

UNIVERSITE CHEIKH ANTA DIOP DE DAKAR
FACULTE DE MEDECINE, DE PHARMACIE ET D'ODONTOLOGIE



ANNEE 2018

N° 95

Optimisation et validation d'une méthode d'identification des mycoplasmes urogénitaux (*Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*)

MEMOIRE

Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée

PRESENTE ET SOUTENU

Le 27 Juin 2018

Par

Sètondji Islamiath KISSIRA de nationalité BENINOISE

MEMBRES DU JURY

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

Dédicaces et remerciements

Par la grâce de Dieu tout puissant je dédie ce travail :

- A ma fille **Amirath Marie-Diana KOUDOKPON**, puisse l'Eternel t'accorder tout le bonheur de ce monde afin que joie, paix prospérité et santé puisse être ton quotidien.
- Pour cette occasion particulière, je tiens à remercier :
 - **Ma très chère mère Rita Marthe SINSIN et à mon père Issah KISSIRA**, pour qu'ils y voient la consécration de tous les efforts consentis à mon égard depuis tant d'années. Merci pour l'amour et l'éducation que vous m'avez donné.
 - **Ma sœur Nadiath KISSIRA**, ton soutien et tes prières ont porté fruit. Trouves en ce travail mon amour et mes sincères remerciements.
 - **Mon très cher Oncle Brice Augustin SINSIN**, Tonton en plus de m'avoir donné le goût de la recherche, tu m'as accompagné et soutenu dans ce chemin que j'ai choisi. Puisse Dieu t'accorder la longévité afin que tu me vois plus haut. Merci tonton.
 - **Ma maman Cathérine COOVI**, pour son soutien indéfectible. Sincères remerciements.
 - **Mes frères Relewane, Fahad, Amour-Hadil KISSIRA et mes nièces Liinath et Faiqoth BOUSSARI**, votre soutien et vos prières ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Recevez ici mes sincères remerciements.
 - **Charles Hornel KOUDOKPON**, que puis-je te dire que tu ne sais déjà ? Merci pour les sacrifices consentis et ton soutien inexprimable.
 - **Mon très cher Gervais TOKPOHOZIN**, tu as été plus que présent durant mon parcours. Reçois ici l'expression de ma profonde gratitude. Sois bénis.
 - **Le couple Julie et Arsène KPANGON et leurs enfants**, ma famille d'adoption, je manque de mots pour vous témoigner ma gratitude. Soyez bénis.
 - **Les Docteurs Jean-Robert KLOTOE, Victorien T. DOUGNON, Lauris FAH, et leurs épouses** pour l'aide précieuse que vous m'avez apportée dans la réalisation de ce travail. Merci pour tout.
 - Le personnel de l'Unité de recherche en Microbiologie-virologie du HALD, en particulier le **Dr Assane DIENG, M. Amadou DIOP, Abdoulaye DIOP, Dior DIENG**, et **tonton Oumar**, pour votre accueil, aide, conseils et la mise à disposition des ressources matérielles et humaines dans le cadre de la réalisation de ce travail. Vous êtes pour moi une famille. Merci pour tout.

- Le personnel enseignant du Master de Microbiologie Fondamentale et Appliquée, en particulier les Professeurs **Cheikh Saad Bouh BOYE, TOURE-KANE Coumba et aux Docteurs Abdoulaye SECK et Assane DIENG.**

Pour la qualité de l'enseignement que vous m'avez donné et pour tous vos conseils

- **Bernice ADEOYE, Sandra KOUMONDJI, Marie-faustine TOKPOHOZIN, Julienne ADANCHOEDO, Stéphanie DJIKOUNON, Laetitia KANGA, Gloria LIGAN, Gislain DENAKPO, Julien ETCHO, Ange ZOCLANCLOUNON, Maysoon MOHAMED et Ornela AGOSSOU** En souvenir des nombreux moments passés ensemble, je vous souhaite une brillante carrière; une réussite sociale et une vie épanouie.
- A tous mes camarades de promotion en particulier **Aminata DIOP, Yves VIGBEDOR, Ibrahima SENE, Awa DIOP, Rama BARRY, Aïda NDOUME.** C'est le moment pour moi de vous témoigner ma profonde gratitude pour tous ces moments. Sincères remerciements.
- Tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la réalisation de ce travail. Dieu vous bénisse.
- **Mes amis (es),** pensées affectueuses.

A NOS MAITRES ET JUGES

A notre Président du Jury

Professeur Cheikh Saad Bouh BOYE

Cher Maître, vous nous faites un grand honneur en acceptant de présider ce jury malgré vos multiples occupations.

Grâce à vous ce travail a pu aboutir. Vous vous êtes investi aussi bien moralement, scientifiquement que financièrement. Un grand merci pour la rigueur dans laquelle ce travail s'est déroulé. Votre ouverture d'esprit 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 feront sans doute de ce travail un document fiable. Veuillez trouver dans ces mots l'expression de notre sincère admiration. Que Dieu vous bénisse.

A notre Maître et Directeur de mémoire,

Monsieur Abdoulaye SECK, Maître-assistant

Vous avez suivi et encadré ce travail avec rigueur scientifique, malgré vos multiples occupations, en faisant montre de simplicité, de disponibilité et de patience face à nos sollicitations sans cesse renouvelées par les incertitudes et angoisses de l'apprentissage.

Veuillez trouver ici, cher Maître, l'expression de nos remerciements les plus sincères.

A notre Maître et juge

Professeur Ndèye Coumba KANE-TOURE

La spontanéité avec laquelle vous avez accepté de juger ce travail nous réjouit. Cela témoigne de votre gentillesse et votre dévouement pour tous. Plus qu'un honneur, c'est pour nous une joie de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de vos compétences. Vos contributions apporteront sans doute de la qualité à ce document vue la perspicacité de votre esprit scientifique.

A notre Maître et juge

Monsieur Babacar MBENGUE, Maître de Conférences Agrégé

Cher Maître merci d'avoir accepté sans réserve de siéger dans ce jury malgré notre sollicitation tardive. Vous nous avez guidé et prodigué de nombreux conseils avec beaucoup d'amabilité et de bon sens au cours de notre formation. C'est pour nous une immense joie de vous compter parmi nos juges et de pouvoir profiter de vos compétences. Nous espérons que vous verrez en ce travail la réalisation de vos conseils.

Nous vous prions cher Maître, d'accepter notre profonde gratitude.

Liste des abréviations

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ARN	: Acide RiboNucléique
ATP	: Adénosine Tri Phosphate
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CLSI	: Chirurgical and Laboratory Standards Institutes
CSB	: Conscience Scientifique pour le Bien-être
CV	: Coefficient de Variation
FN	: Faux Négatif
FP	: Faux Positif
HALD	: Hôpital Aristide LeDantec
H₂S	: Hydrogène sulfuré
IST	: Infection Sexuellement Transmissible
LCR	: Liquide Céphalo Rachidien
Mh	: <i>Mycoplasma hominis</i>
NAD	: Nitrate Adénine Dinucléotide Oxydase
NH₃	: Nitrites
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PPLO	: Pleuro Pneumonia Like Organism
SE	: Sensibilité
SP	: Spécificité
UCAD	: Université Cheikh Anta Diop
UCC	: Unité de Changement de Couleur
UTM	: Universal Transport Milieu
Uu	: <i>Ureaplasma urealyticum</i>
VN	: Vrai Négatif
VP	: Vrai Positif
VPN	: Valeur Prédicative Négative
VPP	: Valeur Prédicative Positive

Liste des tableaux

Tableau I: Profil métabolique des mycoplasmes	7
Tableau II : Fréquence des mycoplasmes urogénitaux en fonction du nombre de partenaires sexuels.....	10
Tableau III : Importance du rôle des mycoplasmes génitaux selon le tableau clinique.	11
Tableau IV: Evaluation d'un test de diagnostic selon ses performances intrinsèques..	18
Tableau V : Tableau récapitulatif de la microplaque MicroCSB System®	26
Tableau VI : Présentation des résultats obtenus avec le kit MicroCSB System® :.....	31
Tableau VII : Présentation des résultats obtenus avec le kit mycoplasma IST2	32
Tableau VIII : Récapitulatif des performances du test avec la microgalerie MicroCSB System®.....	32
Tableau IX: Récapitulatif des performances du test avec le kit mycoplasma IST2.	32

Liste des figures

Figure 1: Structure des mycoplasmes.....	6
Figure 2: Fermentation du glucose par <i>Mycoplasma genitalium</i>	6
Figure 3: Hydrolyse de l'arginine par <i>Mycoplasma hominis</i>	7
Figure 4: Matériel de prélèvement pour la recherche de mycoplasmes urogénitaux ..	13
Figure 5: Technique de prélèvement pour la recherche de mycoplasmes urogénitaux	13
Figure 6: Photo d'une microplaque MicroCSB System®ensemencée.....	27
Figure 7 : Photo des colonies de <i>Ureaplasma urealyticum</i> et <i>Mycoplasma hominis</i> sur gélose A7 à l'objectif 10 au M.O	27
Figure 8: Répartition des souches utilisées pour le test.....	30
Figure 9 : Répartition des résultats des 50 échantillons	30

Table des matières

INTRODUCTION	1
PREMIERE PARTIE:REVUE DE LA LITTERATURE	4
I. Généralités sur les mycoplasmes	5
I.1. Structure et Morphologie	5
I.2. Caractères bactériologiques	6
I.2.1. Caractères biochimiques	6
I.2.2. Métabolisme glucidique	7
I.2.3. Métabolisme lipidique.....	7
I.2.4. Métabolisme protidique	8
I.2.5. Caractères antigéniques.....	8
I.3. Epidémiologie	8
I.3.1. Fréquence d'isolement	9
I.3.2. Facteurs favorisants.....	9
I.4. Physiopathologie	10
I.5. Diagnostic biologique	12
I.5.1. Le Prélèvement.....	12
I.5.2. Transport des échantillons.....	14
I.5.3. Diagnostic bactériologique.....	14
I.5.3.1. L'identification.....	15
I.5.3.2. Méthode moléculaire.....	15
I.5.3.3. Interprétation	15
I.6. Traitement	16
I.7. Evaluation des performances d'un test [37].....	17
I.7.1. Performances intrinsèques : sensibilité et spécificité.....	17
I.7.2. Performances extrinsèques : valeurs prédictives positives et négatives	18

DEUXIEME PARTIE:TRAVAIL EXPERIMENTAL	20
I. Objectif de l'étude.....	21
II. Cadre d'étude.....	21
III. Critère d'inclusion.....	21
IV. Matériel d'étude.....	21
V. Méthodologie.....	23
V.1. contrôle de performances.....	23
V.2 Collecte des échantillons.....	23
V.3. Préparation des milieux de culture (annexe).....	24
V.4. Préparation et conditionnement des plaques déshydratées.....	24
V.5. Identification des souches avec la microgalerie MicroCSB system®.....	24
V.5.1. Identification et titrage en milieu liquide.....	25
V.5.2. Isolement et identification sur milieu solide.....	27
V.6. Contrôle de qualité et Validation.....	28
I. Résultats et Discussion.....	30
I.2. Résultats.....	30
Présentation des résultats.....	30
II. Discussion.....	33
Conclusion.....	36
Références bibliographiques.....	38
Annexes.....	1

INTRODUCTION

La recrudescence des affections liées aux mycoplasmes urogénitaux dans les populations a suscité un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. Ces mycoplasmes étant des bactéries atypiques constituent de nos jours un réel problème de santé publique [1].

En santé humaine, les espèces pathogènes les plus isolées sont *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* ; ils colonisent principalement les voies respiratoires et uro-génitales [2]. Des pathogènes opportunistes comme *M.penetrans* et *M.fermentans* ont été isolés chez des patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [3] [4].

L'absence de données réside dans la difficulté de leur isolement au laboratoire, contraintes liées à leurs caractères culturels [5]. Mais aussi la controverse qui existe sur leur pathogénicité suivant le contexte, malgré qu'il soit connu depuis 1898. La difficulté d'établir leur pouvoir pathogène est surtout due à leur saprophytisme urogénital chez la femme et chez l'homme. Ces agents sont également incriminés dans des affections dont certaines sont très graves, vaginites non spécifiques, urétrites non gonococciques, salpingites, etc.

De nos jours, il est connu qu'au moins cinq espèces ont été mis en évidence dans le tractus urogénital humain ; parmi elles nous avons *M.hominis* et *U.urealyticum* qui sont très fréquentes. *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 mais est nettement plus élevée pour *U.urealyticum* que pour *M.hominis*. Ces deux espèces de mycoplasmes sont responsables d'endométrites, fièvres postpartum/abortum et d'infections néonatales. *M.hominis* est aussi fréquemment isolé au cours de vaginoses bactériennes [6] et est responsable de salpingites et de bartholinites [7]. *U.urealyticum* est responsable de chorioamniotites et d'avortements [8].

La classification génomique se base sur les arbres phylogéniques d'où le séquençage.

Néanmoins, il se pose un problème dans l'identification précise de ces germes dans les affections urogénitales dû au caractère commensal de ces germes au niveau des voies génitales, mais aussi, dans la disponibilité des méthodes de diagnostic de routine dans nos laboratoires à ressources limitées.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris ce travail dont l'objectif principal est de continuer d'améliorer les performances des microgaleries MicroCSB System® pour

l'identification des mycoplasmes urogénitaux. Spécifiquement, il s'agit de réduire le délai de lecture des résultats avec les microgaleries MicroCSB System® et de valider notre méthodologie.

PREMIERE PARTIE
REVUE DE LA LITTERATURE

I. Généralités sur les mycoplasmes

Les mycoplasmes sont des microorganismes ubiquitaires retrouvés chez l'homme, les animaux vertébrés, les arthropodes et les plantes. Elles appartiennent à la classe des Mollicutes (mollis=doux et cutis=peau). Initialement confondus avec les virus en raison de leur filtrabilité, ils furent ensuite assimilés à des bactéries parce qu'ils possèdent à la fois de l'ADN et l'ARN qu'ils ont une activité métabolique propre, et peuvent être cultivés sur des milieux cellulaires. Cependant l'absence de parois les distingue des autres bactéries d'où la classification dans la classe des mollicutes. Anciennement appelé PPLO (Pleuro Pneumonia-Like Organisms) du fait de sa première détection dans une pleuropneumonie bovine, elles comprennent aujourd'hui plus de 200 espèces [9].

I.1. Structure et Morphologie

Contrairement aux autres procaryotes, les mycoplasmes n'ont aucune paroi cellulaire car ils sont incapables de synthétiser du peptidoglycane ou ses précurseurs. Ils sont donc sensibles aux chocs osmotiques, aux détergents, aux alcools ainsi qu'aux anticorps en présence de complément. Ils sont immobiles et aérobies ou anaérobies facultatifs. Ce sont les procaryotes les plus petits et les plus simples que l'on connaît capable d'autoréplication. Caractérisés par leur extrême pléomorphisme ; les mycoplasmes sont des cellules de très petite taille (300µm) et d'une relative fragilité due à l'absence de paroi. Leur structure simple est celle d'une bactérie dépourvue de paroi ; comprenant un noyau procaryote, un cytoplasme bourré de granulations de ribosomes et une membrane tri-lamellaire de structure classique. La membrane en trois feuillets contient des lipides en grande quantité des glucides, des glycolipides et des protéines. On note la présence d'une structure terminale « tip » chez certains mycoplasmes qui joue un rôle dans l'adhérence et la mobilité [10]. Les mycoplasmes présentent un grand pléomorphisme : il existe des formes allongées fusiformes ou filamenteuses.

Les mycoplasmes peuvent être responsables d'infections respiratoires et génitales. Des complications obstétricales, néonatales et extra-génitales ont été décrites [11]. Dans le cadre de la présente étude, nous nous contenterons des mycoplasmes urogénitaux. Les mycoplasmes fréquemment isolés dans le tractus génital, et potentiellement pathogènes, sont *M. hominis*, *U. urealyticum* et *M. genitalium* [2].

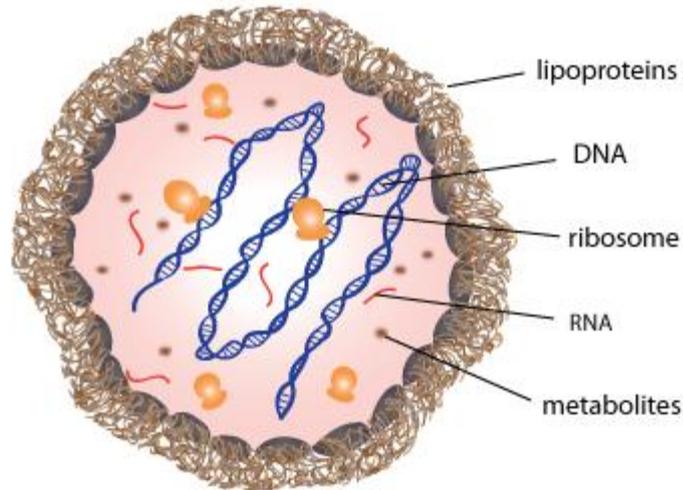


Figure 1: Structure des mycoplasmes (<http://www.invivogen.com/review-mycoplasma>) consulté le 30/07/2018

I.2. Caractères bactériologiques

I.2.1. Caractères biochimiques

Les mycoplasmes fermentent le glucose, hydrolysent l'urée et l'arginine (figure2) et (figure3). Ces trois propriétés sont importantes dans le diagnostic biologique des mycoplasmes et permettent de les identifier (tableau I) [12]. Bien qu'ils soient capables de synthétiser les nucléotides, un apport en peptides préformés est indispensable à leur métabolisme. Leur système de transport d'électrons est relativement simple. Leurs exigences nutritives plus souvent importantes nécessitent ainsi des milieux plus complexes et enrichis.

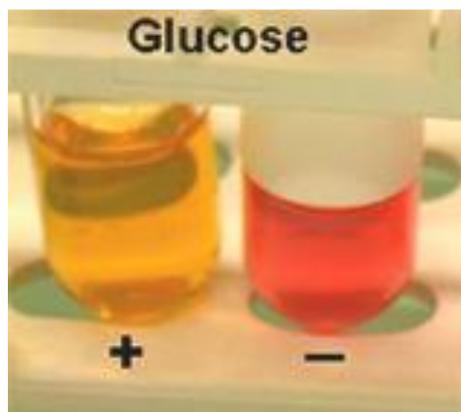


Figure 2: Fermentation du glucose par *Mycoplasma genitalium* consulté le 30/07/2018

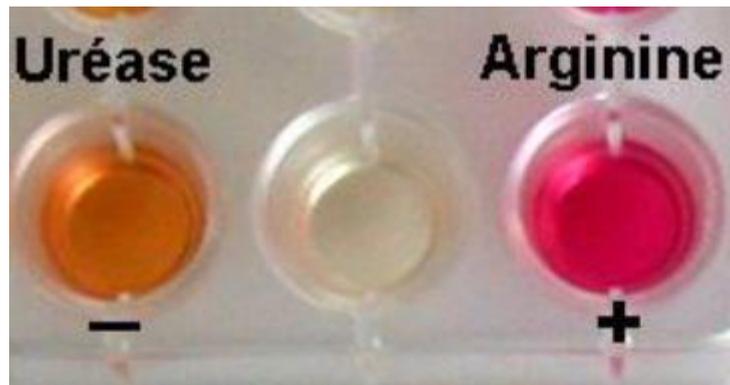


Figure 3: Hydrolyse de l'arginine par *Mycoplasma hominis* consulté le 30/07/2018

Tableau I: Profil métabolique des mycoplasmes [12].

Espèces	Caractères biochimiques		
	Glucose	Urée	Arginine
Mycoplasmes respiratoires :			
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+	-	-
Mycoplasmes génitaux :			
<i>Mycoplasma hominis</i>	-	+	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	+	-	-
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	-	-	+

+ : fermentation du glucose

+ : hydrolyse de l'urée

+ : hydrolyse de l'arginine

I.2.2. Métabolisme glucidique

Certains mycoplasmes utilisent le glucose comme source de carbone et d'énergie. Le produit final de la dégradation est le plus souvent de l'acide lactique pyrrolique et acétique en très faible quantité [12].

I.2.3. Métabolisme lipidique

Tous les mycoplasmes ont un besoin accru en cholestérol non estérifié. Il peut être remplacé par d'autres stérols par exemple le stigmastérol. Il conditionne la stabilité osmotique de la cellule, joue donc un rôle structural et nécessaire aux échanges à travers la membrane [12].

I.2.4. Métabolisme protidique

Les mycoplasmes ne sont pas protéolytiques en général, seules quelques espèces liquéfiant la gélatine peuvent liquéfier également le sérum coagulé ou la caséine [12]. Excepté *Mycoplasma pneumoniae* et *Ureaplasma urealyticum*, les mycoplasmes dégradent l'arginine avec production d'ammoniaque. Cette propriété constitue leur source majeure d'énergie et un moyen biochimique d'identification. Seul *Ureaplasma* possède une uréase et dégrade l'urée. C'est la propriété la plus caractéristique de *Ureaplasma*.

I.2.5. Caractères antigéniques

La composition antigénique des mycoplasmes est très mal connue. Les immunogènes des mycoplasmes sont des antigènes de surface localisés sur la membrane cytoplasmique. Ils sont pour la plupart thermolabiles et sensibles aux enzymes protéolytiques. Sur le plan de l'immunité, les mycoplasmes sont peu immunogènes ; les anticorps neutralisants qui inhibent les cultures ou ceux décelés par immunofluorescence seraient responsables de l'immunité mais n'empêcheraient pas la persistance du germe dans l'organisme.

Dans les infections, la présence d'anticorps spécifiques est rare et leur titre est peu élevé, maximum 1/8, d'où leur faible utilisation du point de vue diagnostique [13]. Un mycoplasme possède plusieurs constituants antigéniques dont certains sont spécifiques [14]. Actuellement 14 sérotypes sont connus pour *Ureaplasma urealyticum* et 7 pour *Mycoplasma hominis*. Des études tendent à montrer que certains sérotypes seraient plus pathogènes que d'autres et seraient reliés à une certaine pathologie. Le sérotype 4 de *Ureaplasma urealyticum* a été rencontré lors d'urétrites non gonococciques masculines et les sérotypes 3, 6, 11 et 13 ont été retrouvés lors d'avortements. *Mycoplasma pneumoniae* présente 2 types d'antigènes qui sont les glycolipides membranaires et les antigènes protéiques parmi lesquels l'adhésine, qui constitue l'antigène immuno-dominant. Il possède un seul sérotype, et entraîne une immunité protectrice partielle.

I.3. Epidémiologie

La présence des mycoplasmes chez l'homme varie selon de nombreux paramètres parmi lesquels le sexe et l'âge.

De l'adolescence à la puberté, c'est à partir de ce moment de la vie que les mycoplasmes réapparaissent au niveau des voies génitales : les échanges par contact sexuel augmentent la fréquence des sujets colonisés.

Chez l'adulte homme, *Ureaplasma urealyticum* est isolé de l'urètre et *Mycoplasma hominis* du prépuce alors que chez la femme, ces deux germes sont rencontrés au niveau du vagin et plus rarement au niveau de l'endocol [11].

I.3.1. Fréquence d'isolement

Cette fréquence est surtout notée pour les mycoplasmes urogénitaux. *Mycoplasma hominis* est rencontré à l'état saprophyte dans le tractus génital chez 38% des hommes et 45% des femmes. *Ureaplasma urealyticum* fait partie de la flore urogénitale dans 40-70% des cas mais prédomine chez la femme. Cependant, il peut parfois être isolé chez 60% des hommes et 80% des femmes issus d'une population à risque suivie ou en consultation d'IST [15].

Les taux d'infection avec manifestation clinique et les taux de portage ainsi que les co-infections avec d'autres agents responsables d'IST varient selon les populations, les études et le sexe : de 1 à 4 % et de 1 à 6,4 % en population générale respectivement pour les hommes et les femmes [10], de 15 à 20 % chez les hommes ayant des urétrites non gonococciques [16]. La prévalence de *Mycoplasma genitalium* chez les populations à haut risque est de 4 à 38 % dans les centres d'IST [10]. Une méta-analyse des prévalences chez les femmes à haut risque d'IST montre une prévalence allant de 0 à 42 % [17]. Les femmes considérées comme à haut risque d'IST étaient celles consultant un centre d'IST, celles ayant des signes cliniques urogénitaux, celles consultant un centre de planning familial pour grossesse et celles identifiées comme travailleuses sexuelles. Cet important intervalle de prévalence s'explique par différents facteurs :

- Clinico-biologiques (mode d'expression, pathologie, co-infection),
- Epidémiologiques (géographique, conduite sexuelle, type de recrutement, mode de calcul des prévalences)
- Technique (type de PCR). Les prévalences de ces différentes études sont décrites dans le Tableau II. L'émergence de *Mycoplasma genitalium* a pu le faire comparer à un "nouveau chlamydia" de par l'importance de sa prévalence chez les femmes [18].

I.3.2. Facteurs favorisants

Les critères de sélection des malades ont d'emblée écarté tous les sujets à risque si l'on sait qu'en Afrique les conditions socio-économiques précaires pourraient constituer des facteurs de susceptibilité aux infections. Pour les infections urogénitales le seul facteur commun déterminant reste le niveau de l'activité sexuelle. Une étude réalisée par Taylor et

Robinson rapporte la fréquence des mycoplasmes en fonction du nombre de partenaires sexuels des individus [19].

Tableau II: Fréquence des mycoplasmes urogénitaux en fonction du nombre de partenaires sexuels en pourcentage. [20].

ESPECES	1 Partenaire		3 Partenaires	
	Hommes	Femmes	Hommes	Femmes
<i>Ureaplasma urealyticum</i>	19	38	45	75
<i>Mycoplasma hominis</i>	0	9	14	17

La fréquence d'isolement des mycoplasmes urogénitaux augmente avec le nombre de partenaires ; la femme est plus sensible que l'homme au portage. D'autres auteurs [21] [22] avaient aussi montré que la colonisation des muqueuses génitales par les mycoplasmes augmente avec l'activité sexuelle. Bebear et Latrille [21] ont mis ceci en évidence chez des prostituées [22]. En effet en l'absence de relation sexuelle, la colonisation du sujet adulte par ces germes demeure très faible (similaire à celle des enfants impubères) [23].

I.4. Physiopathologie

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

- Infections masculines: urétrite non gonococcique (UNG) essentiellement, épididymite, prostatite beaucoup plus rarement;
- Infections gynécologiques: vaginose bactérienne (*M. hominis*), cervicite, endométrite, salpingite ;
- Troubles de la reproduction: chorio-amniotite, 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).[12].

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

Pathologie	<i>M. genitalium</i>	<i>Ureaplasma spp.</i> ^a	<i>M. hominis</i>
Infections génitales masculines			
UNG	+	+	-
Epididymites, prostatites	±	±	-
Infections gynécologiques			
Vaginose bactérienne	±	-	+
Cervicites	+	-	-
Endométrites	+	-	+
Salpingites	+	-	+
Troubles de la reproduction			
Chorioamniotites	?	+	±
Fièvres, endométrites post-partum	?	+	+
Avortement spontané	?	±	±
Prématurité	?	+	-
Retard de croissance intra-utérin	?	±	-
Atteintes néonatales			
Hypotrophie	?	+	-
Infections respiratoires neurologiques, bactériennes, abcès	?	+	+
Dysplasie broncho-pulmonaire	?	±	-
Infections extra génitales			
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

U. urealyticum est impliqué dans l'étiologie des urétrites non gonococciques, principalement chez l'homme [24]. Il serait également impliqué dans les lithiases urinaires: grâce à son uréase, il est susceptible d'induire la formation de cristaux de struvite et de phosphate de calcium dans l'urine. Outre les vaginoses bactériennes provoquées par ces deux espèces de bactéries [25], *M. hominis* serait responsable d'environ 5% des cas de pyélonéphrite aiguë. On a ainsi isolé *M. hominis* du tractus génital supérieur chez des patients qui présentaient les symptômes d'une infection rénale aiguë [26].

Dans une étude réalisée par Zinzendorf *et al.* en 2008 sur 1058 échantillons de sperme à Abidjan, il ressort que l'isolement de *M. hominis* et *U. urealyticum* pourrait être à la base des désordres de pH, de mortalité des spermatozoïdes et de concentration du sperme [27]. Ces deux germes pourraient donc jouer un rôle important dans la stérilité masculine. *M. hominis* a été isolé en culture pure au niveau de l'endomètre ou des trompes de Fallope chez des femmes souffrant de salpingites [28].

Mycoplasma genitalium est responsable de différentes infections génitales : urétrite aiguë et chronique, épидидymite, prostatite, d'arthrite réactionnelle et d'infertilité ([10] [29] [30] [31]). Chez la femme, son rôle est avéré dans les affections urogénitales basses (urétrites et cervicites) et probablement hautes (endométrites, salpingites, inflammations pelviennes chroniques), mais aussi ce pathogène semble être impliqué dans l'infertilité ([10] [29] [30] [17] [32]). Son impact sur l'issue de la grossesse (avortement, prématurité, fièvre du post-partum) ou sur les nouveau-nés (infections néonatales, faible poids de naissance) n'est pour l'instant pas assez documenté ([10] [33] [34]) comme pour d'autres bactéries apparentées (*Mh* et *Uu*) ([12] [11]). Longtemps mal connu en raison d'une culture lente et fastidieuse (mais possible sur culture cellulaire) *Mycoplasma genitalium* est maintenant considéré comme un agent émergent cosmopolite d'infections génitales chez l'homme comme chez la femme grâce à l'avènement de la biologie moléculaire (PCR) depuis les années 1990 [35].

I.5. Diagnostic biologique

I.5.1. Le Prélèvement

Les mycoplasmes génitaux peuvent être recherchés à partir de prélèvements urétraux, d'urine (1er 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. Le Sérodiagnostic ne doit jamais être réalisé pour les infections génitales. (figure 4) et (figure 5)



Figure 4: Matériel de prélèvement pour la recherche de mycoplasmes urogénitaux (<http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html>) consulté le 30/07/2018

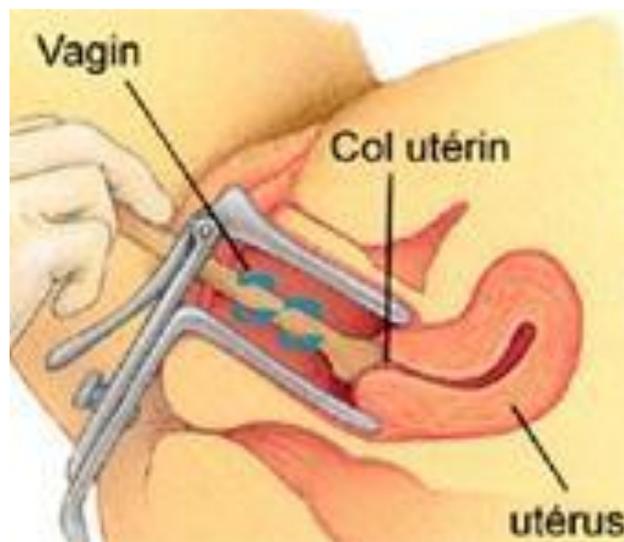


Figure 5: Technique de prélèvement pour la recherche de mycoplasmes urogénitaux (<http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html>) consulté le 30/07/2018

I.5.2. Transport des échantillons

Les mycoplasmes étant très sensibles à la dessiccation, il faut utiliser des milieux de transport adaptés. Le meilleur moyen serait de l'ensemencer directement sur le milieu de culture mais cela n'étant pas toujours évident, le milieu saccharose-phosphate (2 SP) enrichi de 5% de sérum de veau foetal, sans antibiotique ou le milieu UTM (milieu de transport universel) est utilisé, mais également le milieu A3 qui est un milieu à pH acide contenant du sérum de poulain. 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 2-4°C pendant 48 h au plus. La congélation à -70°C apparait comme le meilleur moyen de conservation [36].

I.5.3. Diagnostic bactériologique

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 utilisés sont complexes, rendus sélectifs par addition d'une bêta-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 foetal. 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.

En milieu liquide, le diagnostic se fait d'après le virage d'indicateurs. Sur milieu gélosé, l'apparition de colonies doit être recherchée à la loupe binoculaire. Leur aspect est variable, en forme d'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 des irrégularités observées parfois sur la gélose [36].

I.5.3.1. L'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 à la méthode 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 recommander, en cas de doute, la vérification du résultat par culture sur milieu gélosé [36].

I.5.3.2. Méthode moléculaire

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.

I.5.3.3. Interprétation

- Prélèvements normalement stériles: s'il y a absence de mycoplasmes urogénitaux sur les milieux d'isolements et d'identifications.

- Prélèvements en contact avec une flore commensale :

Titre de *Ureaplasma spp.*, de *M. hominis* $\leq 10^4$ UCC/ml

- Prélèvements pathogènes :

Titre de *Ureaplasma spp.*, de *M. hominis* $\geq 10^4$ UCC/ml (Chez la femme)

et *Ureaplasma spp.*, de *M. hominis* $\geq 10^3$ UCC/ml (Chez l'homme)

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 1er jet d'urine.

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.

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 endotrachéal, d'une aspiration naso-pharyngée ou d'un liquide gastrique en quantité élevée ($\geq 10^4$ UCC/ml) revêt une signification plus grande confronté à un tableau clinique évocateur.

I.6. Traitement

Les mycoplasmes sont naturellement résistants à certaines familles d'antibiotiques: bêta-lactamines, glycopeptides, fosfomycine, rifampicine, polymyxines, acide nalidixique, sulfamides et triméthoprim. Les antibiotiques potentiellement actifs sont les cyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés. Des concentrations critiques pour les principaux membres de ces trois familles ont récemment été définies par le Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

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. Des résistances acquises ont été décrites pour les cyclines, pour les macrolides et pour les fluoroquinolones pour le traitement des infections à mycoplasmes urogénitaux. Seule la résistance aux cyclines, 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 troussees adaptées à l'étude de la sensibilité aux antibiotiques de *Ureaplasma spp.* et *M. hominis* sont commercialisées, seules ou combinées avec la trousse de l'identification.

Ces troussees peuvent également être employées en seconde intention après culture primaire de l'échantillon, ce qui permet une meilleure standardisation de l'inoculum. L'utilisation des cyclines conduit à de très nombreux échecs cliniques malgré une apparente activité in vitro. La résistance acquise à l'azithromycine, macrolide recommandé en première intention dans le traitement des infections sexuellement transmissibles, touche 10% à 15% des

souches en France. La moxifloxacin 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.

I.7. Evaluation des performances d'un test [37]

Un test de dépistage permet de tirer au sein d'une population cible apparemment en bonne santé, les personnes probablement atteintes d'une maladie des personnes probablement indemnes. Un test de dépistage doit avoir les qualités suivantes : simple, fiable, reproductible, acceptable, peu coûteux et valide. La validé d'un test est sa capacité à différencier au sein de la population cible les personnes probablement atteintes de la maladie de celles qui sont probablement indemnes. Cette capacité dépend à la fois des performances propres du test et des caractéristiques de la population testée.

Les performances propres du test de dépistage sont sa sensibilité et sa spécificité, définissant la validé intrinsèque du test. Elles sont définies et calculées en conditions expérimentales et sont donc indépendantes du type de personne testée.

Les caractéristiques de la population testée, en particulier la prévalence de la maladie, conditionnent les performances extrinsèques du test. Ces performances extrinsèques sont les valeurs prédictives positives et négatives. Elles sont définies et calculées en situation de dépistage et permettent d'apprécier la pertinence de l'utilisation du test dans cette population précise.

I.7.1. Performances intrinsèques : sensibilité et spécificité

La sensibilité d'un test est la probabilité que le test soit positif si la personne est atteinte de la maladie. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs chez des personnes atteintes de la maladie) divisé par le nombre total de personnes atteintes de la maladie ($a/a+c$). Plus un test est sensible moins il comporte de faux négatifs (tests négatifs chez des personnes atteintes de la maladie) et mieux il permet, s'il est négatif, d'exclure la maladie

$$Se = \frac{VP}{VP+FN}$$

Tableau IV: Evaluation d'un test de diagnostic selon ses performances intrinsèques

		Maladie (Test de Référence)		Total
		Présente	Absente	
est	Positif	a	b	a+b
	Négatif	c	d	c+d
Total		a+c	b+d	Effectif total

a : vrai positif (VP), b : faux positif (FP), a+b : total tests positifs, c : faux négatif (FN), d : vrai négatif (VN), c+d : total tests négatifs, a+c : total malades, b+d : total non malades

La spécificité d'un test est la probabilité que le test soit négatif si la personne est indemne de la maladie. C'est le nombre de vrais négatifs (tests négatifs chez des personnes indemnes de la maladie) divisé par le nombre total de personne indemnes de la maladie (d/b+d). Plus un test est spécifique, moins il occasionne de faux positifs (tests positifs chez des personnes indemnes de la maladie) et mieux il permet, s'il est positif, d'affirmer la maladie.

$$Sp = \frac{VN}{VN+FP}$$

La sensibilité et la spécificité d'un test sont interdépendantes : l'augmentation de la sensibilité d'un test se fait toujours au détriment de sa spécificité et inversement.

I.7.2. Performances extrinsèques : valeurs prédictives positives et négatives

En pratique quotidienne de dépistage, la question qui se pose au médecin est d'évaluer chez une personne apparemment en bonne santé la probabilité d'être malade ou non malade en fonction du résultat positif ou négatif du test. Cette probabilité est aussi appelée probabilité a posteriori ou probabilité post-test. Elle dépend des caractéristiques du test (sensibilité et spécificité) et de la probabilité à priori (probabilité pré-test) que la personne ait une maladie, c'est-à-dire de la prévalence de la maladie dans la population considérée. La prévalence de la maladie est la probabilité a priori que la maladie soit présente chez une personne prise au hasard dans une population (a+b/ a+b+c+d).

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 ($a/a+b$). 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).

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

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 ($d/c+d$).

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

La prévalence de la maladie et la VPP du test de dépistage varient dans le même sens. Quelles que soient les performances intrinsèques du test, si la prévalence de la maladie est faible, la probabilité qu'une personne ayant un test positif soit réellement malade est faible : un test positif a dans ce cas de fortes chances d'être un faux positif.

**DEUXIEME PARTIE
TRAVAIL EXPERIMENTAL**

I. Objectif de l'étude

L'objectif de l'étude était de continuer d'améliorer les performances des microgaleries MicroCSB System® pour l'identification des mycoplasmes urogénitaux, afin de réduire le délai de lecture des résultats et valider la méthode.

II. Cadre d'étude

C'est une étude transversale, analytique et comparative qui a eu pour cadre l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide LeDantec et le laboratoire de Bactériologie-Virologie fondamentale et appliquée de l'U.C.A.D. II. La collecte des souches a été faite au niveau de l'Institut Pasteur de Dakar, au laboratoire de bactériologie-virologie du HALD et de quelques cliniques privées de Dakar.

III. Critère d'inclusion

Sont inclus dans cette étude les échantillons des patients reçus pour la recherche de mycoplasmes urogénitaux.

IV. Matériel d'étude

• Matériel biologique

Le matériel biologique était constitué de prélèvements vaginaux, urétraux et d'urines.

Matériel pour la préparation des milieux

- balance de précision,
- agitateur magnétique,
- pH-mètre,
- flacons en verre avec bouchon à vis de 5, 100, 150 ml 500ml,
- seringues,
- filtres de 0,2 µm de porosité,
- tubes stériles à bouchons de 2,5 et 5ml,
- erlenmeyer,
- embouts stériles,
- micro pipettes,
- autoclave,

- boîte de pétri de 6cm de diamètre,
- hotte à flux laminaire,
- papier emballage
- **Matériel pour l'isolement et l'identification**
 - Micro plaques,
 - micro pipettes de 20 μ l, 200 μ l,
 - pipette Pasteur,
 - huile de paraffine,
 - embouts stériles,
 - étuve,
 - films adhésifs,
 - bec bunsen,
 - jarre d'incubation,
 - microscope optique,
 - générateur d'anaérobie.
- **Matériel pour la conservation des souches**
 - Cryotubes à billes,
 - tubes à visse,
 - tubes nunc,
 - écouvillons,
 - portoir.
 - bouillon de conservation
- **Réactifs**
 - Bouillon A3 : milieu de conservation et de transport des mycoplasmes.
 - Bouillon arginine : milieu de d'isolement et d'identification de *Mycoplasma hominis*
 - Bouillon urée : milieu d'isolement et d'identification de *Ureaplasma urealyticum*
 - Gélose A7 : milieux d'isolement et d'identification des mycoplasmes.

V. Méthodologie

V.1. contrôle de performances

Un contrôle d'efficacité et de stérilité a été réalisé sur chaque lot de milieu préparé.

- **Contrôle d'efficacité**

Chaque lot de milieu préparé a été testé avec une souche de contrôle. Une souche pure d'*Escherichia coli* pour le témoin négatif du bouillon urée, pour le témoin positif une souche pure de *Klebsiella pneumoniae* a été utilisée. Pour le bouillon arginine une souche de *Klebsiella pneumoniae* ou *Escherichia coli* a été utilisée pour le témoin négatif. Le contrôle positif des bouillons arginine a été réalisé avec des souches pures d'*Enterococcus faecalis*. La positivité du test se traduit par un virage de la couleur jaune orangée au rouge. Pour un test négatif le milieu garde sa coloration d'origine.

- **Contrôle de stérilité**

Pour le bouillon, un millilitre (1ml) de chaque milieu préparé a été déposé dans des tubes à hémolyses stériles, qui ont ensuite été incubés à 37°C pendant 24 heures. Les milieux étaient considérés stériles en l'absence de trouble et de virage de l'indicateur coloré.

La gélose A7 quant à elle, a été incubée à l'étuve à 37°C en anaérobie comme en aérobie. La stérilité du milieu s'est traduite par la présence de colonies après la durée d'incubation requise.

V.2 Collecte des échantillons

Un total de 100 échantillons a été collecté au cours de notre étude. Il s'agit de 50 souches de mycoplasme (*Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum*) identifiés par le kit de Bio Mérieux (mycoplasma IST2 Sans A7) et 50 échantillons de sécrétion cervico vaginale, de prélèvement urétral et d'urines. Les souches ont été transportées au laboratoire à l'aide du bouillon A3 qui a servi de milieux de transport. Les prélèvements ont été inoculés dans 2ml de bouillon A3 puis acheminés au laboratoire.

V.3. Préparation des milieux de culture (annexe)

Pour étudier l'identification, le titrage, l'isolement et la réduction du temps d'incubation des mycoplasmes urogénitaux par la microgalerie MicroCSB system® nous avons préparé :

- bouillon A3
- bouillon urée
- bouillon arginine
- gélose A7

V.4. Préparation et conditionnement des plaques déshydratées

Les milieux de culture (bouillon urée et arginine) ont été distribués dans les micro-cupules :180µl dans chaque puits. Les plaques ont ensuite été placées à l'étuve à 37° pendant 24h pour permettre la déshydratation des substrats.

Pour tous les milieux déshydratés préparés, nous avons effectué des tests de stérilité et d'efficacité.

Le contrôle de stérilité des microplaques consistait à mettre en évidence l'absence de contaminant dans le milieu. Les cupules ont été inoculées avec de l'eau physiologique stérile puis recouvertes à l'huile de paraffine et incubées à l'étuve à 37°C pendant 24h.

Le contrôle d'efficacité des microplaques est réalisé pour s'assurer que les milieux n'ont pas été dénaturés lors de la déshydratation. Pour les micro-cupules d'urée, une souche pure d'*Escherichia coli* était mise dans l'eau distillée puis incubée pour le témoin négatif et une souche pure de *Klebsiella pneumoniae* pour le témoin positif. Pour les micro-cupules d'arginine, une souche pure de *Klebsiella pneumoniae* a été également utilisée pour le témoin négatif, ainsi qu'une souche d'*Enterococcus faecalis* pour le témoin positif.

V.5. Identification des souches avec la microgalerie MicroCSB system®

Les souches collectées ont été identifiées en vue de confirmer la présence de *Mycoplasma hominis* et/ou de *Ureaplasma urealyticum*.

Pour ce fait, en un premier temps, nous a procédé à l'identification des souches par la micro méthode MicroCSB myco puis nous avons déterminé la présence et le titre des

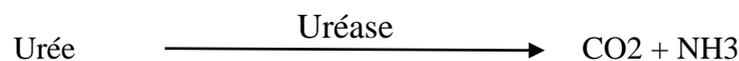
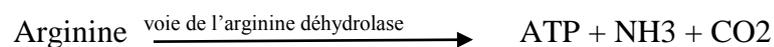
mycoplasmes identifiés. Les souches positives ont ensuite été ensemencés sur gélose A7 et les colonies observées au microscope optique afin de voir les caractéristiques de ces colonies. Les mycoplasmes confirmés ont servi pour le contrôle de qualité.

En second lieu, les prélèvements effectués ont servis pour l'identification des mycoplasmes avec la microgalerie MicroCSB System® et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par celui du Kit mycoplasma IST2 utilisés dans les laboratoires où ces prélèvements ont été effectués.

V.5.1. Identification et titrage en milieu liquide

- Principe

L'identification des mycoplasmes en milieu liquide est basée sur le principe suivant: *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* sont respectivement incubés dans les bouillons arginine et urée en présence d'un indicateur coloré: le rouge de phénol. Le principe est alors basé sur le métabolisme du substrat présent dans le bouillon (urée, arginine); lequel est détecté par le virage de l'indicateur de pH.



L'ammoniac libéré augmente le pH dans le milieu entraînant ainsi le virage de l'indicateur qui devient alors rouge-orangé et rose framboise pour l'urée et l'arginine respectivement. Chaque espèce est identifiée par sa capacité à métaboliser ou non le substrat. Notons que la croissance des mycoplasmes ne s'accompagne pas du trouble du milieu qui traduirait une autre croissance bactérienne. A cet effet, les levures sont capables de métaboliser certains constituants du milieu en libérant des substances basiques. Leur croissance s'accompagne du trouble et /ou d'un dépôt blanchâtre.

- Mode opératoire

La microplaque utilisée dispose de deux rangées de 8 cupules chacune.

La rangée supérieure contient le bouillon urée déshydratée (A) et la rangée inférieure le bouillon arginine déshydraté (B). Les puits N°1 de chaque rangée correspondent aux témoins négatifs du test, donc ne contient ni l'urée ni l'arginine.

Etape1 : Homogénéiser le milieu de transport ensemencé avec l'échantillon (bouillon A3).

Etape2 : Prélever 20µl du bouillon A3 puis l'introduire dans les cupules N°1 de chaque rangée (changer d'embout à chaque fois).

Etape3 : Prélever 20µl du bouillon A3 ensemencé et l'introduire dans la cupule N°2 de la rangée A. Faire une série de dilution ($\frac{1}{10}$) de la cupule N°2 à la cupule N°8 (20µl du puit N°2 ajouté au puit N°3, ainsi de suite jusqu'au dernier puit).

Etape4 : Changer d'embout et reproduire l'étape 3 au niveau de la rangée B.

Etape5 : Mettre une goutte d'huile de paraffine dans chaque puit ensemencé de la microplaque.

Etape6 : Incuber la microplaque à l'étuve à 37°C entre 16h et 24h (tableauV).

NB : En cas de réaction négative réincuber pendant 24h supplémentaire pour une dernière lecture.

- Interprétation

- Une coloration jaune orange indique une absence de croissance.
- Un virage du milieu urée en rouge orangé indique la présence de *Ureaplasma urealyticum*.
- Un virage du milieu arginine au rose framboise indique la présence de *Mycoplasma hominis*.
- Le titre est donné par la dernière cupule positive (rouge orangé ou rouge framboise), et est exprimé en UCC/ml. (figure 6).

Tableau V : Récapitulatif de la microplaque MicroCSB System®

A	Témoin urée (-)	Titre 10 ²	10 ⁴	10 ⁸	10 ¹⁰	10 ¹²	10 ¹⁴	10 ¹⁶
B	Témoin arginine (-)	Titre 10 ²	10 ⁴	10 ⁸	10 ¹⁰	10 ¹²	10 ¹⁴	10 ¹⁶



Figure 6: Photo d'une microplaque MicroCSB System® ensemencée

V.5.2. Isolement et identification sur milieu solide

Les échantillons étaient ensemencés sur la gélose A7. La gélose ensemencée est mise en pré incubation pendant 5min à température ambiante avant d'être incubé à 37°C en anaérobie. Ceci allant de 24h à 72h. L'identification était microscopique et reposait sur l'aspect caractéristique des colonies de chaque espèce.

Les colonies de *Ureaplasma urealyticum* sont irrégulières, très petites, 15 à 50µm d'où leur ancien nom de souche T (tiny: minuscule), brunes en présence de sulfate de manganèse. Elles apparaissent entre 24h et 72h et se présentent sous la forme d'oursin ; à ne pas confondre avec des cristallisations dans la gélose.

Mycoplasma hominis donne entre 24h et 72h des colonies dites larges d'environ 10 à 600 µ en forme d'œuf sur le plat.



Figure 7: Colonies de *Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis* sur gélose A7 à l'objectif 10 au M.O

V.6. Contrôle de qualité et Validation

Pour le contrôle de qualité et la validation de la détection des mycoplasmes par la microgalerie MicroCSB system®, nous avons déterminé la reproductibilité, la répétabilité, la stabilité, le conditionnement, la sensibilité et la spécificité de ce test. Nous avons également cherché à voir le temps de réalisation du test.

- Sensibilité

La sensibilité de la microgalerie MicroCSB System® a permis de connaître la probabilité que le test soit positif en cas de présence de mycoplasme. C'est le nombre de vrais positifs (tests positifs après identification et titrage dans le bouillon urée et ou arginine et sur gélose A7) divisé par le nombre total de cas positif avec le kit Biomérieux (vrai positif + faux négatif). Plus un test est sensible moins il comporte de faux négatifs (tests négatifs pour le kit Biomérieux et positif après identification et titrage dans le bouillon urée et ou arginine et sur gélose A7). Nous avons utilisé les 50 échantillons traités simultanément avec le kit Biomérieux et la microgalerie MicroCSB System®.

- Spécificité

La spécificité de la Microgalerie MicroCSB System® a permis de connaître la probabilité que le test soit négatif en cas d'absence de mycoplasme. C'est le nombre de vrais négatifs (test négatif après identification et titrage dans le bouillon urée et ou arginine) divisé par le nombre total de cas négatif avec le kit Biomérieux. Plus un test est spécifique, moins il occasionne de faux positifs (test Positif pour le kit Biomérieux et Négatif après identification et titrage dans le bouillon urée et ou arginine et sur gélose A7).

La sensibilité et la spécificité d'un test sont interdépendantes : l'augmentation de la sensibilité d'un test se fait toujours au détriment de sa spécificité et inversement.

- Reproductibilité

Par le test de reproductibilité, nous avons recherché la capacité de trois kits de la microgalerie MicroCSB System® à donner les mêmes résultats pour un même inoculum. Pour ce fait, un inoculum a été réalisé pour chacune des souches contrôles. Le test d'identification MicroCSB System® a été ensuite réalisé pour les trois lots de souche. Les caractères obtenus ont été comparés pour les trois lots par souches contrôles. Une absence de différence entre ces trois résultats traduit une bonne reproductibilité.

- Répétabilité

Par le test de répétabilité, nous avons recherché la capacité du test MicroCSB System® à donner les mêmes résultats dans les mêmes conditions. Pour cela trois souches contrôle ont été choisies et le test réalisé à l'intervalle de 5 jours pour les mêmes souches sept (7) fois. Les résultats pour chaque souche ont été comparés pour chacune des sept fois. Une absence de discordance pour les 7 fois traduit une bonne répétabilité.

- Stabilité

Par le test de stabilité nous avons recherché la capacité du test à donner les mêmes résultats pour une durée de conservation donnée. Ainsi Trois lots de réactif ont été conservés à 4°C et à -20°C. Le premier lot de réactif a été testé un mois après conservation, le second lot deux mois après conservation et le troisième lot trois mois après conservation. L'obtention d'un même résultat pour les trois lots a traduit une bonne stabilité du réactif.

- Temps de réalisation

Le temps moyen de réalisation d'un test de MicroCSB System® a été déterminé. Pour ce fait trois tests ont été réalisés, le temps mis pour la réalisation a été noté et la moyenne pour les trois temps déterminés.

I. Résultats et Discussion

I.2. Résultats

Présentation des résultats

Sur les 50 souches de mycoplasmes utilisées pour les différents tests de contrôle de qualité, 30 souches étaient des souches de *Ureaplasma urealyticum* et 15 souches de *Mycoplasma hominis*. Sur les 50 échantillons (Urines, Pv et PU), nous avons noté après identification 28 échantillons négatifs (56%). Pour les 22 échantillons positifs, nous avons identifié 15 souches de *Ureaplasma urealyticum* (30%), 4 souches de *Mycoplasma hominis* (8%) et 3 échantillons portaient les deux souches (6%).

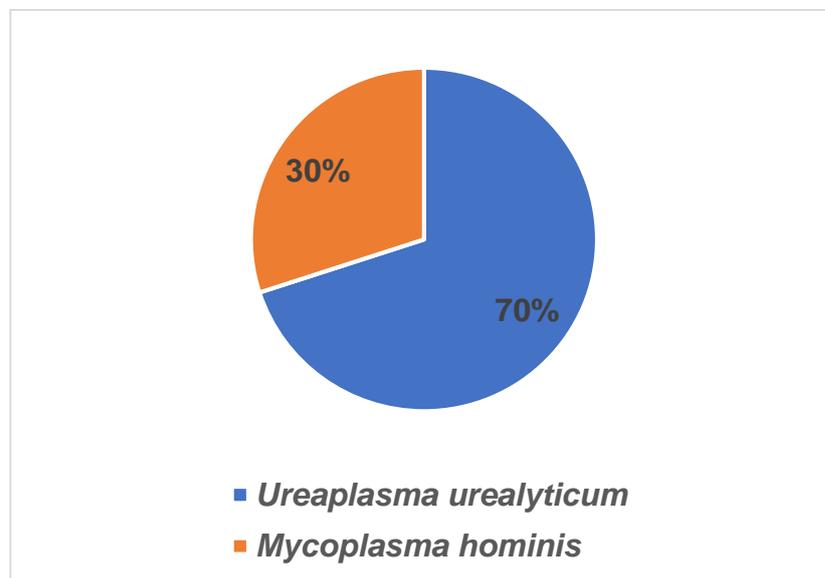


Figure 8 : Répartition des souches utilisées pour le test

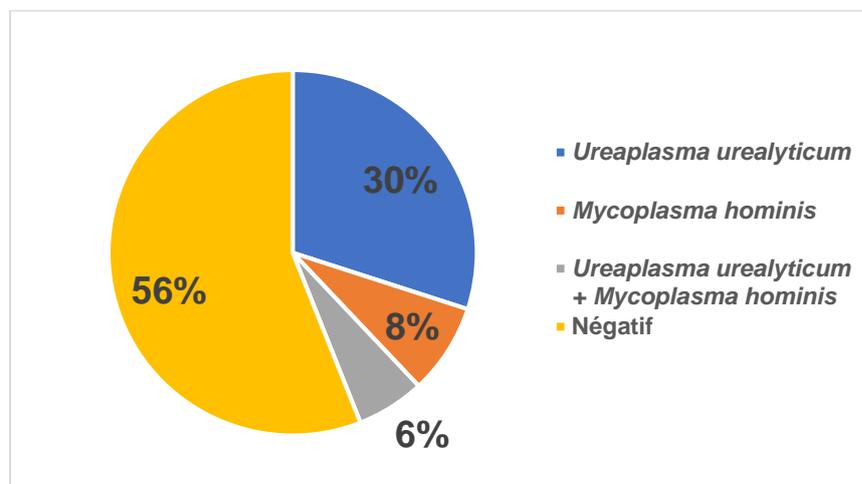


Figure 9 : Répartition des résultats des 50 échantillons

- **Contrôle de qualité du test**

- Stérilité

L'étude de la stérilité des milieux a permis de noter qu'aucun virage n'a été observé pour les bouillons Urée et Arginine pour le test en milieu liquide. Quant à la gélose A7 nous n'avons noté aucune colonie après incubation de ce dernier à l'étuve. Ceci témoigne une bonne stérilité des milieux utilisés dans la présente étude.

- Stabilité

Après conservation pendant 3 mois de ces milieux, nous n'avons noté aucune variation au niveau des milieux conservé à 4°C. Ceci témoigne de la bonne qualité de nos milieux s'ils sont conservés à 4°C.

Répétabilité et Reproductibilité

Les tests réalisés avec les souches connues de mycoplasmes donnent les mêmes résultats pour le test réalisé avec les trois lots de réactif et pour les trois tests par lot. Ce qui traduit une bonne répétabilité et une bonne reproductibilité du kit MicroCSB System®.

- Durée du test

Les souches de *Uu* ont pu être identifiées en 16h, par contre les souches de *Mh* ont été identifiées en 24h minimum.

- **Performances du kit MicroCSB System®**

La performance de ce test passe par la détermination de la spécificité et de la sensibilité du test. Ainsi, sur les 50 échantillons prélevés, les résultats se présentent comme l'indique les tableaux 6 et 7. De l'analyse des résultats de ce tableau, le calcul de la spécificité et de la sensibilité donne respectivement les résultats suivants :

Tableau VI: Présentation des résultats obtenus avec le kit MicroCSB System®

		Gélose A7		Total
		Positif	Négatif	
Micro CSB system®	Positif	28 (56%)	4 (8%)	32 (64%)
	Négatif	3 (6%)	15 (30%)	18 (36%)
Total		31 (62%)	19 (38%)	50 (100%)

On constate dans ce tableau 56% de vrai positif et 30% de vrai négatif. Nous notons également 6% de faux négatif et 8% de faux positif à la microgalerie MicroCSB system®

Tableau VII : Présentation des résultats obtenus avec le kit mycoplasma IST2

		Gélose A7		Total
		Positif	Négatif	
Mycoplasma IST2	Positif	23 (46%)	10 (20%)	33 66%
	Négatif	7 (14%)	10 (20%)	17 34%
Total		30 (60%)	20 (40%)	50 10%

On constate dans ce tableau 46% de vrai positif et 20% de vrai négatif. Nous notons également 14% de faux négatif et 20% de faux positif au kit mycoplasma IST2.

Tableau VIII: Récapitulatif des performances du test avec la microgalerie MicroCSB System®.

Indicateur	Valeurs	Intervalle de confiance 95%
Exactitude	0,86	[0,76 - 0,96] *
Sensibilité	0,90	[0,75 – 0,96] *
Spécificité	0,78	[0,56 – 0,91] *
Valeur prédictive positive	0,87	[0,76 - 0,99] *
Valeur prédictive négative	0,83	[0,66 - 1] *

* = Valeur comprise dans l'intervalle de confiance

Tableau IX: Récapitulatif des performances du test avec le kit mycoplasma IST2.

Indicateur	Valeurs	Intervalle de confiance 95%
Exactitude	0,66	[0,529 - 0,791] *
Sensibilité	0,76	[0,59 – 0,88] *
Spécificité	0,50	[0,29– 0,70] *
Valeur prédictive positive	0,69	[0,532- 0,848] *
Valeur prédictive négative	0,58	[0,345 - 0,815] *

* = Valeur comprise dans l'intervalle de confiance

II. Discussion

L'identification précise des mycoplasmes responsables d'infections urogénitales constitue une préoccupation majeure en santé. Sur les échantillons recueillis au cours de la présente étude nous notons une prédominance de *Ureaplasma urealyticum* par rapport aux souches de *Mycoplasma hominis*. Ces résultats corroborent ceux de Baybirak *et al.* en 2009, Ahmadi *et al.* en 2016 et Javedinia *et al.* en 2017 ([38] [39] [40]). Ces auteurs ont également montré la liaison entre la présence de ces bactéries à titre élevé chez les femmes enceintes et la survenue des avortements. Ceci dénote de l'intérêt d'une bonne identification des mycoplasmes.

Sur les 50 souches de mycoplasmes identifiées avec les méthodes de références, seules 5 sont non identifiées par la microgalerie MicroCSB system®. Ceci rejoint les études de Bakhoun (2004) qui affirme que les méthodes moléculaires sont les plus fiables et rapides et facile d'exécution mais elles sont rares dans les pays en voie de développement qui sont obligé de recourir à des méthodes phénotypiques offrant quand même des résultats qui sont très proches[41]. C'est le cas de la microgalerie MicroCSB system® qui a montré de bonne performance. En effet, les kits commerciaux ont présenté une sensibilité et une spécificité respectives de 22% et 64 %. Ceci montre une faible capacité de ces tests à détecter tous les sujets présentant une infection à mycoplasma et à écarter ceux qui n'en ont pas, cela s'explique par le fait que le kit Biomérieux ne comporte pas de gélose A7. Ce qui le rend ainsi limité.

En ce qui concerne les tests du contrôle de qualité, nous avons noté une bonne spécificité et une bonne sensibilité de la microgalerie MicroCSB system®. Ceci montre l'exécution facile du test sans risque de souillure et de résultat discordant pour un même patient. Il s'agit de critères très importants pour un test diagnostic. Le test de répétabilité et de reproductibilité sont des critères importants du contrôle de qualité d'une méthode [42]. Dans un test de répétabilité, le coefficient de variation (CV) est le reflet de la dispersion relative des résultats dans une même série et doit être inférieur ou égal à 5% pour valider la méthode [43]. Le test de reproductibilité quant à lui permet d'évaluer la qualité et la stabilité des réactifs et de sa conservation [44]. L'absence de variation entre les résultats dans notre étude montre la bonne qualité de la microgalerie MicroCSB system®. A cela s'ajoute la durée d'obtention des résultats acceptable. La discordance des valeurs qualitatives observées entre le kit MicroCSB System® et le kit mycoplasma IST2 serait due au fait que le kit mycoplasma IST2 ne possède qu'un puit de titrage de 10^4 . Alors qu'on a chez les hommes un titre de 10^3 ce qui est inférieur

au titre représenté, alors que pour le kit MicroCSB System® nous avons des titres rapprochés aussi bien inférieurs que supérieurs.

En effet, la majorité de nos résultats est obtenue en milieu liquide, et ce, dans l'intervalle de 24h (16h pour U.u et 24h pour Mh). Les tests négatifs ont été confirmés après 48h, et pour la culture sur milieu gélosé la lecture s'est faite entre 24h et 72h.

La microgalerie MicroCSB System® présente ainsi deux avantages :

- La lecture des résultats possible en 24h, avec une possibilité de détection de U.u possible en 16h.
- La possibilité d'éviter les faux positifs car comportant une gélose A7 pour la culture en milieu gélosé.
- La possibilité également d'éviter les faux négatifs avec des titres de 10^3 UCC/ml, surtout dans l'avantage des hommes.

Cependant le coût exact de la réalisation reste à être déterminé.

Tout ceci nous permet de valider cette méthode et de recommander son utilisation dans les pays à faibles revenus pour une meilleure identification des mycoplasmes urogénitaux et une prise en charge adéquate et rapide des malades

Recommandations

Nous suggérons que :

- ☞ Les laboratoires fassent de façon systématique la culture sur gélose A7 pour plus de fiabilité.
- ☞ Il faudra aussi allonger la durée des tests de stabilité pour vérifier la conservation pour des périodes plus avancées.
- ☞ D'autres investigations peuvent être entreprises avec une augmentation de la taille de l'échantillon pour d'autres tests de validation méthodologique.

Conclusion

Cette étude a été réalisée à l'Unité de Recherche et de Biotechnologie Microbienne du laboratoire de bactériologie-virologie de l'hôpital Aristide LeDantec et au laboratoire de Bactériologie-Virologie fondamentale et appliquée de l'U.C.A.D. II. L'objectif était d'améliorer les performances des microgaleries MicroCSB System® en réduisant le délai de lecture des résultats et en validant la méthode par des tests qualitatifs et de performance.

Au total 50 souches d'*Ureaplasma urealyticum* et *Mycoplasma hominis*, ainsi que 50 échantillons ont été analysés. *Ureaplasma urealyticum* était majoritaire dans les souches, soit un pourcentage de 70 contre 30 pour *Mycoplasma hominis*. Avec les échantillons prélevés nous avons également observés majoritairement *Ureaplasma urealyticum* (30%), seul 6% des échantillons comportaient les deux bactéries. La microgalerie MicroCSB System® nous a permis de lire les résultats dans un délai réduit avec plus de fiabilité car comportant la gélose A7.

Après identification des germes en un temps réduit (16h-24h pour *Ureaplasma urealyticum* et 24h-48h pour *Mycoplasma hominis*), l'étude présente une amélioration des performances des microgaleries MicroCSB System®. Cependant, une étude plus approfondie sur une durée plus allongée, avec un échantillonnage plus grand permettrait l'obtention de meilleures performances.

Références bibliographiques

- 1- **Razin S. et Hermann R.**. Molecular Biology and Pathogenicity of mycoplasmas. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. 2002. 235p
- 2- **Blanchard A. et Bébéar C.M.**. Mycoplasmas of Humans. In (Razin S. et Hermann R. Edts). Molecular biology and pathogenicity of Mycoplasmas. Kluwer Academic / Plenum Publishers, New York. 2002. p. 45–71
- 3- **Shimizu, K., Hitt, M., Vaidyanath, D., & Pisano, V.**. Theoretical foundations of cross-border mergers and acquisitions: A review of current research and recommendations for the future. *Journal of International Management*. 2004. 10 (3) : 307 - 353
- 4- **Djigma W.F.**. Co-infection de *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma urealyticum* avec le virus de l'immunodéficience humaine chez les femmes VIH séropositives à Ouagadougou. DEA Biochimie-Biologie Moléculaire. UFR-SVT CERBA/LABIOGENE. Université de Ouagadougou. 2009. 67p
- 5- **Razin S. et Hayflick L.**. Highlights of mycoplasma research --an historical perspective. *Biologicals: Journal of the International Association of Biological Standardization*. 2010. 38, 183-190.
- 6- **Kingsley C.A. et Gregor R.**. Organisms associated with bacterial vaginosis in Nigerian women as determined by PCR-DGGE and 16 rRNA gene sequence. *African Health Sciences*. 2007. 7 (2): 68-72.
- 7- **Pipingas A., Dangor Y., Radebe F., Fehler H.G., Khumalo S., De Gouvea L., Koornhof H.J., Ballard R.C.**. Microbiological investigation of Bartholin's gland abscesses in urban women in Johannesburg. *The South. J. of Epidem. And Infect.* 2007. 22 (1), 18-22.
- 8- **Guibert M., Zupan V., Attou M.A., Dehan M. et Nordmann P.**. Colonisation de nouveau-nés prématurés par les mycoplasmes uro-génitaux : leur rôle au cours des dysplasies broncho-pulmonaires. *Méd. et Mal. Infect.*; 1996. 26(5) :612-617.
- 9- **Shahhosseiny M.H., Hosseiny Z., Khoramkhorshid H.R., Azari S., Shokrgozar M.A.** Rapid and sensitive detection of Mollicutes in cell culture by polymerase chain reaction. *Journal of Basic Microbiology*. 2010. 50 (2), 171-178
- 10- **Cazanave C., Manhart L.E., Bébéar C.**. *Mycoplasma genitalium*, an emerging sexually transmitted pathogen. *Médecine Mal Infect.* 2012. 42(9): 381-92.
- 11- **Bébéar C, Cazanave C, Pereyre S, Bébéar C.M.**. Mycoplasmes urogénitaux. In: (Janier M, Edt). Les infections sexuellement transmissibles (1^{ère} édition). Elsevier Masson, Paris. 2009. p.57-61.
- 12- **Bébéar C, Bébéar C.M.**. Infections humaines à mycoplasmes. *Rev Francoph Lab.* 391: 2007. 63-9

- 13- Escarguel C.** La sérologie des mycoplasmes urogénitaux *Spectrabiologie.*; 1988. 89/6: 39-42.
- 14- Weidner W, Krause W, Scheieffer HG, Brunner H, Friedrich HJ.** Ureaplasma infection of the male urogenital tract in particular prostatitis and semen quality. *Urol Ins.*; 1985. 40: 5-9
- 15- Fari A.** Recherche et identification d'une infection génitale. *Encycl. Méd. Chirurg.*, Paris; 1986. 73 : 1-6p.
- 16- Blanchard A. et Bébéar C.** The evolution of *Mycoplasma genitalium*. *Ann N Y Acad Sci.* 2011.1230: E61-4.
- 17- McGowin C.L., Anderson-Smiths C.** *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of sexually transmitted disease in women. *PLoS Pathog.* 2011. 7 (5) : e1001324.
- 18- Oakeshott P., Aghaizu A., Hay P., Reid F., Kerry S., Atherton H.** Is *Mycoplasma genitalium* in women the « New Chlamydia? » A community-based prospective cohort study. *Clin Infect Dis.* 2010. 51 (10) : 1160-6.
- 19- Taylor D., Robinson.** Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma* : an update. *Clinical infectious diseases.* 1996. 23, 671-684
- 20- Jalil N., Doble A., Gilchrist C., Taylor R.D.** Infection of the epididymis by *U. urealyticum*. *Genitorius.* 1988. *Med.* 64 : 367-368
- 21- Bebear C. Latrille J.** Mycoplasmes In : (Leon le Minor, Edt): Bactériologie médicale. Flammarion, Paris. 1990. p. 1088-1097
- 22- Henry S.J.** Infections en gynécologie : les moyens actuels de diagnostic et de traitement. *Actualités gynécologiques.* 1991. 22: 101-112
- 23- Ndour M.A. Sankale J.L. Gaye A. Boye C.S.B.** Les mycoplasmes dans les infections urogénitales de la femme à Dakar : résultats préliminaires. Thèse de Doctorat, FMPOS, Université Cheik Anta Diop Dakar 2003. (Sénégal). N°54. 157p
- 24- Vanwayenbergh J.** L'urétrite masculine. *Acta Urol Belg*, 1993. 6 : 157-160.
- 25- Demba E., Morinson L., Van Der Loeff M. S., Awasana Akum A., Gooding E., Bailey R., Mayaud P. And West B.,** Bacterial vaginosis, vaginal flora patterns and vaginal hygiene practices in patients presenting with vaginal discharge syndrome in Gambia. *West Africa. BMC infectious diseases.* 2005.5 : 1-12.
- 26- Boudry P.** Mycoplasmes urogénitaux. Implications en pathologie humaines. *Louvain Med.* 1998. 117 : 128-141.

- 27- Zizendorf NY., Kouassi-Agbessi BT., Lathro JS., Don C., Kouadio L. Loukou YG.** *Ureaplasma urealyticum* or *Mycoplasma hominis* infections and semen quality of infertile men in Abidjan. *J. of Rep. and Contr.* 2008. 19 : 65-72.
- 28- Dan M., Samra Z., Katz A., Debby A., Gutman R., Zakut H.** Etiology of acute pelvic inflammatory disease proven by laparoscopy. *Sex. Transm. Dis.* 1993. 20 (3) : 158-63.
- 29- Taylor-Robinson D., Jensen J.S.** . *Mycoplasma genitalium*: from Chrysalis to multicolored butterfly. *Clin Microbiol Rev.* 2011. 24 (3) : 498 - 514.
- 30- Sethi S., Singh G., Samanta P., Sharma M.** .*Mycoplasma genitalium*: an emerging sexually transmitted pathogen. *Indian J Med Res.* 2012. **136** (6) : 942 - 55.
- 31- Manhart LE.** *Mycoplasma genitalium*: An emergent sexually transmitted disease? *Infect Dis Clin North Am.* 2013. 27 (4) : 779-92.
- 32- Haggerty CL, Taylor BD.** *Mycoplasma genitalium*: an emerging cause of pelvic inflammatory disease. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2011. 2 : 95-98.
- 33- Oakeshott P., Hay P., Taylor-Robinson D., Hay S., Dohn B., Kerry S.** Prevalence of *Mycoplasma genitalium* in early pregnancy and relationship between its presence and pregnancy outcome. *BJOG Int J Obstet Gynaecol.* 2004. 111 (12) : 1464-7.
- 34- Hitti J., Garcia P., Totten P., Paul K., Astete S., Holmes K.K.** . Correlates of cervical *Mycoplasma genitalium* and risk of preterm birth among Peruvian women. *Sex Transm Dis.* 2010. 37 (2) :81-5.
- 35- Palmer H.M., Gilroy C.B., Furr P.M., Taylor-Robinson D.** Development and evaluation of the polymerase chain reaction to detect *Mycoplasma genitalium*. *FEMS Microbiol Lett.* 1991.**61** (2) : 199-203
- 36- Avril JL,Dabernat H.,Denis F.,Monteil H.** *Mycoplasma – Ureaplasma Bactériologie clinique* Edition Ellipses. 1988. 39: 481-491
- 37- ADECA, Annual Report. 2016**
- 38- Baybirack R. M., Ozerol H. I., GucluervN., Celik O.,** prevalence and antibiotic susceptibility *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women. 2009. international Societyfor infectious diseases.
- 39- Ahmadi A., Rashid R., Mazaher K., Fariba F., Samaneh R., Shaho M., Reza M., juillet.** A case- control study on the relationship between *Mycoplasma genitalium* infection in women with normal pregnancy and spontaneous abortionusing polymerase chain reaction. Korea Centers for Diseases and Prevention. 2016.

- 40- Javedinia S., Zahra M., Mohamed R.S., Mehri N., Azardokht T., Ramin A., Maryam J.,** prevalence of Mycoplasma genitalium and Ureaplasma urealyticum in pregnant women of Teheran by duplex PCR, Cur Pediatr Res 2017, 21 (4): 680-685.
- 41- Bakhoum I.M.N.S.** Contrôle de qualité et validation de différentes microméthodes d'identification bacterienne. Thèse de Doctorat, FMPOS, Université Cheik Anta Diop Dakar 2004 (Sénégal) , 119p. N°08
- 42- Bernad S.** Biochimie Clinique. Maloine, 1985 Paris. 265p
- 43- Yassault A., Dumont G., Labbe M.** Définition des critères de qualité d'une méthode d'analyse : 1992.*le moniteur internet*. 26 : 20 - 33.
- 44- Eurachem Guide..** The fitness for purpose of analytical method validation and related topics. Raven Press: 1998. New York. 89p

Webographie

<http://www.invivogen.com/review-mycoplasma>

<http://www.microbes-edu.org/etudiant/etudiants.html>

Annexes

PREPARATION DE MILIEU DE BASE

Milieu de base (ph = 6,1 – 6,3)

- Bouillon PPLO

Bouillon PPLO	3	g
Eau distillée	100	ml

- ☞ Dissoudre la poudre à chaud
- ☞ Stériliser à l'autoclave 15 minutes à 121°C
- ☞ Laisser refroidir jusqu'à 60°C

PREPARATIONS DES DIFFERENTS MILIEUX

Milieu de transport A3

Milieu de base PPLO (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

- ☞ Ajouter stérilement les différents composants au milieu de base
- ☞ Filtrer le mélange
- ☞ Répartir en tubes à hémolyse stériles sous un volume de 2 ml
- ☞ Conserver :
 - à +4°C pendant 3 semaines
 - à -20°C pendant 1 an

Bouillon Urée

Milieu de base PPLO (ph = 7)	80	ml
Sérum de cheval	10	ml
Chlorhydrate de cystéine à 4%	0,25	ml
Pénicilline (solution à 500.000 U/ml)	0,20	ml
VCN	1	ml
Extrait de levure 10%	0,4	ml
Mélange Polyvitex	1	ml
Urée à 10%	1	ml
Rouge de phénol à 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 2 ml
- ☞ Conserver :
 - à +4°C pendant 3 semaines
 - à -20°C pendant 1 an
- ☞ Ramener le milieu à 25°C avant emploi

Bouillon Arginine

Milieu de base PPLO (ph = 7,8)	80	ml
Sérum de cheval	10	ml
Pénicilline (solution à 500.000 U/ml)	1	ml
VCN	1	ml
Chlorhydrate de cystéine à 4%	0,25	ml
Extrait de levure 10%	0,4	ml
Mélange Polyvitex	1	ml
Chlorhydrate d'Arginine à 20%	1	ml

Rouge de phénol à 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 2 ml
- ☞ Conserver :
 - à +4°C pendant 3 semaines
 - à -20°C pendant 1 an
- ☞ Ramener le milieu à 25°C avant emploi

Gélose A7

Milieu PPLO Agar Base

- PPLO Agar Base 2,84g
- Eau distillée 80ml

- ☞ Chauffer le mélange sous agitation fréquente et laisser bouillir pendant une minute de manière à dissoudre parfaitement la poudre.
- ☞ Mettre à l'autoclave à 121°C pendant 15 minutes. A la fin du cycle, laisser refroidir jusqu'à 60°C.

Sérum de cheval	20	ml
Pénicilline (solution à 500.000 U/ml)	1	ml
VCN	1	ml
Chlorhydrate de cystéine à 4%	0,25	ml
Mélange Polyvitex	1	ml
Chlorhydrate d'Arginine à 10%	1	ml
Urée à 5%	2	ml
Extrait de levure 10%	1	ml

- ☞ Faire le mélange stérilement et filtrer
- ☞ Ajouter au milieu de base préalablement préparé

- ☞ Répartir dans des boîtes de pétri de 4 cm de diamètre à raison de 4 ml par boîte ou dans des boîtes de 6 cm de diamètre à raison de 10 ml par boîte.
- ☞ Laisser sécher, puis conserver à +4°C dans des sacs en plastique scellés.

Résumé

La recrudescence des affections liées aux mycoplasmes urogénitaux dans les populations a suscité un intérêt croissant au sein de la communauté scientifique. Ces mycoplasmes étant des bactéries atypiques constituent de nos jours un réel problème de santé publique. Cette étude vise à améliorer les performances des microgaleries MicroCSB System®.

Des souches de *Mycoplasma hominis* et *Ureaplasma Urealyticum* ont été utilisées ainsi que des prélèvements d'échantillons chez des patients destinés à la recherche des mycoplasmes urogénitaux. Des analyses comparatives ont été faites entre la microgalerie MicroCSB System® et le kit mycoplasma IST2. Des tests de performances (répétabilité, reproductibilité, spécificité, exactitude, sensibilité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative) ont été réalisés afin de valider la méthode.

Il ressort de cette étude que *Ureaplasma urealyticum* est le mycoplasme urogénital le plus isolés tant des souches que des prélèvements reçus avec respectivement des pourcentages de 70 et 30. Le délai de lecture des résultats a été réduit à 16h pour *Ureaplasma urealyticum*, et entre 24h et 48h au plus pour *Mycoplasma hominis*. Les tests de performance ont donné d'excellents résultats, successivement 0,83 ; 0,87 ; 0,86 ; 0,90 ; 0,78 pour VPN, VPP, exactitude, sensibilité et spécificité.

Au vu de nos résultats nous validons la microgalerie MicroCSB System® car facile à utiliser en routine, rapide et fiable. Néanmoins, nous recommandons que l'étude se fasse également sur un échantillonnage plus grand dans une période plus avancée, mais également que les laboratoires adoptent de façon systématique la gélose A7.

Mots clés : *Mycoplasma hominis* *Ureaplasma Urealyticum* MicroCSB System®, reproductibilité, spécificité, exactitude, sensibilité, valeur prédictive positive et valeur prédictive négative