) + (a + b) (b + d)].$$

La concordance est évaluée suivant la valeur kappa ci-après :

Si Kappa compris entre 0,10 – 0,40 la concordance est faible

Si Kappa compris entre 0,40 – 0,60 la concordance est nette

Si Kappa compris entre 0,60 – 0,80 la concordance est forte

Si Kappa compris entre 0,81 – 1,00 la concordance est presque complète

Résultats

Nous avons eu à tester 19 souches dont 13 de *U.urealyticum* et 6 de *Mycoplasma hominis*. Ces souches ont été sélectionnées du lot de souches identifiées, isolées et titrées. Nous avons eu à choisir les isolats dont les titres ont été supérieurs à 10^4 UCC/ml afin de respecter les normes de l'antibiogramme des mycoplasmes. Deux lectures ont été effectuées à 24h et 48h.

Cette étude a été réalisée en comparant simultanément les résultats obtenus de Mycoplasma IST2 Biomérieux et ceux obtenus par microméthode MicroCSB System®. Les lectures ont été différées de 24h à 48h. La comparaison a porté sur cinq antibiotiques appartenant à trois différentes familles : (les cyclines, les macrolides, les quinolones). Les souches intermédiaires ont été considérées comme résistantes.

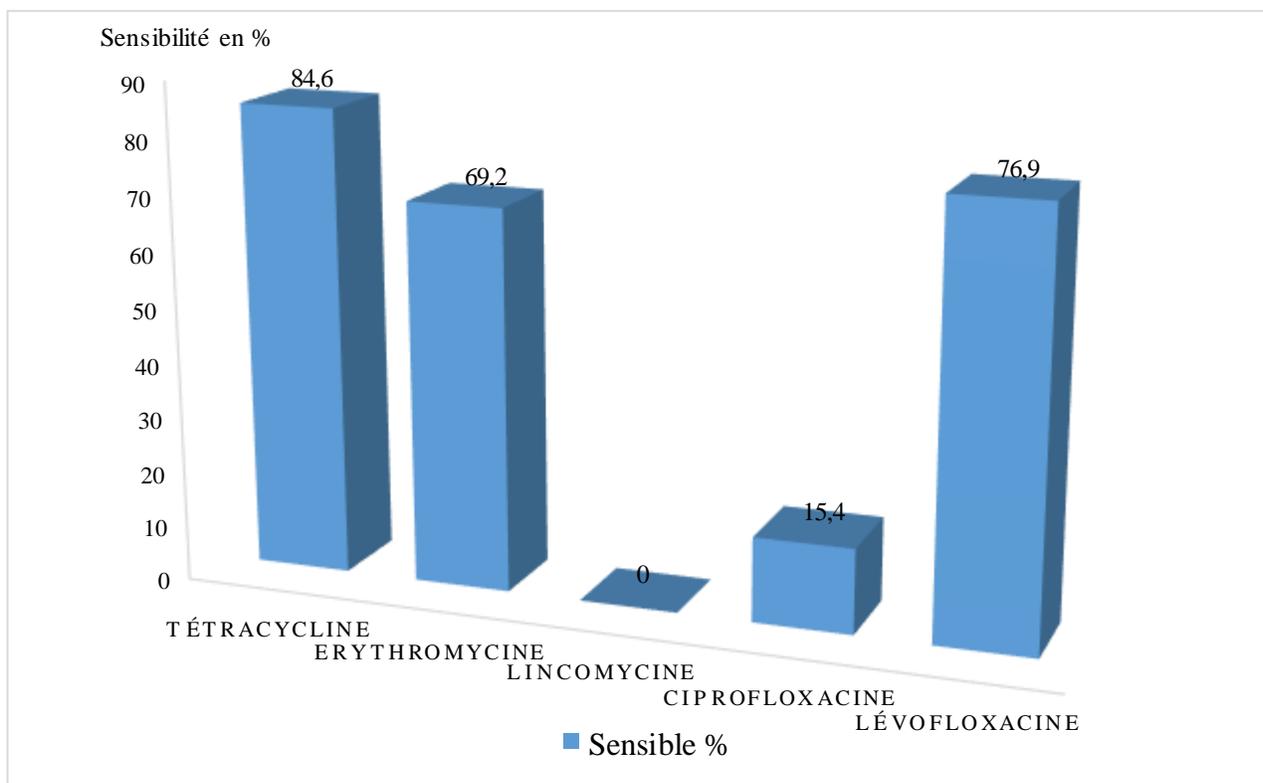


Figure 1: Résultat de l'étude de la sensibilité des souches de *U.urealyticum* par microméthode (N=13)

- **Les quinolones**

Les quinolones étudiées ici sont la ciprofloxacine et la lévofloxacine. Pour la ciprofloxacine, nous avons obtenu 15,4% de souches sensibles. Quant à la lévofloxacine, 76,9% des souches sont sensibles.

- Les cyclines

Seule l'activité de la tétracycline a été testée et il y ressort 84,6% de souches sensibles.

- Les macrolides

L'érythromycine a donné 69,2% de souches sensibles.

Nous remarquons de façon générale, une meilleure activité de la tétracycline et la lévofloxacine sur des souches de *U.urealyticum*.

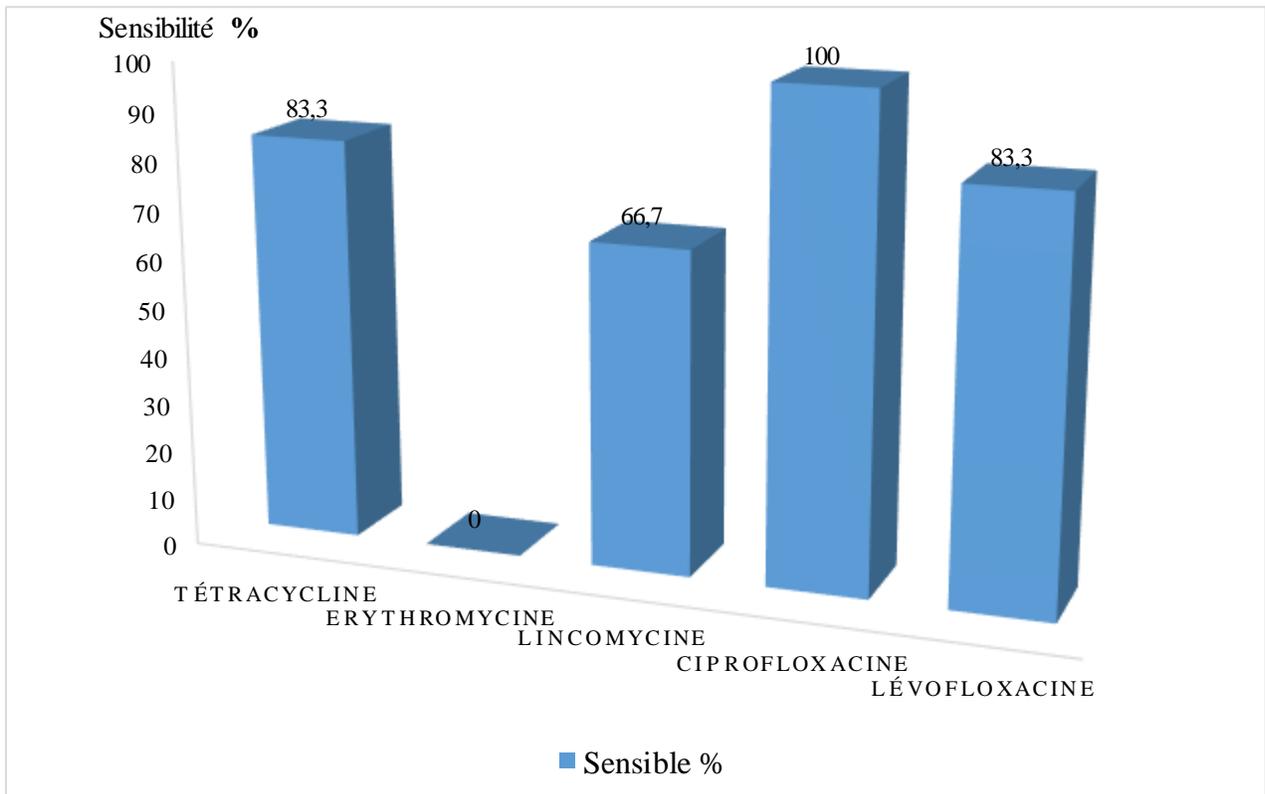


Figure 2 : Résultat de l'étude de la sensibilité des souches de *M.hominis* par Microméthode (N=6)

- Quinolones

Toutes les souches de *M.hominis* étudiées ont été sensibles à la ciprofloxacine (100%). Par contre, la lévofloxacine n'a été efficace que sur 83,3 % des souches.

- Cyclines

Pour la seule molécule testée, nous avons noté une sensibilité de 83,3% sur les souches.

- Les macrolides

L'érythromycine est inactive sur *M.hominis*. Nous avons noté une résistance totale. Quant à la lincomycine, nous avons obtenu 66,7% de souches sensibles.

On note globalement une meilleure activité de la Ciprofloxacine sur les souches de *M.hominis* (100%).

Tableau VIII: Résultats de l'évaluation de MicroCSB System®

		MicroCSB System®		Total
		Sensibles	Résistants	
Mycoplasma IST2	Sensibles	29 (50,9%)	2 (3,5%)	31 (54,4%)
	Résistants	1 (1,7%)	25 (43,8%)	26 (45,6%)
Total		30 (52,6%)	27 (47,4%)	57 (100%)

En considérant que l'index de notre échantillon est supérieur ou égal à 0,5, l'évaluation des résultats de la microméthode comparés à ceux de la méthode Mycoplasma IST2 a été effectuée. Nous constatons 50,9% de vraies souches sensibles et 45,6% de vraies souches résistantes. Nous

notons également 3,5% de fausses souches résistantes et 1,7% de fausses souches sensible à la microgalerie MicroCSB System®.

Tableau IX: Résultats de l'analyse de la performance de la Microméthode MicroCSB System® par rapport à la Galerie Mycoplasma IST2 (Biomérieux®)

Indicateurs	Valeurs (%)
Spécificité	96,15
Sensibilité	93,55
Exactitude relative	94,74
Index de concordance kappa	0,89
Valeur prédictive négative	92,59
Valeur prédictive positive	96,67

En se basant sur l'intervalle de confiance fixé à 95% pour la validation d'un test, la spécificité a été de 96,15% et 93,55% pour la sensibilité. L'exactitude relative entre la microméthode et la méthode de référence a été de 94,74% pour les deux espèces. L'index de concordance kappa était de 0,89.

Tableau X: Récapitulatif du test répétabilité de la microméthode System®

	Test ₁		Test ₂		Test ₃		
	S	R	S	R	S	R	
Erythromycine	2	1	2	1	2	1	
Tétracycline	3	0	3	0	3	0	
Ciprofloxacine	1	2	1	2	1	2	
Lincomycine	1	2	1	2	1	2	
Lévofloxacine	3	0	3	0	3	0	
Répétabilité	100%						

L'évaluation de la répétabilité obtenue par trois lots de tests pour les souches de mycoplasme a donné le même résultat (100%).

Discussion

Un total de 19 souches de *M.hominis* et *U.urealyticum* ont été inclus dans cette étude. Les résultats de cette étude indiquent que pour les quinolones *U.urealyticum* présente 84,6% de souches résistantes à la ciprofloxacine et 23,1% de souches sont résistantes à la lévofloxacine. Par contre aucune souche de *M.hominis* n'est résistante à la ciprofloxacine. Ces résultats sont comparables à ceux de Min Young Lee et coll. en 2016 qui montre une résistance de 62,1% à la ciprofloxacine et aucune résistance pour *M.hominis* (20). Concernant les cyclines, 15,4% de souches de *U.urealyticum* sont résistantes à la tétracycline seule molécule testée ; *M.hominis* présente 16,7% de résistances. Ceci rejoint les études de BEBEAR et coll. en 2007 qui affirme que certains *U.urealyticum* ont acquis une résistance génétique à la Tétracycline grâce à une mutation génique Tet(M) (21).

Quant aux macrolides, *U.urealyticum* présente une faible résistance de 30,8% à l'érythromycine et 69,2% de souches sensibles à l'opposé de la lincomycine avec une totale résistance pour la même souche. Des fréquences de résistances plus basses ont été rapportées par DJIGMA et coll. en 2008 soit 6,3 % à l'érythromycine (22). Cette molécule est efficace sur *U.urealyticum* mais ne présente aucune activité sur *M.hominis*. Avec la lincomycine, 66,7% de *M.hominis* sont restés sensibles et 33,3% de souches résistantes. Nos résultats sont comparables à ceux de SOW et coll. (2000) à Dakar dont les échantillons présentaient une sensibilité à la lincomycine (70,0 %) (23). Ceci démontre une faible activité des quinolones sur les mycoplasmes contrairement aux cyclines.

En outre, les résultats de l'évaluation de notre test montrent 50,9% de vraies souches sensibles et 45,6% de vraies souches résistantes aux molécules d'ATB. Nous notons également 3,5% de fausses souches résistantes et 1,7% de fausses souches sensible à la microgalerie MicroCSB System® ; avec une sensibilité de 93,55% et une spécificité de 96,16%. Ces résultats sont similaires à ceux de Tiziana et coll. en 2017, qui ont montré une sensibilité de 95,3% pour *Mycoplasma* IT2 (24). Ceci démontre la grande capacité du test à identifier des souches sensibles et ceux résistantes.

L'exactitude relative entre la microméthode et la méthode de référence calculée a donné 94,74%. L'index de concordance trouvé indique que la concordance des résultats de la microméthode MicroCSB System® était presque complète à ceux de Mycoplasma IST2. Cela montre l'utilisation du test sans risque de contamination et de résultat discordant pour un même patient. Le test peut être donc réalisé dans la plupart des laboratoires de diagnostic et ne nécessite pas une expertise particulière.

Pour le test de répétabilité, la limite de détection doit être inférieure ou égal à 0,5 pour valider la méthode (17). La précision du test de répétabilité était de 100% ; ce qui montre la qualité des résultats et de la méthode.

Ces performances analytiques sont excellentes. Cette méthode simple, qui ne nécessite pas un grand matériel permet une bonne étude de sensibilité des mycoplasmes urogénitaux et est appelée à s'implanter dans tous les laboratoires de bactériologie.

RECOMMANDATIONS

Il serait intéressant de :

- Effectuer d'autres tests de validation méthodologique réalisés dans plusieurs laboratoires avec une augmentation de la taille de l'échantillonnage pour une meilleure spécificité soit 99% c'est-à-dire avec un risque de 1% de se tromper.
- Mettre à jour les concentrations des antibiotiques aux recommandations du CA-SFM.
- Réduire la durée de lecture du résultat.
- Augmenter le nombre d'antibiotiques testés pour élargir le choix dans la thérapie.

CONCLUSION

En raison du rôle pathogène avéré des mycoplasmes dans les infections urogénitales, des méthodes de diagnostic rapides et efficaces sont indispensables pour traiter les infections et minimiser les complications. La présente étude est la première à comparer MicroCSB System® avec d'autres tests disponibles sur le marché pour la recherche de sensibilité des mycoplasmes dans des échantillons cliniques génitaux.

Le test s'est révélé très sensible et spécifique. Il offre l'avantage de pouvoir être réalisé dans tous les laboratoires de bactériologies car permettant d'obtenir des résultats fiables sans aucun automate avec des performances analytiques excellentes. Cependant, cette étude présente de mineures limites étant réalisée dans un seul laboratoire. Des réflexions doivent se poursuivre pour arriver à une amélioration de diagnostic plus fiable.

REFRENECES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **BLIGNY E.**, (2012) Le point sur les mycoplasmoses des ruminants. École nationale vétérinaire d'alfort.
2. **RAZIN S., HAYFLICK L.**, (2010) Highlights of mycoplasma research --an historical perspective. *Biologicals: Journal of Biological Standardization*. 38, 183-190.
3. **ALCARAZ I, DUPIN N, JANIER M, DERANCOURT CH, PELLETIER F, MILPIED B.**, (2006) Mycoplasmes génitaux. In: *Annales de dermatologie et de vénéréologie*: Elsevier Masson; p. 17–18.
4. **DIOH H.D.**, (1998) Standardisation et évaluation de mièrométhodes d'identification et d'étude de la sensibilité aux antibiotiques de différentes espèces de Mycoplasmes. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 54: 4-5
5. **BEBEAR C., BEBEAR C.M.**, (2007) Infections humaines à mycoplasmes. *Revue Francophone des Laboratoires*. (391):63–69.
6. **WENDKUUNI FLORENCIA D.**, (2009) Co-infection de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum* avec le virus de l'immunodéficience humaine chez les femmes VIH séropositives à Ouagadougou.
7. **KONATE D.**, (2001) Standardisation, optimisation et évaluation d'une micromethode d'étude de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux. Université Cheikh Anta Diop de Dakar. 84:15-16.
8. **BOUDRY P.**, (1998) Mycoplasmes urogénitaux. Implications en pathologies humaines.
9. **ZIZENDORF NY., KOUASSI-AGBESSI BT., LATHRO JS., et coll.**, (2008) *Ureaplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* infections and semen quality of infertile men in Abidjan. *J. of Rep. and Contr.* 19: 65-72.
10. **MIRNEJAD R., AMIRMOZAFARI N., KAZEMI B.** 2011. Simultaneous and rapid differential diagnosis of *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* based on a polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 29 (1):33-36.

11. **EB F., ORFILA J.**, (1985) Mycoplasmes génitaux. Rôle pathogène et diagnostic. Médecine et maladies infectieuses. 15(9):491–494.
12. **PEREYRE S, BEBEAR CM, BEBEAR C.**, (2001) Les mycoplasmes en pathologie humaine. Revue Française des Laboratoires. (329):34–36.
13. **WENDKUUNI FLORENCIA D.**, (2011) Caractérisation moléculaire des papillomavirus humains et leurs co-infections avec les mycoplasmes chez les femmes VIH-séropositives et négatives à Ouagadougou. Université de Ouagadougou.
14. **BERCHE P. GAILLARD JL. SIMONET M.**, (1988) Les mycoplasmes et formes L des bactéries Bactériologie: bactéries des infections humaines. Ed. Flammarion, Médecine-Sciences, Paris, 53: 506-513
15. **SARA EO.**, (2014) Mycoplasmes: Caractéristiques et impact pathologique. Université Mohammed V-Souissi. N°24.
16. **BEBEAR C., DE BARBEYRAC B., PEREYRE S., BEBEAR CM.**, (2004) Résistance aux antibiotiques chez les mycoplasmes et les chlamydiae. Antibiotiques. 6(4): 263–272.
17. **SERVICE D'ACCREDITATION SUISSE.** (2017) Guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement. Vol. rév. 04.
18. **YASSAULT A., DUMONT G., LABBE M.**, (1992) Définition des critères de qualité d'une méthode d'analyse : le moniteur internet. 26 : 20 - 33.
19. **AMADOU D. ABDOULAYE D. FATOU BINTOU G. AMY S. CHEIKH SAAD-BOU B.**, (2013) Coffret d'identification des mycoplasmes. URBM/MON/Id.MYCO.
20. **MIN YOUNG L., MYEONG HEE K., WOO IN L., SO YOUNG K., YOU LA J.** (2016) Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women. Yonsei Med J.
21. **BEBEAR C.M., DE BARBEYRAC B., PEREYRE S., BEBEAR C.**, (2007) Mycoplasmes et chlamydiae: sensibilité et résistance aux antibiotiques. Revue francophone des laboratoires. (391):77–85.

22. **DJIGMA F., OUEDRAOGO C., OUERMI D., BISSEYE C., SAGNA T., ZEBA M.,** (2008) Co-infection de *Mycoplasma hominis* et d'*Ureaplasma urealyticum* chez les femmes séropositives au VIH à Ouagadougou. Science et technique, Sciences de la santé. Vol. 31.
23. **SOW A.I., DIALLO Y., EL HADI A.D., SAMB A.,** (2000) Sensibilité in vitro aux antibiotiques de 178 souches de mycoplasmes génitaux isolées chez des consultantes en gynécologie à Dakar. 93(1):6–7.
24. **TIZIANA D., GIULIA D., BARBARA F. et coll.,** (2017) Comparison of Mycoplasma IES, Mycofast Revolution and Mycoplasma IST2 to detect genital mycoplasmas in clinical samples. Institute of Microbiology, Catholic University. J Infect Dev Ctries. 11(1):98-101.

ANNEXES

Préparation des milieux

Milieu de base : Prélever dans l'erenmeyer

- Bouillon PPLOR 3g
- Eau distillée 100 ml

Chauffer le mélange sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant une minute de manière à dissoudre parfaitement la poudre. Ajuster le pH entre 6,1 – 6,3

Transvaser dans un flacon en verre avec bouchon à vis 100 ml puis mettre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. A la fin du cycle, laisser refroidir jusqu'à 60°C.

Bouillon A3 pour sensibilité : Milieu de conservation et de transport

Pour un flacon de 100 ml :

Milieu de base PPLO	80ml
Sérum de cheval	20ml
Extrait de levure 10%	0,4ml
Chlorhydrate de cystéine à 4%	0,25ml
Isovitalex	1ml
VCN	1ml
Urée 10%	1ml
Arginine à 20%	1ml

Homogénéiser le mélange puis le filtrer dans un flacon de 100ml stérile.

Au milieu de base autoclavé, ajouter les réactifs homogénéisés et filtrés pour avoir le milieu complet.

Le milieu obtenu a été réparti dans des tubes à vis sous un volume de 2ml et conservé à 4°C pendant 3 semaines ou à -20°C pendant 1 an.

Milieu de transport A3 : Pour l'antibiogramme des souches

Milieu de base PPLOR (pH = 7,8 ± 0,2)	80 ml
Sérum de cheval	20 ml
Chlorhydrate de cystéine à 4%	0,25 ml
Pénicilline (solution à 500.000 U/ml)	1 ml
VCN	1 ml
Extrait de levure 10%	0,4 ml
Mélange Polyvitex	1 ml
Rouge de Phénol 1%	0,1 ml

- ☞ Ajouter stérilement les différents composants au milieu de base
- ☞ Filtrer le mélange
- ☞ Répartir en tubes à hémolyse stériles sous un volume de 15 ml
- ☞ Conserver :
 - à +4°C pendant 3 semaines
 - à -20°C pendant 1 an

MICRO-METHODS : EVALUATION POUR LA VALIDATION DE LA METHODE D'ETUDE DE LA SENSIBILITE DES MYCOPLASMES

RESUME

L'étude de la sensibilité des mycoplasmes aux antibiotiques ne se fait que timidement dans les laboratoires des pays en développement. Leur implication est plus perceptible dans certaines infections urogénitales et néonatales. De ce fait, ces bactéries n'ont cessé de faire objet des études scientifiques. Des méthodes de diagnostic ont été mises au point mais certaines demeurent encore non validées. La présente étude vise à évaluer la méthode de recherche de la sensibilité des mycoplasmes urogénitaux MicroCSB System® en vue de sa validation.

19 souches de mycoplasmes (6 souches de *M.hominis*) et (13 souches de *U.urealyticum*) identifiées, à partir des prélèvements urétraux et vaginaux de patients reçus à l'HALD et l'IPD ont été incluses dans cette étude. Plusieurs paramètres ont été étudiés afin de permettre la validation de la méthode. Nous avons évalué les performances en laboratoire de la microméthode MicroCSB System® par rapport à Mycoplasma IST2. Chaque souche a été testée en parallèle à la méthode de référence.

Il en ressort que pour les quinolones, *U.urealyticum* présente 84,6% de résistance à la ciprofloxacine et 23,1% à la lévofloxacine. Quant aux cyclines 15,4% de souches de *U.urealyticum* sont résistantes à la tétracycline; *M.hominis* présente 16,7% de résistances. Concernant les macrolides, *U.urealyticum* présente une résistance de 30,8% à l'érythromycine. La sensibilité et la spécificité étaient respectivement de 93,55% et 96,15%. Cette méthode est équivalente à Mycoplasma IST2 déjà commercialisé basé sur une identification rapide, simple et précise ne nécessitant pas un grand matériel pour une bonne étude de sensibilité des mycoplasmes urogénitaux, particulièrement attrayant pour les pays en développement. Au terme de cette étude, nous validons la méthode. Cependant nous recommandons qu'une étude avec un échantillonnage plus grand pendant une durée plus avancée soit envisagée pour de meilleures performances.

Mots clés : *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma Urealyticum*, sensibilité, spécificité, MicroCSB System®

ABSTRACT

The susceptibility of mycoplasma to antibiotics is only tentatively studied in laboratories in developing countries. Their involvement is more noticeable in some urogenital and neonatal infections. As a result, these bacteria have continued to be the subject of scientific studies. Diagnostic methods have been developed but some are still not validated. The purpose of this study is to evaluate the MicroCSB System® urogenital mycoplasma sensitivity testing method for validation.

19 strains of mycoplasma (6 strains of *M.hominis*) and (13 strains of *U.urealyticum*) identified, from urethral and vaginal specimens from patients received at HALD and IPD were included in this study. Several parameters were studied in order to validate the method. We evaluated the laboratory performance of the MicroCSB System® micromethod against Mycoplasma IST2. Each strain was tested in parallel with the reference method.

Translated with www.DeepL.com/Translator It shows that for quinolones, *U.urealyticum* has 84.6% resistance to ciprofloxacin and 23.1% to levofloxacin. As for cyclins, 15.4% of *U.urealyticum* strains are resistant to tetracycline; *M.hominis* has 16.7% resistance. Concerning macrolides, *U.urealyticum* has a resistance of 30.8% to erythromycin. Sensitivity and specificity were 93.55% and 96.15% respectively. This method is equivalent to Mycoplasma IST2 already marketed based on rapid, simple and accurate identification not requiring large equipment for a good sensitivity study of urogenital mycoplasma, particularly attractive for developing countries. At the end of this study, we validate the method. However, we recommend that a study with a larger sample over a longer period of time be considered for better performance.

Keywords: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma Urealyticum*, sensitivity, specificity, MicroCSB System