

Physiopathologie et diagnostic des infections à *Mycoplasma pneumoniae*

Pathogenesis and laboratory diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections

C.-M. Bébéar

Laboratoire de bactériologie EA 3671, infections humaines à mycoplasmes et à chlamydiae, centre national de référence des infections à chlamydiae, université Victor-Segalen Bordeaux 2 et CHU de Bordeaux, 146, rue Léo-Saignat, 33076 Bordeaux cedex, France

Disponible sur Internet le 7 septembre 2007

Résumé

Mycoplasma pneumoniae est le seul mycoplasme respiratoire pathogène pour l'homme. Responsable surtout de trachéobronchites, c'est le deuxième agent responsable de pneumopathies communautaires bactériennes, probablement impliqué dans des exacerbations de l'asthme. Ces infections surviennent à l'état endémique avec des poussées épidémiques tous les quatre à sept ans et atteignent plus volontiers l'enfant de plus de cinq ans. Le diagnostic biologique est fait uniquement dans les infections sévères, le plus souvent par la sérologie en raison de la croissance fastidieuse du mycoplasme. Cependant, *M. pneumoniae* peut être facilement détecté par amplification moléculaire. Les macrolides et apparentés sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections respiratoires à *M. pneumoniae* touchant principalement l'enfant. La sensibilité aux antibiotiques de *M. pneumoniae* est exceptionnellement recherchée. En effet, les résistances acquises sont encore rarement décrites et le délai nécessaire à leur mise en évidence fait qu'il n'y a pas de conséquence thérapeutique immédiate.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Abstract

Mycoplasma pneumoniae is the only mycoplasma clearly involved in respiratory tract infections in man. Implicated most often in tracheobronchitis, it is the second most frequent agent responsible for community-wide bacterial pneumonia, and in addition it probably causes asthma exacerbations. *M. pneumoniae* infection occurs endemically, with epidemic peaks every 4–7 years, mostly in children above five years of age. The laboratory diagnosis of these infections, mainly by serology, is made only in severe cases because of the fastidious growth of this microorganism. *M. pneumoniae* can, however, be detected easily by molecular amplification techniques. Macrolides and related antibiotics are considered the treatment of choice for *M. pneumoniae* infection in both adults and children. Antibiotic sensitivity testing of *M. pneumoniae* is not done routinely because resistant isolates have only rarely been described, the results are delayed, and they have no immediate therapeutic consequence.

© 2007 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Culture ; Infections respiratoires ; Macrolides ; *Mycoplasma pneumoniae* ; PCR ; Sérologie

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*; Bacterial pneumonia; Diagnosis; Therapy; Macrolides

1. Introduction

Les mycoplasmes sont responsables d'infections respiratoires, d'infections génitales et d'infections systémiques chez les immunodéprimés [1,2]. Hormis quelques caractères épidémiologiques, ces infections ne présentent pas de trait clinique spécifique permettant de les identifier. La preuve de l'origine de ces infections ne peut être faite que par le diagnostic biologique.

Celui-ci doit tenir compte des propriétés particulières des mycoplasmes et fait appel à des techniques différentes selon l'espèce recherchée. Il est souvent difficile du fait du caractère fastidieux de la croissance de certaines espèces.

2. Les mycoplasmes, des bactéries particulières

Ils appartiennent à la classe des *Mollicutes* (de *mollis cutis* : peau molle). Leur caractéristique la plus originale est l'absence de paroi d'où un aspect polymorphe et une insensibilité totale aux

Adresse e-mail : cecile.bebear@u-bordeaux2.fr.

bêta-lactamines. Il s'agirait de formes très évoluées, dérivées de Bactéries à Gram positif à faible pourcentage en guanine + cytosine et ayant perdu la capacité de synthétiser un paroi.

De très petite taille, 300–850 nm, les mycoplasmes sont polymorphes, coccoïdes ou filamenteux et ne sont pas colorables par le Gram. Une structure terminale spécialisée, le *tip*, permet à *M. pneumoniae* d'adhérer aux cellules eucaryotes.

Ils possèdent un génome de très petite taille (816 kpb pour *M. pneumoniae*). La séquence du génome est connue pour la plupart des espèces pathogènes pour l'homme dont *M. pneumoniae*. Il existe une certaine hétérogénéité antigénique à l'intérieur d'une même espèce. Deux groupes sont décrits chez *M. pneumoniae* en fonction de la séquence du gène de l'adhésine P1.

Anaérobies facultatifs, les mycoplasmes pathogènes pour l'homme exigent des milieux complexes renfermant des stéroïdes. Ainsi, *M. pneumoniae* utilise comme source principale d'énergie, le métabolisme du glucose. Sa croissance est difficile et fastidieuse.

3. Épidémiologie, habitat

Largement répandus dans la nature, les mycoplasmes colonisent chez l'homme les muqueuses respiratoires et les muqueuses génitales.

Parmi les espèces respiratoires, seul *M. pneumoniae* colonise les voies respiratoires hautes et basses et a un pouvoir pathogène certain. Il serait responsable de 15 à 20 % des pneumonies communautaires [3], chiffre pouvant monter à 40 % chez l'enfant. Il viendrait en deuxième position derrière *Streptococcus pneumoniae*. Il provoque des infections respiratoires le plus souvent bénignes se manifestant à l'état endémique avec de petites poussées épidémiques tous les quatre à sept ans. Une de ces poussées s'est produite dans plusieurs pays d'Europe en 1992, au Danemark en 1999 et dans certaines régions françaises en 2004–2005. Leur fréquence réelle est mal connue, le diagnostic étiologique étant rarement porté. Une enquête menée en France lors d'infections respiratoires communautaires aiguës de l'adulte, entre 1997 et 2000, a montré la présence de *M. pneumoniae* par PCR dans 7,3 % des pneumopathies aiguës (671 cas) et 2,3 % des bronchites aiguës (2336 cas) [4].

Ces infections sont relativement peu contagieuses nécessitant un contact étroit pour leur transmission. Une étude très récente [5] effectuée lors d'une épidémie survenue dans une unité de l'armée israélienne a montré que deux facteurs de risque, un état de fumeur et un niveau préalable faible d'IgG, étaient significativement associés à la survenue d'une infection. La persistance du mycoplasme dans les voies respiratoires pendant quelques semaines, contribue à la nature endémique de la maladie. Malgré cette persistance, *M. pneumoniae* n'appartient pas à la flore commensale des voies aériennes.

4. Pathogénie

La pathogénie des infections à *M. pneumoniae* a été étudiée sur différents modèles animaux, hamster, chimpanzé et récemment un modèle murin [6]. Deux mécanismes y

contribuent, l'adhésion de *M. pneumoniae* à l'épithélium respiratoire suivie de lésions cellulaires localisées et des désordres immunopathologiques susceptibles de provoquer des lésions à distance. L'adhésion se fait au niveau de l'extrémité effilée, le *tip*, par un système complexe de protéines, la principale étant l'adhésine P1. L'adhésion entraîne un arrêt de l'activité ciliaire et des altérations cellulaires liées à la production de peroxydes et de superoxydes par *M. pneumoniae*. Le mycoplasme serait capable de pénétrer à l'intérieur des cellules et de s'y multiplier lentement. Les désordres immunopathologiques expliquent l'apparition d'autoanticorps au cours de l'infection. Ces autoanticorps seraient dus à des parentés antigéniques existant entre glycolipides membranaires de *M. pneumoniae* et certains tissus (pancréas, cerveau).

Le rôle possible de *M. pneumoniae* dans l'asthme est connu de longue date et étayé par des arguments récents. Chez la souris, des travaux expérimentaux montrent que *M. pneumoniae* provoque une inflammation des voies respiratoires avec hyperréactivité bronchique. Ces effets sont encore plus marqués après sensibilisation allergénique, plaçant ainsi la souris en situation à risque d'asthme [6–8]. L'association de *M. pneumoniae* aux exacerbations aiguës de l'asthme a été montrée essentiellement chez l'enfant [9,10], mais aussi chez l'adulte [11]. Il y aurait aussi un lien entre asthme chronique stable et *M. pneumoniae*.

5. Diagnostic biologique

Le diagnostic biologique d'une infection à *M. pneumoniae* est plus souvent réalisé par la sérologie que par la culture et l'amplification génique, cette dernière se développant de plus en plus. Ces méthodes directes ont cependant l'avantage d'affirmer le caractère récent de l'infection [2,12].

5.1. Diagnostic bactériologique direct

La culture est plus rarement réalisée pour *M. pneumoniae* en raison des délais nécessaires. Elle est avantageusement remplacée par l'amplification génique.

5.1.1. Prélèvements

Quelle que soit la méthode de prélèvement, celui-ci doit ramener des cellules auxquelles *M. pneumoniae* adhère.

Prélèvements de gorge et aspirations nasopharyngées chez le jeune enfant sont à préférer pour la recherche de *M. pneumoniae* en raison du caractère diffus de l'infection. Brossage bronchique et lavage bronchoalvéolaire sont également adaptés, contrairement aux expectorations, trop contaminées et pouvant contenir des inhibiteurs de PCR. Les prélèvements sur écouvillon seront mis en milieu de transport adapté.

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

5.1.2. Milieux de culture

Les milieux utilisés sont complexes, renferment 20 % de sérum, de l'extrait de levure et sont rendus sélectifs par addition

d'une bêtalactamine et éventuellement d'autres inhibiteurs. Il faut utiliser des milieux liquides et gélosés. Les milieux liquides sont ensemencés en faisant des dilutions pour éliminer des inhibiteurs tissulaires et éventuellement faire une étude quantitative. L'incubation a lieu à 37 °C, de préférence sous CO₂.

Pour *M. pneumoniae*, milieu de Hayflick modifié et milieu SP-4 peuvent être utilisés. Les milieux liquides renferment glucose et rouge de phénol. La croissance se traduit par une acidification du milieu après six à 21 jours. Sur milieu gélosé, les colonies sont petites, granulaires.

La croissance en milieu liquide doit toujours être contrôlée sur milieu gélosé pour éviter une confusion avec un virage d'indicateur coloré dû à la présence d'autres bactéries ou de cellules.

5.1.3. Identification d'espèce

Elle se fait sur les propriétés métaboliques et l'aspect des colonies.

Pour *M. pneumoniae*, il s'agit de la fermentation du glucose et de l'absence d'hydrolyse de l'arginine auxquelles peuvent s'ajouter les propriétés d'hémadsorption ou d'hémagglutination absentes chez les mycoplasmes commensaux. Ces propriétés ne permettent pas de séparer *M. pneumoniae* et *M. genitalium*. Seule l'amplification génique peut le faire.

5.1.4. Amplification génique

C'est une excellente alternative à la culture pour *M. pneumoniae*, tant sur le plan sensibilité que spécificité [13,14]. Différentes cibles ont été proposées pour l'amplification génique de *M. pneumoniae*, principalement le gène de l'adhésine P1 et le gène codant l'ARNr 16S [15,16]. Des techniques de PCR en point final et de PCR en temps réel sont utilisées dans certains laboratoires et il existe à ce jour quelques troupes commercialisées. La PCR peut être réalisée sur les différents prélèvements déjà cités, en particulier les prélèvements de gorge ou les aspirations nasopharyngées, mis en milieu de transport. Il est possible par PCR-RFLP de typer *M. pneumoniae* et de séparer deux groupes dans un but épidémiologique [17].

5.1.5. Détection antigénique

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

5.1.6. Interprétation

L'isolement de *M. pneumoniae* chez un patient est un élément significatif car, a priori, cette bactérie n'appartient pas à la flore commensale, à l'exception des périodes épidémiques.

5.2. Sérologies

5.2.1. Techniques

Ce sont les méthodes les plus utilisées pour le diagnostic d'infection à *M. pneumoniae* [18,19]. La présence d'agglutinines froides n'est ni constante ni spécifique. La réaction de

fixation du complément détecte IgG et IgM. Bien que moins sensible que d'autres techniques plus récentes, c'est un critère d'appréciation toujours valable à condition d'avoir une séroconversion ou un taux minimum présomptif de 64.

Parmi les autres techniques disponibles, les techniques immunoenzymatiques (EIA) sont les plus employées en raison de leur meilleure sensibilité et spécificité. Elles permettent de détecter séparément IgM, IgG et IgA. Certains fabricants proposent des tests EIA rapides détectant sur membrane les IgM seules, d'autres simultanément les IgG et IgM.

5.2.2. Interprétation

La présence d'IgM spécifiques seules, est souvent interprétée comme la preuve d'une infection aiguë car ce type d'anticorps apparaît typiquement une semaine après le début de l'infection et deux semaines avant l'apparition des IgG. Cela présente l'avantage théorique d'autoriser l'analyse d'un seul sérum. Cependant, la présence d'IgM, témoignant d'une primo-infection, est souvent observée chez les enfants et adolescents, mais rarement chez l'adulte. Chez l'adulte, il s'agit le plus souvent de réinfection avec une augmentation de titre des IgG sans réponse IgM.

Les IgA sont, comme les IgM, présentes dans les infections aiguës, mais sont, à l'inverse des IgM, également présentes lors des réinfections. Chez l'adulte, la présence d'IgA pourrait donc permettre de poser le diagnostic d'infection en cours en absence de réponse IgM. Il est donc recommandé de rechercher les IgM, les IgG et éventuellement les IgA sur les deux sérums.

L'élévation parfois tardive des IgG, la forte prévalence des IgG qui peuvent persister longtemps chez des patients ayant eu une infection à *M. pneumoniae* et l'absence fréquente d'une réponse IgM chez l'adulte impose de sérieuses limites au diagnostic sérologique chez l'adulte. Cependant, le diagnostic sérologique a l'avantage de faire la différence entre un état de colonisation et un état d'infection entraînant une réponse en anticorps. Les méthodes directes comme l'amplification génique ou la culture ne permettent pas de différencier infection de colonisation, notamment en période épidémique. Une approche diagnostique optimale est donc d'associer la PCR ou la culture à des sérologies.

5.3. Mycoplasmes et antibiotiques

Les mycoplasmes ont des caractéristiques naturelles expliquant leur résistance intrinsèque à certaines familles d'antibiotiques comme les bêtalactamines et glycopeptides. Les antibiotiques potentiellement actifs sont les tétracyclines, les fluoroquinolones, les macrolides et apparentés [20].

Les macrolides et apparentés sont les antibiotiques de choix pour le traitement des infections respiratoires à *M. pneumoniae* touchant principalement l'enfant [3]. La sensibilité aux antibiotiques de *M. pneumoniae* est exceptionnellement recherchée. En France, de très rares cas de résistance acquise aux macrolides ont été décrits [20]. Cependant les récentes publications japonaises faisant état d'une augmentation de la fréquence des souches de *M. pneumoniae* résistantes aux macrolides, une surveillance épidémiologique reste nécessaire.

Références

- [1] Bébéar C. In: Nicolas JC, editor. Mycoplasmes et chlamydiae. Collection MediBio. Paris: Elsevier; 2002.
- [2] Bébéar C, Bébéar CM. Infections humaines à mycoplasmes. Rev Fr Lab 2007;391:63–9.
- [3] Waites KB, Talkington D. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 2004;17(4):697–728.
- [4] Gaillat J, Flahault A, de Barbeyrac B, Orfila J, Portier H, Ducroix JP, et al. Community epidemiology of *Chlamydia* and *Mycoplasma pneumoniae* in LRTI in France over 29 months. Eur J Epidemiol 2005;20(7):643–51.
- [5] Klement E, Talkington DF, Wasserzug O, Kayouf R, Davidovitch N, Dumke R, et al. Identification of risk factors for infection in an outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract disease. Clin Infect Dis 2006;43(10):1239–45.
- [6] Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Hatfield J, Iglehart J, Rogers BB, et al. *Mycoplasma pneumoniae* induces chronic respiratory infection, airway hyperreactivity, and pulmonary inflammation: a murine model of infection-associated chronic reactive airway disease. Infect Immun 2002;70(2):649–54.
- [7] Hardy RD, Jafri HS, Olsen K, Wordemann M, Hatfield J, Rogers BB, et al. Elevated cytokine and chemokine levels and prolonged pulmonary airflow resistance in a murine *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia model: a microbiologic, histologic, immunologic, and respiratory plethysmographic profile. Infect Immun 2001;69(6):3869–76.
- [8] Martin RJ, Chu HW, Honour JM, Harbeck RJ. Airway inflammation and bronchial hyperresponsiveness after *Mycoplasma pneumoniae* infection in a murine model. Am J Respir Cell Mol Biol 2001;24(5):577–82.
- [9] Biscardi S, Lorrot M, Marc E, Boutonnat-Faucher B, Heilbronner C, Iniguez J-L, et al. *Mycoplasma pneumoniae* and asthma in children. Clin Infect Dis 2004;38:1341–6.
- [10] Freymuth F, Vabret A, Brouard J, Toutain F, Verdon R, Petitjean J, et al. Detection of viral, *Chlamydia pneumoniae* and *Mycoplasma pneumoniae* infections in exacerbations of asthma in children. J Clin Virol 1999;13(3):131–9.
- [11] Lieberman D, Lieberman D, Printz S, Ben-Yaakov M, Lazarovich Z, Ohana B, et al. Atypical pathogen infection in adults with acute exacerbation of bronchial asthma. Am J Respir Crit Care Med 2003;167:406–10.
- [12] Waites KB, Bébéar CM, Roberston JA, Talkington DF, Kenny GE, editors. Cumitech 34, laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. Washington DC: American Society for Microbiology; 2001.
- [13] de Barbeyrac B, Bernet-Poggi C, Febrer F, Renaudin H, Dupon M, Bébéar C. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium* in clinical samples by polymerase chain reaction. Clin Infect Dis 1993;17(Suppl 1):S83–9.
- [14] Loens K, Ursi D, Goossens H, Ieven M. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. J Clin Microbiol 2003;41(11):4915–23.
- [15] Loens K, Ieven M, Ursi D, Beck T, Overdijk M, Sillekens P, et al. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by real-time nucleic acid sequence-based amplification. J Clin Microbiol 2003;41(9):4448–50.
- [16] Pitcher D, Chalker VJ, Sheppard C, George RC, Harrison TG. Real-time detection of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory samples with an internal processing control. J Med Microbiol 2006;55(Pt 2):149–55.
- [17] Cousin-Allery A, Charron A, de Barbeyrac B, Fremy G, Jensen JS, Renaudin H, et al. Molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* strains by PCR-based methods and pulsed-field gel electrophoresis. Application to French and Danish isolates. Epidemiol Infect 2000;124(1):103–11.
- [18] de Barbeyrac B, Obeniche F, Ratsima E, Labrousche S, Morate C, Renaudin H, et al. Serologic diagnosis of *chlamydial* and *Mycoplasma pneumoniae* infections. Ann Biol Clin (Paris) 2006;64(5):409–19.
- [19] Beersma MF, Dirven K, van Dam AP, Templeton KE, Claas EC, Goossens H. Evaluation of 12 commercial tests and the complement fixation test for *Mycoplasma pneumoniae*-specific immunoglobulin G (IgG) and IgM antibodies, with PCR used as the “gold standard”. J Clin Microbiol 2005;43(5):2277–85.
- [20] Bébéar CM, de Barbeyrac B, Pereyre S, Bébéar C. Mycoplasmes et chlamydiae : sensibilité et résistance aux antibiotiques. Rev Fr Lab 2007;392:77–85.